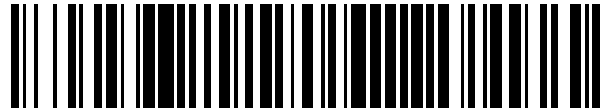


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 427 257**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2005 E 05739951 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.06.2013 EP 1866340**

54 Título: **Fragmento Fc de inmunoglobulina modificado por un polímero no peptídico y composición farmacéutica que contiene el mismo**

30 Prioridad:

08.04.2005 KR 20050029666

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.10.2013

73 Titular/es:

**HANMI SCIENCE CO., LTD. (100.0%)
550 Dongtangiheung-ro, Dongtan-myeon,
Hwaseong-si
Gyeonggi-do 445-813, KR**

72 Inventor/es:

**KIM, YOUNG-MIN;
BAE, SUNG-MIN;
KIM, DAE-JIN;
SONG, DAE-HAE;
LIM, CHANG-KI;
KWON, SE-CHANG y
LEE, GWAN-SUN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 427 257 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 inmunoglobulina modificado por un polímero no peptídico y composición farmacéutica que contiene el mismo.

5

Campo técnico

La presente invención se refiere a un complejo en el que un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico se conjuga a un fármaco a través de un enlazador y una composición farmacéutica que contiene tal complejo.

10

Antecedentes técnicos

En el pasado, un gran número de farmacólogos y químicos hicieron esfuerzos para alterar y/o modificar químicamente la actividad in vivo de moléculas naturales fisiológicamente activas. Estos esfuerzos asociados con sustancias fisiológicamente activas se enfocaron principalmente en aumentar la actividad in vivo específica, prolongar la actividad in vivo, reducir la toxicidad, eliminar o reducir los efectos secundarios, o modificar actividades fisiológicas específicas. Cuando una sustancia fisiológicamente activa se modifica químicamente, pierde algo o la mayor parte de sus actividades fisiológicas en muchos casos. Sin embargo, en algunos casos, la modificación podría producir un aumento o cambio en la actividad fisiológica. A este respecto, muchos estudios se han enfocado en la modificación química capaz de alcanzar la actividad fisiológica deseada, y la mayoría de los estudios han implicado unir covalentemente una sustancia fisiológicamente activa (fármaco) a un vehículo fisiológicamente aceptable.

15

20

Para estabilizar proteínas y prevenir la degradación enzimática y depuración por el riñón, convencionalmente se usó un polímero que tiene alta solubilidad, tal como polietilenglicol (de aquí en adelante denominado simplemente como "PEG") para modificar químicamente la superficie de un fármaco proteínico. Puesto que PEG se une de una manera no específica a una región específica o varias regiones de una proteína diana, tiene los efectos de aumentar la solubilidad de la proteína, estabilizar la proteína y prevenir la hidrólisis de la proteína, y no tiene efectos secundarios específicos (Sada et al., *J. Fermentation Bioengineering* 71: 137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de la capacidad de aumentar la estabilidad de las proteínas, este acoplamiento de PEG tiene problemas de reducir mucho los títulos de las proteínas fisiológicamente activas y reducir el rendimiento debido a la reactividad del PEG con proteínas que disminuye al aumentar el peso molecular del PEG.

25

30

Recientemente, se han sugerido conjugados de polímero-fármaco proteínico. Por ejemplo, como se describe en la patente en EE UU No. 5.738.846, se puede preparar un conjugado mediante unión de un fármaco proteínico idéntico a ambos extremos de PEG para mejorar la actividad del fármaco proteínico. Además, como se describe en la publicación de patente internacional No. WO 92/16221, se pueden unir dos fármacos proteínicos diferentes a ambos extremos de PEG para proporcionar un conjugado que tiene dos actividades diferentes. Sin embargo, estos métodos no son eficaces en el sostenimiento de la actividad de fármacos proteínicos.

35

Kinstler y col, describieron que una proteína de fusión preparada acoplado el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a albúmina humana tiene estabilidad mejorada (Kinstler et al., *Pharmaceutical Research* 12(12): 1883-1888, 1995). Sin embargo, en esta publicación, puesto que el fármaco modificado, que tiene una estructura G-CSF-PEG-albúmina, mostró solo un aumento de aproximadamente cuatro veces en el tiempo de residencia en el cuerpo y un ligero aumento en la vida media en suero comparado con la administración única del G-CSF nativo, no se ha industrializado como una formulación eficaz de acción prolongada para fármacos proteínicos.

40

45

Un método alternativo para mejorar la estabilidad in vivo de proteínas fisiológicamente activas incluye unir un gen de proteína fisiológicamente activa a un gen que codifica una proteína que tiene una alta estabilidad en suero mediante recombinación genética y cultivar una célula animal transfectada con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, se puede preparar una proteína de fusión conjugando albúmina, que se sabe que es la más eficaz en aumentar la estabilidad de proteínas, o su fragmento a una proteína fisiológicamente activa de interés mediante recombinación genética (publicación de patente internacional No. WO 93/15199 y WO 95/15200, 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 bajo el nombre comercial 'Albuferon™', tiene una vida media aumentada desde 5 horas hasta 93 horas en monos, pero es problemática en términos de tener un actividad in vivo muy disminuida menos del 5% comparada con el interferón alfa sin modificar (Osborn et al., *J. Phar. Exp. Ther.* 303(2): 540-548, 2002).

50

55

Se aplicaron tecnologías de ADN recombinante para fusionar un fármaco proteínico a un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, interferón (publicación de patente coreana accesible al 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 un factor de crecimiento unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de una unión peptídica. Además, la patente en EE UU No. 5.116.964 divulga proteínas fusionadas al extremo amino o carboxilo terminal de un fragmento Fc de inmunoglobulina por recombinación genética. La patente en EE UU No.

60

65

5.349.053 divulga una proteína de fusión que comprende IL-2 fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un enlazador peptídico. 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 0/23472), y una proteína de fusión del receptor de IL-5 y un fragmento Fc de inmunoglobulina (patente en EE UU No. 5.712.121), una proteína de fusión de interferón alfa y la región Fc de la inmunoglobulina G4 (patente en EE UU No. 5.723.125), y una proteína de fusión de la proteína CD4 y la región Fc de la inmunoglobulina G2 (patente en EE UU No. 6.451.313).

Sin embargo, estas proteínas de fusión de Fc, en las que se une un polipéptido/proteína al extremo N- o C-terminal de un fragmento Fc a través de enlace peptídico, son problemáticas, como sigue. La producción recombinante de una proteína de fusión de Fc se puede alcanzar solo mediante expresión de una molécula de ácido nucleico que codifica la proteína de fusión de Fc en una única forma de polipéptido/proteína en una única célula huésped. Por tanto, puesto que la proteína de fusión entera está glicosilada o aglicosilada por este sistema, es imposible la fusión entre proteínas glicosiladas y aglicosiladas. Además, estas proteínas de fusión de Fc median funciones efectoras por la región Fc. A través de las funciones efectoras de la región Fc, fijan complementos o se unen a células que expresan FcR, lo que produce la lisis de células específicas, e induce la producción y secreción de varias citoquinas que inducen inflamación, lo que produce inflamación no deseada (Patente en EE UU No. 6.656.728; Zheng et al., *J. Immunology*, 1999, 163:4041-4048; Huang et al., *Immunology letters*, 2002, 81:49-58). Además, la fusión crea una nueva secuencia de aminoácidos, no presente en seres humanos, en una región de unión entre la región Fc y el compañero proteínico, que podría potencialmente inducir respuestas inmunitarias en seres humanos.

Se han hecho muchos esfuerzos para preparar una inmunoglobulina o fragmento de inmunoglobulina que retenga una vida media en suero larga pero que sea deficiente en funciones efectoras. Cole y col., describieron que, cuando los residuos de aminoácidos de la región C_H2 en las posiciones 234, 235 y 237, que se sabe que desempeñan un papel importante en la unión a receptores de Fc, se sustituyen con alanina para producir un derivado de Fc que tiene una afinidad de unión reducida a los receptores de Fc, la actividad ADCC se inhibe (Cole et al., *J. Immunol.* 159: 3613-3621, 1997). Además, la patente en EE UU No. 5.605.690 divulga una proteína de fusión TNFR-Fc de IgG1 que se prepara por recombinación genética usando un fragmento Fc de IgG1 que tiene alteraciones de aminoácidos en la región de unión al complemento o región de unión al receptor de Fc de inmunoglobulina. Sin embargo, no se alcanzó una mejora llamativa por ninguna de estas variantes. Por ejemplo, Fc puede haber aumentado la inmunogenicidad comparada con la región Fc humana nativa debido a la presencia de residuos de aminoácidos inapropiados y puede perder funciones preferibles de Fc.

Por otra parte, se ha introducido la pegilación de inmunoglobulinas que forman complejos antígeno-anticuerpo, por ejemplo, para la administración oral (*J. Immunological Methods*, 1992, 152:177-190) o para prevenir la inducción de la reacción del complemento por agregación (*Biochimica et Biophysica Acta*, 1984, 788:248-255). La patente en EE UU No. 4.732.863 empleó un método de pegilación para reducir la inmunogenicidad de anticuerpos monoclonales y disminuir la unión no específica de los anticuerpos a los receptores de Fc. Sin embargo, tal pegilación se lleva a cabo de una manera de modificación no específica usando PEG que tiene un peso molecular de 1 a 5 kDa para pegilar la inmunoglobulina entera. Por tanto, estos métodos de pegilación son desventajosos en términos de tener dificultad en retener las funciones de Fab y controlar el grado de pegilación.

Además, se describió un método de pegilación selectiva de sitio, que comprende la protección primaria a través de acoplamiento a un ligando, y después pegilación. La patente en EE UU No. 6.548.644 empleó tal método de pegilación para inhibir la inmunogenicidad, aumentar la solubilidad e incrementar la vida media en suero de una proteína de fusión TNFR-Fc. La proteína de fusión se protege usando TNF como un agente protector y después se pegila, pegilando de esta manera solo sitios que no participan en la unión al ligando. Cuando el 20% de los residuos de lisina se pegilaron usando PEG que tenía un peso molecular de 1 a 5 kDa, la unión al receptor de Fc se inhibió. Sin embargo, este método de pegilación tiene inconvenientes como sigue: los sitios de unión a FcRn se pueden pegilar, lo que produce una reducción en la vida media en suero; los pasos de protección y desprotección son muy complicados; y es difícil de obtener un producto pegilado homogéneo.

Como se ha descrito anteriormente, los métodos de modificación con PEG descritos se enfocan en la eliminación de la inmunogenicidad o la inhibición de la unión no específica al receptor de Fc de la inmunoglobulina terapéutica o proteínas de fusión de Fc. Sin embargo, no hay intento de describir la modificación de un fragmento Fc de inmunoglobulina nativo o recombinante por un método de pegilación para su uso como soporte.

El documento WO 2004/081053A divulga un conjugado proteínico que comprende una inmunoglobulina como un soporte covalentemente unido a un polipéptido fisiológicamente activo mediante un enlazador no peptídico. El documento WO 2004/081053A no divulga un fragmento Fc como soporte para un fármaco polipeptídico.

Antes de la presente invención, los presentes inventores determinaron que, cuando un fragmento Fc, que no es la inmunoglobulina entera sino un fragmento peptídico, se une con un fármaco en forma de proteína no fusionada, mejora la duración in vivo de la acción del fármaco y minimiza una reducción en la actividad in vivo del fármaco, y presentaron solicitudes de patente para el uso del fragmento Fc como soporte y aplicación del mismo (solicitudes de patente internacional No. PCT/KR2004/002942, 002943, 002944 y 002945; presentadas el 13 de noviembre, 2004).

Los presentes inventores encontraron que, cuando el fragmento Fc útil como soporte se pegila y usa como un soporte, no tiene sensibilidad aumentada a enzimas proteolíticas, retiene su capacidad de unión a FcRn pero es deficiente en la unión a FcR I, II, III y C1q, y tiene una vida media en suero similar a la del Fc nativo.

5

Divulgación de la invención

Los presentes inventores prepararon un fragmento Fc pegilado en un estado homogéneo, y encontraron que la unión de tal fragmento Fc a un fármaco a través de un enlazador elimina las desventajas del fragmento Fc como soporte, inmunogenicidad e inmunotoxicidad, aumenta la duración y estabilidad in vivo del fármaco conjugado, y minimiza la reducción en la actividad in vivo del fármaco, produciendo de esta manera la presente invención, que describe un fragmento Fc modificado útil como soporte y su uso.

10

Por tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un complejo que comprende un fragmento Fc pegilado que está unido a un fármaco a través de un enlazador.

15

Es otro objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc pegilado que está unido a un fármaco a través de un enlazador.

La presente invención se refiere a métodos de preparación del fragmento Fc modificado y un complejo de tal fragmento y un fármaco.

20

Breve descripción de las figuras

Los anteriores y otros objetos, características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con las figuras acompañantes, en las que:

25

la figura 1 muestra el resultado de SDS-PAGE de INF α -PEG-G1Fc (carril 1), ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-dCysG4Fc (carril 2) y hGH-PEG-dCysG4Fc-20K (carril 3) purificados en condiciones no reducidas y reducidas (M: marcador de tamaño molecular);

30

las figuras 2a y 2b muestran los resultados de HPLC de fase reversa para determinar la pureza de los soportes (figura 2a) y complejos (figura 2b) purificados;

la figura 3 es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacocinético de G-CSF nativo y ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K;

35

la figura 4 es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacocinético de hGH nativa y hGH-PEG-dCysG4Fc-20K;

40

la figura 5 es un gráfico que muestra los efectos in vivo de G-CSF nativo y ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K;

la figura 6 es un gráfico que muestra los efectos in vivo de hGH nativa y hGH-PEG-dCysG4Fc-20K;

la figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación del soporte G1FC nativo, dCysG1Fc, dCysG1Fc pegilado y dCysG4Fc pegilado para la afinidad de unión al complemento C1q; y

45

la figura 8 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación del complejo INF α -PEG-G1Fc, complejo INF α -PEG-G1Fc-20K, complejo INF α -PEG-G1Fc-(20K)₂ y complejo INF α -PEG-G1Fc-40K para la afinidad de unión al complemento C1q.

50

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un complejo de fármaco en el que un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico se conjuga a un fármaco a través de un enlazador.

55

En el complejo el fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico se usa como un soporte de fármaco.

El término "soporte", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia unida a un fármaco. Típicamente, un complejo que comprende un fármaco unido a un soporte disminuye mucho la actividad fisiológica del fármaco. Sin embargo, con respecto a los objetos de la presente invención, se emplea un soporte en la presente invención para minimizar un descenso en la actividad fisiológica de un fármaco de interés, unido al soporte, y reducir la inmunogenicidad de soporte, aumentando de esta manera la estabilidad in vivo del fármaco. Para lograr estos objetos, la presente invención emplea un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico como soporte.

60

65

Se estudiaron un gran número de sustancias, tales como lípidos y polímeros, para determinar su idoneidad como soportes de fármacos. Sin embargo, las técnicas que emplean un fragmento Fc de inmunoglobulina, no como una parte de una proteína de fusión sino como un soporte de fármaco, se desconocen. Antes de la presente invención, los presentes inventores identificaron que un fragmento Fc el mismo, que es un fragmento polipeptídico correspondiente a una parte de una proteína inmunoglobulina, es una sustancia novedosa que tiene una nueva utilidad como un soporte de fármacos, que es diferente de la utilidad conocida de las inmunoglobulinas (por ejemplo, inducción de respuestas inmunitarias por reacciones antígeno-anticuerpo).

Para reducir la inmunogenicidad de un soporte al tiempo que se aumenta la duración in vivo de la acción de un fármaco unido al soporte y se minimiza la reducción de la actividad in vivo del fármaco, la presente invención proporciona particularmente un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico, preferiblemente un fragmento Fc derivado de IgG o IgM modificado por un polímero no peptídico, más preferiblemente un fragmento Fc derivado de IgG modificado por un polímero no peptídico, y en particular preferiblemente un fragmento Fc derivado de IgG2 o IgG4 modificado por un polímero no peptídico.

El término "inmunoglobulina G (de aquí en adelante, usado de forma intercambiable con "IgG")", como se usa en el presente documento, colectivamente significa proteínas que participan en la inmunidad protectora del cuerpo actuando selectivamente contra antígenos. Las inmunoglobulinas están compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las cadenas ligeras y pesadas comprenden regiones variables y constantes. Hay cinco tipos distintos de cadenas pesadas basados en diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: tipos gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) y épsilon (ϵ), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gamma 1 (γ 1), gamma 2 (γ 2), gamma 3 (γ 3), gamma 4 (γ 4), alfa 1 (α 1) y alfa 2 (α 2). Además, hay dos tipos de cadenas ligeras basadas en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: tipos kappa (κ) y lambda (λ) (Coleman et al., *Fundamental Immunology*, 2ª Ed., 1989, 55-73). Según las características de las regiones constantes de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se clasifican en cinco isotipos: IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. IgG se subdivide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Se sabe que las inmunoglobulinas generan varios fragmentos estructuralmente diferentes, que incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, scFv, Fd y Fc. Entre los fragmentos de inmunoglobulinas, 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_H1) de la cadena pesada, y tiene un único sitio de unión a antígeno. El fragmento Fab' se diferencia de los fragmentos Fab en términos de tener la región bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C (extremo carboxilo) del dominio C_H1 de la cadena pesada. Los fragmentos F(ab')₂ se producen como un par de los fragmentos Fab' mediante puentes disulfuro formados entre residuos de cisteína de las regiones bisagra de los fragmentos Fab'. Fv es el fragmento mínimo de anticuerpo que contiene solo la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Los fragmentos scFv (Fv de cadena única) comprenden la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera que están unidas entre sí por un enlazador peptídico y por tanto están presentes en una única cadena polipeptídica. Además, los fragmentos Fd comprenden solo la región variable y el dominio C_H1 de la cadena pesada.

El término "fragmento Fc", como se usa en el presente documento, se produce cuando una molécula de inmunoglobulina (Ig) se digiere con papaína, y es una región de una molécula de inmunoglobulina excepto para la región variable (V_L) y las regiones constantes (C_L) de la cadena ligera y la región variable (V_H) y la región constante 1 (C_H1) de la cadena pesada. Un fragmento Fc es adecuado para su uso como un soporte de fármacos porque se biodegrada in vivo. Además, un fragmento Fc es beneficioso en términos de preparación, purificación y rendimiento de un complejo con el fragmento Fc porque tiene un pequeño peso molecular relativo a las moléculas de inmunoglobulinas completas. Además, puesto que la región Fab, que muestra alta no homogeneidad debido a la diferencia en la secuencia de aminoácidos entre anticuerpos, se elimina, el fragmento Fc tiene homogeneidad de sustancia altamente aumentada y un bajo potencial para inducir antigenicidad en suero. El fragmento Fc puede además incluir la región bisagra en la región constante de la cadena pesada. Además, el fragmento Fc puede ser sustancialmente idéntico a una forma nativa, o puede ser un fragmento Fc extendido que contiene una parte o el total de la región constante 1 de la cadena pesada (C_H1) y/o región constante 1 de la cadena ligera (C_L1) siempre que tenga un efecto mejorado. Además, el fragmento Fc puede ser un fragmento que tenga una delección en una parte relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C_H2 y/o C_H3. Un fragmento Fc preferido es un fragmento Fc derivado de IgG o de IgM. Un fragmento Fc derivado de IgG es más preferido, y fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4 son particularmente preferidos.

El fragmento Fc modificado según la presente invención puede ser una combinación o un híbrido, en detalle, una combinación o un híbrido de fragmentos Fc derivados de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM. El término "combinación" significa un polipéptido dimérico o multimérico en el que fragmentos Fc de cadena única del mismo origen se unen a un fragmento Fc de cadena única de un origen diferente para formar un dímero o multímero. El término "híbrido" significa un polipéptido en el que dos o más dominios de diferente origen están presentes en un fragmento Fc de cadena única. Por ejemplo, un híbrido puede estar compuesto de uno a cuatro dominios seleccionados entre los dominios C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4 contenidos en Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

El fragmento Fc modificado según la presente invención puede derivar de seres humanos u otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdo, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, y preferiblemente de seres humanos. El fragmento Fc derivado de ser humano es preferible a un fragmento Fc no humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y producir respuestas inmunitarias indeseables tal como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

El fragmento Fc modificado según la presente invención incluye una secuencia nativa de aminoácidos y mutantes (variantes) de secuencia de la misma. Un "mutante de la secuencia de aminoácidos" significa tener una secuencia diferente debido a una delección, una inserción, una sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más residuos de aminoácidos de una secuencia nativa de aminoácidos. Los intercambios de aminoácidos en proteínas y péptidos que generalmente no alteran la actividad de las proteínas o péptidos se conocen en el técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Los intercambios que se producen más comúnmente son Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thy/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu y Asp/Gly, en ambas direcciones. Además, el fragmento Fc, si se desea, se puede modificar mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, y similares.

La variante de aminoácidos puede ser un equivalente funcional que tiene actividad biológica idéntica a una proteína nativa, o, si se desea, se puede hacer alterando la propiedad de la forma nativa. Por ejemplo, la variante puede tener estabilidad estructural aumentada contra calor, pH, etc., o alteración de solubilidad aumentada y modificación de la secuencia nativa de aminoácidos de la misma. Por ejemplo, en un Fc de IgG, los residuos 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 una diana adecuada para la modificación. Además, varios otros derivados son posibles, incluyendo uno en que una región capaz de formar un enlace disulfuro se deleciona, o ciertos residuos de aminoácidos se eliminan en el extremo N-terminal de una forma Fc nativa o se añade un residuo de metionina a la misma. Además, para eliminar funciones efectoras, se puede producir una delección en un sitio de unión al complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio ADCC. Las técnicas para preparar tales derivados de secuencia del fragmento Fc de la inmunoglobulina se divulgan en la publicación de patente internacional No. WO97/34631 y WO96/32478 y similares.

El fragmento Fc modificado según la presente invención se puede obtener de formas nativas aisladas de seres humanos u otros animales, o se pueden obtener de células animales o microorganismos transformados por técnicas recombinantes.

El fragmento Fc modificado según la presente invención puede estar en la forma de tener cadenas de azúcares nativos, cadenas de azúcares aumentadas comparado con una forma nativa o cadenas de azúcares disminuidas comparado con la forma nativa, o puede estar en una forma desglicosilada. Un fragmento Fc glicosilado tiene un alto riesgo de inducir respuestas inmunitarias debido a su actividad de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) más fuerte que una forma aglicosilada. Por tanto, con respecto a los presentes objetos, se prefiere un fragmento Fc aglicosilado o desglicosilado.

Como se usa en el presente documento, el término "fragmento Fc desglicosilado" se refiere a un fragmento Fc en el que los grupos de azúcar se eliminan artificialmente, y el término "fragmento Fc aglicosilado" significa un fragmento Fc que se produce en una forma sin glicosilar por un procarionte, preferiblemente *E. coli*. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar del fragmento Fc se puede alcanzar por métodos comunes en la técnica, tales como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética usando un microorganismo.

Un fragmento Fc recombinante tiene sensibilidad enzimática aumentada debido a la diferencia en la estructura tridimensional de su forma nativa. Además, una IgG aglicosilada es muy altamente sensible a enzimas proteolíticas (pepsina, quimotripsina) comparada con la IgG nativa (Morrison et al., *J. Immunology*, 1989, 143:2595-2601). Un fragmento Fc recombinante tiene la misma afinidad de unión a FcRn que tiene el Fc nativo producido por tratamiento con papaína, pero el fragmento Fc nativo tiene una vida media en suero de 2 a 3 veces más larga que la del fragmento Fc recombinante (*Eur. J. Immunology*, 1999, 29:2819-2825). En el fragmento Fc modificado según la presente invención, un sitio de corte enzimático se protege por un polímero no peptídico. Esta protección previene que el fragmento Fc sea altamente sensible a hidrolasas y que tenga vida media en suero reducida.

La desglicosilación reduce notablemente la actividad del complemento de un fragmento Fc en aproximadamente dos veces o más pero no elimina por completo la actividad del complemento. Sin embargo, un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico tenía una pérdida completa de actividad del complemento independientemente de la glicosilación (figura 8). Además, se demostró que un complejo del fragmento Fc modificado con un polímero no peptídico y un fármaco actuaba como un fármaco seguro que no tiene funciones efectoras ni inmunogenicidad (figura 7). Como se demuestra a partir de estos resultados, puesto que el presente fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico aumenta la vida media en suero de fármacos al tiempo que mantiene la actividad in vivo de los fármacos, así como que raramente tiene riesgo de inducir respuestas inmunológicas, es muy útil como un soporte para fármacos tales como polipéptidos fisiológicamente activos.

En otro aspecto, la presente invención se refiere a método de modificación de un fragmento Fc.

En un aspecto detallado, el presente método comprende hacer reaccionar un fragmento Fc con un polímero no peptídico a un pH de más de 7,0, preferiblemente de pH 7,5 a pH 9, y más preferiblemente a pH 8,0.

La modificación de un fragmento Fc se alcanza mediante pegilación.

La modificación de un fragmento Fc se realiza de una manera selectiva de sitio. Esto se basa en los siguientes hechos.

(1) Un aumento en la vida media en suero de un fragmento Fc depende de la afinidad de unión del fragmento Fc a FcRn y la sensibilidad del fragmento Fc a enzimas. Esta sensibilidad a enzimas del fragmento Fc depende de las diferentes secuencias de aminoácidos de los sitios de unión a FcRn. Por ejemplo, IgG3 tiene una vida media en suero de 7 días, que es aproximadamente tres veces menos que la vida media en suero de 20 días de IgG1. Esta vida media en suero más corta de IgG3 se correlaciona con afinidad de unión reducida a FcRn tres veces relativa a IgG1 debido a la diferencia de secuencia en un sitio de unión a FcRn entre IgG1 (His435) e IgG3 (Arg435) (Eur. J. Immunology, 1999, 29:2819-2825).

(2) Un sitio de unión requerido para las funciones de anticuerpo de un fragmento Fc, es decir, funciones ADCC y CDC, está situado cerca de la región bisagra del dominio C_{H2} de Fc, y los residuos de aminoácidos incluyendo Pro331, Lys322, Lys320 y Glu318 actúan directamente en la unión a FcR o C1q (JBC, 2001, 276:6591-6604). El sitio de unión para FcRn está situado en un sitio de unión entre los dominios C_{H2} y C_{H3} en la región Fc, y los residuos de aminoácidos incluyendo His310, Ile253, His435 e His433 forman un puente salino con FcRn (International Immunology, 2001, vol. 13, 12:1551-1559).

Puesto que el sitio de unión a FcRn es rico en histidina como se ha descrito anteriormente, la interacción entre Fc y FcRn se produce de una manera dependiente de pH en la que la unión se produce a menos de pH 6,5 y la disociación se produce a más de pH 7,0 (Molecular Cell, 2001, vol. 7: 867-877). Por tanto, la modificación de residuos de His y Lys diferencialmente se produce a diferentes condiciones de pH óptimo en la base de pH 6,5.

Puesto que el sitio de unión para FcR I, II y III tiene una estructura tridimensional diferente del sitio de unión para FcRn, la mayoría de los residuos de Lys en la región Fc están presentes en el sitio de unión para FcR I, II y III, y el sitio de unión para FcRn es rico en His, una región (Lys322 a Lys320) cerca de la región bisagra del dominio C_{H2} se modifica selectivamente a más de pH 7,0, por ejemplo, pH 8,0. De esta manera, se prepara un fragmento Fc modificado, que retiene la capacidad de unión a FcRn pero es deficiente en la unión a FcR I, II y III y C1q.

El fragmento Fc modificado preparado según el método anterior retiene la afinidad de unión a FcRn y tiene la misma vida media en suero que el fragmento Fc nativo pero carece de la capacidad de unirse a FcR I, II y III y C1q.

El fragmento Fc modificado con polímero no peptídico, preparado como se ha descrito anteriormente, sirve como un soporte de fármacos.

Como se usa en el presente documento, el término "polímero no peptídico" que modifica un fragmento Fc se refiere a polietilenglicol (PEG). El término "pegilación" indica un proceso de acoplamiento de polietilenglicol, y con respecto a los presentes objetos, significa unir covalentemente polietilenglicol a un fragmento Fc.

El polímero se une con un fragmento Fc a través un grupo reactivo específico. Los ejemplos de grupos reactivos incluyen un grupo aldehído, un grupo aldehído propiónico, un grupo butilaldehído, un grupo maleimida, un grupo cetona, un grupo vinilsulfona, un grupo tiol, un grupo hidracida, un grupo carbonildimidazol (CDI), un grupo carbonato de nitrofenilo (NPC), un grupo trisilato, un grupo isocianato y derivados de succinimida. Los ejemplos de derivados de succinimida incluyen propionato de succinimidilo (SPA), ácido succinimidilbutanoico (SBA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), succinimidilsuccinamida (SSA), succinato de succinimidilo (SS), carbonato de succinimidilo y N-hidroxisuccinimida (NHS). Preferiblemente, el polímero se acopla selectivamente a un residuo de lisina de un fragmento Fc. Para esto, está disponible polietilenglicol que tiene un grupo reactivo que es un derivado de succinimida, que se ejemplifica por propionato de succinimidilo, ácido succinimidilbutanoico, carboximetilato de succinimidilo, succinimidilsuccinamida, succinato de succinimidilo, carbonato de succinimidilo y N-hidroxisuccinimida. Más preferido es polietilenglicol que tiene un grupo reactivo que es propionato de succinimidilo y N-hidroxisuccinimida. Los residuos de Lys322 a Lys320, localizados cerca de la región bisagra del dominio C_{H2} de Fc, se pegilan selectivamente, creando de esta manera un fragmento Fc pegilado que retiene la afinidad de unión a FcRn pero carece de la unión a FcR I, II y III y C1q.

El fragmento Fc y el polímero no peptídico se conjugan entre sí a una relación molar de más de 1:1, preferiblemente de 1:1 a 10:1, y más preferiblemente de 1:1 a 1:2. Para preparar un fragmento Fc modificado a esta relación, el polímero no peptídico reacciona a una relación molar de más de 1:1. Cuando el fragmento Fc se modifica mediante uno o más polímeros no peptídicos, los polímeros no peptídicos pueden ser iguales o diferentes.

Puesto que la actividad del complemento de un fragmento Fc disminuye con el aumento en peso molecular y el número de polietilenglicol conjugado al fragmento Fc, se debe usar polietilenglicol que tenga un peso molecular adecuado. Preferiblemente, el polietilenglicol tiene un peso molecular de 5 kDa a 50 kDa, y más preferiblemente de 10 kDa a 40 kDa. La actividad del complemento disminuida del fragmento Fc debido al acoplamiento a polietilenglicol se produce independientemente de los subtipos de IgG o la glicosilación.

Como se usa en el presente documento, el término “complejo de fármaco”, usado de forma intercambiable con el término “complejo”, significa una sustancia en la que uno o más fármacos se conjugan con uno o más fragmentos Fc.

Como se usa en el presente documento, el término “fármaco” se refiere a una sustancia que muestra actividad terapéutica y preventiva cuando se administra a seres humanos o animales. El fármaco es un fármaco polipeptídico.

Los términos “fármaco polipeptídico fisiológicamente activo”, “fármaco polipeptídico” y “fármaco proteínico”, como se usan en el presente documento, se usan con los mismos significados, y se caracterizan en que están en una forma fisiológicamente activa que muestra acciones antagonísticas contra varios fenómenos fisiológicos in vivo.

El fármaco polipeptídico tiene una desventaja de que es incapaz de sostener la acción fisiológica durante un largo periodo de tiempo debido a su propiedad de ser fácilmente desnaturalizado o degradado por enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo. Sin embargo, cuando el fármaco polipeptídico se conjuga al fragmento Fc modificado según la presente invención para formar un complejo, el fármaco tiene estabilidad estructural aumentada y una vida media de degradación aumentada. Además, el polipéptido conjugado al fragmento Fc tiene una disminución mucho menor en la actividad fisiológica que otras formulaciones de fármacos polipeptídicos conocidas. Cuando IFN α , G-CSF, hGH y otros fármacos proteínicos se unen al fragmento Fc de la presente invención, muestran un aumento de aproximadamente dos a seis veces en la vida media en suero comparado con sus formas convencionales conjugadas a PEG solo o tanto a PEG como a albúmina.

Una proteína de fusión, conocida antes de la presente invención, que comprende un fragmento Fc y un fármaco polipeptídico que están fusionados por un método de recombinación se obtiene de tal manera que el polipéptido está unido a extremo N o al extremo C del fragmento Fc a través de enlace peptídico, y por tanto se expresa como un único polipéptido a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión. La unión del fragmento Fc y un fármaco proteínico de la presente invención se caracteriza en que no es una fusión por un método de recombinación convencional como se ha descrito anteriormente. Esto produce una disminución intensa en la actividad de la proteína de fusión resultante porque la actividad de una proteína como una sustancia fisiológicamente activa está determinada por la conformación de la proteína. Por tanto, cuando un fármaco polipeptídico se fusiona con Fc por un método de recombinación, no hay efecto con respecto a la biodisponibilidad in vivo incluso cuando la proteína de fusión tiene estabilidad estructural aumentada. Además, puesto que tal proteína de fusión con frecuencia está mal plegada y por tanto se expresa como cuerpos de inclusión, el método de fusión es poco económico en la producción de proteína y rendimiento de aislamiento. Además, cuando la forma activa de un polipéptido está en forma glicosilada, el polipéptido se debe expresar en células eucariotas. En este caso, Fc también está glicosilada, y esta glicosilación puede producir respuestas inmunitarias no adecuadas in vivo. Solo la presente invención hace posible producir un complejo de un polipéptido activo glicosilado y un fragmento Fc aglicosilado, y supera todos los problemas anteriores, incluyendo la mejora en el rendimiento de producción de proteína, porque los dos componentes del conjugado se preparan individualmente y se aíslan mediante los mejores sistemas.

Si se necesita aumentar la vida media en suero, cualquier fármaco se puede usar sin limitación específica como un compañero proteínico del fragmento Fc para formar un complejo en la presente invención. Un polipéptido fisiológicamente activo preferiblemente se une al fragmento Fc. Tales polipéptidos fisiológicamente activos incluyen varios péptidos fisiológicamente activos usados para tratar o prevenir enfermedades humanas, que se ejemplifican mediante hormonas, citoquinas, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligandos o receptores, antígenos de superficie celular y antagonistas de receptores, y derivados y análogos de los mismos.

En detalle, los ejemplos no limitantes de los fármacos incluyen hormona de crecimiento humana, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, péptido liberador de la hormona de crecimiento, interferones y receptores de interferones (por ejemplo, interferón- α , - β y - γ , receptor de interferón soluble en agua de tipo I, etc.), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), péptidos similares a glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), receptores acoplados a proteínas G, interleuquinas (por ejemplo, interleuquina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, etc.) y receptores de interleuquinas (por ejemplo, receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, alfa-galactosidasa-A, agalsidasa alfa y beta, alfa-L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleuquinas y citoquinas (por ejemplo, IL-18bp, proteína de unión a TNF, etc.), factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento

de metástasis, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, 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 colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimuladora ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conjuntivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nerviosos (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de axogénesis 1, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado de glía, netrina, factor inhibidor neurófilo, factor neurotrófico, neurturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento de tipo insulínico, hormona corticosuprarrenal, glucagón, colecistocinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimuladora tiroidea, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFR (P75), TNFR (P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor del factor activador de células B, etc.), antagonistas de receptores (por ejemplo, IL-1-Ra, etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus.

En particular, se prefieren como polipéptidos fisiológicamente activos los que requieren dosificación frecuente tras la administración al cuerpo para terapia o prevención de enfermedades, que incluyen hormona de crecimiento humana, interferones (interferón- α , - β , - γ , etc.), factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina (EPO) y fragmentos de anticuerpos.

El "enlazador" en el complejo media la unión del fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico y el fármaco. Este enlazador es un enlazador no peptídico.

El término "enlazador no peptídico", como se usa en el presente documento, se refiere a todos los grupos de unión que tienen dos o más grupos reactivos excepto para el enlazador peptídico. Se prefiere un polímero no peptídico. Un enlazador polimérico no peptídico usado para unir el fragmento Fc modificado a un fármaco se puede ejemplificar mediante los polímeros no peptídicos mencionados anteriormente. El polímero no peptídico usado como tal enlazador tiene grupos reactivos en ambos extremos, que individualmente se unen a grupos reactivos de un polipéptido, por ejemplo, un extremo amino, un residuo de lisina, un residuo de histidina o un residuo de cisteína. Los grupos reactivos del polímero incluyen un grupo aldehído, un grupo aldehído propiónico, un grupo butilaldehído, un grupo maleimida, un grupo cetona, un grupo vinilsulfona, un grupo tiol, un grupo hidracida, un grupo carbonildimidazol (CDI), un grupo carbonato de nitrofenilo (NPC), un grupo trisilato, un grupo isocianato y derivados de succinimida. Los ejemplos de derivados de succinimida incluyen propionato de succinimidilo (SPA), ácido succinimidilbutanoico (SBA), carboximetilato de succinimidilo (SCM), succinimidilsuccinamida (SSA), succinato de succinimidilo (SS), carbonato de succinimidilo y N-hidroxisuccinimida (NHS). Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede tener un grupo maleimida en un extremo y un grupo aldehído en el otro extremo.

Los aglutinantes químicos de bajo peso molecular, tales como carbodiimida o glutaraldehído, tienen los siguientes problemas: se unen simultáneamente a varios sitios en una proteína, lo que produce la desnaturalización de la proteína, y se unen de forma no específica, haciendo difícil de esta manera controlar los sitios de unión o purificar una proteína unida. En contraste, el polímero no peptídico usado en la presente invención tiene ventajas de facilitar el control de los sitios de unión, minimizar las reacciones no específicas y facilitar la purificación de la proteína.

El número de moléculas de fármaco y enlazador, que se pueden unir al presente fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico, no está particularmente limitado. Preferiblemente, en el complejo del fármaco de la presente invención, el fármaco y el fragmento Fc modificado se pueden conjugar entre sí en una relación molar de 1:1 a 10:1, y preferiblemente de 1:1 a 2:1.

La unión del fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico, un cierto enlazador y un cierto fármaco incluye todos los enlaces covalentes excepto para un enlace peptídico formado cuando el fragmento Fc y un fármaco polipeptídico se expresan como una proteína de fusión por recombinación genética, y todos los tipos de enlaces no covalentes tales como enlaces de hidrógeno, interacciones iónicas, fuerzas de van der Waals e interacciones hidrofóbicas. Sin embargo, con respecto a la actividad fisiológica del fármaco, la unión se hace preferiblemente mediante enlaces covalentes.

El complejo del fármaco puede incluir una o más copias de una estructura unidad de "fármaco-enlazador-fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico", que se unen preferiblemente de forma lineal por enlaces covalentes. Se puede formar un complejo de fármaco monomérico, dimérico o multimérico a través de un fragmento Fc uniendo uno o más fármacos a un único fragmento Fc, alcanzando de esta manera eficazmente un aumento en la actividad y estabilidad in vivo de fármacos.

En la práctica detallada, cuando un polipéptido fisiológicamente activo se unió a un fragmento Fc pegilado a través de polietilenglicol para formar un complejo, las vida medias en suero de ¹⁷S-G-CSF y hGH aumentaron aproximadamente de cinco a diez veces (figuras 3 y 4), y la actividad in vivo de los polipéptidos aumentó más de cinco veces (figuras 5 y 6). Además, cuando se evaluó un complejo, que comprendía IFN alfa unido a un fragmento Fc glicosilado o un fragmento Fc glicosilado modificado por PEG como soporte, para la afinidad de unión a C1q, un complejo de un Fc glicosilado e IFN α (IFN α -PEG-G1Fc) mantuvo una alta afinidad por C1q, mientras que todos los complejos de interferón con un Fc glicosilado modificado por PEG que tenía un peso molecular de 20 kDa a 40 kDa perdieron completamente la afinidad por C1q (figura 7).

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende un complejo de fármaco en el que un fragmento Fc modificado por PEG se une a un fármaco polipeptídico a través de un enlazador no peptídico, la composición farmacéutica aumenta la duración in vivo de la acción y la estabilidad del fármaco polipeptídico.

La composición farmacéutica se puede administrar a través de varias vías. El término "administración", como se usa en el presente documento, significa la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente por un cierto método adecuado. El complejo de la presente invención se puede administrar a través de cualquiera de las vías comunes, siempre que pueda alcanzar un tejido deseado. Se contemplan una variedad de modos de administración, incluyendo por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente invención no está limitada a estos modos de administración ejemplificados. Sin embargo, puesto que los péptidos se digieren tras la administración oral, los principios activos de una composición para la administración oral se deben recubrir o formular para protección contra la degradación en el estómago. Preferiblemente, la presente composición se puede administrar en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar usando un cierto aparato capaz de transportar los principios activos a una célula diana.

La composición farmacéutica de la presente invención puede incluir un soporte farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el soporte farmacéuticamente aceptable puede incluir aglutinantes, lubricantes, disgregantes, excipientes, solubilizantes, agentes dispersantes, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes colorantes y perfumes. Para las preparaciones inyectables, el soporte farmacéuticamente aceptable puede incluir agentes tamponantes, agentes conservantes, analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos y estabilizantes. Para las preparaciones para la administración tópica, el soporte 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 soportes farmacéuticamente aceptables anteriormente mencionados. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, pastillas, 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 multidosis o una ampolla como una dosis farmacéutica unidosis. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

Los ejemplos de soportes, excipientes y diluyentes adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir además rellenos, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, emulsionantes y antisépticos.

La dosis de la composición farmacéutica de la presente invención que comprende el fragmento Fc modificado por PEG como soporte se puede determinar mediante varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades, vías de administración, la edad del paciente, sexo, peso y gravedad de la enfermedad, así como por los tipos del fármaco como componente activo. Puesto que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una duración muy larga in vivo, tiene la ventaja de reducir mucho la frecuencia de administración de los fármacos. Además, puesto que la presente composición no es inmunogénica in vivo, tiene un bajo riesgo de efectos secundarios, se puede administrar durante un periodo de tiempo largo y es segura.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un método de preparación de un complejo de fármaco en el que un fragmento Fc modificado por un enlazador no peptídico se une a un fármaco a través de un enlazador.

En un aspecto detallado, el método comprende:

- (a) facilitar una reacción entre un enlazador que tiene un grupo reactivo en ambos extremos del mismo, un fármaco y un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico que se van a entrecruzar de forma covalente; y
- (b) aislar un complejo resultante en el que el fármaco y el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico están covalentemente unidos a cada extremo del enlazador.

En el paso (a), la unión covalente de los tres componentes se produce secuencial o simultáneamente. Por ejemplo, cuando el fármaco y el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico se unen a cada extremo del enlazador, cualquiera del fármaco y el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico se une a un extremo del enlazador, y después se une el otro al otro extremo del enlazador. Esta unión secuencial se prefiere para minimizar la producción de subproductos diferentes de un complejo deseado.

En detalle, el paso (a) puede incluir:

- (a1) unir covalentemente un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico o un fármaco a un extremo de un enlazador;
- (a2) aislar un conjugado que comprende el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico o el fármaco unido al enlazador de la mezcla de reacción; y
- (a3) unir covalentemente un fármaco o un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico al otro extremo del enlazador del conjugado aislado para proporcionar un complejo que comprende el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico y el fármaco, que están unidos a cada extremo del enlazador.

En el paso (a1), la relación molar óptima de la reacción del fármaco y el enlazador puede variar desde 1:1,25 hasta 1:5, y la relación molar óptima de reacción del fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico y el enlazador puede variar desde 1:5 hasta 1:10.

Por otra parte, en el paso (a3), la relación molar de reacción del conjugado obtenido en el paso (a2) respecto al polipéptido fisiológicamente activo o el fragmento Fc modificado por el polímero no peptídico puede variar desde 1:0,5 hasta 1:20, y preferiblemente desde 1:1 hasta 1:3.

Si se desea, los pasos (a1) y (a3) se pueden llevar a cabo en presencia de un agente reductor dependiendo del tipo de grupos reactivos en ambos extremos del enlazador que participan en las reacciones en los pasos (a1) y (a3). Los agentes reductores preferidos pueden incluir cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), borohidruro de sodio, borato de dimetilamina y borato de piridina.

Considerando las purezas requeridas en los pasos (a2) y (b) y los pesos moleculares y cargas de los productos, se puede seleccionar un método de aislamiento de proteínas adecuado de los métodos comúnmente usados para el aislamiento de proteínas en la técnica. Por ejemplo, se pueden aplicar una variedad de métodos conocidos incluyendo cromatografía de exclusión molecular y cromatografía de intercambio iónico. Si se desea, se puede usar una combinación de una pluralidad de métodos diferentes para un alto grado de purificación.

Se puede obtener un mejor entendimiento de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se muestran para ilustrar, pero que no se deben interpretar como el límite de la presente invención.

Ejemplo 1: Preparación de soporte y soporte pegilado

<Paso 1> Preparación de soporte nativo (fragmento Fc de inmunoglobulina) usando inmunoglobulina.

Se preparó un fragmento Fc de inmunoglobulina nativo como sigue. Se trataron 200 mg de inmunoglobulina G de 150 kDa (IgG, Green Cross, Corea) disueltos en tampón fosfato 10 mM, con 2 mg de una enzima proteolítica, papaína (Sigma) a 37°C durante 2 horas con agitación suave. Después de la reacción enzimática, el fragmento Fc de inmunoglobulina nativo regenerado de esta manera se sometió a cromatografía para la purificación usando secuencialmente una columna de Superdex, una columna de proteína A y una columna de intercambio catiónico. En detalle, la solución de reacción se cargó en una columna de Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (PBS, pH 7,3), y la columna se eluyó con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Las moléculas de inmunoglobulina sin reaccionar (IgG) y F(ab')_2 , que tenían un peso molecular relativamente alto comparadas con el fragmento Fc de inmunoglobulina nativa, se eliminaron usando su propiedad de ser eluidas antes que el fragmento Fc de Ig nativa. Los fragmentos Fab que tienen un peso molecular similar al fragmento Fc de Ig nativa se eliminaron mediante cromatografía en columna de proteína A. Las fracciones resultantes que contenían el fragmento Fc de Ig nativa eluido de la columna de Superdex 200 se cargaron a una velocidad de flujo de 5 ml/min en una columna de proteína A (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), y la columna se lavó con el mismo tampón para eliminar las proteínas no unidas a la columna. A continuación, la columna de proteína A se eluyó con tampón citrato de sodio 100 mM (pH 3,0) para obtener el fragmento Fc de inmunoglobulina nativa muy puro. Las fracciones de Fc recogidas de la columna de proteína A se purificaron por último usando una columna de intercambio catiónico (poliCAT, PoliLC Company), en donde esta columna cargada con las fracciones Fc se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,4 M en tampón acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando de esta manera fracciones Fc de Ig nativa altamente puras.

<Paso 2> Preparación de soporte recombinante (fragmento Fc de inmunoglobulina)

<Preparación de un vector de expresión derivado de Fc de IgG4>

Para preparar las regiones constantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana IgG4, se preparó un derivado (dCysG4Fc), que tenía una delección de nueve aminoácidos en el extremo amino de la región bisagra nativa.

5 Como vector de expresión que contenía una secuencia secretora de *E. coli*, se usó pT14S1SH-4T20V22Q (patente coreana No. 38061), desarrollado anteriormente a la presente invención por el presente inventor.

Para obtener las regiones constantes de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana IgG4, se llevó a cabo RT-PCR usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde, como sigue. Primero, se aisló ARN total de aproximadamente 6 ml de sangre usando un kit de ARN de sangre Qiamp (Qiagen), y la amplificación génica se realizó usando el ARN total como molde y un kit One-Step RT-PCR (Qiagen). En esta PCR, se usaron un par de cebadores sintetizados representados por SEQ ID NO: 1 y 2 y otro par de cebadores sintetizados representados por SEQ ID NO: 2 y 3. SEQ ID NO: 1 es una secuencia de nucleótidos que empieza desde el 10^o residuo, serina, de 12 residuos de aminoácidos (SEQ ID NO. 9), posteriormente, de la región bisagra de IgG4. SEQ ID NO. 3 se diseñó para tener una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio C_H2 que tiene alanina como primer residuo de aminoácido. SEQ ID NO. 2 se diseñó para tener un sitio de reconocimiento de BamHI que contiene un codón de terminación. SEQ ID NO. 10 indica una secuencia de nucleótidos de una hebra sentido que codifica una secuencia de aminoácidos correspondiente a la región bisagra de IgG4, y SEQ ID NO. 11 indica una secuencia de nucleótidos de una hebra antisentido de la secuencia de nucleótidos anterior.

20

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
gag	tcc	aaa	tat	ggt	ccc	cca	tgc	cca	tca	tgc	cca	(SEQ ID NO. 10)
ctc	agg	ttt	ata	cca	ggg	ggt	acg	ggt	agt	acg	ggt	(SEQ ID NO. 11)
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	(SEQ ID NO. 9)

25 Para clonar cada uno de los fragmentos amplificados de la región constante de IgG4 en un vector de expresión que contenía una variante de secuencia secretora de *E. coli*, se usó pT14S1SH-4T20V22Q (patente coreana No. 38061), desarrollada anteriormente a la presente invención por el presente inventor. Este vector de expresión contiene un derivado de la secuencia secretora de enterotoxina estable al calor que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO. 4. Para facilitar la clonación, se insertó un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Stu*I en un extremo del derivado de la secuencia secretora de enterotoxina estable al calor de *E. coli* del plásmido pT14S1SH-4T20V22Q mediante mutagénesis dirigida usando un par de cebadores representados por SEQ ID NO. 5 y 6 para inducir mutagénesis para introducir el sitio *Stu*I en la secuencia de nucleótidos que codifica el último residuo de aminoácido de la secuencia secretora. Se determinó que esta inserción del sitio *Stu*I tuvo éxito mediante secuenciación de ADN. El plásmido pT14S1SH-4T20V22Q resultante que contenía un sitio *Stu*I se designó "pmSTII". El plásmido pmSTII se trató con *Stu*I 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 secretora de enterotoxina estable al calor de *E. coli*. A continuación, los fragmentos génicos amplificados se digirieron con BamHI y se ligaron con el fragmento del vector de expresión linearizado, proporcionado de esta manera pSTIIIdCG4Fc y pSTIIIG4Mo.

<Preparación de un vector de expresión derivado de Fc de IgG1>

40 Para preparar una región constante de la cadena pesada de la inmunoglobulina humana IgG1, se preparó un derivado (dCysG1Fc), que tenía una delección de doce aminoácidos en el extremo amino de la región bisagra nativa. Se llevó a cabo RT-PCR usando un par de cebadores de SEQ ID NO: 7 y 8 según el mismo método descrito anteriormente.

45 SEQ ID NO. 7 es una secuencia de nucleótidos que empieza desde el 13^{er} residuo, prolina, de 15 residuos de aminoácidos de la región bisagra (Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro). El gen amplificado usando el par de cebadores representados por SEQ ID NO: 7 y 8 se diseñó para que contuviera un extremo amino terminal que empieza con la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra y los dominios C_H2 y C_H3, entre una secuencia génica de Fc de IgG1 entera.

50 Para clonar el gen Fc de IgG1 amplificado en un vector de expresión que contenía una secuencia secretora de *E. coli*, se usó el vector pmSTII anteriormente mencionado. Según un procedimiento de clonación similar al descrito anteriormente, el plásmido pmSTII se trató con *Stu*I y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un fragmento grande (4,7 kb), que contenía la variante de la secuencia secretora de enterotoxina estable al calor de *E. coli*. A continuación, el gen Fc de IgG1 se digirió con BamHI y se ligó con el vector de expresión linearizado, proporcionado de esta manera pSTIIIdCG1Fc.

Los vectores de expresión así construidos se transformaron en una célula huésped de expresión, *E. coli* BL21(DE3), y los transformantes de *E. coli* resultantes se designaron BL21/pSTIIIdCG4Fc (HM10932), BL21/pSTIIIdCG4Mo

(HM10934) y BL21/pSTIIIdCG1Fc (HM10927), que se depositaron en el Centro Coreano de Cultivo de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre, 2004 y se asignaron número de registro KCCM-10597, KCCM-10599 y KCCM-10588. A continuación, cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 80, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteínas. Los cultivos se cultivaron adicionalmente durante 40 a 45 horas hasta que el valor de la DO a 600 nm aumentó de 100 a 120. Las células de *E. coli* recuperadas del líquido de fermentación se rompieron para proporcionar lisados celulares. Los lisados celulares se sometieron a cromatografía en columna de dos pasos para purificar derivados de la región constante de inmunoglobulinas recombinantes presentes en el citosol.

Se equilibraron 5 ml de columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) con PBS, y los lisados celulares se cargaron en la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Las proteínas sin unir se lavaron con PBS, y las proteínas unidas se eluyeron con citrato 100 mM (pH 3,0). Las fracciones recogidas se desalaron usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). A continuación, se llevó a cabo una cromatografía en columna de intercambio aniónico secundaria usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Las fracciones de derivado de Fc de inmunoglobulinas aglicosiladas recombinantes purificadas primarias se cargaron en la columna de Q-Sepharosa HP 26/10, y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,2 M en tampón Tris 10 mM (pH 8,0), proporcionando de esta manera fracciones de derivado de Fc de inmunoglobulina aglicosilada recombinante altamente puras, fracciones dCysG4Fc y dCysG1Fc.

<Paso 3> Preparación de soportes pegilados

Se mezclaron individualmente polietilenglicol propionato de succinimidilo (PEG-SPA, pesos moleculares medios 5.000, 12.000 y 20.000 Da, Shearwater) y polietilenglicol N-hidroxisuccinimidilo (PEG-NHS, peso molecular medio 40.000 Da, Shearwater) con 100 mg de soportes nativo (G1Fc) o recombinante (dCysG4Fc, dCysG1Fc) en 20 ml de tampón Tris-HCl 50 mM (pH 8,0) a una relación molar soporte:PEG de 1:2. La mezcla de reacción se dejó reaccionar a 4°C durante 2 horas, y se purificaron soportes monopegilados y soportes dipegilados como sigue. La mezcla de reacción se cargó en una columna de Q-Sepharosa HP (Pharmacia) equilibrada con tampón Tris-HCl 10 ml (pH 7,5) a una velocidad de flujo de 10 ml/m. Después de lavar suficientemente la columna con el tampón de equilibrar, la columna se eluyó con un gradiente lineal usando NaCl 0,5 M. Se eluyeron secuencialmente con alta pureza soportes monopegilados y soportes dipegilados, purificando de esta manera una total de derivados de soportes en formas nativas (G1Fc monopegilado y G1Fc dipegilado) y formas recombinantes (dCysG1Fc monopegilado y dCysG4Fc monopegilado). G1Fc monopegilado se preparó en dos formas, G1Fc-20K y G1Fc-40K, y G1Fc dipegilado en forma de G1Fc-(20K)₂. dCysG1Fc monopegilado estaba en tres formas dCysG1Fc-5K, dCysG1Fc-12K y dCysG1Fc-20K y dCysG4Fc monopegilado en forma de dCysG4Fc-20K (tabla 1).

TABLA 1

No.	Soporte	Fragmento Fc	Forma PEGilada
1	G1Fc	IgG1 nativa	-
2	G1Fc-20K	IgG1 nativa	Mono PEG de 20 KDa
3	G1Fc-(20K) ₂	IgG1 nativa	Di PEG de 20 KDa
4	G1Fc-40K	IgG1 nativa	Mono PEG de 40 KDa
5	dCysG1Fc	Derivado de IgG1 recombinante	-
6	dCysG1Fc-5K	Derivado de IgG1 recombinante	Mono PEG de 5 KDa
7	dCysG1Fc-12K	Derivado de IgG1 recombinante	Mono PEG de 12 KDa
8	dCysG1Fc-20K	Derivado de IgG1 recombinante	Mono PEG de 20 KDa
9	dCysG4Fc	Derivado de IgG1 recombinante	-
10	dCysG4Fc-20K	Derivado de IgG1 recombinante	Mono PEG de 20 KDa

Ejemplo 2: Preparación de complejos interferón-PEG-soporte

<Paso 1> Preparación de conjugado interferón-PEG

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 α -2b, MW: 20 kDa) disuelto en tampón fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml a una relación molar IFN α :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla, se añadió un agente reductor, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃, Sigma) a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 3 horas con agitación suave para permitir que el PEG se uniera al extremo amino terminal del interferón alfa. Para obtener un conjugado 1:1 de PEG e interferón alfa, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión molecular usando una columna de Superdex® (Pharmacia). El conjugado IFN α -PEG se eluyó de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se eliminaron el interferón sin unir a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos diméricos donde PEG estaba unido a dos moléculas de interferón alfa. El conjugado IFN α -PEG purificado se concentró a 5 mg/ml. Mediante este experimento, se determinó que la relación molar óptima de la reacción para IFN α respecto a PEG, que proporciona la mayor reactividad y genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

<Paso 2> Preparación de complejos IFN α -PEG-Fc

Para unir el conjugado IFN α -PEG purificado en el anterior paso 1 al extremo N de un soporte nativo (o soporte nativo pegilado), el fragmento Fc de inmunoglobulina nativa (G1Fc, aproximadamente 53 kDa) preparado en el ejemplo 1 se disolvió en tampón fosfato 10 mM y se mezcló con el conjugado IFN α -PEG a una relación molar de conjugado IFN α -PEG:Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que la concentración de tampón fosfato de la solución de reacción se ajustara a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 20 horas con agitación suave. Mediante este experimento, se determinó que la relación molar óptima de la reacción para conjugado IFN α -PEG respecto a Fc, que proporciona la mayor reactividad y genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2. Se prepararon complejos IFN α -PEG-soporte según el mismo método descrito anteriormente usando fragmentos Fc de inmunoglobulina nativa (G1Fc-20K, G1Fc-(20K)₂, G1Fc-40K) modificados por mono PEG de 20 kDa, di PEG de 20 kDa y mono PEG de 40 kDa, respectivamente.

<Paso 3> Aislamiento y purificación de los complejos IFN α -PEG-soporte

Después de la reacción del paso anterior 2, para eliminar sustancias sin reaccionar y subproductos y purificar los complejos proteínicos IFN α -PEG-soporte producidos, la mezcla de reacción se cargó en una columna PoliWAX LP (PoliLC) equilibrada con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). La columna se eluyó después con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) que contenía NaCl 1 M, purificando de esta manera el complejo IFN α -PEG-soporte. Las fracciones del complejo IFN α -PEG-soporte se cargaron en una columna PoliCAT LP (PoliLC) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en tampón acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M, purificando de esta manera los complejos IFN α -PEG-G1Fc-20K, IFN α -PEG-G1Fc-(20K)₂ y IFN α -PEG-G1Fc-40K.

Ejemplo 3: Preparación de complejo derivado de factor estimulante de colonias de granulocitos humano (¹⁷S-G-CSF)-PEG-soporte recombinante

Se preparó y purificó un conjugado ¹⁷S-G-CSF-PEG según el mismo método que el paso 1 del ejemplo 2, excepto que se usó un fármaco diferente a interferón alfa, factor estimulante de colonias de granulocitos humano (hG-CSF). El conjugado ¹⁷S-G-CSF-PEG purificado se unió al extremo N del soporte recombinante pegilado (dCysG4Fc-20K) preparado en el ejemplo 1. La reacción de acoplamiento se llevó a cabo según el mismo método que el paso 2 del ejemplo 2. Después de la reacción de acoplamiento, se usaron 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) de modo que se eliminaran las sustancias sin reaccionar y los subproductos y purificar el complejo ¹⁷S-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K producido. La solución de la reacción de acoplamiento se desaló usando una columna de desalado HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0). A continuación, la solución de reacción se cargó en 50 ml de una columna Q HP 26/10 a una velocidad de flujo de 8 ml/min, y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,2 M para obtener fracciones del complejo ¹⁷S-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K altamente purificado.

Ejemplo 4: Preparación de complejo hGH-PEG-soporte recombinante

Se obtuvieron fracciones del complejo hGH-PEG-dCysG4Fc-20K altamente puras según el mismo método que en el ejemplo 3, usando un fármaco diferente de interferón alfa, la hormona de crecimiento humana (hGH, MW: 22 kDa).

Ejemplo experimental 1: Identificación y análisis cuantitativo de los complejos proteínicos**<1-1> identificación de los complejos proteínicos**

Los complejos proteínicos preparados en los ejemplos anteriores se analizaron mediante SDS-PAGE reducido y no reducido usando un gel en gradiente del 4-20% y un gel del 10% y ELISA (R&D System).

<1-2> Análisis cuantitativo de los complejos proteínicos

Los complejos proteínicos preparados en los ejemplos anteriores se cuantificaron por cromatografía de exclusión molecular usando una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) y tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, en donde se comparó un área de pico de cada conjugado proteínico al del un grupo control. Previamente estándares cuantitativamente analizados, IFN α , hGH, ¹⁷S-G-CSF y Fc, se sometieron individualmente a cromatografía de exclusión molecular, y se determinó un factor de conversión entre concentración y pico. Una cantidad predeterminada de cada complejo proteínico se sometió a la misma cromatografía de exclusión molecular. Restando un área de pico correspondiente a un fragmento Fc de inmunoglobulina del área de pico así obtenido, se determinó un valor cuantitativo para una proteína fisiológicamente activa presente en cada complejo proteínico.

Cuando un polipéptido fisiológicamente activo conjugado a Fc se analizó cuantitativamente usando un anticuerpo específico para el polipéptido fisiológicamente activo, se previno que el anticuerpo se uniera al polipéptido, produciendo un valor menor que el valor real calculado por la cromatografía. En el caso del complejo IFN α -PEG-Fc, un ELISA produjo un valor de ELISA correspondiente a aproximadamente el 30% del valor real.

<1-3> Evaluación de la pureza y masa de los complejos proteínicos

Se llevó a cabo HPLC de fase reversa para determinar la pureza de los complejos proteínicos preparados en los ejemplos anteriores, IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-Fc DG (desglicosilado) e IFN α -PEG-derivado de Fc AG (aglicosilado) recombinante. Se usó una columna de fase reversa (columna 259 VHP54, Vydac). La columna se eluyó con un gradiente de acetonitrilo del 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 2, las muestras no contenían interferón o Fc de inmunoglobulina sin unir, y se determinó que todos los complejos proteínicos, IFN α -PEG-G1Fc, ¹⁷S-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K y hGH-PEG-dCysG4Fc-20K, tenían una pureza mayor del 96%.

Para determinar pesos moleculares precisos de los complejos proteínicos purificados, se analizó la masa para cada complejo usando un espectrofotómetro de masas MALDI-TOF de alta rendimiento (Voyager DE-STR, Applied Biosystems). Se usó ácido sinapínico como matriz. Se dispusieron 0,5 μ l de cada muestra de prueba sobre un portaobjetos de muestra y se secaron al aire, se mezclaron de nuevo con igual volumen de una solución de matriz y se secaron al aire, y se introdujeron en una fuente de iones. La detección se llevó a cabo de una manera positiva usando un analizador TOF en modo lineal. Los iones se aceleraron con una fuente de extracción con división operado con extracción retrasada (DE) usando un tiempo de extracción retrasado de 750 ns a 1500 ns a una diferencia de potencial de aceleración total de aproximadamente 2,5 kV.

Los pesos moleculares observados por espectrometría de masas de MALDI-TOF para los complejos proteínicos de Fc preparados en los ejemplos se dan en la tabla 2, a continuación. Como resultado, se determinó que los complejos proteínicos obtenidos tenían una pureza de más del 95% y un peso molecular muy próximo al MW teórico. Además, se determinó que IFN, ¹⁷S-G-CSF y hGH se acoplaban individualmente al fragmento Fc de inmunoglobulina en una relación de 1:1.

TABLA 2

	MW teórico (kDa)	MW medido (kDa)
IFN α -PEG-G1Fc (E.2)	75,4	75,9
IFN α -PEG-G1Fc-20K (E.2)	95,4	95,9
IFN α -PEG-G1Fc-(20K) ₂ (E.2)	115,4	115,9
IFN α -PEG-G1Fc-40K (E.2)	115,4	115,7
hGH-PEG-dCysG4Fc-20K (E.2)	94,9	95,0
¹⁷ S-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K (E.2)	91,5	91,5

Ejemplo experimental 2: Análisis farmacocinético

Las formas nativas de las proteínas fisiológicamente activas (controles) y los complejos proteínicos preparados en los ejemplos 3 y 4 se evaluaron para la estabilidad en suero y parámetros farmacocinéticos en ratas SD (cinco ratas por grupo). Los controles, y el complejo ¹⁷S-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K y el complejo hGH-PEG-dCysG4Fc-20K (grupos de prueba) se inyectaron individualmente por vía subcutánea a una dosis de 100 μ 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 horas en los grupos control, y en los grupos de prueba a las 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 288 horas. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con anticoagulante, heparina, y se centrifugaron durante 5 minutos usando una microcentrífuga de alta velocidad Eppendorf para eliminar células sanguíneas. Los niveles de proteínas en suero se midieron mediante ELISA usando anticuerpos específicos para las proteínas fisiológicamente activas.

Los resultados de los análisis farmacocinéticos se dan en las tablas 3 y 4, a continuación. En las siguientes tablas, T_{max} indica el tiempo que lleva alcanzar la concentración máxima de fármaco en suero, T_{1/2} indica la vida media en suero de un fármaco, y TRM (tiempo de residencia medio) indica el tiempo medio que una molécula de fármaco reside en el cuerpo.

TABLA 3

	G-CSF nativo (Filgrastim)	¹⁷ S-G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K
C _{max} (ng/ml)	87,6	397,3
T _{max} (h)	2	24
T _{1/2} (h)	1,28	10,52
AUC (ngxh/ml)	455	12194
TRM (h)	6,0	25,9

TABLA 4

	NIBSC hGH	hGH-PEG-dCysG4Fc-20K
C_{max} (ng/ml)	30,4	156,7
T_{max} (h)	0,5	12
$T_{1/2}$ (h)	0,8	4,4
AUC (ngxh/ml)	64,4	3033
TRM (h)	1,6	17,3

5 Como se ve de los datos de la tabla 3 para el análisis farmacocinético de G-CSF y su derivado, el complejo ^{17}S -G-CSF-PEG-dCysG4Fc-20K tenían un vida media media en suero de aproximadamente 10 veces más larga que tenía el G-CSF nativo (filgrastim). El efecto creciente del fragmento Fc de inmunoglobulina en el tiempo de circulación sanguínea de proteínas se mantuvo en el derivado de G-CSF en el que algunos residuos de aminoácidos de la región bisagra se eliminan y el dominio C_{H2} se modifica por PEG. Estos resultados indican que la pegilación no
10 afecta al dominio C_{H3} que es un sitio de unión a FcRn, y que el complejo pegilado retiene el efecto de aumentar la vida media en suero de un fármaco.

El efecto aumentador del fragmento Fc en la vida media en suero también se encontró en casos que usan hGH. Como se muestra en la tabla 4, el complejo hGH-PEG-dCysG4Fc-20K tenía una vida media en suero
15 aproximadamente 5 veces más larga y un TRM 10 veces mayor que la hGH nativa.

Ejemplo experimental 3: Ensayo de citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)

20 Para determinar si los derivados preparados en los ejemplos anteriores y las proteínas correspondientes a las regiones constantes de las inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes de *E. coli* y purificadas, se unen a C1q humano, se llevó a cabo un ensayo inmunoanálisis de adsorción (ELISA) como sigue. Como grupos de prueba se usaron las regiones constantes de las inmunoglobulinas producidas por los transformantes HM10932 y HM10927 y los derivados preparados en los ejemplos anteriores. Como estándar, se usó una inmunoglobulina glicosilada (IVIG-globulina S, Green Cross PBM). Las muestras de prueba y estándar se prepararon en tampón carbonato 10 mM (pH 9,6) a una concentración de 1 µg/ml. Las muestras se alicuotearon en una placa de 96 pocillos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pocillo, y la placa se cubrió durante la noche a 4°C. A continuación, cada pocillo se lavó con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na_2HPO_4 10 mM, KH_2PO_4 2 mM, Tween 20 al 0,05%) tres veces, se bloquearon con 250 µl de un tampón de bloqueo (seroalbúmina bovina al 1% en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 hora, y se lavaron de nuevo con el mismo PBS-T tres veces. Las muestras estándar y de prueba se
30 diluyeron en PBS-T a una concentración predeterminada y se añadieron a pocillos recubiertos de anticuerpo, y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 hora y se lavó con PBS-T tres veces. Después de ello, se añadió C1q (R&D Systems) 2 µg/ml a la placa y reaccionó a temperatura ambiente durante 2 horas, y la placa se lavó con PBS-T seis veces. Se añadieron 200 µl de una dilución 1:1000 de un conjugado de anticuerpo anti-C1q humano-peroxidasa (Biogenesis, EE UU) en el tampón de bloqueo a cada pocillo y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 1 hora. Después de cada pocillo se lavara con PBS-T tres veces, se mezclaron volúmenes iguales de reactivos de color A y B (color A: peroxidasa estabilizada) y color B: Cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems), y se añadieron 200 µl de la mezcla a cada pocillo, seguido por incubación durante 30 minutos. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución de terminación de la reacción, ácido sulfúrico 2 M. La placa se leyó usando un lector de microplacas (Molecular Device). Se midió la absorbancia de las muestras estándar y de prueba a 450 nm, y los resultados se dan en las figuras 7 y 8, respectivamente.
40

45 Cuando se evaluó el fragmento Fc de inmunoglobulina para actividad del complemento según su glicosilación y pegilación, la desglicosilación notablemente redujo aproximadamente dos veces la actividad del complemento del fragmento Fc. La pegilación produjo un descenso en la actividad del complemento, y no se encontró diferencia en este descenso entre los subtipos dCysG1Fc y dCysG4Fc. La actividad del complemento disminuyó según aumentaban los pesos moleculares del PEG. Cuando el PEG usado tenía un peso molecular de más de 12 kDa, la actividad del complemento se eliminó por completo (figura 8).

50 Para determinar si el soporte mantiene la propiedad de no tener afinidad de unión a C1q incluso después de ser conjugado a un péptido fisiológicamente activo, se prepararon complejos IFN alfa-Fc usando Fc glicosilado y Fc glicosilado modificado por PEG como soportes para IFN alfa y se evaluó su afinidad de unión a C1q. Un complejo de IFN alfa acoplado a Fc glicosilado (IFN α -PEG-G1Fc) retuvo la alta afinidad de unión a C1q. En contraste, cuando el interferón alfa se acopló a Fc glicosilado modificado por PEG que tenía un peso molecular de 20 kDa a 40 kDa, los complejos de interferón resultantes perdieron todos por completo la afinidad de unión a C1q, demostrando de esta
55 manera que los derivados Fc pegilados son soportes seguros que carecen de funciones efectoras (figura 7).

Aplicabilidad industrial

5 La composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico como soporte, aumenta la vida media en suero de un fármaco conjugado al fragmento Fc, mantiene el tiempo de circulación en sangre del fármaco, y minimiza una reducción en la actividad in vivo del fármaco. Además, la presente composición farmacéutica supera los problemas más significativos de las formulaciones de acción prolongada convencionales, inmunogenicidad y toxicidad del fragmento Fc de inmunoglobulina, y por tanto no tiene riesgo de inducir respuestas inmunitarias. Debido a estas ventajas, la presente composición farmacéutica es útil para el desarrollo de formulaciones de acción prolongada seguras de fármacos proteínicos. Además, las formulaciones de acción prolongada de fármacos proteínicos según la presente invención pueden reducir el dolor del paciente de las inyecciones frecuentes, y mantener las concentraciones en suero de polipéptidos activos durante un periodo de tiempo prolongado, proporcionando establemente de esta manera eficacia farmacéutica.

15 Además, el presente método de preparar un complejo de fármaco usando un fragmento Fc modificado por un polímero no peptídico supera las desventajas de la producción de proteínas de fusión por manipulación genética, incluyendo el difícil establecimiento de sistemas de expresión, diferente glicosilación de la forma nativa, inducción de respuestas inmunitarias y orientación limitada de fusión de proteínas, bajos rendimientos debido a reacciones no específicas, y problemas de acoplamiento químico tales como toxicidad de compuestos químicos usados como aglutinantes, proporcionando de esta manera fácilmente fármacos proteínicos de forma económica con vida media extendida en suero y alta actividad.

20 **Lista de secuencias**

<110> Hanmi Pharmaceutical Co., Ltd.
 25 <120> Fragmento Fc de inmunoglobulina modificado por un polímero no peptídico u composición farmacéutica que comprende el mismo

<160> 11

30 <170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 35
 <212> ADN
 35 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para la amplificación de la región constante de IgG4

40 <400> 1
 cgtcatgccc agcacctgag ttctggggg gacca 35

<210> 2
 <211> 42
 45 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para la amplificación de la región constante de IgG4

50 <400> 2
 ggggatcct catttaccca gagacagga gaggctcttc tg 42

<210> 3
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador para la amplificación de la región constante de IgG4

<400> 3
 cggcacctga gttctgggg ggacatca 29

65 <210> 4

ES 2 427 257 T3

	<211> 69	
	<212> ADN	
	<213> Escherichia coli	
5	<400> 4 atgaaaaaga caatcgatt tcttcttgca tctatgttcg ttttttctat tgctacaaat	60
	gcccaggcg	69
	<210> 5	
	<211> 45	
10	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
	<223> cebador para la mutagénesis dirigida de la secuencia señal de enterotoxina	
15	<400> 5 tctattgcta caaatgccca ggccttccca accattccct tatcc	45
	<210> 6	
20	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador para la mutagénesis dirigida de la secuencia señal de enterotoxina	
	<400> 6 agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tgtaagggga atagg	45
30	<210> 7	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
35	<223> cebador para la amplificación de la región constante de IgG1	
	<400> 7 cgccgtgcc agcacctgaa ctctctggggg gac	33
40	<210> 8	
	<211> 33	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
45	<220>	
	<223> cebador para la amplificación de la región constante de IgG1	
	<400> 8 gggggatcct catttacccg gagacagggga gag	33
50	<210> 9	
	<211> 12	
	<212> PRT	
55	<213> homo sapiens	
	<220>	
	<221> SITIO	
	<222> (1)..(12)	
60	<223> región bisagra de la región constante de IgG4	

ES 2 427 257 T3

<400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro

1 5 10

<210> 10

5 <211> 36

<212> ADN

<213> homo sapiens

<400> 10

10 gagtccaaat atggtcccc atgcccata tgccca

36

<210> 10

<211> 36

<212> ADN

15 <213> homo sapiens

<400> 11

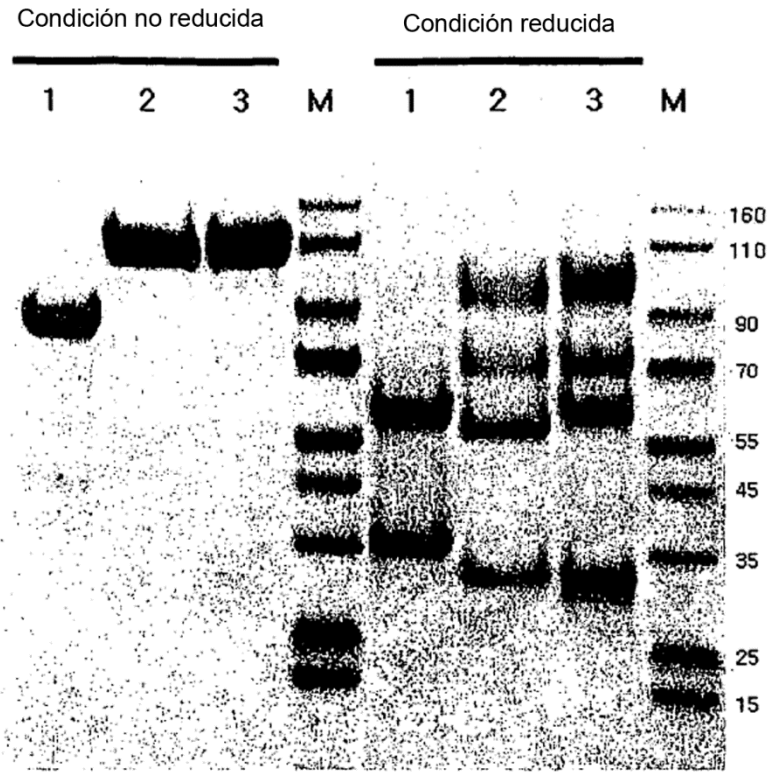
tggcatgat gggcatggg gaccatatt ggactc.

36

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un complejo que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina modificado por PEG, un enlazador no peptídico, y un fármaco polipeptídico, en donde dicho fragmento Fc de inmunoglobulina modificado por PEG está covalentemente unido al fármaco polipeptídico a través del enlazador no peptídico.
2. Un complejo como se expone en la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc es un fragmento Fc derivado de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM o una combinación o híbrido de los mismos.
- 10 3. El complejo como se expone en la reivindicación 2, en donde el fragmento Fc es un fragmento Fc derivado de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o una combinación o híbrido de los mismos.
4. El complejo como se expone en la reivindicación 3, en donde el fragmento Fc es un fragmento Fc de IgG4.
- 15 5. El complejo como se expone en la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc está aglicosilado.
6. El complejo como se expone en la reivindicación 1, en donde el enlazador es un polímero no peptídico.
- 20 7. El complejo como se expone en la reivindicación 6, en donde el polímero no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, co-poli(etilen/propilen)glicol, polioxietileno, poliuretano, polifosfaceno, polisacáridos, dextrano, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidonas, polivinil-etil-éter, poliacrilamida, poliacrilato, policianoacrilatos, polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico, heparina y combinaciones de los mismos.
- 25 8. El complejo como se expone en la reivindicación 1, en donde el fármaco polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en hormonas, citoquinas, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligandos, receptores, antígenos de superficie celular y antagonistas de receptores.
- 30 9. El complejo como se expone en la reivindicación 8, en donde el fármaco polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en hormona de crecimiento humana, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, péptido liberador de la hormona de crecimiento, interferones, receptores de interferones, factores estimulantes de colonias, péptidos similares a glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), receptor acoplado a proteínas G, interleuquinas, receptores de interleuquinas, enzimas, proteínas de unión a interleuquinas, proteínas de unión a citoquinas, factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento de metástasis, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, 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 foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nerviosos, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento de tipo insulínico, hormona corticosuprarrenal, glucagón, colecistocinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimuladora tiroidea, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores, antagonistas de receptores, antígenos de superficie celular, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos.
- 50 10. El complejo como se expone en la reivindicación 9, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en hormona del crecimiento humana, factores estimuladores de colonias, interferón-alfa y eritropoyetina.
- 55 11. Una composición farmacéutica que comprende el complejo de la reivindicación 1 y un soporte farmacéuticamente aceptable.

Fig.1



SDS-PAGE al 10%

Fig.2a

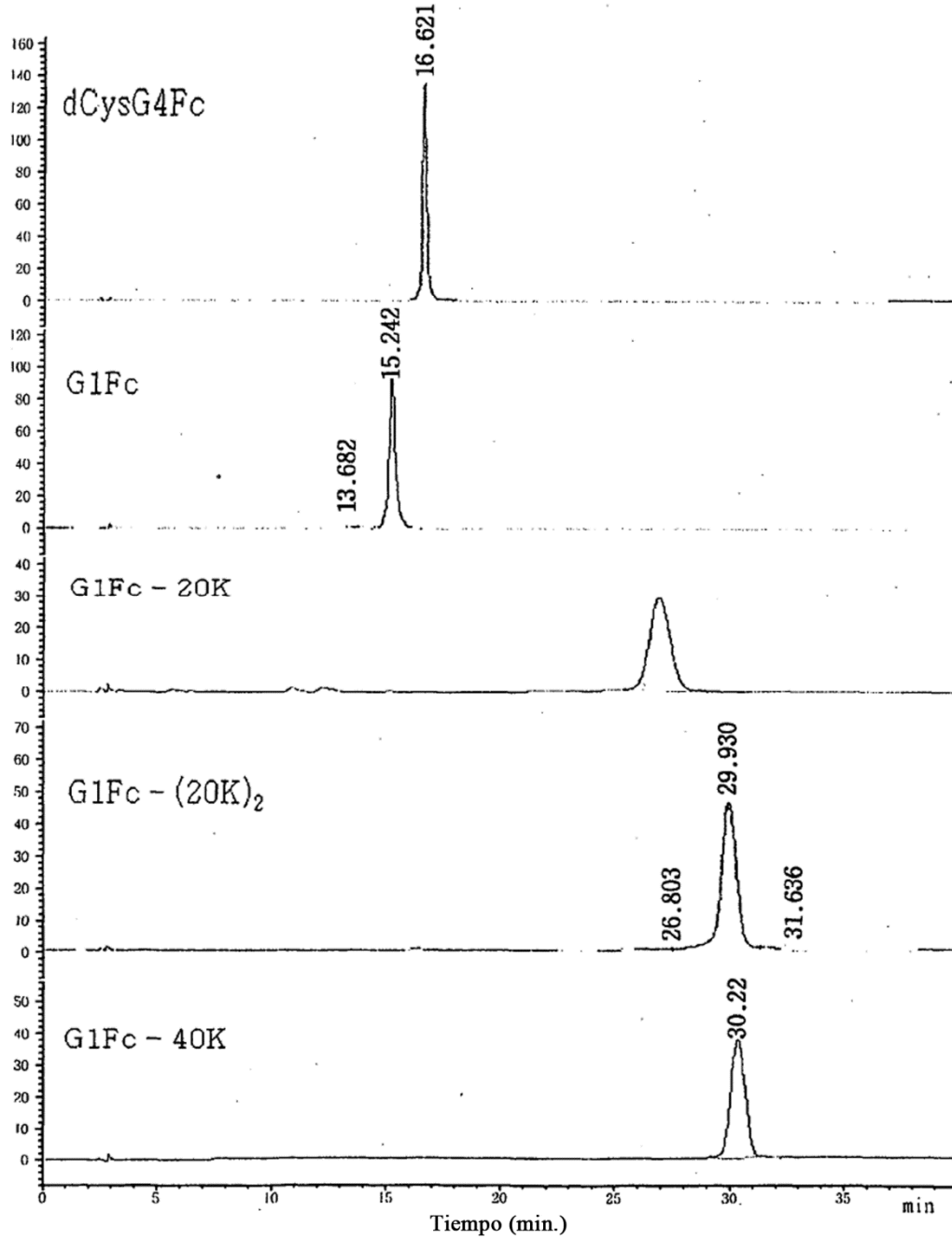


Fig.2b

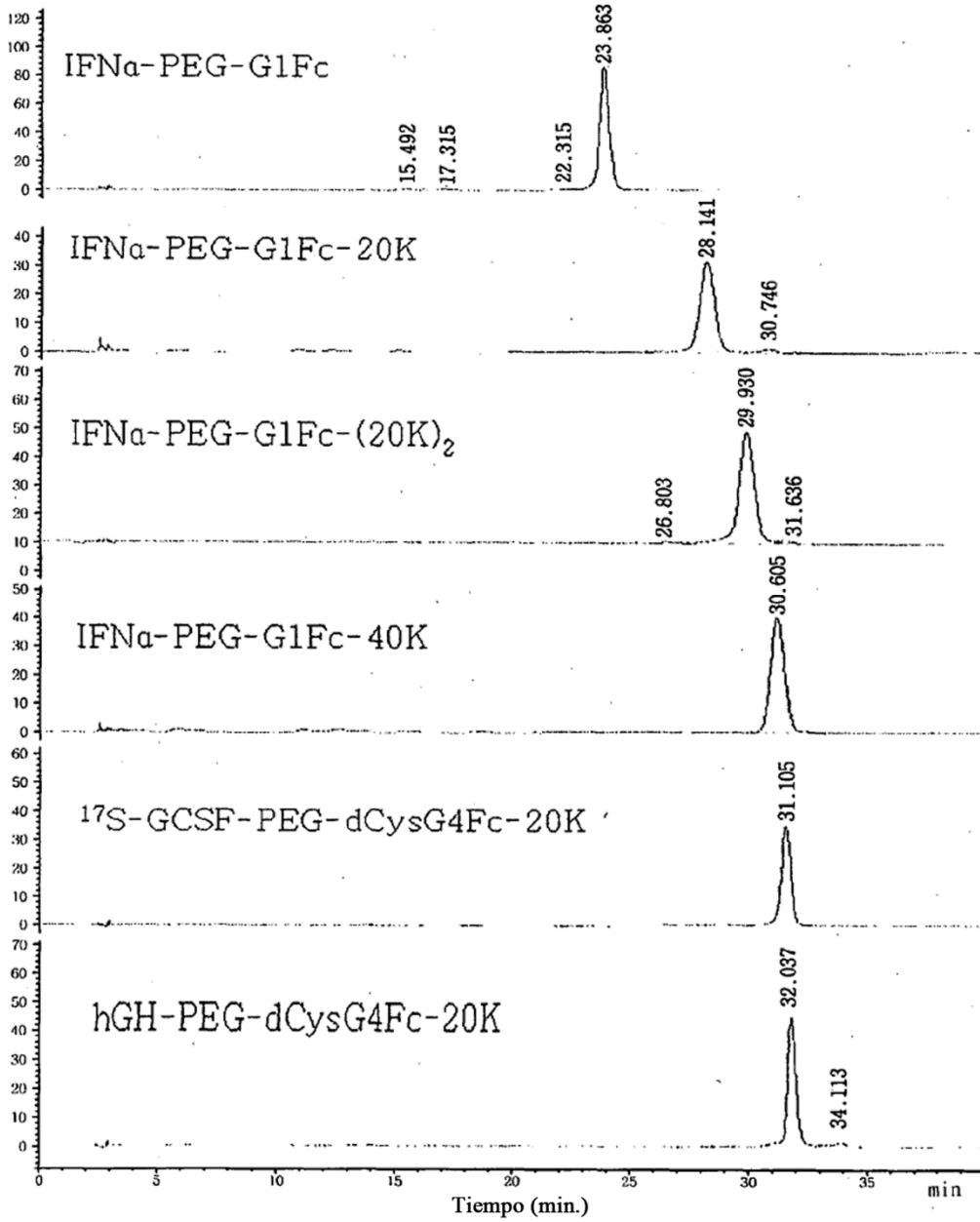


Fig.3

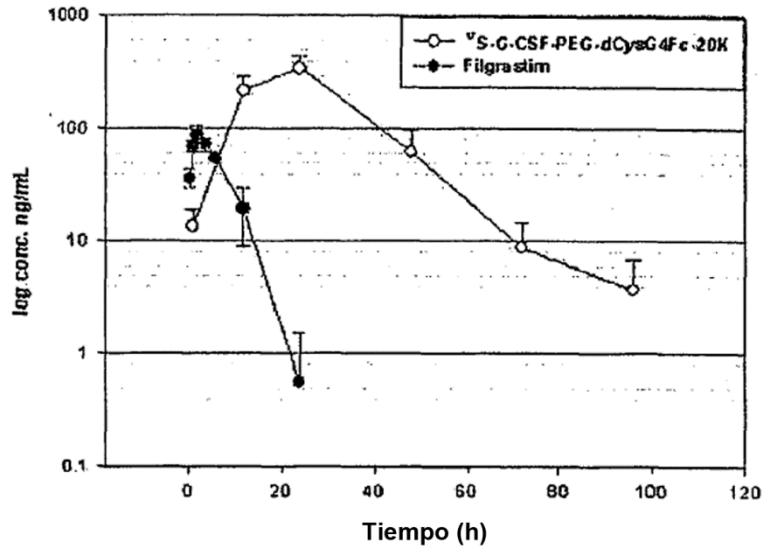


Fig.4

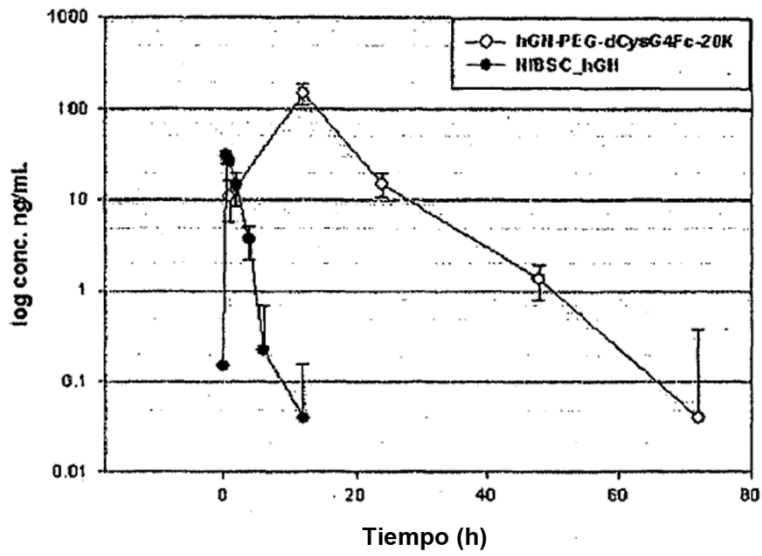


Fig.5

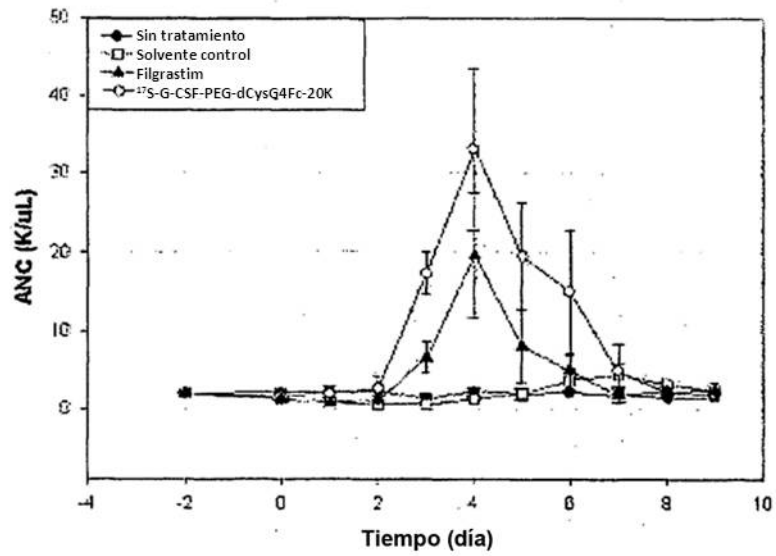


Fig.6

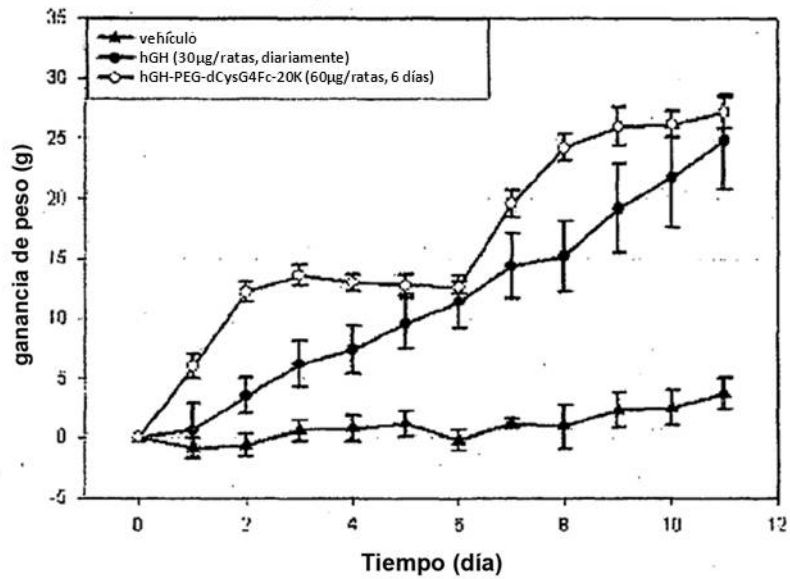


Fig.7

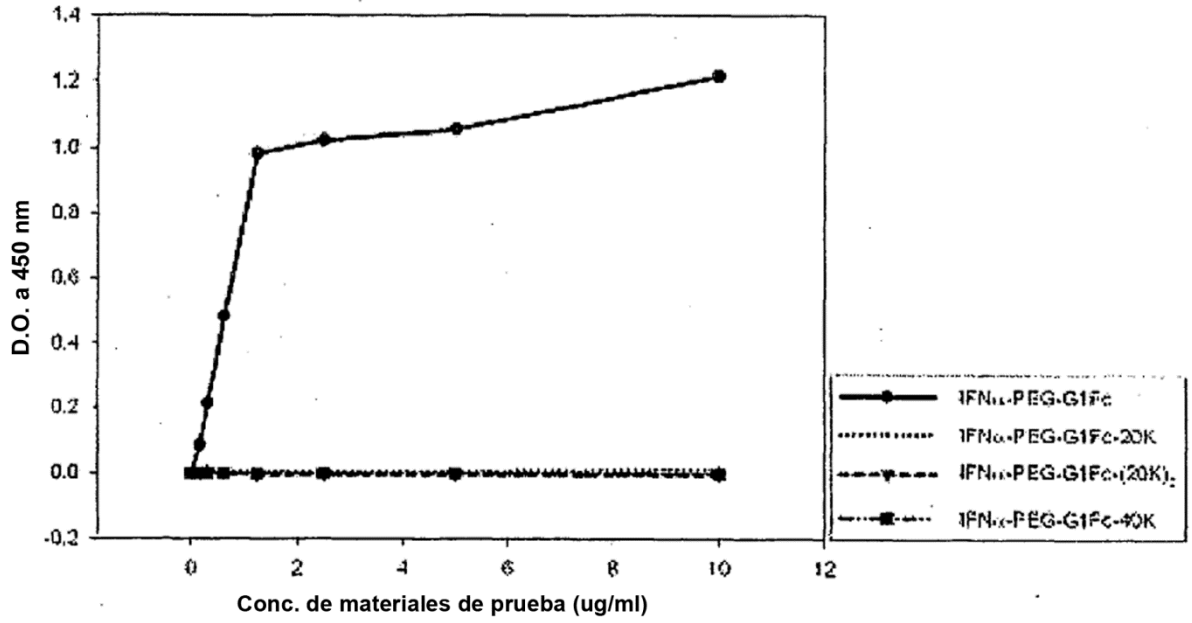


Fig.8

