

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 438 098**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2004 E 10006326 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2239273**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende un Fc de inmunoglobulina como vehículo**

30 Prioridad:

13.11.2003 KR 20030080299

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

15.01.2014

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;
SONG, DAE HAE;
JUNG, SUNG YOUB;
KIM, CHANG HWAN;
CHOI, IN YOUNG;
KWON, SE CHANG y
LEE, GWAN SUN**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 438 098 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

Composición farmacéutica que comprende un Fc de inmunoglobulina como vehículo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un uso novedoso de un fragmento Fc de inmunoglobulina. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo y a un procedimiento para mejorar la duración *in vivo* de la acción de un fármaco unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina.

Técnica antecedente

10 En el pasado, una gran cantidad de farmacólogos y químicos realizaron esfuerzos para alterar y modificar químicamente la actividad *in vivo* de moléculas fisiológicamente activas existentes en la naturaleza. Estos esfuerzos se enfocaron principalmente en el aumento o la prolongación de determinada actividad *in vivo*, la reducción de la toxicidad, la eliminación o reducción de los efectos secundarios o la modificación de actividades fisiológicas específicas de las sustancias fisiológicamente activas. Cuando una sustancia fisiológicamente activa se modifica químicamente, la misma pierde algunas o la mayoría de sus actividades fisiológicas en muchos casos. Sin embargo,
15 en algunos casos, la modificación podría dar como resultado un aumento o un cambio en la actividad fisiológica. A este respecto, muchos estudios se han enfocado en la modificación química capaz de conseguir actividad fisiológica deseada y la mayoría de tales estudios han implicado la unión covalente de una sustancia fisiológicamente activa (fármaco) a un vehículo fisiológicamente aceptable.

20 Por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO 01/93911 emplea un polímero que tiene una pluralidad de restos ácidos como un vehículo de fármaco. La Publicación de Patente Internacional N° WO 03/00778 desvela copolímeros de bloque anfífilos que contienen grupo aniónico que, cuando se usan como un vehículo de fármaco para un fármaco catiónico, mejoran la estabilidad de fármaco. La Patente Europea N° 0 681 481 describe un procedimiento para mejorar las propiedades de fármacos básicos usando ciclodextrina y ácidos como vehículos. Por otra parte, los fármacos hidrófobos tienen estabilidad baja *in vivo* principalmente debido a su solubilidad acuosa baja.
25 Para mejorar la solubilidad acuosa de fármacos hidrófobos, la Publicación de Patente Internacional N° WO 04/064731 emplea un lípido como un vehículo. Sin embargo, hasta la fecha, no existen informes del uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo de fármaco.

30 Típicamente, dado que los polipéptidos se desnaturalizan con relativa facilidad debido a su estabilidad baja, se degradan mediante enzimas proteolíticas en la sangre y se eliminan fácilmente a través del riñón o el hígado, los medicamentos de proteína, que incluyen polipéptidos como componentes farmacéuticamente eficaces, necesitan administrarse frecuentemente a pacientes para mantener las concentraciones y los títulos del nivel en sangre deseados. Sin embargo, esta administración frecuente de medicamentos de proteína, especialmente a través de la inyección provoca dolor a los pacientes. Para resolver estos problemas, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en suero de fármacos de proteína y mantener los fármacos en la sangre a niveles elevados durante un periodo de tiempo prolongado y de esta forma maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos. Las composiciones farmacéuticas con actividad sostenida, por lo tanto, necesitan aumentar la estabilidad de fármacos de proteína y mantener los títulos a niveles suficientemente elevados sin causar respuestas inmunes en los pacientes.

35 Para estabilizar las proteínas y evitar la degradación enzimática y la eliminación por los riñones, se usó convencionalmente un polímero que tiene una solubilidad elevada, tal como polietilenglicol (denominado en lo sucesivo en el presente documento simplemente "PEG"), para modificar químicamente la superficie de un fármaco de proteína. Mediante la unión a regiones específicas o diversas de una proteína diana, PEG estabiliza la proteína y evita la hidrólisis, sin causar efectos secundarios graves (Sada y col., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de su capacidad de potenciar la estabilidad de proteína, este acoplamiento a PEG tiene problemas tales como que reduce enormemente el número de títulos de proteínas fisiológicamente "activas".
45 Además el rendimiento disminuye con el peso molecular creciente de PEG debido a la reactividad reducida con las proteínas.

Recientemente, se han sugerido conjugados de polímero-fármaco de proteína. Por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos N° 5.738.846, un conjugado se puede preparar enlazando un fármaco de proteína idéntico a ambos extremos de PEG para mejorar la actividad del fármaco de proteína. También, como se describe en la Publicación de Patente Internacional N° WO 92/16221, dos fármacos de proteína diferentes se pueden enlazar a ambos extremos de PEG para proporcionar un conjugado que tiene dos actividades diferentes. Sin embargo, los procedimientos anteriores no fueron muy exitosos para mantener la actividad de los fármacos de proteína.

55 Por otra parte, Kinstler y col. informaron que una proteína de fusión preparada acoplado un factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) a albúmina humana mostró estabilidad mejorada (Kinstler y col., Pharmaceutical Research 12 (12): 1883-1888, 1995). Sin embargo, en esta publicación, ya que el fármaco modificado que tiene una estructura de G-CSF-PEG, mostró únicamente un aumento de aproximadamente cuatro veces en el tiempo de residencia en el organismo y un aumento ligero en la semivida en suero en comparación con la administración única

del G-CSF nativo, no se ha industrializado como una formulación de acción prolongada eficaz para fármacos de proteína.

Un procedimiento alternativo para mejorar la estabilidad *in vivo* de proteínas fisiológicamente activas es enlazando un gen de proteína fisiológicamente activa a un gen que codifica una proteína que tiene estabilidad en suero elevada mediante tecnología de recombinación genética y cultivando las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, una proteína de fusión se puede preparar conjugando albúmina, una proteína que se conoce que es la más eficaz para potenciar la estabilidad de proteína, o su fragmento a una proteína fisiológicamente activa de interés mediante recombinación genética (Publicaciones de Patente Internacionales N° WO 93/15199 y WO 93/15200, Publicación de Patente Europea N° 413.622). Una proteína de fusión de interferón-alfa y albúmina, desarrollada por la Compañía de Ciencias del Genoma Humano y comercializada bajo el nombre comercial de 'Albuferon™', aumentó la semivida de 5 horas a 93 horas en monos, pero se conocía que era problemática debido a que reducía la actividad *in vivo* a menos del 5% de interferón alfa no modificado (Osborn y col., J. Phar. Exp. Ther. 303(2): 540-548, 2002).

Se aplicaron tecnologías de ADN recombinante para fusionar un fármaco de proteína a un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, interferón (Publicación de Patente Coreana abierta a Consulta por el Público N° 2003-9464) y receptor de interleuquina 4, receptor de interleuquina 7 o receptor de eritropoyetina (EPO) (Registro de Patente Coreana N° 249572) se expresaron previamente en mamíferos en una forma fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La Publicación de Patente Internacional N° WO 01/03737 describe una proteína de fusión que comprende una citoquina o un factor del crecimiento unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de enlace peptídico. Además, la Patente de Estados Unidos N° 5.116.964 desvela proteínas fusionadas al extremo amino o carboxilo terminal de un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante recombinación genética. La Patente de Estados Unidos N° 5.349.053 desvela una proteína de fusión que comprende IL-2 fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de enlace peptídico. Otros ejemplos de proteínas de fusión de Fc preparadas mediante recombinación genética incluyen una proteína de fusión de interferón beta o su derivado y un fragmento Fc de inmunoglobulina (Publicación de Patente Internacional N° WO 00/23472) y una proteína de fusión de receptor de IL-5 y un fragmento Fc de inmunoglobulina (Patente de Estados Unidos N° 5.712.121), una proteína de fusión de interferón alfa y el fragmento Fc de inmunoglobulina G4 (Patente de Estados Unidos N° 5.723.125) y una proteína de fusión de proteína CD4 y el fragmento Fc de inmunoglobulina G2 (Patente de Estados Unidos N° 6.451.313).

Las técnicas que implican la modificación de restos de aminoácido de un fragmento Fc de inmunoglobulina también se conocen. Por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 5.605.690 desvela una proteína de fusión de TNFR-IgG1 Fc, que se prepara mediante recombinación genética usando un fragmento Fc de IgG1 que tiene alteraciones de aminoácidos en la región de unión de complemento o la región de unión de receptor. También, otros procedimientos para preparar una proteína de fusión usando un fragmento Fc de inmunoglobulina modificado mediante recombinación genética se desvelan en las Patentes de Estados Unidos N° 6.277.375, 6.410.008 y 6.444.792.

Tales proteínas de fusión de Fc producidas mediante recombinación genética tienen las siguientes desventajas: la fusión de proteína ocurre únicamente en una región específica de un fragmento Fc de inmunoglobulina, que está en un extremo amino o carboxilo terminal; se producen únicamente formas homodiméricas y no formas monoméricas; y una fusión podría tener lugar únicamente entre las proteínas glicosiladas o entre las proteínas aglicosiladas y es imposible preparar una proteína de fusión compuesta de una proteína glicosilada y una proteína aglicosilada. Además, una nueva secuencia de aminoácidos creada mediante la fusión puede desencadenar respuestas inmunes y una región de engarce se puede volver susceptible a degradación proteolítica.

El documento WO 02/066514 A desvela simplemente proteínas de fusión de polipéptidos farmacéuticamente activos y fragmentos Fc, en los que la unión entre los mismos se forma mediante fusión recombinante. El documento WO 02/066514 A es totalmente silente con respecto a un conjugado de no fusión de fragmento Fc de IgG -polipéptido.

El documento US-A-5 045 312 se refiere a un uso terapéutico de un GH fisiológicamente activo conjugado a un ligando, particularmente un ligando de IgG, donde dicho GH se une a dicho ligando mediante un agente de entrecruzamiento que tiene dos grupos reactivos. El documento US-A-5 045 312 simplemente usa IgG como el anticuerpo completo, no como un fragmento de Fc para un ligando para mejorar la actividad de GH, el documento USA-5 045 312 desvela únicamente un conjugado de una IgG y GH enlazados mediante un engarce químico.

El documento WO 01/81415 A2 se refiere a un agente terapéutico que modula las actividades de PTH (paratiroides) y THrP (proteína relacionada con la paratiroides) y desvela un dominio Fc como un vehículo deseable y que se puede usar un engarce no peptídico. Sin embargo, el documento WO 01/81415 A2 desvela únicamente conjugados de PTH-Fc y PTHrP-Fc producidos como una proteína de fusión mediante un procedimiento recombinante, pero no enseña o sugiere un conjugado de PTH-engarce-Fc en el que se usa un engarce no peptídico.

Para resolver estos problemas, los inventores de la presente solicitud condujeron una investigación y llegaron al conocimiento de que, cuando un fármaco se administra en forma como estando enlazado a un fragmento Fc de IgG, el fármaco tiene estabilidad *in vivo* mejorada a la vez que muestra una reducción mínima de la actividad *in vivo*.

Divulgación de la invención

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo, en el que dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está unido covalentemente a un fármaco que es un polipéptido fisiológicamente activo a través de un engarce no peptídico, en el que el enlace entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco no es una fusión mediante recombinación genética y en el que el engarce no peptídico se selecciona entre el grupo que consiste en poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxetilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil éter, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas y ácido hialurónico.

Es otro objeto de la presente invención proporcionar un procedimiento para mejorar la duración *in vivo* de la acción de un fármaco mediante el uso *in vitro* de un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo.

Breve descripción de los dibujos

El objeto anterior y otros objetos, características y ventajas de la presente invención se comprenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los cuales:

La FIGURA 1 muestra los resultados de cromatografía de un fragmento Fc de inmunoglobulina obtenido mediante escisión de una inmunoglobulina con papaína;

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

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

La FIGURA 4 muestra los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño de un conjugado de IFN α -PEG-Fc que se purifica después de una reacción de acoplamiento;

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

Las FIGURAS 6a y 6b muestran los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de SDS-PAGE, respectivamente, de un Fc de inmunoglobulina nativo y un Fc de inmunoglobulina desglicosilado (DG Fc);

La FIGURA 7 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado de IFN α -PEG-Fc y un conjugado de IFN α -PEG-DG Fc;

Las FIGURAS 8a a 8c muestran los resultados de HPLC de fase inversa de conjugados de IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc e IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante;

La FIGURA 9 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de farmacocinética de un IFN α nativo, un complejo de IFN α -40K PEG, un conjugado de IFN α -PEG-albúmina y un conjugado de IFN α -PEG-Fc;

La FIGURA 10 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de farmacocinética de una EPO nativa, una EPO altamente glicosilada, un conjugado de EPO-PEG-Fc y un conjugado de EPO-PEG-AG Fc;

La FIGURA 11 es un gráfico que muestra los resultados de análisis de farmacocinética de conjugados de IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc e IFN α -PEG-AG Fc recombinante;

La FIGURA 12 es un gráfico que muestra la farmacocinética de un Fab', un complejo de Fab'-S-40K PEG, un conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc;

La FIGURA 13 es un gráfico que muestra las actividades *in vivo* de Fab', un complejo de Fab'-S-40K PEG, un conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc;

La FIGURA 14 es un gráfico que muestra los resultados de comparación de subclases de IgG humana para afinidad de unión al complemento de Clq; y

La FIGURA 15 es un gráfico que muestra los resultados de comparación de un Fc glicosilado, un Fc DG desglicosilado enzimáticamente y un conjugado de interferón-PEG-vehículo donde el vehículo es AG Fc producido por *E. coli* para afinidad de unión al complemento de Clq.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo.

El término "vehículo", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia enlazada a un fármaco, que típicamente aumenta, disminuye o elimina la actividad fisiológica del fármaco mediante la unión al fármaco. Sin embargo, con respecto a los objetos de la presente invención un vehículo se emplea en la presente invención para minimizar una reducción en la actividad fisiológica de un fármaco de interés, enlazado al vehículo, a la vez que se potencia la estabilidad *in vivo* del fármaco.

Para conseguir los objetos de la presente invención, la presente invención se caracteriza por el empleo de un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo.

El fragmento Fc de inmunoglobulina es de uso seguro como un vehículo de fármaco debido a que es un polipéptido biodegradable que se metaboliza en el organismo. También, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con la molécula de inmunoglobulina completa, siendo por tanto provechoso en la preparación, purificación y producción de conjugados a partir del mismo. Además, debido a que el fragmento Fc de inmunoglobulina no contiene el fragmento Fab, cuya secuencia de aminoácidos difiere entre subclases de anticuerpo y que por tanto es altamente no homogénea, el mismo puede aumentar enormemente la homogeneidad de sustancias y ser menos antigénico.

La expresión "fragmento Fc de inmunoglobulina", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región constante de cadena pesada 2 (C_{H2}) y la región constante de cadena pesada 3 (C_{H3}) de una inmunoglobulina y no las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}) de la inmunoglobulina. El mismo puede incluir además la región bisagra en la región constante de cadena pesada. También, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede contener una parte de toda la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y/o la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}), con la excepción de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. También, siempre y cuando el mismo tenga una función fisiológica sustancialmente similar a o mejor que la proteína nativa, el fragmento Fc de IgG puede ser un fragmento que tiene una supresión en una parte relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C_{H2} y/o C_{H3}. Es decir, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede comprender 1) un dominio C_{H1}, un dominio C_{H2}, un dominio C_{H3} y un dominio C_{H4}, 2) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H2}, 3) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H3}, 4) un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región bisagra) y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de cadena pesada y la región constante de cadena ligera.

El fragmento Fc de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos nativa y derivados de secuencia (mutantes) de la misma. Un derivado de secuencia de aminoácidos es una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una supresión, una inserción, una sustitución no conservativa o conservativa o combinaciones de las mismas de uno o más restos de aminoácidos. Por ejemplo, en un Fc de IgG, los restos de aminoácidos que se conoce 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 modificación. También, son posibles otros derivados diferentes, incluyendo uno en el cual se suprime una región capaz de formar un enlace disulfuro o determinados restos de aminoácidos se eliminan en el extremo N terminal de una forma nativa de Fc o un resto de metionina se añade al mismo. Además, para eliminar funciones efectoras, se puede producir una supresión en un sitio de unión a 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 inmunoglobulina se desvelan en las Publicaciones de Patente Internacional N° WO 97/34631 y WO 96/32478.

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

Además, el fragmento Fc, si se desea, se puede modificar mediante fosforilación, sulfatación, acilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

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

Además, estos fragmentos Fc se pueden obtener a partir de formas nativas aisladas a partir de seres humanos y otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámster, ratas y cobayas o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos a partir de células animales o microorganismos transformados. En el presente documento, los mismos se pueden obtener a partir de una inmunoglobulina nativa aislando las inmunoglobulinas completas a partir de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa en fragmentos Fab y Fc y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos pF'c y F(ab')₂. Estos fragmentos se pueden someter, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c.

Preferentemente, un fragmento Fc obtenido de humano es un fragmento Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene a partir de un microorganismo.

Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en forma de tener cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar producidas en comparación con la forma nativa o puede estar en una forma desglucosilada. El aumento, la reducción o la eliminación de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina se puede conseguir mediante procedimientos comunes en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética usando un microorganismo. La eliminación de cadenas de azúcar a partir de un fragmento Fc da como resultado la reducción aguda en la afinidad de unión a la parte C1q del primer componente de complemento C1 y una reducción o pérdida de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o

citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), no induciendo de este modo respuestas inmunes innecesarias *in vivo*. Con respecto a esto, un fragmento Fc de inmunoglobulina en una forma desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuado para el objeto de la presente invención como un vehículo de fármaco.

5 Como se usa en el presente documento, el término “desglucosilación” se refiere a que restos de azúcar se eliminan enzimáticamente de un fragmento Fc y el término “aglicosilación” significa que un fragmento Fc se produce en una forma no glicosilada por un procarionta, preferentemente *E. coli*.

10 Por otra parte, el fragmento Fc de inmunoglobulina se puede obtener a partir de seres humanos u otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámster, ratas y cobayas y preferentemente seres humanos. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc que se obtiene a partir de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se prepara mediante combinaciones de las mismas o híbridos de las mismas. Preferentemente, se obtiene a partir de IgG o IgM, que está entre las proteínas más abundantes en sangre humana y más preferentemente a partir de IgG, que se conoce que potencia las semividas de proteínas de unión a ligando.

15 Por otra parte, el término “combinación”, como se usa en el presente documento, significa que los polipéptidos que codifican fragmentos Fc de inmunoglobulina de cadena única del mismo origen se enlazan a un polipéptido de cadena única de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, un dímero o multímero se puede formar a partir de dos o más fragmentos seleccionados entre el grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

20 El término “híbrido” como se usa en el presente documento, significa que las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de origen diferente están presentes en un fragmento Fc de inmunoglobulina de cadena única. En la presente invención, son posibles también diversos tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados entre el grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4 y pueden incluir la región bisagra.

25 Por otra parte, IgG se divide en subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de las mismas. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4 y el más preferido es el fragmento Fc de IgG4 que rara vez tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) (véanse las FIGURAS 14 y 15).

30 Es decir, como el vehículo de fármaco de la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina más preferible es un fragmento Fc no glicosilado obtenido de IgG4 humana. El fragmento Fc obtenido de humano es más preferible que un fragmento Fc obtenido de no humano, el cual puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes indeseables tales como la producción de un nuevo anticuerpo frente al antígeno.

El fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, preparado como se ha descrito anteriormente, actúa como un vehículo de fármaco y forma un conjugado con un fármaco.

El término “conjugado de fármaco” o “conjugado”, como se usa en el presente documento, significa que uno o más fármacos están unidos a uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina.

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

40 Las expresiones “polipéptido fisiológicamente activo”, “proteína fisiológicamente activa”, “polipéptido activo”, “fármaco polipeptídico” y “fármaco de proteína”, como se usan en el presente documento, son intercambiables en sus significados y se caracterizan en que los mismos están en una forma fisiológicamente activa que muestra diversas funciones fisiológicas *in vivo*.

45 El fármaco polipeptídico tiene una desventaja de ser incapaz de mantener la acción fisiológica durante un periodo largo de tiempo debido a su propiedad de desnaturalizarse o degradarse fácilmente por enzimas proteolíticas presentes en el organismo. Sin embargo, cuando el fármaco polipeptídico se conjuga al fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención para formar un conjugado, el fármaco tiene estabilidad estructural y semivida de degradación aumentadas. También, el polipéptido conjugado al fragmento Fc tiene una reducción mucho menor en actividad fisiológica que otras formulaciones de fármaco polipeptídico conocidas. Por lo tanto, en comparación con la biodisponibilidad *in vivo* de fármacos polipeptídicos convencionales, el conjugado del polipéptido y el fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención se caracteriza por tener biodisponibilidad *in vivo* mejorada de forma marcada. Esto también se describe claramente a través de realizaciones de la presente invención. Es decir, cuando se enlazan al fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, 50 $IFN\alpha$, G-CSF, hGH y otros fármacos de proteína presentaron un aumento de aproximadamente dos a seis veces en la biodisponibilidad *in vivo* en comparación con sus formas convencionales conjugadas a PEG en solitario o tanto a PEG como a albúmina (Tablas 8, 9 y 10).

55 Por otra parte, la unión de una proteína y el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención se caracteriza porque no es una fusión mediante un procedimiento de recombinación convencional. Una forma de fusión del fragmento Fc de inmunoglobulina y un polipéptido activo usado como un fármaco mediante un

procedimiento de recombinación se obtienen de una forma tal que el polipéptido se enlaza al extremo N o extremo C del fragmento Fc y, por tanto, se expresa y pliega como un polipéptido único a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica la forma de fusión.

5 Esto produce una reducción marcada en la actividad de la proteína de fusión resultante debido a que la actividad de una proteína como una sustancia fisiológicamente funcional está determinada por la conformación de la proteína. Por tanto, cuando un fármaco polipeptídico se fusiona con Fc mediante un procedimiento de recombinación, no existe un efecto con respecto a la biodisponibilidad *in vivo* incluso cuando la proteína de fusión tiene estabilidad estructural aumentada. También debido a que una proteína de fusión de este tipo con frecuencia tiene un plegamiento defectuoso y por tanto se expresa como cuerpos de inclusión, el procedimiento de fusión es poco
10 rentable para la producción de proteína y rendimiento de aislamiento. Además, cuando la forma activa de un polipéptido está en una forma glicosilada, el polipéptido debería expresarse en células eucariotas. En este caso, Fc también está glicosilado y esta glicosilación puede provocar respuestas inmunes no adecuadas *in vivo*.

15 Es decir, únicamente la presente invención hace posible producir un conjugado de un polipéptido glicosilado activo y un fragmento Fc de inmunoglobulina aglicosilado y supera todos los problemas mencionados anteriormente, incluyendo mejorar el rendimiento de producción de proteína, debido a que los dos componentes del complejo se preparan individualmente y se aíslan mediante los mejores sistemas.

20 Los ejemplos no limitantes de fármacos de proteína capaces de conjugarse con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluyen hormona del crecimiento humana, hormona de liberación de la hormona del crecimiento, péptido de liberación de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferón (por ejemplo, interferón α , β y γ , receptor de interferón de tipo I soluble en agua, etc.), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos (GM-CSF), péptidos similares a glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), receptor acoplado a proteína 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 interleuquina (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, acetil hidrolasa del factor activador de plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleuquina y citoquina (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, linfotóxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor del crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador de 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 del crecimiento derivado de plaquetas, factor del crecimiento epitelial, factor del crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor del crecimiento óseo, proteína estimulante del hueso, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona de liberación de hormona luteinizante, factores de crecimiento nerviosos (por ejemplo, factor del crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de axogénesis
35 1, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico obtenido de la glía, netrina, factor inhibidor de neutrófilo, factor neurotrófico, neutrina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor del crecimiento similar a insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido de liberación de gastrina, factor de liberación de corticotropina, hormona estimulante de tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo, TNFR (P75), TNFR (P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor de factor activador de células B, etc.), antagonistas de receptor (por ejemplo, IL1-Ra etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), antígenos de vacuna de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F (ab') 2 y Fd) y antígenos de vacuna obtenidos de virus. Un fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab', F (ab') 2, Fd o scFv, que es capaz de unirse a un antígeno específico y preferentemente Fab'. Los fragmentos Fab contienen el dominio variable (V_L) y el dominio constante (C_L) de la cadena ligera y el dominio variable (V_H) y el primer dominio constante (C_{H1}) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en términos de adición de varios restos de aminoácidos incluyendo uno o más restos de cisteína desde la región bisagra al extremo carboxilo del dominio C_{H1} . Los fragmentos Fd comprenden únicamente el dominio V_H y C_{H1} y los fragmentos F (ab') 2 se producen como un par de fragmentos Fab' mediante enlace de disulfuro o una reacción química. Los fragmentos scFv (Fv de cadena única) comprenden los dominios V_L y V_H que están unidos entre sí mediante un engarce peptídico y por tanto están presentes en una cadena polipeptídica única.
50

60 En particular, los polipéptidos fisiológicamente activos preferidos son aquellos que requieren dosificación frecuente tras la administración al organismo para terapia o prevención de enfermedades, que incluyen hormona del crecimiento humano, interferones (interferón α , β y γ , etc.), factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina (EPO) y fragmentos de anticuerpo. Además, determinados derivados están incluidos en el alcance de los polipéptidos fisiológicamente activos de la presente invención siempre y cuando los mismos tengan función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idéntica a o mejorada en comparación con las formas nativas de

los polipéptidos fisiológicamente activos. En la presente invención, el fármaco polipeptídico más preferible es interferón alfa.

Además de los fármacos polipeptídicos, otros fármacos también están disponibles en la presente invención. Los ejemplos no limitantes de estos fármacos incluyen antibióticos seleccionados entre los derivados y mezclas de tetraciclina, minociclina, doxiciclina, ofloxacina, levofloxacina, ciprofloxacina, claritromicina, eritromicina, cefaclor, cefotaxima, imipenem, penicilina, gentamicina, estreptomina, vancomicina y similares; agentes anticáncer seleccionados entre derivados y mezclas de metotrexato, carboplatino, taxol, cisplatino, 5-fluorouracilo, doxorubicina, etopósido, paclitaxel, camptotecina, citosina arabinósido y similares; agentes antiinflamatorios seleccionados entre derivados y mezclas de indometacina, ibuprofeno, ketoprofeno, piroxicam, probuprofen, diclofenaco y similares; agentes antivirales seleccionados entre derivados y mezclas de aciclovir y robavina; y agentes antibacterianos seleccionados entre derivados y mezclas de ketoconazol, itroconazol, fluconazol, anfotericina B y griseofulvina.

Por otra parte, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención es capaz de formar un conjugado enlazado a un fármaco a través de un engarce.

Este engarce es un engarce no peptídico y de forma más preferida es un polímero no peptídico.

El término "engarce peptídico", como se usa en el presente documento, significa aminoácidos y preferentemente 1 a 20 aminoácidos, que se enlazan de forma lineal entre sí mediante enlace peptídico y que pueden estar en una forma glicosilada. Con respecto a los objetos de la presente invención, se prefiere una forma aglicosilada. Este engarce peptídico es preferentemente un péptido que tiene una unidad de repetición de Gly y Ser, que es inmunológicamente inactiva para células T.

El término "polímero no peptídico", como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades de repetición enlazadas entre sí mediante un enlace covalente excluyendo el enlace peptídico. El polímero no peptídico incluye poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil éter, polímeros biodegradables tales como PLA (ácido poli(láctico)) y PLGA (ácido poli(láctico-glicólico)), polímeros lipídicos, quitinas y ácido hialurónico. El más preferido es poli(etilenglicol) (PEG).

El conjugado de la presente invención, fragmento Fc de inmunoglobulina-fármaco o fragmento Fc de inmunoglobulina-engarce-fármaco, se prepara a diversas proporciones molares. Es decir, el número del fragmento Fc de inmunoglobulina y/o engarce unido a un fármaco polipeptídico único no está limitado. Sin embargo, preferentemente, en el conjugado de fármaco de la presente invención, el fármaco y el fragmento Fc de inmunoglobulina se conjugan entre sí a una proporción molar de 1:1 a 10:1 y preferentemente 1:1 a 2:1.

Además, el enlace del fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, un engarce determinado y un fármaco determinado incluye todos los enlaces covalentes excepto un enlace peptídico formado cuando el fragmento Fc y un fármaco polipeptídico se expresan como una proteína de fusión mediante recombinación genética. Con respecto a la actividad fisiológica del fármaco, el enlace se realiza mediante enlaces covalentes.

Adicionalmente, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, un engarce determinado y un fármaco determinado se pueden unir entre sí en un sitio determinado del fármaco. Por otra parte, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención y un fármaco polipeptídico se pueden enlazar entre sí en un extremo N o extremo C y preferentemente en un grupo libre y un enlace covalente se forma fácilmente entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco especialmente en un extremo amino terminal, un grupo amino de un resto de lisina, un grupo amino de un resto de histidina o un resto de cisteína libre.

Por otra parte, el enlace del fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, un engarce determinado y un fármaco determinado se puede realizar en una dirección determinada. Es decir, el engarce se puede unir al extremo N, el extremo C o un grupo libre del fragmento Fc de inmunoglobulina y también se puede unir al extremo N, el extremo C o un grupo libre del fármaco de proteína. Cuando el engarce es un engarce peptídico, el enlace puede tener lugar en un sitio de unión determinado.

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

Por otra parte, la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo, se puede administrar a través de una diversidad de vías.

El término "administración", como se usa en el presente documento, significa la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente mediante un procedimiento adecuado determinado. El conjugado de la presente invención se puede administrar a través de cualquiera de las vías comunes, siempre y cuando sea

capaz de alcanzar el tejido deseado. Se contempla una diversidad de modos de administración, incluyendo por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía intradérmica, por vía oral, por vía tópica, por vía intranasal, por vía intrapulmonar y por vía intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración ilustrados. Sin embargo, debido a que los péptidos se digieren tras la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deberían revestirse o formularse para protección frente a la degradación en el estómago. Preferentemente, la presente composición se puede administrar en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar usando un aparato determinado capaz de transportar los principios activos a una célula diana.

La composición farmacéutica que comprende el conjugado de acuerdo con la presente invención puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para administración oral, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir aglutinantes, lubricantes, disgregantes, excipientes, solubilizantes, agentes de dispersión, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes colorantes y perfumes. Para preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agentes de tamponamiento, agentes conservantes, analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos y estabilizantes. Para preparaciones para administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir bases, excipientes, lubricantes y agentes conservantes. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una diversidad de formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes y obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica se puede formular en una forma de dosificación unitaria, tal como un recipiente multidosis o una ampolla como una forma de dosificación de dosis única. La composición farmacéutica también se puede formular en soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

Por otra parte, los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábica, alginato, gelatina, fosfato 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 adicionalmente cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, emulsionantes y antisépticos.

Una dosificación sustancial de un fármaco en combinación con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención como un vehículo se puede determinar mediante varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades que se tienen que tratar, las vías de administración, la edad, género, peso del paciente y gravedad de la enfermedad, así como también mediante los tipos de fármaco como un componente activo. Debido a que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una duración bastante prolongada de acción *in vivo*, la misma tiene la ventaja de reducir enormemente la frecuencia de administración de medicamentos farmacéuticos.

En otro aspecto, otro objeto de la presente invención es proporcionar un procedimiento para mejorar la duración *in vivo* de un fármaco mediante el uso *in vitro* de un fragmento Fc de inmunoglobulina.

En una realización de la presente invención, un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo-PEG-fragmento Fc de inmunoglobulina ejerce una estabilidad mucho más elevada que un complejo de polipéptido-PEG o un conjugado de polipéptido-PEG-albúmina. Los análisis de farmacocinética desvelaron que IFN α tiene una semivida en suero aumentada en aproximadamente 20 veces cuando se une a PEG de 40-kDa (complejo de IFN α -40K PEG) y de aproximadamente 10 veces en un conjugado de IFN α -PEG-albúmina, en comparación con el IFN α nativo. Por el contrario, un conjugado de IFN α -PEG-Fc mostró una semivida aumentada de forma notable en aproximadamente 50 veces (véase la Tabla 3). Además, el mismo resultado se observó en otras proteínas diana, hormona del crecimiento humano (hGH), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y su derivado (17 S-G-CSF) y eritropoyetina (EPO). Los conjugados de proteína de acuerdo con la presente invención, cada uno de los cuales comprende una proteína diana unida a PEG-Fc, presentaron aumentos de aproximadamente 10 veces en el tiempo de residencia medio (TRM) y semivida en suero en comparación con las formas nativas de las proteínas y las formas conjugadas a PEG o PEG-albúmina (véanse, las Tablas 4 a 7).

Además, cuando un complejo de PEG-Fc se une a un grupo -SH cerca del extremo C de un Fab' o al extremo N del Fab', el conjugado de Fab'-PEG-Fc resultante presentaba una semivida en suero 2 a 3 veces más larga que un complejo de 40K PEG-Fab' (véase la FIGURA 12).

Además, cuando los conjugados de proteína se preparan usando Fc de inmunoglobulina desglucosilado (DG Fc), donde se han eliminado los restos de azúcar y derivados de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante (AG Fc), sus semividas en plasma y actividad *in vitro* se mantuvieron similares a los conjugados de proteína preparados usando el Fc nativo (véanse, Tabla 3 y FIGURAS 8 y 11).

Por lo tanto, debido a que los conjugados de proteína de la presente invención tienen semividas y tiempo de residencia medio (TRM) extendidos cuando se aplican a una diversidad de polipéptidos fisiológicamente activos incluyendo hormona del crecimiento humana, interferón, eritropoyetina, factor estimulante de colonias o sus

derivados y derivados de anticuerpo, los mismos son útiles para desarrollar formulaciones de acción prolongada de diversos polipéptidos fisiológicamente activos.

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

5 **Ejemplo 1: Preparación I de conjugado de IFN α -PEG-fragmento Fc de inmunoglobulina**

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

Un fragmento Fc de inmunoglobulina se preparó de la forma siguiente. 200 mg de inmunoglobulina G (IgG) de 150-kDa (Green Cross, Corea) disueltos en tampón de fosfato 10 mM se trataron con 2 mg de enzima proteolítica, papaína (Sigma) a 37 °C durante 2 h con agitación suave. Después de la reacción enzimática, el fragmento Fc de inmunoglobulina regenerado de este modo se sometió a cromatografía para purificación usando de forma secuencial una columna Superdex, una columna de proteína A y una columna de intercambio catiónico. En detalle, la solución de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM (PBS, pH 7,3) y la columna se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. Las moléculas de inmunoglobulina (IgG) y de F(ab')₂ que no reaccionaron, que tenían un peso molecular relativamente elevado en comparación con el fragmento Fc de inmunoglobulina, se eliminaron usando su propiedad de eluirse antes que el fragmento Fc de Ig. Los fragmentos Fab que tienen peso molecular similar al fragmento Fc de Ig se eliminaron mediante cromatografía en columna de proteína A (FIGURA 1). Las fracciones resultantes que contienen el fragmento Fc de Ig eluidas a partir de la columna de Superdex 200 se cargaron a un caudal de 5 ml/min en una columna de proteína A (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0) y la columna se lavó con el mismo tampón para eliminar las proteínas no unidas a la columna. Posteriormente, la columna de proteína A se eluyó con tampón de citrato de sodio 100 mM (pH 3,0) para obtener fragmento Fc de inmunoglobulina altamente puro. Las fracciones Fc recogidas a partir de la columna de proteína A se purificaron finalmente usando una columna de intercambio catiónico (polyCAT, PolyLC Company), en la que esta columna cargada con las fracciones Fc se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0,15-0,4 M en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando de ese modo fracciones Fc altamente puras. Las fracciones Fc altamente puras se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% (carril 2 en la FIGURA 2).

<Etapa 2> Preparación de complejo de IFN α -PEG

Polietilenglicol de 3,4-kDa que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), se mezcló con interferón alfa-2b humano (hIFN α -2b, PM: 20 kDa) disuelto en tampón de fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml a una proporción molar de 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 permitió que reaccionara a 4 °C durante 3 h con agitación suave para permitir que el PEG se uniera al extremo amino terminal de interferón alfa. Para obtener un complejo 1:1 de PEG e interferón alfa, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia). El complejo de IFN α -PEG se eluyó de la columna usando tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución y el interferón alfa no unido a PEG, el PEG que no había reaccionado y los subproductos de dímero donde PEG se unió a dos moléculas de interferón alfa se eliminaron. El complejo de IFN α -PEG purificado se concentró hasta 5 mg/ml. A través de este experimento, la proporción molar de reacción óptima para IFN α a PEG, que proporciona la reactividad más elevada y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se observó que era 1:2,5 a 1:5.

40 <Etapa 3> Preparación de conjugado de IFN α -PEG-Fc

Para unir el complejo de IFN α -PEG purificado en la etapa anterior 2 al extremo N de un fragmento Fc de inmunoglobulina, el fragmento Fc de inmunoglobulina (aproximadamente 53 kDa) preparado en la etapa 1 anterior se disolvió en tampón de fosfato 10 mM y se mezcló con el complejo de IFN α -PEG a una proporción molar de complejo de IFN α -PEG:Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que la concentración de tampón de fosfato de la solución de reacción se ajustó a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. A través de este experimento, la proporción molar de reacción óptima para el complejo de IFN α -PEG a Fc, que proporciona la reactividad más elevada y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se observó que era 1:2.

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

Después de la reacción de la etapa 3 anterior, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño Superdex de forma de eliminar las sustancias que no reaccionaron y los subproductos y purificar el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc producido. Después de que la mezcla de reacción se concentró y se cargó en una columna Superdex, tampón de fosfato 10 mM (pH 7,3) se pasó a través de la columna a un caudal de 2,5 ml/min para eliminar el Fc no unido y las sustancias que no reaccionaron, seguido por elución de columna para recoger las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc. Debido a que las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc contenían una cantidad pequeña de impurezas, Fc sin reaccionar y dímeros de interferón

alfa, se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico para eliminar las impurezas. Las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc se cargaron en una columna PolyCAT LP (PolyLC) 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 de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M. Finalmente, el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc se purificó usando una columna de intercambio aniónico. Las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc se cargaron en una columna PolyWAX LP (PolyLC) equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y la columna se eluyó posteriormente con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) usando NaCl 1 M, aislando de ese modo el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc en una forma altamente pura.

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

10 <Etapa 1> Preparación de complejo de Fc-PEG

Polietilenglicol de 3,4-kDa que tiene un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), se mezcló con el fragmento Fc de inmunoglobulina preparado en la etapa 1 del Ejemplo 1 a proporciones molares de Fc:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20, donde el fragmento Fc de Ig se había disuelto en tampón de fosfato 100 mM en una cantidad de 15 mg/ml. A esta mezcla, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃ (Sigma), a una concentración final de 20 mM y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 3 h con agitación suave. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y Fc, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia). El complejo de Fc-PEG se eluyó de la columna usando tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución y fragmento Fc de inmunoglobulina no unido a PEG, PEG que no reaccionó y subproductos de dímero donde PEG se había unido a dos moléculas de fragmento Fc de inmunoglobulina se eliminaron. El complejo de Fc-PEG purificado se concentró hasta aproximadamente 15 mg/ml. A través de este experimento, la proporción molar de reacción óptima para Fc a PEG, que proporciona la reactividad más elevada y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se observó que era 1:3 a 1:10.

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

Para unir el complejo de Fc-PEG purificado en la etapa anterior 1 al extremo N de IFN α , el complejo de Fc-PEG se mezcló con IFN α disuelto en tampón de fosfato 10 mM a proporciones molares de complejo de Fc-PEG:IFN α de 1:1, 1:1,5, 1:3 y 1:6. Después de que la concentración de tampón de fosfato de la solución de reacción se ajustó a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Después de que la reacción se completara, las sustancias que no reaccionaron y los subproductos se eliminaron de acuerdo con el mismo procedimiento de purificación de la etapa 4 del Ejemplo 1, aislando de este modo el conjugado de proteína de Fc-PEG-IFN α en una forma altamente pura.

Ejemplo 3: Preparación de conjugado de hGH-PEG-Fc

Un conjugado de hGH-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, con la excepción de que se usó fármaco diferente a interferón alfa, hormona del crecimiento humana (hGH, PM: 22 kDa) y una proporción molar de hGH:PEG fue 1:5.

Ejemplo 4: Preparación de conjugado de (G-CSF)-PEG-Fc

Un conjugado de (G-CSF)-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, con la excepción de que se usó fármaco diferente a interferón alfa, factor estimulante de colonias de granulocitos humano (G-CSF), y una proporción molar de G-CSF:PEG fue 1:5.

40 Por otra parte, un conjugado de proteína de ¹⁷S-G-CSF-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente usando un derivado de G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, que tiene una sustitución de serina en el décimo séptimo resto de aminoácido del G-CSF nativo.

Ejemplo 5: Preparación de conjugado de EPO-PEG-Fc

45 Un conjugado de EPO-PEG-Fc se preparó y purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1, con la excepción de que se usó fármaco diferente a interferón alfa, eritropoyetina humana (EPO), y una proporción molar de EPO:PEG fue 1:5.

Ejemplo 6: Preparación de conjugado de proteína usando PEG que tiene grupo reactivo diferente

50 Un conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc se preparó usando PEG que tiene un grupo reactivo succinimidil propionato (SPA) en ambos extremos, de la forma siguiente. Polietilenglicol de 3,4-kDa, SPA-PEG-SPA (Shearwater), se mezcló con 10 mg de interferón alfa disuelto en tampón de fosfato 100 mM a proporciones molares de IFN α :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. Posteriormente se permitió que la mezcla reaccionara a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 h. Para obtener un complejo 1:1 de PEG e interferón alfa (complejo de IFN α -PEG), donde PEG se unió selectivamente al grupo amino de un resto de lisina de interferón alfa, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño Superdex. El complejo de IFN α -PEG se eluyó de la

columna usando tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como un tampón de elución y el interferón alfa no unido a PEG, el PEG que no reaccionó y los subproductos de dímero en los cuales dos moléculas de interferón alfa se habían unido a ambos extremos de PEG se eliminaron. Para unir el complejo de IFN α -PEG al grupo amino de un resto de lisina de Fc de inmunoglobulina, el complejo de IFN α -PEG purificado se concentró hasta aproximadamente 5 mg/ml y se preparó un conjuntado de IFN α -PEG-Fc y se purificó de acuerdo con los mismos procedimientos de las etapas 3 y 4 del Ejemplo 1. A través de este experimento, la proporción molar de reacción óptima para IFN α a PEG, que proporciona la reactividad más elevada y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se observó que era 1:2,5 a 1:5.

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

Ejemplo 7: Preparación de conjugado de proteína usando PEG que tiene peso molecular diferente

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

Ejemplo 8: Preparación de conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc (grupo -SH)

<Etapa 1> Expresión y purificación de Fab'

Un transformante de *E. coli*, BL21/poDLHF (número de acceso: KCCM-10511), que expresa Fab' anti-factor de necrosis tumoral alfa, se cultivó en 100 ml de medio LB durante una noche con agitación y se inoculó en un fermentador de 5 l (Marubishi) y se cultivó a 30 °C y 500 rpm a un caudal de aire de 20 vvm. Para compensar los nutrientes insuficientes para crecimiento bacteriano durante la fermentación, los cultivos de complementaron con glucosa y extractos de levadura de acuerdo con los estados fermentados de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 80-100, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteína. Los cultivos se cultivaron adicionalmente durante 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm aumentó a 120 a 140. El fluido de fermentación obtenido de este modo se centrifugó a 20.000 xg durante 30 min. El sobrenadante se recogió y el sedimento se descartó.

El sobrenadante se sometió a la siguiente cromatografía en columna de tres etapas para purificar Fab' anti-factor de necrosis tumoral alfa. El sobrenadante se cargó en una columna de proteína G HiTrap (5 ml, Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0) y la columna se eluyó con glicina 100 mM (pH 3,0). Las fracciones de Fab' recogidas se cargaron posteriormente en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM (PBS, pH 7,3) y esta columna se eluyó con el mismo tampón. Finalmente, las fracciones del segundo Fab' se cargaron en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC) y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,4 M en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando de este modo fracciones de Fab' anti-factor de necrosis tumoral alfa altamente puras.

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

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

Después de que la reacción se completó, el tampón de reacción se intercambió con tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0) para eliminar el NHS-PEG-MAL no unido. Posteriormente, la mezcla de reacción se cargó en una columna polyCAT (PolyLC). La columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). Durante esta elución, el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG se eluyó antes que el Fc de inmunoglobulina que no había reaccionado y el Fc de Ig que no había reaccionado se eluyó más tarde, eliminando de ese modo las moléculas de Fc de Ig que no habían reaccionado.

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

Para unir el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG a un grupo de cisteína del Fab', el Fab' purificado en la etapa anterior 1 se disolvió en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 7,3) a una concentración de 2 mg/ml y se mezcló con el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG preparado en la etapa anterior 2 a una proporción molar de

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

Después de que la reacción se completó, la mezcla de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) y la columna se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. El conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc acoplado se eluyó relativamente más temprano debido a su alto peso molecular y el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG que no había reaccionado y el Fab' se eluyeron posteriormente, eliminando de ese modo las moléculas que no habían reaccionado. Para eliminar completamente el Fc de inmunoglobulina-PEG que no había reaccionado, las fracciones de conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc recogidas se cargaron nuevamente en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC) y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0), proporcionando de este modo un conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc puro que comprende el complejo de Fc-PEG unido a un grupo -SH cerca del extremo C del Fab'.

Ejemplo 9: Preparación de conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc (extremo N)

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

40 mg del Fab' purificado en la etapa 1 del Ejemplo 8 se disolvieron en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 5 mg/ml y se mezclaron con ALD-PEG-butil ALD (3,4 kDa, Nektar) a una proporción molar de Fab':PEG de 1:5. Se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la mezcla de reacción a una concentración final de 20 mM y se permitió que la mezcla de reacción reaccionara posteriormente a 4 °C durante 2 h con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, el tampón de reacción se intercambiaba con tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). Después, la mezcla de reacción se cargó en una columna polyCAT (PolyLC). La columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,4 M en tampón de acetato 20 mM (pH 4,5). Durante esta elución de columna, el complejo de Fab'-PEG que comprende el engarce de PEG unido al extremo N del Fab' se eluyó más temprano que el Fab' que no había reaccionado y el Fab' que no había reaccionado se eluyó más tarde, eliminando de ese modo las moléculas de Fab' que no habían reaccionado.

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

Para unir el complejo de Fab'-PEG purificado en la etapa anterior 1 al extremo N de un Fc de inmunoglobulina, el complejo de Fab'-PEG se disolvió en tampón de fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 10 mg/ml y se mezcló con el Fc de inmunoglobulina disuelto en el mismo tampón a una proporción molar de complejo de Fab'-PEG:Fc de 1:5. Después de que la mezcla de reacción se concentró hasta una concentración de proteína final de 50 mg/ml, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la mezcla de reacción a una concentración final de 20 mM y la mezcla de reacción se sometió a reacción posteriormente a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

Después de que la reacción se completó, la mezcla de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) y la columna se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. El conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc acoplado se eluyó relativamente más temprano debido a su peso molecular elevado y el Fc de inmunoglobulina y el complejo de Fab'-PEG que no habían reaccionado se eluyeron más tarde, eliminando de ese modo las moléculas que no habían reaccionado. Para eliminar completamente las moléculas de Fc de inmunoglobulina que no había reaccionado, las fracciones de conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc recogidas se cargaron nuevamente en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC) y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0), proporcionando de este modo un conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc puro que comprende el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG unido al extremo N del Fab'.

Ejemplo 10: Preparación y purificación de Fc de inmunoglobulina desglucosilado

200 mg de un Fc de inmunoglobulina preparado de acuerdo con el mismo procedimiento que en el Ejemplo 1 se disolvieron en tampón de fosfato 100 mM (pH 7,5) a una concentración de 2 mg/ml y se mezclaron con 300 U/mg de una desglucosilasa, PNGasa F (NEB). Se permitió que la mezcla de reacción reaccionara a 37 °C durante 24 h con agitación suave. Posteriormente, para purificar el Fc de inmunoglobulina desglucosilado, la mezcla de reacción se cargó en una columna de SP Sepharose FF (Pharmacia) y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,1-0,6 M en tampón de acetato 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M. El Fc de inmunoglobulina nativo se eluyó más temprano y el Fc de inmunoglobulina desglucosilado (DG Fc) se eluyó más tarde.

Ejemplo 11: Preparación de conjugado de IFN α -PEG-DG Fc

Para unir el Fc de inmunoglobulina desglucosilado preparado en el Ejemplo 10 al complejo de IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del Ejemplo 1, el complejo de IFN α -PEG se mezcló con el DG Fc disuelto en tampón de fosfato 10 mM a proporciones molares de complejo de IFN α -PEG:DG Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que la concentración del tampón de fosfato de la solución de reacción se había ajustado a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. A través de este experimento, la proporción molar de reacción óptima para el

complejo de IFN α -PEG a DG Fc, que proporciona la reactividad más elevada y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se observó que era 1:2.

Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia) de forma de eliminar las sustancias que no habían reaccionado y los subproductos y purificar el conjugado de proteína de IFN α -PEG-DG Fc. Después de que la mezcla de reacción se cargó en la columna, un tampón de fosfato (pH 7,3) se pasó a través de la columna a un caudal de 2,5 ml/min para eliminar el DG Fc no unido y las sustancias que no habían reaccionado, seguido por elución de columna para recoger las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-DG Fc. Debido a que las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-DG Fc recogidas contenían una cantidad pequeña de impurezas, DG Fc y complejo de IFN α -PEG que no habían reaccionado, se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico para eliminar las impurezas. Las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-DG Fc se cargaron en una columna PolyCAT LP (PolyLC) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) y la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,6 M en tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M. Finalmente, el conjugado de proteína de IFN α -PEG-DG Fc se purificó usando una columna de intercambio aniónico. Las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc se cargaron en una columna PolyWAX LP (PolyLC) equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y la columna posteriormente se eluyó con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) usando NaCl 1 M, aislando de ese modo el conjugado de proteína de IFN α -PEG-DG Fc en una forma altamente pura.

Ejemplo 12: Preparación y purificación de derivado de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante

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

Para preparar regiones constantes de cadena pesada de IgG4 de inmunoglobulina humana, se prepararon un primer derivado (IgG4 delta-Cys), que tiene una supresión de nueve aminoácidos en el extremo amino de la región bisagra nativa y un segundo derivado (monómero de IgG4), que carece de la región bisagra por una supresión de los doce aminoácidos de la región bisagra. Se usó pT14S1SH-4T20V22Q (Patente Coreana N° 38061), desarrollado anteriormente a la presente invención por la presente invención, como un vector de expresión que contiene secuencia secretora de *E. coli*.

Para obtener regiones constantes de cadena pesada de IgG4 de inmunoglobulina humana, se llevó a cabo RT-PCR usando ARN aislado a partir de células sanguíneas humanas como un molde, de la forma siguiente. En primer lugar, ARN total se aisló a partir de aproximadamente 6 ml de sangre usando un kit Qiamp RNA blood (Qiagen) y se llevó a cabo amplificación génica usando el ARN total como un molde y un kit One-Step RT-PCR (Qiagen). En esta PCR, se usó un par de cebadores sintetizados representados por SEC ID N°: 1 y 2 y otro par de cebadores sintetizados representados por SEC ID N° 2 y 3. SEC ID N°: 1 es una secuencia de nucleótidos que comienza en el 10° resto, serina, de 12 restos de aminoácidos, más adelante, de la región bisagra de IgG4. SEC ID N°: 3 se diseñó para tener una secuencia de nucleótidos que codifica un dominio C_H2 que tiene alanina como un primer resto de aminoácido. SEC ID N°: 2 se diseñó para tener un sitio de reconocimiento BamHI que contiene un codón de parada.

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

Para clonar cada uno de los fragmentos de región constante de IgG4 amplificados en un vector de expresión que contiene un derivado de secuencia secretora de *E. coli*, se usó el pT14S1SH-4T20V22Q (Patente Coreana N° 38061) desarrollado antes de la presente invención por los presentes inventores. Este vector de expresión contiene un derivado de secuencia secretora de enterotoxina termoestable que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEC ID N°: 4. Para facilitar la clonación, se insertó un sitio de reconocimiento StuI en un extremo del derivado de secuencia secretora de enterotoxina termoestable de *E. coli* del plásmido pT14S1SH-4T20V22Q a través de mutagénesis dirigida usando un par de cebadores representados por SEC ID N°: 5 y 6 para inducir mutagénesis para introducir el sitio StuI en una secuencia de nucleótidos que codifica el último resto de aminoácido de la secuencia secretora. Esta inserción del sitio StuI se observó que era satisfactoria mediante secuenciación de ADN. El plásmido pT14S1SH-4T20V22Q resultante que contiene un sitio StuI se denominó pmSTII. El plásmido pmSTII se trató con StuI y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa y un fragmento grande (4,7 kb), que contenía el derivado de secuencia secretora de enterotoxina termoestable de *E. coli*, se purificó. Posteriormente, los fragmentos de genes amplificados se digirieron con BamHI y se ligaron con el vector de expresión linealizado, proporcionando de ese modo pSTIIIdCG4Fc y pSTIIIG4Mo.

Los vectores de expresión finales se transformaron individualmente en *E. coli* BL21(DE3) y los transformantes resultantes se denominaron BL21/pSTIIIdCG4Fc (HM10932) y BL21/pSTIIIdCG4Mo (HM10933), que se depositaron en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se les asignaron los números de acceso KCCM-10597 y KCCM-10598, respectivamente. A partir de entonces, cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 80, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir expresión de proteína.

Los cultivos se cultivaron adicionalmente durante 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm aumentó a 100 a 120. Las células de *E. coli* recogidas a partir de los líquidos de fermentación se alteraron y los lisados celulares resultantes se sometieron a cromatografía en columna de dos etapas para purificar los derivados de la región constante de inmunoglobulina recombinantes presentes en el citosol de *E. coli*.

- 5 5 ml de una columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) se equilibraron con PBS y los lisados celulares se cargaron en la columna a un caudal de 5 ml/min. Las proteínas no unidas 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 desalado HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). Posteriormente, se llevó a cabo cromatografía en columna de intercambio aniónico secundaria usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Las fracciones
- 10 de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante purificadas primarias se cargaron en la columna de Q-Sepharose 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 ese modo un derivado de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante altamente puro (AG Fc), IgG4 delta-Cys y una fracción de monómero de IgG4 altamente pura.

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

- 15 De acuerdo con los mismos procedimientos de los Ejemplos 1 y 11, el complejo de FN α -PEG se unió al extremo N del IgG4 delta-Cys como un derivado de AG Fc preparado en el Ejemplo 12. Después de la reacción de acoplamiento, las sustancias que no reaccionaron y los subproductos se eliminaron de la mezcla de reacción y el conjugado de proteína de IFN α -PEG-AG Fc (I) producido de este modo se purificó principalmente usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) y se purificó adicionalmente mediante un ensayo de cromatografía líquida a
- 20 alta presión usando una columna polyCAT 21.5x250 (polyLC), purificando de ese modo el conjugado a un grado elevado. La solución de reacción de acoplamiento se desaló usando una columna de desalado HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). A continuación, la solución de reacción se cargó posteriormente en 50 ml de una columna de Q HP 26/10 (Pharmacia) a un caudal de 8 ml/min y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,2 M para obtener fracciones deseadas. Las fracciones recogidas se cargaron nuevamente en
- 25 una columna polyCAT 21.5x250 equilibrada con tampón de acetato 10 mM (pH 5,2) a un caudal de 15 ml/min y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,1-0,3 M, proporcionando de este modo fracciones altamente puras. De acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente, se preparó otro conjugado de proteína de IFN α -PEG-AG Fc (II) usando otro derivado de AG Fc preparado en el Ejemplo 12, monómero de IgG4.

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

- 30 De acuerdo con el mismo procedimiento del Ejemplo 13, se preparó un conjugado de EPO-PEG-derivado de AG Fc recombinante enlazando un derivado de AG Fc, IgG4 delta-Cys, al complejo de EPO-PEG.

Ejemplo comparativo 1: Preparación de complejo de IFN α -40K PEG

- 35 5 mg de interferón alfa se disolvieron en tampón de fosfato 100 mM para obtener un volumen final de 5 ml y se mezclaron con metoxi-PEG-aldehído activado de 40-kDa (Shearwater) a una proporción molar de IFN α :40-kDa PEG de 1:4. A esta mezcla, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃ a una concentración final de 20 mM y se permitió que reaccionara a 4 °C durante 18 h con agitación suave. Para inactivar PEG, que no había reaccionado con IFN α , se añadió etanolamina a la mezcla de reacción a una concentración final de 50 mM.

- 40 Una columna Sephadex G-25 (Pharmacia) se usó para eliminar PEG que no había reaccionado e intercambiar el tampón con otro tampón. En primer lugar, esta columna se equilibró con dos volúmenes de columna (VC) de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y se cargó con la mezcla de reacción. Los flujos continuos se detectaron midiendo la absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro de UV. Cuando la columna se eluyó con el mismo tampón, el interferón alfa modificado mediante adición de PEG que tiene un peso molecular más elevado en su extremo N se eluyó más temprano y el PEG que no había reaccionado se eluyó más tarde, permitiendo de este modo el aislamiento de únicamente IFN α -40K PEG.

- 45 La siguiente cromatografía se llevó a cabo para purificar adicionalmente el complejo de IFN α -40K PEG a partir de las fracciones recogidas. 3 ml de una columna PolyWAX LP (PolyLC) se equilibraron con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5). Las fracciones recogidas que contienen el complejo de IFN α -40K PEG se cargaron en la columna a un caudal de 1 ml/min y la columna se lavó con 15 ml del tampón de equilibrio. Posteriormente, la columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl del 0-100% usando 30 ml de NaCl 1 M, eluyendo de ese modo interferón alfa conjugado a tri, di y mono-PEG secuencialmente. Para purificar adicionalmente el interferón alfa conjugado a mono-PEG, las fracciones recogidas que contienen el interferón alfa conjugado a mono-PEG se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño. Las fracciones se concentraron y se cargaron en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,0) y la columna se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. Las moléculas de interferón alfa conjugadas a tri y di-PEG se eliminaron en base a su propiedad de
- 55 eluirse más temprano que el interferón alfa conjugado con mono-PEG, aislando de ese modo el interferón alfa conjugado con mono-PEG en una forma altamente pura.

De acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente, PEG de 40-kDa se conjugó al extremo N de hormona del crecimiento humana, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y un derivado de G-CSF, proporcionando de ese modo complejos de derivados de hGH-40K PEG, G-CSF-40K PEG y 40K PEG-¹⁷S-G-CSF.

Ejemplo comparativo 2: Preparación de conjugado de IFN α -PEG-albúmina

5 Para unir el complejo de IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del Ejemplo 1 al extremo N de albúmina, el complejo de IFN α -PEG se mezcló con albúmina sérica humana (HSA, aproximadamente 67 kDa, Green Cross) disuelta en tampón de fosfato 10 mM a una proporción molar de complejo de IFN α -PEG:albúmina de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que la concentración del tampón de fosfato de la solución de reacción se había ajustado a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se permitió
10 que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. A través de este experimento, la proporción molar de reacción óptima para el complejo de IFN α -PEG a albúmina, que proporciona la reactividad más elevada y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, se observó que era 1:2.

Después de la reacción de acoplamiento, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia) de forma de eliminar las sustancias que no habían reaccionado y los subproductos y purificar el conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina producido. Después de que la mezcla de reacción se concentró y se cargó en la columna, se pasó tampón de acetato de sodio 10 mM a través de la columna a un caudal de 2,5 ml/min para eliminar la albúmina no unida y las sustancias que no habían reaccionado, seguido por elución de columna para purificar únicamente el conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina. Debido a que las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina recogidas contenían una cantidad pequeña de impurezas, albúmina que no había reaccionado y dímeros de interferón alfa, se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico para eliminar las impurezas. Las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina se cargaron en una columna SP5PW (Waters) 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 de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M, aislando de ese modo el conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina en una forma altamente pura.
15
20

25 De acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente, la albúmina se conjugó a hormona del crecimiento, G-CSF y un derivado de G-CSF, proporcionando de este modo conjugados de hGH-PEG-albúmina, G-CSF-PEG-albúmina y ¹⁷S-G-CSF-PEG-albúmina.

Ejemplo Comparativo 3: Preparación de complejo de Fab'-S-40K PEG

30 El resto de cisteína libre del Fab' purificado en la etapa 1 del Ejemplo 8 se activó mediante incubación en un tampón de activación (acetato de sodio 20 mM (pH 4,0), DTT 0,2 mM) durante 1 h. Después de que el tampón se había intercambiado por un tampón de modificación de PEG, fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5), se añadió maleimida-PEG (PM: 40 kDa, Shearwater) al mismo a una proporción molar de Fab':40-kDa PEG de 1:10 y se sometió a reacción para reaccionar a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

35 Después de que la reacción se completó, la solución de reacción se cargó en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón de fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3) y la columna se eluyó con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. El 40-kDa PEG conjugado a Fab' (Fab'-40K PEG) se eluyó relativamente más temprano debido a su alto peso molecular y el Fab' que no había reaccionado se eluyó más tarde, eliminando de ese modo el Fab' que no había reaccionado. Para eliminar completamente el Fab' que no había reaccionado, las fracciones de complejo de Fab'-40K PEG recogidas se cargaron nuevamente en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC) y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón de fosfato de sodio 20 mM (pH 4,5), proporcionando de esa forma un complejo de Fab'-S-40K PEG puro que comprende PEG de 40-kDa unido a un grupo -SH del Fab'.
40

Ejemplo experimental 1: Identificación y análisis cuantitativo de los conjugados de proteína

<1-1> Identificación de los conjugados de proteína

45 Los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos anteriores se analizaron mediante SDS-PAGE no reducida usando un gel de gradiente del 4-20% y un gel al 12% y ELISA (R&D System).

Como resultado del análisis de SDS-PAGE, como se muestra en la FIGURA 3, una reacción de acoplamiento de un polipéptido fisiológico, un polímero no peptídico, PEG y un fragmento Fc de inmunoglobulina dio como resultado la producción satisfactoria de un conjugado de IFN α -PEG-Fc (A), un conjugado de ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y un conjugado de EPO-PEG-Fc (C).
50

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

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

Los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos anteriores se cuantificaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) y tampón de fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como un tampón de dilución, en el que un área pico de cada conjugado de proteína se comparó con la de un grupo de control. Los patrones analizados cuantitativamente previamente, IFN α , hGH, G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, EPO y Fc, se sometieron individualmente a cromatografía de exclusión por tamaño y se determinó un factor de conversión entre una concentración y un pico. Una cantidad predeterminada de cada conjugado de proteína se sometió a la misma cromatografía de exclusión por tamaño. Restando un área de pico que corresponde a un fragmento Fc de inmunoglobulina del área de pico obtenida de este modo, se determinó un valor cuantitativo para una proteína fisiológicamente activa presente en cada conjugado de proteína. La FIGURA 4 muestra el resultado de cromatografía de exclusión por tamaño del conjugado de IFN α -PEG-Fc purificado, en el que se observó un pico único. Este resultado indica que el conjugado de proteína purificado no contiene impurezas multiméricas tales como un dímero, un trímero o un número más elevado de monómeros.

Cuando un polipéptido fisiológicamente activo conjugado a Fc se analizó cuantitativamente usando un anticuerpo específico para el polipéptido fisiológicamente activo, se evitó la unión del anticuerpo al polipéptido, dando como resultado un valor menor que un valor real calculado mediante la cromatografía. En el caso del conjugado de IFN α -PEG-Fc, un ELISA dio como resultado un valor de ELISA correspondiente a aproximadamente el 30% de un valor real.

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

Los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos anteriores se sometieron a cromatografía de exclusión por tamaño y la absorbancia se midió a 280 nm. Como resultado, los conjugados de IFN α -PEG-Fc, hGH-PEG-Fc, G-CSF-PEG-Fc y ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc presentaron un pico único en el tiempo de retención de una sustancia de 70 a 80-kDa.

Por otra parte, se llevó a cabo HPLC de fase inversa para determinar las purezas de los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos 1, 11 y 13, IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc y IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante. Se usó una columna de fase inversa (columna 259 VHP54, Vydac). La columna se eluyó con un gradiente de acetonitrilo al 40-100% con TFA al 0,5% y las purezas se analizaron mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. Como resultado, como se muestra en la FIGURA 8, las muestras contenían interferón o Fc de inmunoglobulina no unido y se observó que todos los conjugados de proteína, IFN α -PEG-Fc (A), IFN α -PEG-DG Fc (B) y IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (C), tienen una pureza mayor del 96%.

Para determinar los pesos moleculares precisos de los conjugados de proteína purificados, se analizó la masa para cada conjugado usando un espectrofotómetro de masas MALDI-TOF de alto rendimiento (Voyager DE-STR, Applied Biosystems). Se usó ácido sinapínico como una matriz. 0,5 μ l de cada muestra de ensayo se aplicaron como revestimiento en un portaobjetos de muestra y se secaron al aire, se mezclaron nuevamente con el volumen igual 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 de modo lineal. Los iones se aceleraron con una fuente de extracción de división operada con extracción retardada (ER) usando un tiempo de extracción retardada de 750 ns a 1500 ns a un voltaje de aceleración total de aproximadamente 2,5 kV.

Los pesos moleculares observados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para los conjugados de proteína de Fc preparados en los Ejemplos se proporcionan en la Tabla 1, más adelante. La FIGURA 5 muestra el resultado de espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado de EPO-PEG-Fc y la FIGURA 7 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de los conjugados de IFN α -PEG-Fc e IFN α -PEG-DG Fc. Como resultado, se observó que el conjugado de proteína de EPO-PEG-Fc tiene una pureza de más del 95% y un peso molecular muy cercano a un PM teórico. También, se observó que EPO se acopla al fragmento Fc de inmunoglobulina a una proporción de 1:1.

45 TABLA 1

	PM teórico (kDa)	PM medido (kDa)
IFN α -PEG-Fc (E.1)	75,4	75,9
hGH-PEG-Fc (E.3)	78,4	78,6
G-CSF-PEG-Fc (E.4)	75,3	75,9
¹⁷ S-G-derivado de CSF-PEG-Fc (E.4)	75,0	75,9
EPO-PEG-Fc (E.5)	91,4	91,0

Además, cuando Fc y DG Fc preparados en el Ejemplo 10 se examinaron para sus pesos moleculares mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, se observó que DG Fc era de 50 kDa, que es aproximadamente 3-kDa menos que el Fc nativo (FIGURA 6a). Ya que el PM de 3-kDa corresponde al tamaño teórico de restos de azúcar, los resultados demuestran que los restos de azúcar se eliminaron completamente.

- 5 La Tabla 2, más adelante, muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado de IFN α -PEG-DG Fc preparado en el Ejemplo 11 y los conjugados de IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I y II) preparados en el Ejemplo 13. Se observó que el conjugado de IFN α -PEG-DG Fc era 3 kDa más ligero y el conjugado de IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I) era aproximadamente 3-4 kDa más ligero, que el conjugado de IFN α -PEG-Fc de 75,9 kDa. El conjugado de IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (II) acoplado a un monómero de Fc mostró un peso molecular reducido en 24,5 kDa correspondiente al peso molecular del monómero de Fc.

TABLA 2

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

Ejemplo experimental 2: Análisis de farmacocinética I

- 15 Formas nativas de proteínas fisiológicamente activas (controles) y los conjugados de proteína preparados en los Ejemplos y Ejemplos Comparativos, complejos de -40K PEG, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-DG Fc y conjugados de -PEG-derivado de AG Fc recombinante, se evaluaron para estabilidad en suero y parámetros de farmacocinética en ratas SD (cinco ratas por grupo). Los controles y los complejos de -40K PEG, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-DG Fc y conjugados de -PEG-derivado de AG Fc recombinante (grupos de ensayo) se inyectaron individualmente por vía subcutánea a una dosis de 100 μ g/kg. Después de la inyección subcutánea, se recogieron muestras de sangre a 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 h en los grupos de control y, en los grupos de ensayo, a 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 288 h. Las muestras de sangre se recogieron en tubos con un anticoagulante, heparina, y se centrifugaron durante 5 min usando una microcentrífuga de alta velocidad Eppendorf para eliminar las células sanguíneas. Los niveles de proteína sérica se midieron mediante ELISA usando anticuerpos específicos para las proteínas fisiológicamente activas.

- Los resultados de los análisis de farmacocinética de las formas nativas de IFN α , hGH, G-CSF y EPO, y complejos de -40K PEG de los mismos, conjugados de -PEG-albúmina de los mismos, conjugados de -PEG-Fc de los mismos y conjugados de -PEG-DG Fc de los mismos, se proporcionan en las Tablas 3 a 7, más adelante. En las siguientes tablas, T_{máx} indica el tiempo necesario para alcanzar la concentración de fármaco máxima en suero, T_{1/2} indica la semivida en suero de un fármaco y TRM (tiempo de residencia medio) indica el tiempo medio que una molécula de fármaco reside en el organismo.

TABLA 3

Farmacocinética de interferón alfa							
	IFN α Nativo	IFN α -40K PEG (C.E. 1)	IFN α -PEG-albúmina (C.E.2)	IFN α -PEG-Fc (E.1)	IFN α -PEG-DG Fc (E. 11)	IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (I) (E.13)	IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (II) (E.13)
T _{máx} (h)	1,0	30	12	30	48	24	24
T _{1/2} (h)	1,7	35,8	17,1	90,4	71,0	61,2	31,2
TRM (h)	2,1	71,5	32,5	150,1	120,6	111,0	58,8

TABLA 4

Farmacocinética de factor del crecimiento humano				
	hGH Nativa	hGH-40K PEG (C.E.1)	hGH-PEG-albúmina (C.E.2)	hGH-PEG-Fc (E.3)
T _{máx} (h)	1,0	12	12	12
T _{1/2} (h)	1,1	7,7	5,9	11,8
TRM (h)	2,1	18,2	13,0	18,8

TABLA 5

Farmacocinética de G-CSF				
	G-CSF Nativo	G-CSF-40K PEG (C.E.1)	G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2)	G-CSF-PEG-Fc (E.4)
T _{máx} (h)	2,0	12	12	12
T _{1/2} (h)	2,8	4,8	5,2	6,9
TRM (h)	5,2	24,5	25,0	32,6

5

TABLA 6

Farmacocinética de derivado de ¹²⁵ S-G-CSF				
	Derivado de ¹²⁵ S-G-CSF nativo	¹²⁵ S-G-CSF-40K PEG (C.E.1)	¹²⁵ S-G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2)	¹²⁵ S-G-CSF-PEG-Fc (E.4)
T _{máx} (h)	2,0	24	24	24
T _{1/2} (h)	2,9	4,3	6,4	7,0
TRM (h)	5,8	24,4	25,1	33,2

TABLA 7

Farmacocinética de EPO				
	EPO Nativa	EPO altamente glicosilada	EPO-PEG-Fc (E.5)	EPO-PEG-derivado de AG Fc recombinante (E.13)
T _{máx} (h)	6,0	12	30	48
T _{1/2} (h)	9,4	18,4	61,5	87,9
TRM (h)	21,7	26,8	117,6	141,6

10 Como se muestra a partir de los datos de la Tabla 3 y del gráfico de farmacocinética de la FIGURA 9, el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc tenía una semivida en suero de 90,4 h, que era aproximadamente 50 veces más elevado que el de IFN α nativo y aproximadamente 2,5 veces más elevado que el de IFN α -40K PEG que tiene una semivida de 35,8 h, preparado en el Ejemplo Comparativo 1. También, el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc de la presente invención se observó que era superior en semivida en suero a IFN α -PEG-albúmina, que tiene una semivida de 17,1 h.

15 Por otra parte, como se muestra en la Tabla 3 y en la FIGURA 11, el conjugado de IFN α -PEG-DG Fc tenía una semivida en suero de 71,0 h, que era casi la misma que la del conjugado de IFN α -PEG-Fc, indicando que la desglicosilación de Fc no influye de forma grande sobre la estabilidad *in vivo* del conjugado de IFN α -PEG-DG Fc. También, el conjugado preparado usando el derivado de AG Fc recombinante producido mediante un procedimiento

recombinante se observó que tiene un efecto idéntico al del DG Fc obtenido de la forma nativa. Sin embargo, la semivida en suero de un complejo acoplado a un monómero de Fc era aproximadamente la mitad de la de un complejo acoplado a un dímero de Fc normal.

5 Como se muestra en la Tabla 4, la hormona del crecimiento humano también mostró una semivida en suero extendida cuando se conjugaba al fragmento Fc de IgG de acuerdo con la presente invención. Es decir, en comparación con la forma nativa (1,1 h), el complejo de hGH-40K PEG y el conjugado de hGH-PEG-albúmina tenían semividas ligeramente aumentadas de 7,7 y 5,9 h, respectivamente, mientras que el conjugado de proteína de hGH-PEG-Fc de la presente invención mostraba una semivida en suero enormemente extendida de 11,8 h.

10 Como es evidente a partir de los datos de farmacocinética de G-CSF y su derivado en la Tabla 5 y 6, los conjugados de G-CSF-PEG-Fc y ¹⁷S-G-CSF-PEG-Fc presentaron una semivida en suero mucho más larga que el complejo de -40K PEG y el conjugado de -PEG-albúmina. Se observó que el fragmento Fc de inmunoglobulina en el suero prolonga la duración de acción de las proteínas fisiológicamente activas en formas nativas, así como también en sus derivados que tienen alteraciones de determinados restos de aminoácidos en niveles similares a las formas nativas. A partir de estos resultados, es fácilmente predecible que el procedimiento de la presente invención tendrá un efecto similar sobre otras proteínas y sus derivados.

15 Como se muestra en la Tabla 7 y la FIGURA 10, la conjugación de la EPO glicosilada nativa al fragmento Fc también dio como resultado un aumento en la semivida en suero. Es decir, EPO tenía una semivida en suero de 9,4 h en la forma nativa y una semivida en suero prolongada de 18,4 h cuando estaba altamente glicosilada para mejorar la estabilidad en suero. El conjugado de EPO-PEG-Fc, que comprende EPO acoplada al fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, presentaba una semivida en suero prolongada de forma marcada de 61,5 h. También, cuando se conjugaba al derivado de Fc aglicosilado (AG) recombinante obtenido de *E. coli*, la semivida de EPO aumentaba a 87,9 h, indicando que la aglicosilación del fragmento Fc permite la preparación de un conjugado de proteína que no afecta la estabilidad en suero de la proteína sin funciones de anticuerpo.

20 Como es evidente a partir de los resultados anteriores, los conjugados de proteína unidos de forma covalente al fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico de acuerdo con la presente invención presentaron semividas en suero aumentadas a varias decenas de veces a la de la forma nativa. También, cuando el Fc de inmunoglobulina se aglicosilaba mediante producción en *E. coli* o se desglicosilaba mediante tratamiento enzimático, su efecto sobre el aumento de la semivida en suero de su conjugado de proteína se mantenía a un nivel similar.

25 En particular, en comparación con las proteínas modificadas con 40-kDa PEG que tiene la duración más larga de acción entre las moléculas de PEG para aumentar la duración de acción de las proteínas en el suero, los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina tenían estabilidad en suero muy superior. Además, en comparación con los conjugados de proteína acoplados a albúmina en lugar de Fc de inmunoglobulina, los conjugados de proteína de la presente invención presentaban estabilidad en suero excelente, indicando que los conjugados de proteína de la presente invención son eficaces en el desarrollo de formas de acción prolongada de fármacos de proteína. Estos resultados, que los presentes conjugados de proteína tienen efectos excelentes sobre la estabilidad en suero y TRM en una amplia gama de proteínas incluyendo derivados del factor estimulante de colonias mediante mutación puntual en comparación con proteínas conjugadas a PEG o albúmina convencionales, indican que la estabilidad y los efectos de prolongación de la duración de los presentes conjugados de proteína son aplicables a otros polipéptidos fisiológicamente activos.

30 Por otra parte, cuando el conjugado de proteína de IFN α -10K PEG-Fc (Ejemplo 7) preparado usando un polímero no peptídico, PEG de 10-kDa, se evaluó para su semivida en suero de acuerdo con el mismo procedimiento que se ha descrito anteriormente, el mismo mostró una semivida en suero de 48,8 h, que era algo más corta que la semivida en suero (79,7 h) de un conjugado de proteína preparado usando PEG de 3,4-kDa.

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

40 Incluso cuando el grupo reactivo de PEG se intercambió con un grupo reactivo diferente al grupo aldehído, los conjugados de proteína con el PEG mostraron patrones similares en peso molecular aparente y semivida en suero a aquellos acoplados a PEG que tienen un grupo reactivo aldehído.

Ejemplo experimental 3: Análisis de farmacocinética II

45 Para determinar las semividas en suero de los conjugados de Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc preparados en el Ejemplo 8 y 9 y el complejo de Fab'-S-40K PEG preparado en el Ejemplo Comparativo 3, se llevó a cabo el análisis de farmacocinética de fármaco de acuerdo con el mismo procedimiento del Ejemplo Experimental 2 usando Fab' como un control, los conjugados y el complejo. Los resultados se proporcionan en la FIGURA 12.

Como se muestra en la FIGURA 12, los conjugados de Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc presentaron una semivida en suero prolongada dos o tres veces en comparación con el complejo de Fab' o Fab'-S-40K PEG.

Ejemplo experimental 4: Evaluación de actividad intracelular de los conjugados de proteína

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

5 Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína de IFN α , el IFN α -PEG-Fc (Ejemplo 1), IFN α -PEG-DG Fc (Ejemplo 11), IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante (Ejemplo 13), IFN α -40K PEG (Ejemplo Comparativo 1) e IFN α -PEG-albúmina (Ejemplo Comparativo 2) se evaluaron para actividad antiviral mediante un bioensayo de cultivo celular usando células de Riñón Bovino de Madin Darby (MDBK) (ATCC CCL-22) infectadas con virus de estomatitis vesicular. Interferón alfa-2b no pegilado, disponible en el Instituto Nacional de Patrones y
10 Controles Biológicos (NIBSC), se usó como un material patrón.

Células MDBK se cultivaron en MEM (medio esencial mínimo, JBI) complementado con FBS al 10% y penicilina/estreptomycin al 1% a 37 °C en condición de CO₂ al 5%. Las muestras que se tienen que analizar y el material de patrón se diluyeron con el medio de cultivo hasta concentraciones predeterminadas y alícuotas de 100 μ l se colocaron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Las células cultivadas se desprendieron, se añadieron a la placa que contiene las muestras en un volumen de 100 μ l y se cultivaron durante aproximadamente 1 h a 37 °C en
15 condición de CO₂ al 5%. A continuación, 50 μ l de virus de estomatitis vesicular (VSV) de 5-7x10³ PFU se añadieron a cada pocillo de la placa y las células se cultivaron adicionalmente durante aproximadamente 16 a 20 h a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5%. Un pocillo que no contenía la muestra o material de patrón sino que contenía únicamente el virus se usó como un control negativo y un pocillo que contenía únicamente células se usó como un control
20 positivo.

Después de que el medio de cultivo se había eliminado, 100 μ l de una solución de rojo neutro se añadieron a la placa para teñir las células viables, seguido por incubación durante 2 h a 37 °C en condición de CO₂ al 5%. Después los sobrenadantes se eliminaron, se añadieron 100 μ l de una mezcla 1:1 de etanol al 100% y ácido acético al 1% a cada pocillo de la placa. Después de mezcla vigorosa para disolver todos los cristales de rojo neutro eluidos a partir
25 de las células teñidas, se midió la absorbancia a 540 nm. El control negativo se usó como un blanco y se calcularon los valores de DE₅₀ (dosis que causa el 50% de la inhibición de crecimiento celular), donde el crecimiento celular del control positivo se ajustó al 100%.

TABLA 8

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

30 Como se muestra en la Tabla 8, el IFN α -40K PEG disminuyó en actividad al 4,8% del IFN α nativo. Especialmente, a medida que el tamaño de los restos de PEG aumentaba, un conjugado de proteína tiene estabilidad en suero mejorada pero actividad gradualmente reducida. Se informó que el interferón alfa tiene actividades *in vitro* del 25% cuando se modifica con PEG de 12-kDa y aproximadamente el 7% cuando se modifica con PEG de 40-kDa (P. Bailon y col., Bioconjugate Chem. 12: 195-202, 2001). Es decir, debido a que un conjugado de proteína tiene una
35 semivida más larga pero su actividad biológica se reduce de forma marcada a medida que el peso molecular de los restos de PEG aumenta, existe una necesidad de desarrollo de un conjugado de proteína que tenga una semivida en suero más larga y una actividad más fuerte. Además, el conjugado de IFN α -PEG-albúmina presentó una actividad débil de aproximadamente el 5,2% en comparación con el IFN α nativo. Por el contrario, los conjugados de IFN α -PEG-Fc y IFN α -PEG-DG Fc de la presente invención mostraron una actividad relativa marcadamente mejorada del
40 28,1% y el 25,7% en comparación con el IFN α nativo. También, la conjugación de IFN α al derivado de AG Fc recombinante dio como resultado un aumento similar en actividad. A partir de estos resultados, se espera que el interferón alfa conjugado al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en suero aumentada de forma marcada y eficacia farmacéutica enormemente mejorada *in vivo*.

<4-2> Comparación de los conjugados de proteína de hormona del crecimiento humano para actividad intracelular.

Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína de hormona del crecimiento humana, los hGH-PEG-Fc, hGH-40K PEG y hGH-PEG-albúmina se compararon para actividad intracelular.

5 Las actividades intracelulares de los conjugados de hGH se midieron mediante un ensayo *in vitro* usando una línea de células de linfoma de ganglios de rata, Nb2 (Colección Europea de Cultivos Celulares (ECACC) N° 97041101), que desarrolla mitogénesis dependiente de la hormona del crecimiento humano.

10 Las células Nb2 se cultivaron en medio de Fisher complementado con FBS al 10% (suero fetal bovino), NaCO₃ al 0,075%, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y glutamina 2 mM y se cultivaron adicionalmente en un medio similar que no contenía FBS al 10% durante 24 h. A continuación, se realizó el recuento de las células cultivadas y aproximadamente 2x10⁴ células se dividieron en alícuotas en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. El hGH-PEG-Fc, el hGH-40K PEG, el hGH-PEG-albúmina, un patrón disponible en el Instituto Nacional de Patrones y Controles Biológicos (NIBSC) como un control y hormona del crecimiento humano nativa (HM-hGH) se diluyeron y añadieron a cada pocillo a diversas concentraciones, seguido por incubación durante 48 h a 37 °C en condición de CO₂ al 5%. A partir de entonces, para medir la actividad de proliferación celular mediante la determinación del número de células en cada pocillo, 25 µl del reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega) se añadieron a cada pocillo y las células se cultivaron adicionalmente durante 4 h. La absorbancia se midió a 490 nm y se calculó un título para cada muestra. Los resultados se proporcionan en la Tabla 9, más adelante.

TABLA 9

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica* (U/mg)	Actividad relativa (%) para HM-hGH Nativa
hGH Nativa	100	2,71E+06	100
hGH (patrón disponible en NIBSC)	100	2,58E+06	95,2
hGH-40K PEG	100	0,206E+06	7,6
hGH-PEG-albúmina	100	0,141E+06	5,2
hGH-PEG-Fc	100	0,76E+06	28,1
Actividad específica* = 1/DE ₅₀ × 10 ⁶ (DE ₅₀ : cantidad de proteína necesaria para el 50% del crecimiento celular máximo)			

20 Como se muestra en la Tabla 9, también en el caso de hormona del crecimiento humana, la conjugación de PEG de 40-kDa (hGH-40K PEG) dio como resultado una reducción de la actividad hasta aproximadamente el 7,6% de la forma nativa y el conjugado de hGH-PEG-albúmina presentó una actividad *in vitro* baja que era aproximadamente el 5,2% de la hGH nativa. Sin embargo, el conjugado de hGH-PEG-Fc de la presente invención aumentó de forma marcada la actividad relativa a más del 28% en comparación con la hGH humana. A partir de estos resultados, se espera que la hormona del crecimiento humana unida al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en suero aumentada de forma marcada y una eficacia farmacéutica *in vivo* enormemente mejorada. Además, se cree que la actividad aumentada de los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina de la presente invención se debe a la estabilidad en suero aumentada y a la afinidad de unión conservada para los receptores debido al Fc de inmunoglobulina o debido al espacio formado por el polímero no peptídico. Estos efectos se predice que son aplicables a conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina acoplados a otras proteínas fisiológicamente activas.

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

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

35 En primer lugar, una línea de células mieloides humanas, HL-60 (ATCC CCL-240, paciente de leucemia promielocítica/mujer Caucásica de 36 años de edad), se cultivó en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10%. Las células cultivadas se suspendieron a una densidad de aproximadamente 2,2x10⁵ células/ml y se añadió DMSO (dimetilsulfóxido, grado de cultivo, Sigma) al mismo a una concentración final del 1,25% (v/v). A continuación, 90 µl de la suspensión celular se sembraron en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (placa de 96 pocillos Corning/evaporación baja), proporcionando de ese modo una densidad de aproximadamente 2x10⁴ células por pocillo y se cultivaron en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5% durante aproximadamente 72 h.

40 Cada muestra, cuya concentración de proteína se determinó usando un kit de ELISA de G-CSF (R&D systems), se diluyó con RPMI 1640 hasta una concentración idéntica de 10 µg/ml y se diluyó adicionalmente dos veces con RPMI

1640 diecinueve veces. Las diluciones de dos veces en serie se añadieron individualmente a cada pocillo que contenía células HL-60 a un volumen de 10 μ l, de forma que la concentración de cada muestra comenzaba a 1 μ g/ml. A continuación, las células se cultivaron en una incubadora a 37 °C durante 72 h.

5 La proliferación de células HL-60 se ensayó usando Cell Titer 96™ (Nº de Cat G4100, Promega) y el número de células aumentado se determinó midiendo la absorbancia a 670 nm.

TABLA 10

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

10 Como se muestra en la Tabla 10, los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina acoplados a un derivado de G-CSF que tienen una sustitución de aminoácido, ¹⁷Ser-G-CSF, también presentaron efectos similares a conjugados de proteína acoplados a G-CSF nativo. El ¹⁷Ser-G-CSF-PEG se informó previamente que tiene una semivida en suero relativamente aumentada pero una actividad reducida en comparación con ¹⁷Ser-G-CSF no pegilado (Publicación de Patente Coreana abierta a Consulta por el Público Nº 2004-83268). Especialmente, a medida que aumenta el tamaño de los restos de PEG, un conjugado de proteína tenía estabilidad en suero aumentada pero actividad gradualmente reducida. El ¹⁷Ser-G-CSF-40K PEG mostró una actividad muy baja de menos de 15 aproximadamente el 10% en comparación con la forma nativa. Es decir, debido a que un conjugado de proteína tiene una semivida en suero extendida pero una actividad reducida de forma marcada a medida que el peso molecular de los restos de PEG aumenta, existe la necesidad del desarrollo de un conjugado de proteína que tenga una semivida en suero larga y actividad fuerte. El ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-albúmina también mostró una actividad baja de 20 aproximadamente el 23% en comparación con el G-CSF nativo. Por el contrario, el ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc tenía una actividad relativa enormemente aumentada hasta más del 51% en comparación con el G-CSF nativo. A partir de estos resultados, se espera que ¹⁷Ser-G-CSF enlazado al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en suero aumentada de forma marcada y una eficacia farmacéutica *in vivo* enormemente mejorada.

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

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

30 El conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc y el complejo de Fab'-S-40K PEG se diluyeron en serie dos veces y alícuotas de 100 μ l se colocaron en pocillos de una placa de 96 pocillos. rhTNF- α (R&D systems) y actinomicina D (Sigma) usados como un inhibidor de síntesis de ARN se añadieron a cada pocillo a concentraciones finales de 10 ng/ml y 1 μ g/ml, respectivamente, se incubaron durante 30 min en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5% y se transfirieron a una placa de microtitulación para ensayo. Las células L929 se añadieron a cada pocillo a una densidad de 5x10⁴ células/ 50 μ l de medio y se cultivaron durante 24 h en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5%. 35 Después de que el medio de cultivo se eliminó, 50 μ l de MTT (Sigma) disuelto en PBS a una concentración de 5 mg/ml se añadieron a cada pocillo y las células se cultivaron adicionalmente durante aproximadamente 4 h en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5%. 150 μ l de DMSO se añadieron a cada pocillo y se determinó el grado de neutralización de citotoxicidad midiendo la absorbancia a 540 nm. Como un control, se usó el Fab' purificado en la etapa 1 del Ejemplo 8.

40 Como se muestra en la FIGURA 13, todos los conjugados de proteína usados en este ensayo tenían un título similar al Fab'. Estos resultados indican que, cuando se prepara un conjugado de proteína enlazando un Fc de inmunoglobulina a un resto de cisteína libre cerca del extremo N o el extremo C de un Fab' a través de PEG, el Fab' muestra una semivida en suero aumentada de forma marcada y una actividad *in vivo* elevada.

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

Para determinar si los derivados preparados en los Ejemplos y las proteínas correspondientes a las regiones constantes de inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes de *E. coli* y purificadas, se unen a C1q humano, se llevó a cabo un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA) de la forma siguiente. Como grupos de ensayo, se usaron regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM10932 y HM10927, depositados en el Centro de Cultivo de Microorganismos Coreano (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se les asignaron los números de acceso KCCM-10597, KCCM-10588 y los derivados preparados en los Ejemplos anteriores. Como patrones, se usaron una inmunoglobulina glicosilada (IVIG-globulin S, Green Cross PBM) y varios anticuerpos disponibles en el mercado usados como anticuerpos terapéuticos. Las muestras de ensayo y patrón se prepararon en tampón de carbonato 10 mM (pH 9,6) a una concentración de 1 µg/ml. Las muestras se dividieron en alícuotas en una placa de 96 pocillos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pocillo y la placa se revistió durante una noche a 4 °C. A continuación, cada pocillo se lavó con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween 20 al 0,05%) tres veces, se bloqueó con 250 µl de un tampón de bloqueo (albúmina sérica bovina al 1% en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó nuevamente con el mismo PBS-T tres veces. Las muestras patrón y de ensayo se diluyeron en PBS-T hasta una concentración predeterminada y se añadieron a pocillos revestidos con anticuerpo y la placa se incubó a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó con PBS-T tres veces. A partir de entonces, se añadieron 2 µg/ml de C1q (R&D Systems) a la placa y se sometieron a reacción a temperatura ambiente durante 2 h y la placa se lavó con PBS-T seis veces. 200 µl de una dilución 1:1000 de un conjugado anticuerpo anti-C1q humano-peroxidasa humano (Biogenesis, EE.UU.) en el tampón de bloqueo se añadieron a cada pocillo y se sometieron a reacción a temperatura ambiente durante 1 h. Después de que cada pocillo se lavó con PBS-T tres veces, se mezclaron volúmenes iguales de reactivos de color A y B (Color A: peróxido estabilizado y Color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems) y 200 µl de la mezcla se añadieron a cada pocillo, seguido por incubación durante 30 min. A continuación, se añadieron 50 µl de una solución de terminación de reacción, ácido sulfúrico 2 M, a cada pocillo. La placa se leyó usando un lector de placa de microtitulación (Molecular Device). La absorbancia de las muestras patrón y de ensayo se midió a 450 nm y los resultados se proporcionan en las FIGURAS 14 y 15, respectivamente.

Cuando las subclases de inmunoglobulina se compararon entre sí para actividad de complemento en su fragmento Fc de inmunoglobulina, la afinidad de unión más elevada a C1q se observó en inmunoglobulina humana IgG1 (Fitzgerald), la siguiente en IgG2 (Fitzgerald) y después IgG4 (Fitzgerald), indicando que existe una diferencia entre subclases y actividad de complemento. El IVIG usado en este ensayo, que es una combinación de subclases de IgG, mostró una afinidad de unión de C1q casi igual a la IgG1 purificada debido a que IgG1 asciende a casi la totalidad de IVIG. En comparación con estos patrones, con respecto a cambios en la afinidad de unión a C1q por aglicosilación, Fc de IgG1 que tiene la actividad de complemento más fuerte disminuía de forma marcada cuando estaba aglicosilado. Fc de IgG4, que se conoce que no induce activación de complemento, rara vez tenía afinidad de unión a C1q, indicando que el Fc de IgG4 se usa como un vehículo recombinante excelente sin actividad de complemento (FIGURA 14).

Para determinar si el vehículo mantiene su propiedad de no tener afinidad de unión a C1q incluso después de conjugarse a un péptido fisiológicamente activo, se prepararon conjugados de IFN alfa-Fc usando Fc glicosilado, Fc desglicosilado enzimáticamente y Fc recombinante aglicosilado como vehículo para IFN alfa y se evaluaron para su afinidad de unión a C1q. Un conjugado de IFN alfa acoplado a Fc glicosilado (IFN_α-PEG-Fc: IgG1Fc Glicosilado) mantuvo una afinidad de unión a C1q. Por el contrario, cuando interferón alfa se acoplaba a un Fc desglicosilado usando PNGasa F y otras enzimas, el conjugado resultante (IFN_α-PEG-DGFC: IgG1Fc Desglicosilado) presentaba una afinidad de unión reducida de forma marcada a C1q, que era similar a la del conjugado de Fc aglicosilado obtenido de *E. coli*. Además, cuando el resto de IgG1 del conjugado de interferón alfa acoplado a Fc de IgG1 aglicosilado (IFN_α-PEG-AGFcG1:IgG1Fc Aglicosilado), se intercambió con el resto de IgG4, se observó que el conjugado de interferón resultante (IFN_α-PEG- derivado de FcG4 1:IgG4Fc Aglicosilado) perdía completamente su afinidad de unión a C1q. Cuando el resto de Fc de IgG1 se intercambiaba con el monómero de Fc de IgG4, el conjugado resultante (IFN_α-PEG- derivado de FcG4 2:IgG4Fc Aglicosilado). Estos resultados indican que tales formas del fragmento Fc de IgG4 son útiles como vehículos excelentes que no tienen funciones efectoras de fragmentos de anticuerpo (FIGURA 15).

50 Aplicabilidad industrial

Como se ha descrito en el presente documento anteriormente, la composición farmacéutica de la presente invención aumenta enormemente las semividas en plasma de fármacos. Por otra parte, los conjugados de proteína superan la desventaja más significativa de las formulaciones de acción prolongada convencionales, reduciendo los títulos de fármaco, teniendo de ese modo tiempo de circulación en sangre y actividad *in vivo* superior a albúmina, que previamente se conocía como la más eficaz. Adicionalmente, los conjugados de proteína no tienen riesgo de inducir respuestas inmunes. Debido a estas ventajas, los conjugados de proteínas son útiles para desarrollar formulaciones de acción prolongada de fármacos de proteína. Las formulaciones de acción prolongada de fármacos de proteína de acuerdo con la presente invención son capaces de reducir el dolor de pacientes proveniente de inyecciones frecuentes y de mantener concentraciones en suero de polipéptidos activos durante un periodo de tiempo prolongado, proporcionando de ese modo eficacia farmacéutica de forma estable.

Además, el presente procedimiento de preparación de un conjugado de proteína supera las desventajas de la producción de proteína de fusión mediante manipulación genética, incluyendo el establecimiento difícil de sistemas de expresión, glicosilación diferente a partir de una forma nativa, inducción de respuesta inmune y orientación limitada de fusión de proteína, rendimientos bajos debido a reacciones inespecíficas y problemas de acoplamiento químico tales como toxicidad de compuestos químicos usados como aglutinantes, proporcionando de este modo fácilmente y de forma económica fármacos de proteína con semivida en suero extendida y actividad elevada.

LISTADO DE SECUENCIAS

10 <110> Hanmi Pharm. Co., Ltd.

15 <120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UN FC DE INMUNOGLOBULINA COMO VEHÍCULO

15 <150> KR10-2003-0080299
<151> 13-11-2003

20 <160> 6

20 <170> KopatentIn 1.71

25 <210> 1
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> cebador

30 <400> 1
cgctatgcc agcacctgag ttctggggg gacca 35

35 <210> 2
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> cebador

40 <400> 2
gggggatcct catttaccca gagacagga gaggctcttc to 42

45 <210> 3
<211> 29
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> cebador

50 <400> 3
cggcacctga gttcctgggg ggaccatca 29

55 <210> 4
<211> 69
<212> ADN
<213> Homo sapiens

60 <400> 4

60 **atgaaaaga caatcgcatl tcttcttgc tctatgttcg ttttttctat tgotacaat 60**

gcccagggc 69

<210> 5

ES 2 438 098 T3

<211> 45
<212> ADN
<213> Homo sapiens

5 <400> 5
tctattgcta caaatgccca ggccttcca accattcct tatcc 45

10 <210> 6
<211> 45
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 6
agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tgtaaggga atagg 45

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende el fragmento Fc de inmunoglobulina como un vehículo, en el que dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está unido covalentemente a un fármaco que es un polipéptido fisiológicamente activo a través de un engarce no peptídico, en el que el enlace entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco no es una fusión mediante recombinación genética y en el que el engarce no peptídico está seleccionado entre el grupo que consiste en poli(etilenglicol) (PEG), poli(propilenglicol), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxetilados, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, polivinil éter, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas y ácido hialurónico.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está aglicosilado.
3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está compuesto de uno a cuatro dominios seleccionados entre el grupo que consiste en dominios CH1, CH2, CH3 y CH4.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina incluye además una región bisagra.
5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está seleccionado entre el grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM y combinaciones e híbridos de los mismos.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está seleccionado entre el grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 y combinaciones e híbridos de los mismos.
7. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.
8. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4 aglicosilado humano.
9. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el polipéptido fisiológicamente activo está seleccionado entre el grupo que consiste en hormonas, citoquinas, enzimas, anticuerpos, factores del crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación, vacunas, proteínas estructurales, proteínas de ligando y receptores.
10. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 9, en la que el polipéptido fisiológicamente activo está seleccionado entre el grupo que consiste en hormona de liberación de la hormona del crecimiento, péptido de liberación de la hormona del crecimiento, interferones, receptores de interferón, factores estimulantes de colonias, péptidos similares a glucagón, receptor acoplado a proteína G, interleuquinas, receptores de interleuquinas, enzimas, proteínas de unión a interleuquina, proteínas de unión a citoquina, 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 del crecimiento de metástasis, alfa-1 antitripsina, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador de 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 del crecimiento derivado de plaquetas, factor del crecimiento epitelial, factor del crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimuladora de huesos, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona de liberación de la hormona luteinizante, factores del crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido de liberación de gastrina, factor de liberación de corticotropina, hormona estimulante de tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores, antagonistas de receptores, antígenos de superficie celular, antígenos de vacuna obtenidos de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpo.
11. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el polipéptido fisiológicamente activo está seleccionado entre el grupo que consiste en factor estimulante de colonias, interferón alfa, eritropoyetina humana y fragmento de anticuerpo Fab'.
12. Un procedimiento para mejorar la duración *in vivo* de la acción de un fármaco, que se **caracteriza por** el uso *in vitro* del fármaco como la composición farmacéutica definida en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

FIG. 1

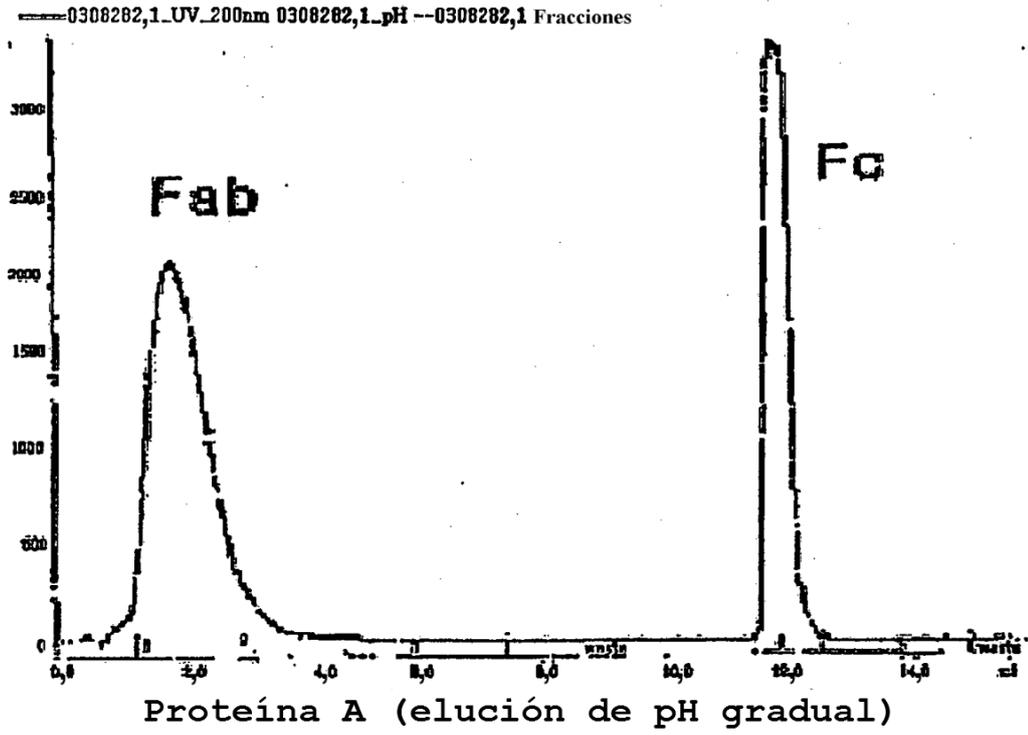


FIG. 2

M IgG Fc

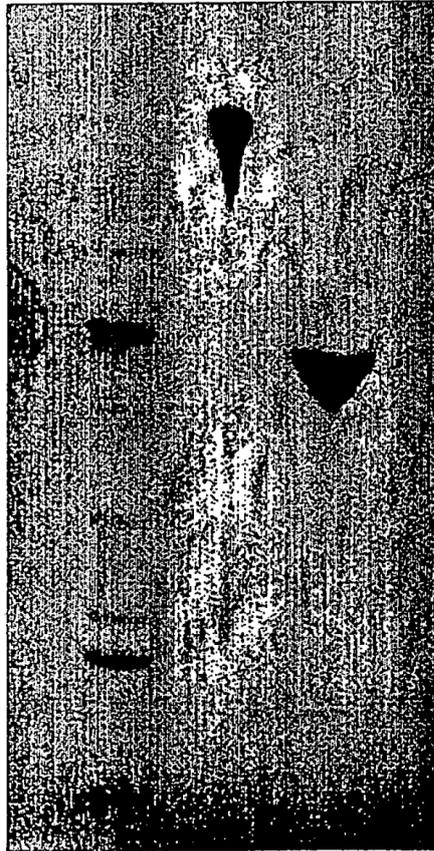
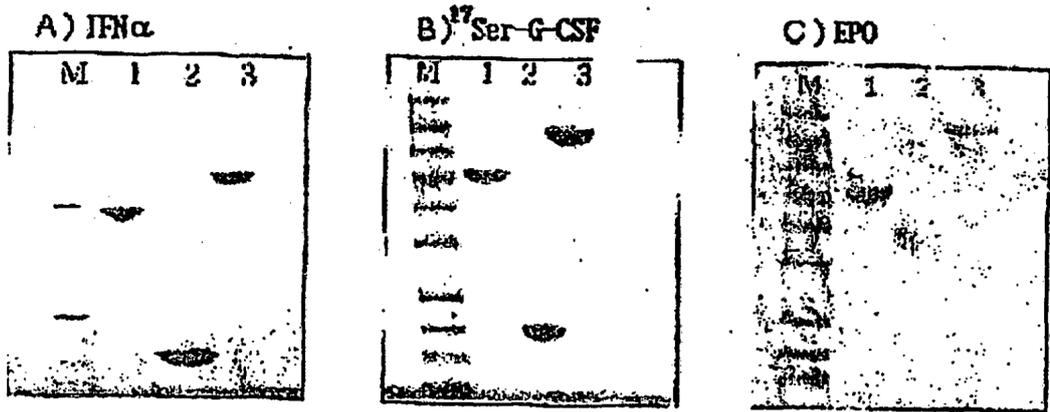


FIG. 3



M: marcador de tamaño molecular
Carril 1: Fc
Carril 2: Proteína fisiológicamente activa
Carril 3: Conjugado de proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc

5

FIG. 4

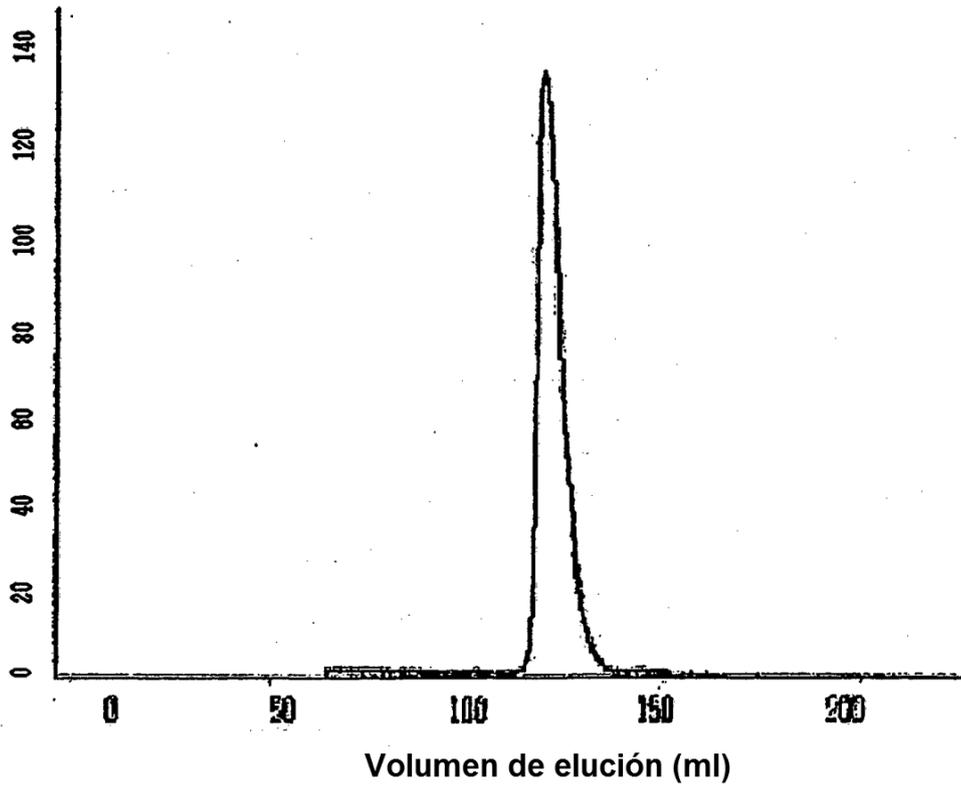


FIG. 5

Espec. Voyager#1⇒BC⇒SM25 [BP=5012.2.2008]

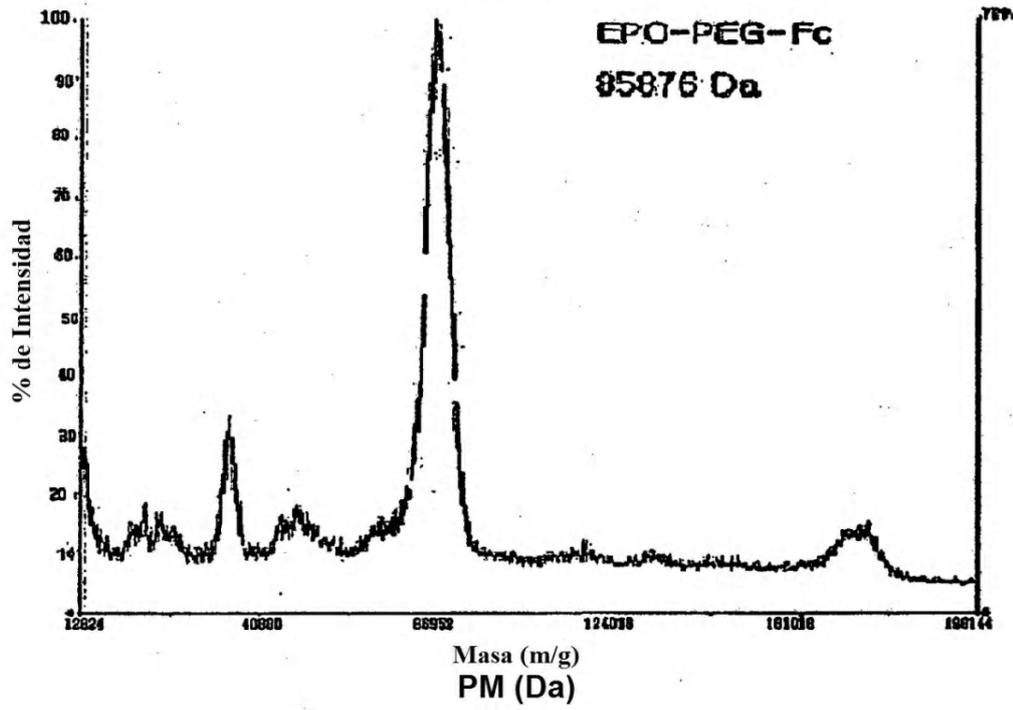


FIG. 6a

Espec. Voyager #1 → BC → RR(2.00) → SM25 (BP-5367.4.4.1478)

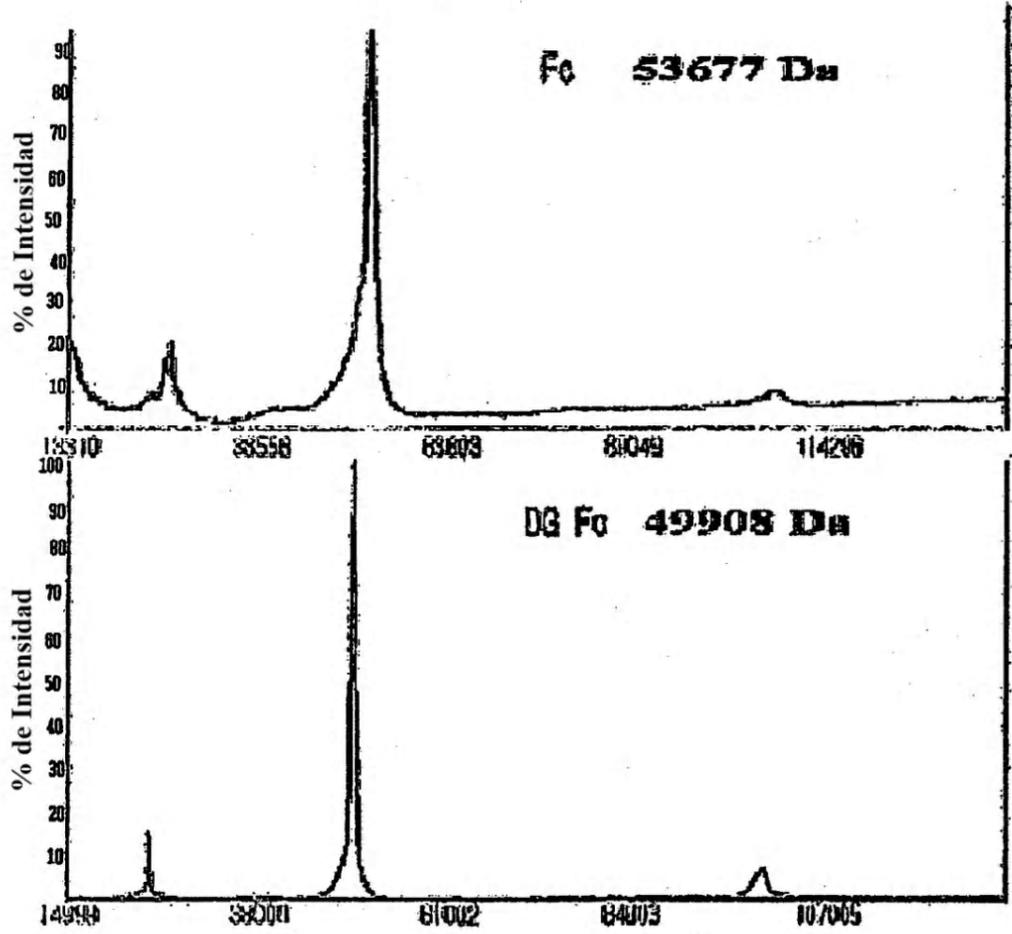


FIG. 6b

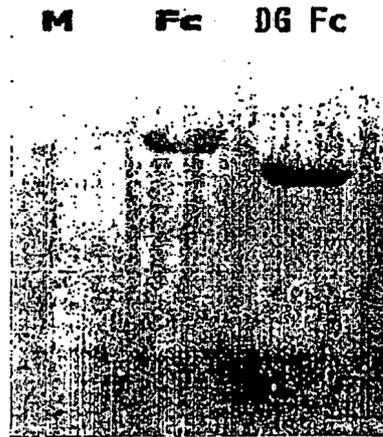


FIG. 7

Espec. #1-BC-NB(2.00)-SM25-SM25 [BP-75945.73551]

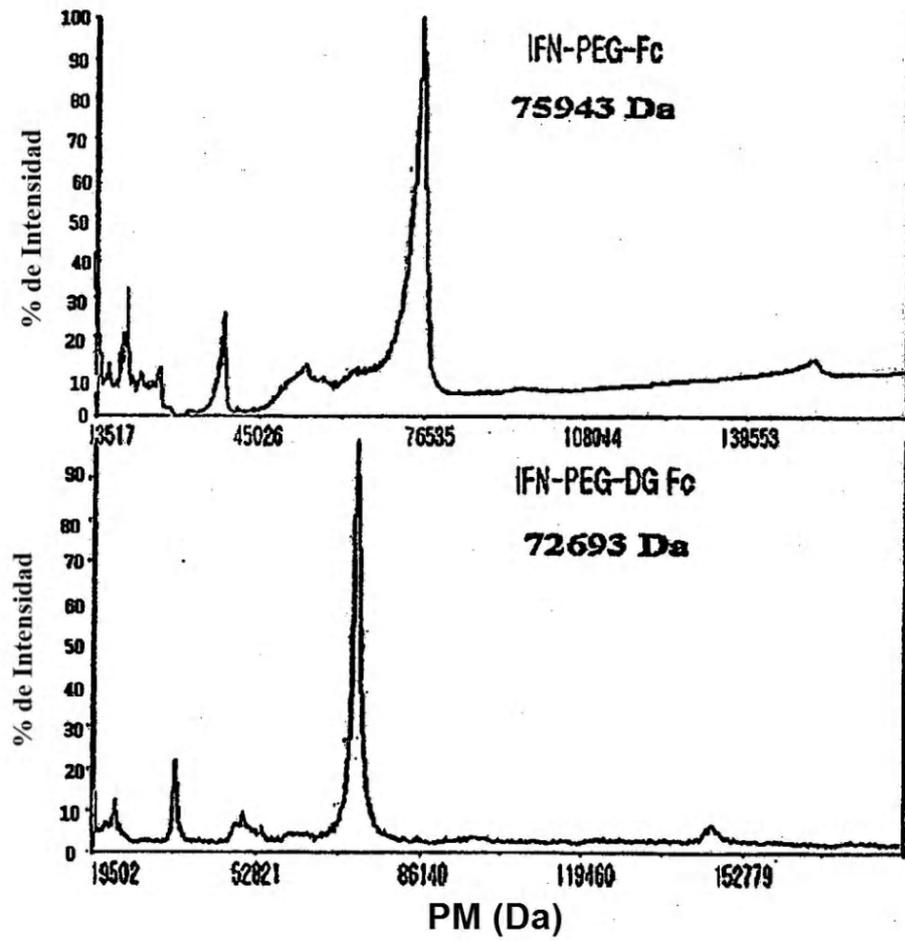


FIG. 8a

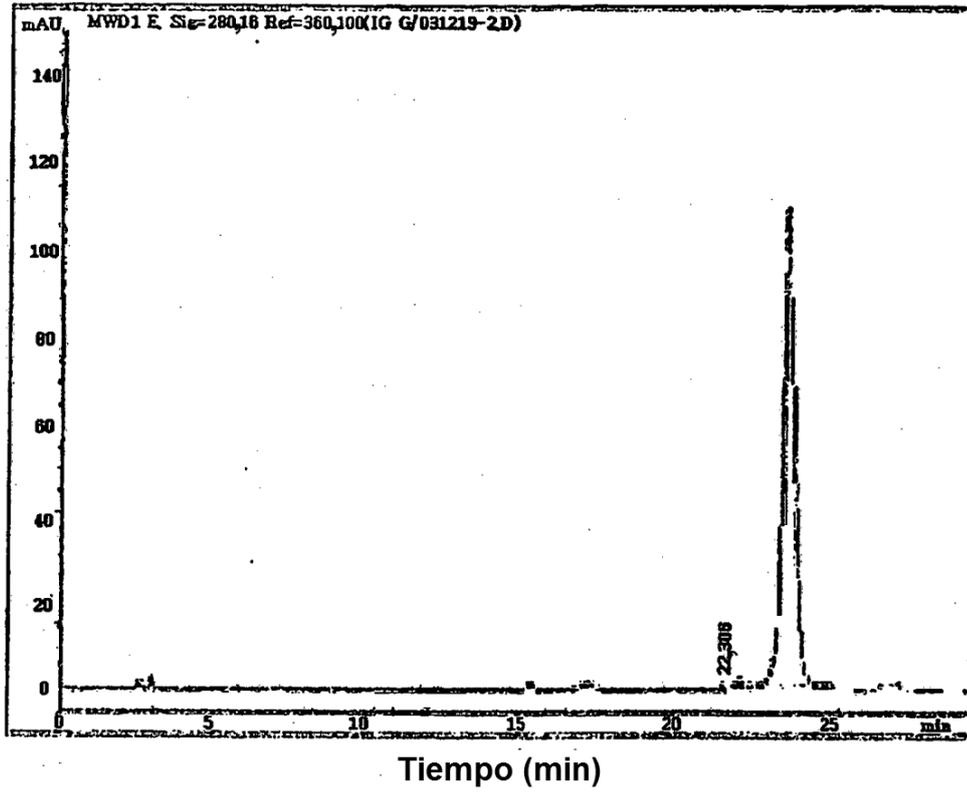


FIG. 8b

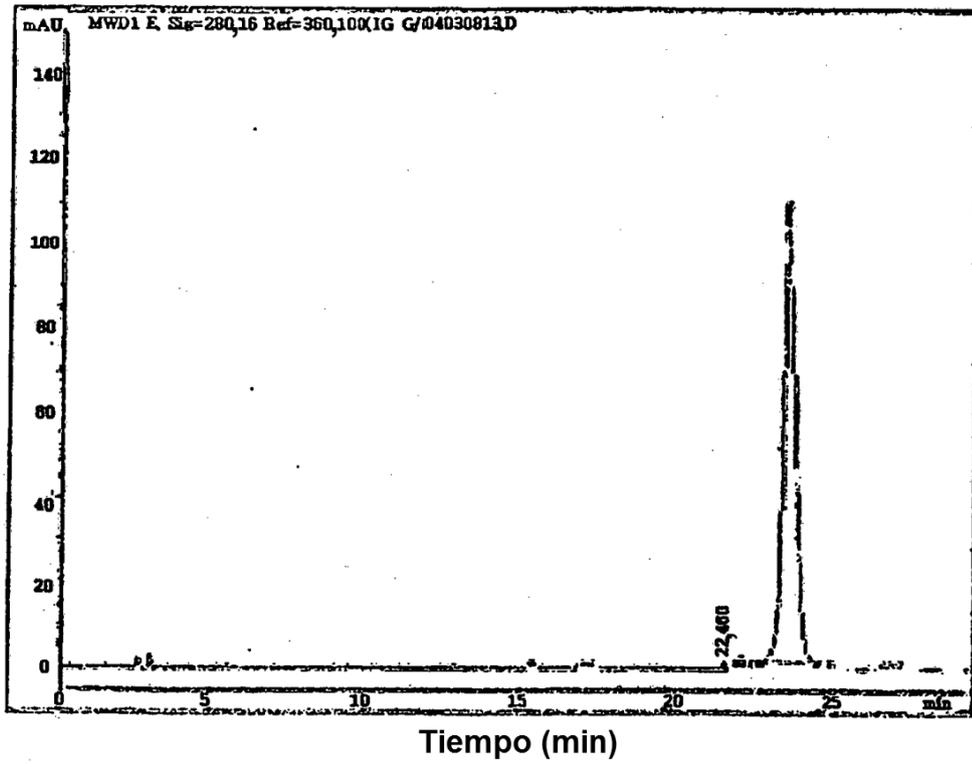


FIG. 8c

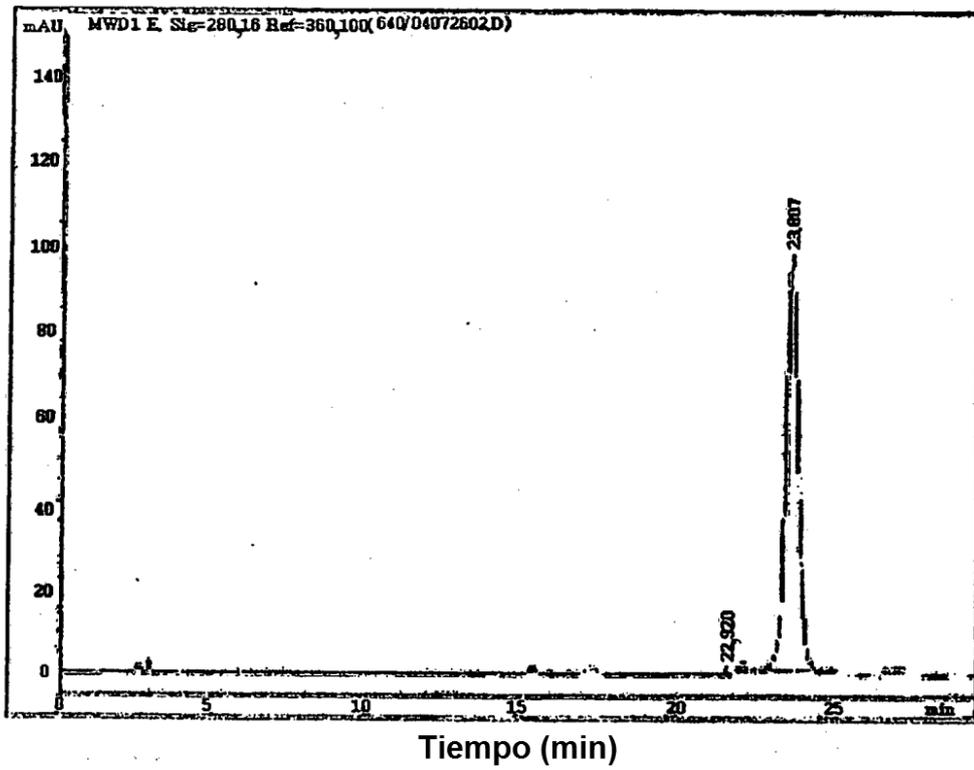


Fig. 9

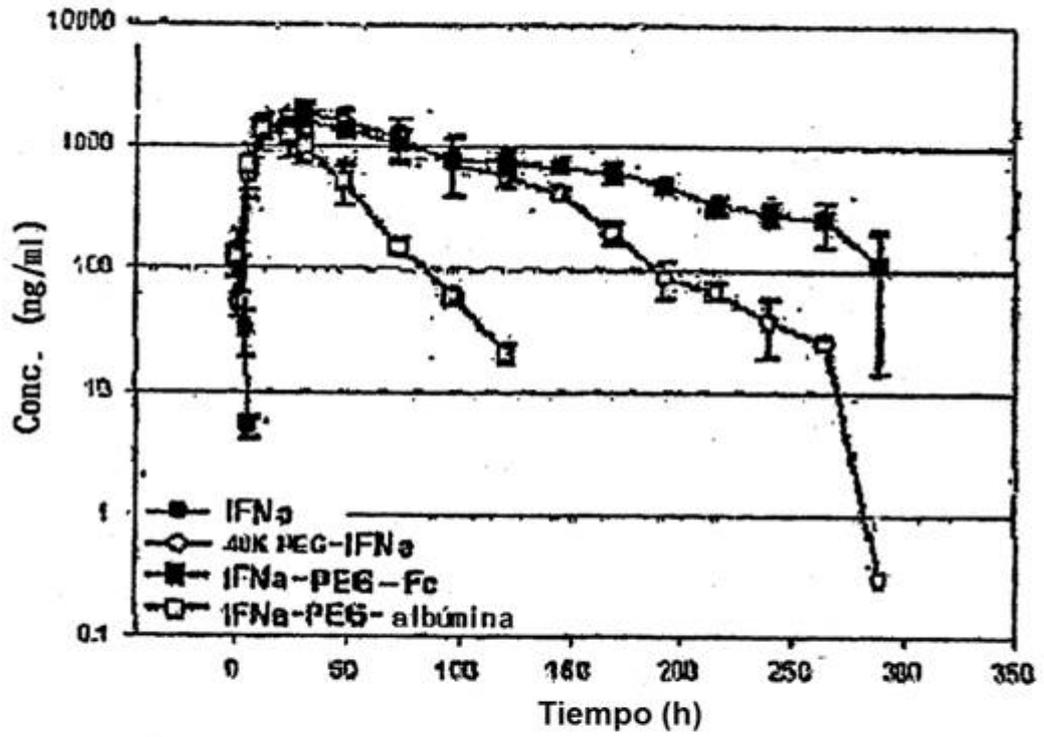


FIG 10

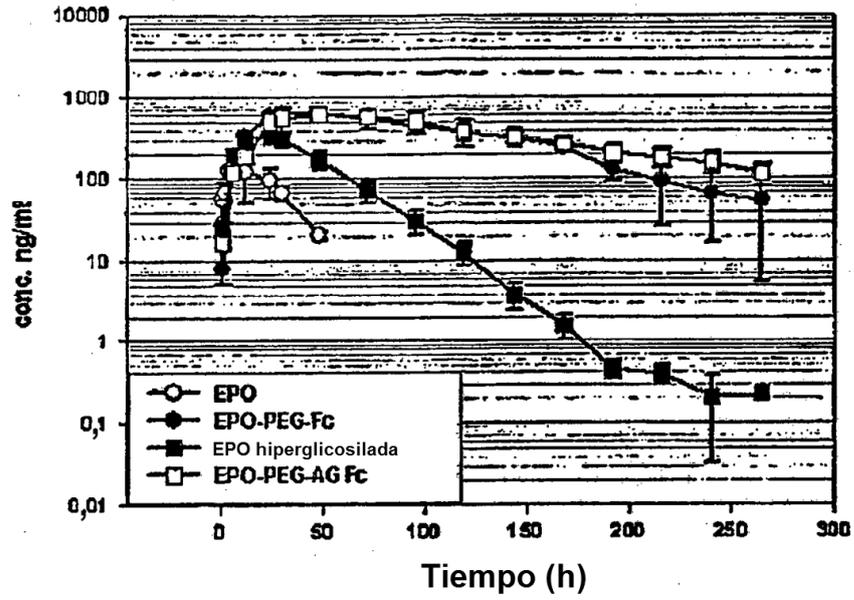


FIG. 11

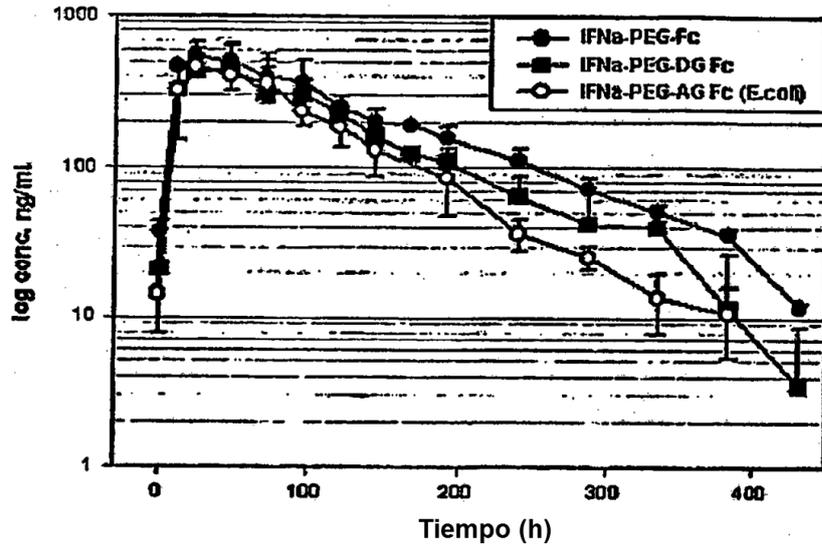


FIG. 12

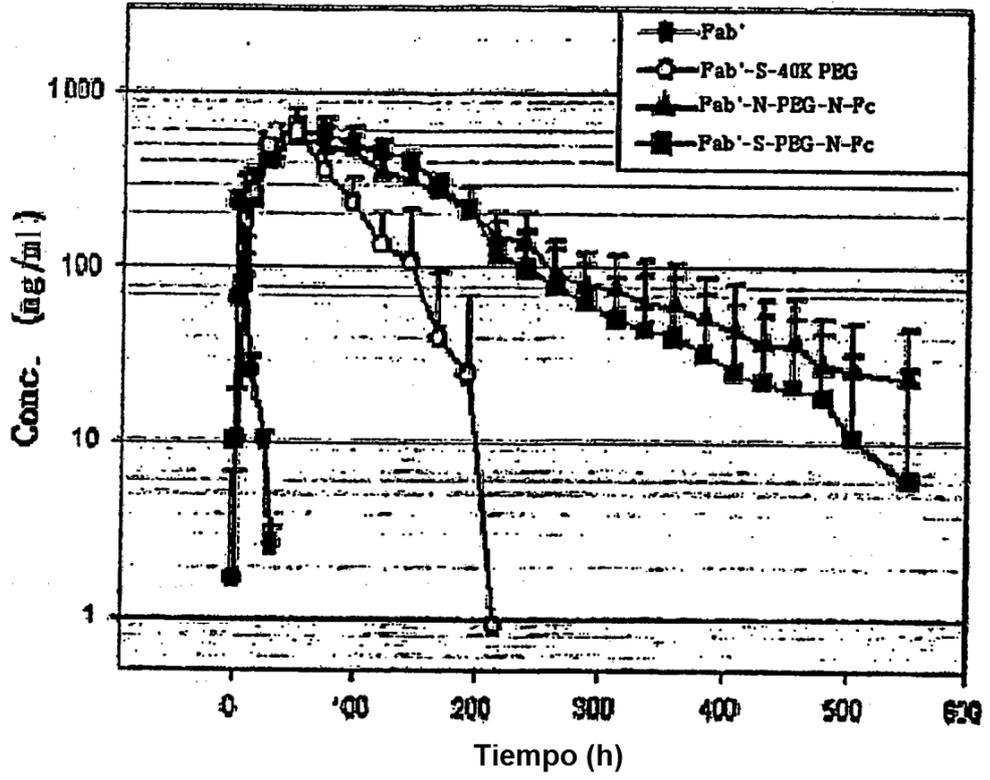


FIG. 13

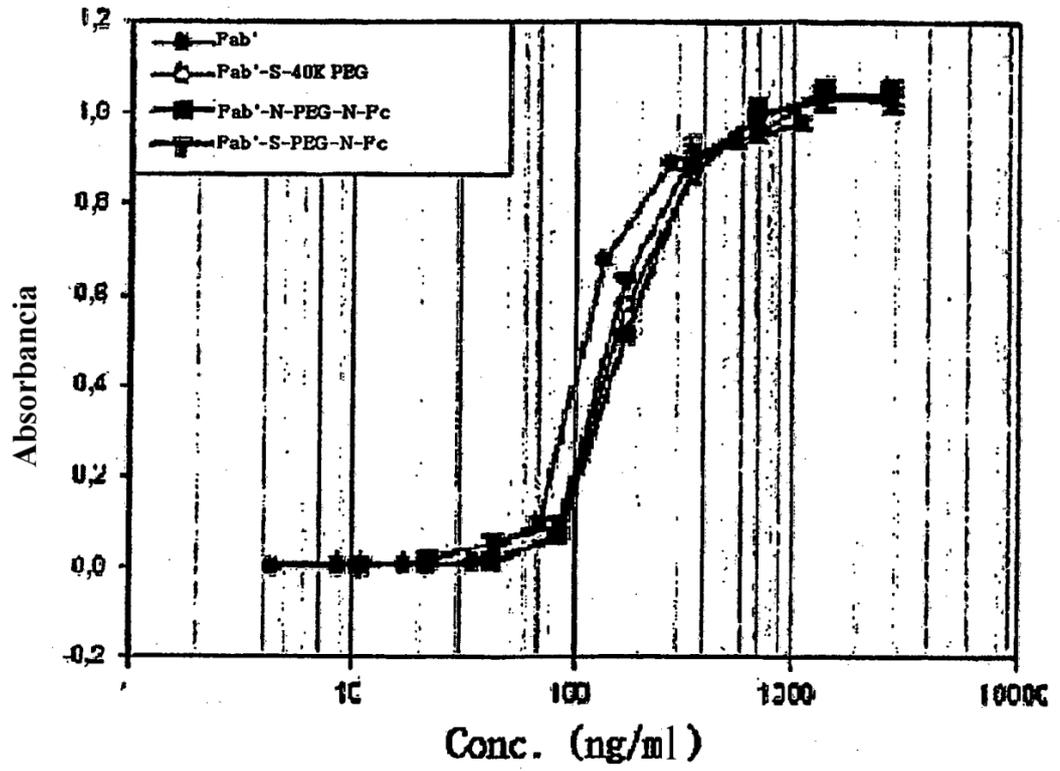


FIG. 14

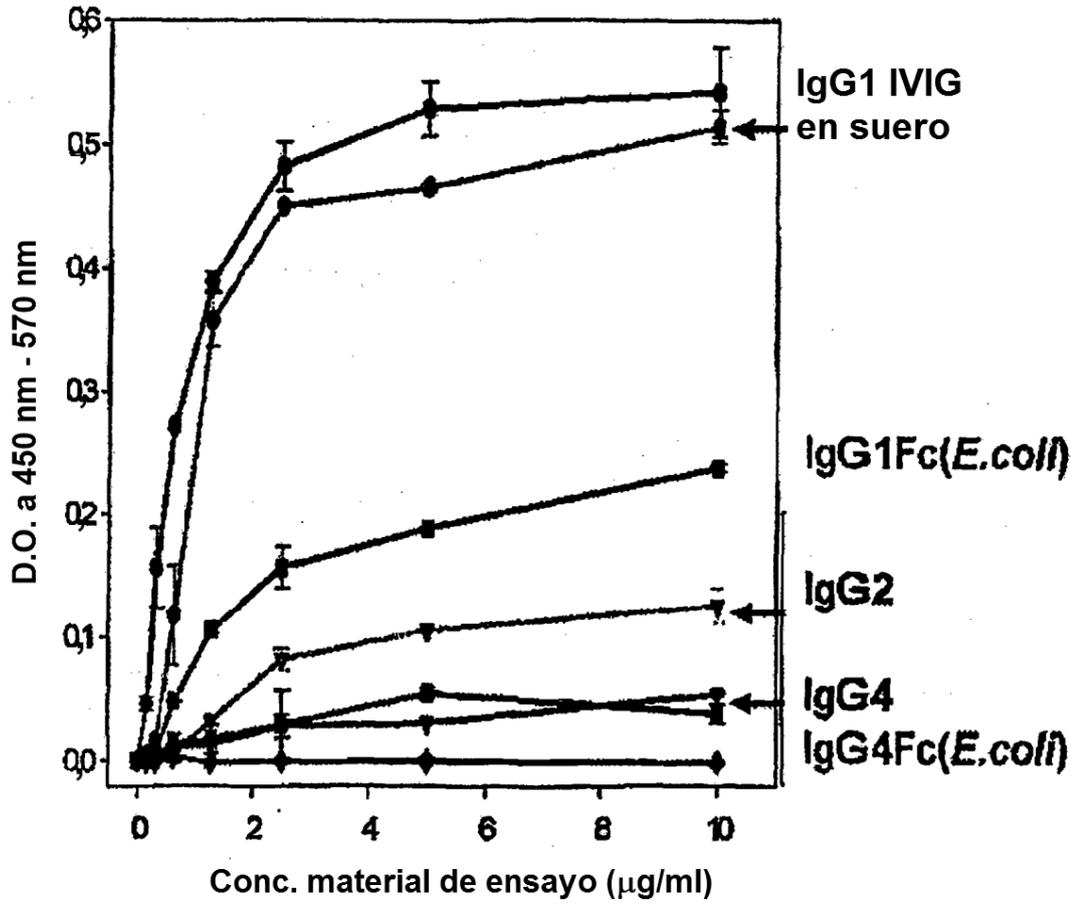


FIG. 15

