

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 454 666**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2004 E 10009129 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2014 EP 2256134**

54 Título: **Fragmento Fc de IgG para un vehículo de fármaco y procedimiento para la preparación del mismo**

30 Prioridad:

13.11.2003 KR 20030080299

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

11.04.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JUNG, SUNG YOUB;
KIM, JIN SUN;
YANG, GEUN HEE;
KWON, SE CHANG y
LEE, GWAN SUN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 454 666 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmento Fc de IgG para un vehículo de fármaco y procedimiento para la preparación del mismo

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un fragmento Fc de IgG útil como vehículo de fármaco polipeptídico, y más en particular, a fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4, combinaciones de los mismos e híbridos de los mismos.

Técnica anterior

10 En el pasado, un gran número de farmacólogos y químicos hicieron esfuerzos para alterar y/o modificar químicamente la actividad in vivo de moléculas fisiológicamente activas, de origen natural. Estos esfuerzos se enfocaron principalmente en incrementar o prolongar determinada actividad in vivo, reducir la toxicidad, eliminar o reducir los efectos secundarios, o modificar actividades fisiológicas específicas de las sustancias fisiológicamente activas. Cuando se modifica químicamente una sustancia fisiológicamente activa, en muchos casos pierde parte o la mayoría de sus actividades fisiológicas.

15 Sin embargo, en algunos casos, la modificación podría dar como resultado un incremento o un cambio en la actividad fisiológica. A este respecto, muchos estudios se han enfocado en la modificación química que puede lograr una actividad fisiológica deseada, y la mayoría de dichos estudios han implicado la unión de forma covalente de una sustancia fisiológicamente activa (fármaco) con un vehículo fisiológicamente aceptable.

20 Por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO 01/93911 emplea un polímero que tiene una pluralidad de restos ácidos como vehículo de fármaco. La publicación de patente internacional n.º WO 03/00778 divulga un grupo aniónico que contiene copolímeros de bloque anfífilicos que, cuando se usa como vehículo de fármaco para un fármaco catiónico, mejora la estabilidad del fármaco. La patente europea n.º 0 681 481 describe un procedimiento de mejora de las propiedades de fármacos básicos usando ciclodextrina y ácidos como vehículos. Por otra parte, los fármacos hidrófobos tienen baja estabilidad in vivo debido principalmente a su baja solubilidad acuosa. Para mejorar la baja solubilidad acuosa de los fármacos hidrófobos, la publicación de patente internacional n.º WO 04/064731 emplea un lípido como vehículo. Sin embargo, hasta la fecha, no hay informes del uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina como vehículo de fármaco.

30 Típicamente, ya que los polipéptidos se desnaturalizan de forma relativamente fácil debido a su baja estabilidad, se degradan por enzimas proteolíticas en la sangre y se eliminan fácilmente a través del riñón o del hígado, los medicamentos de proteínas, incluyendo polipéptidos como componentes farmacéuticamente eficaces, necesitan administrarse con frecuencia a los pacientes para mantener las concentraciones y los títulos del nivel sanguíneo deseados. Sin embargo, esta administración frecuente de medicamentos de proteínas, en especial por medio de inyección causa dolor en los pacientes. Para resolver estos problemas, se han realizado muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en suero de los fármacos con proteínas y para mantener los fármacos en la sangre en niveles altos durante un periodo de tiempo prolongado, y por tanto para maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos. Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas con actividad sostenida necesitan incrementar la estabilidad de los fármacos de proteínas y mantener los títulos en niveles suficientemente altos sin provocar respuestas inmunitarias en los pacientes.

40 Para estabilizar las proteínas y evitar la degradación enzimática y la eliminación por los riñones, se usó de forma convencional un polímero con una alta solubilidad, tal como polietilenglicol (a continuación en el presente documento, denominado simplemente con "PEG"), para modificar químicamente la superficie de un fármaco de proteínas. Al unirse a regiones específicas o determinadas de una proteína diana, el PEG estabiliza la proteína y evita la hidrólisis, sin provocar efectos secundarios graves (Sada et al., J. fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de su capacidad para potenciar la estabilidad de las proteínas, este acoplamiento con PEG tiene problemas tales como la gran reducción del número de títulos de las proteínas fisiológicamente "activas". Además, el rendimiento disminuye con el incremento del peso molecular del PEG debido a la reducción de la reactividad con las proteínas.

45 Recientemente, se han sugerido conjugados de polímero-fármaco de proteína. Por ejemplo, como se describe en la patente los EE. UU. N.º 5.738.846, se puede preparar un conjugado uniendo un fármaco de proteína idéntico en ambos extremos del PEG para mejorar la actividad del fármaco de proteína. Además, como se describe en la publicación de patente internacional n.º WO 92/16221, se pueden unir dos fármacos de proteínas diferentes en ambos extremos del PEG para proporcionar un conjugado que tiene dos actividades diferentes. Los procedimientos anteriores, sin embargo, no fueron muy exitosos en el mantenimiento de la actividad de los fármacos de proteínas.

55 Por otra parte, Kinstler et al. informaron de que una proteína de fusión preparada por acoplamiento del factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) a albúmina humana mostró una mejora en la estabilidad (Kinstler et al., Pharmaceutical Research 12(12): 1883-1888, 1995). En esta publicación, sin embargo, puesto que el fármaco modificado, que tiene una estructura G-CSF-PEG-albúmina, sólo mostró un incremento de aproximadamente cuatro veces en el tiempo de residencia en el cuerpo y un ligero incremento en la semivida en suero en comparación con la administración individual de G-CSF natural, no se ha industrializado como formulación de acción prolongada eficaz para fármacos de proteína.

Un procedimiento alternativo para mejorar la estabilidad in vivo de proteínas fisiológicamente activas es uniendo un gen de proteína fisiológicamente activa a un gen que codifica una proteína que tiene una alta estabilidad sérica por tecnología de recombinación genética y cultivando las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, se puede preparar una proteína de fusión conjugando albúmina, una proteína conocida por ser la más eficaz para potenciar la estabilidad de las proteínas, o su fragmento a una proteína fisiológicamente activa de interés por recombinación genética (publicaciones de patente internacional n.º WO 93/15199 y WO 93/15200, publicación de patentes europea n.º 413.622). Una proteína de fusión de interferón-alfa y albúmina, desarrollada por Human Genome Science Company y comercializada con el nombre comercial 'Albuferon™', incrementó la semivida de 5 horas a 93 horas en monos, pero se supo que era problemática porque disminuyó la actividad in vivo hasta menos de un 5 % del interferón-alfa no modificado (Osborn et al., J. Phar. Exp. Ther. 303(2): 540-548, 2002). No hay informes de una tecnología buena que potencie tanto la duración de acción in vivo como la estabilidad de fármacos de proteína y mantenga la actividad fisiológica in vivo de los fármacos.

Por otra parte, se emplearon inmunoglobulinas y sus fragmentos para potenciar la estabilidad de fármacos de proteínas. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.045.312 divulga un procedimiento de incremento de la actividad de una hormona de crecimiento no modificada conjugando la hormona del crecimiento humano a seroalbúmina o inmunoglobulina de rata usando un agente de reticulación. Además, se han realizado otros intentos de fusionar un fármaco de proteína con un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, se expresaron previamente interferón (publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 2003-9464), y el receptor de interleucina-4, receptor de interleucina-7 o receptor de eritropoyetina (EPO) (patente coreana con número de registro 249572) en mamíferos en una forma fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La publicación de patente internacional n.º WO 01/03737 describe una proteína de fusión que comprende una citocina o un factor de crecimiento unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un enlace peptídico. Además, la patente de los EE. UU. N.º 5.116.964 divulga proteínas fusionadas al extremo amino o carboxilo terminal de un fragmento Fc de inmunoglobulina por recombinación genética. La patente de los EE. UU. N.º 5.349.053 divulga una proteína de fusión que comprende IL-2 fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina por medio de un enlace peptídico.

Otros ejemplos de proteínas de fusión Fc preparadas por recombinación genética incluyen una proteína de fusión de interferón-beta o su derivado y un fragmento Fc de inmunoglobulina (publicación de patente internacional N.º WO 00/23472), y una proteína de fusión de receptor de IL-5 y un fragmento Fc de inmunoglobulina" (patente de los EE. UU. N.º 5.712.121). El documento WO 01/81415 divulga polipéptidos PTH terapéuticos unidos por medio de un enlace peptídico (proteína de fusión) a un fragmento de Fc y también describe el uso de enlazadores poliméricos no peptídicos, tales como PEG para unir un fragmento de Fc a un fármaco. Sin embargo, las técnicas para mejorar la duración de acción para fármacos de polipéptidos fisiológicamente activos usando un fragmento Fc de inmunoglobulina se centran principalmente en el uso del fragmento Fc de inmunoglobulina sólo como un compañero de fusión, y hasta la fecha, no se ha informado de la técnica de uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina como vehículo.

También son conocidas las técnicas que implican la modificación de residuos aminoacídicos de un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 5.605.690 divulga una proteína de fusión TNFR-IgG1 Fc, que se prepara por recombinación genética usando un fragmento Fc de IgG1 con alteraciones de aminoácidos en la región de unión a complemento o la región de unión a receptor.

Sin embargo, dichas proteínas de fusión Fc producidas por recombinación genética tienen las siguientes desventajas: la fusión de proteínas sólo se produce en una región específica de un fragmento Fc de inmunoglobulina, que es un extremo amino o carboxilo terminal; sólo se producen formas homodiméricas y no formas monoméricas; y una fusión sólo podría tener lugar entre las proteínas glucosiladas o entre las proteínas aglucosiladas, y es imposible preparar una proteína de fusión compuesta de una proteína glucosilada y una proteína aglucosilada. Además, una nueva secuencia de aminoácidos creada por la fusión puede desencadenar respuestas inmunitarias, y una región enlazadora puede volverse susceptible a la degradación proteolítica.

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

Divulgación de la invención

Por lo tanto, es un objetivo de la presente invención proporcionar un fragmento G de inmunoglobulina que sea útil como vehículo de fármaco polipeptídico.

Es otro objetivo de la presente invención proporcionar una composición farmacéutica que comprenda un fragmento G de inmunoglobulina.

Breve descripción de los dibujos

El anterior y otros objetivos, características y otras ventajas de la presente invención se comprenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada conjuntamente con los dibujos adjuntos, en los que:

- La FIG. 1 muestra los resultados de bandas western de fragmentos Fc de inmunoglobulina expresada en *E. coli* en condiciones no reductoras;
- Las FIG. 2 y 3 muestran los resultados de SDS-PAGE de fragmentos Fc de inmunoglobulina en condiciones no reductoras y reductoras usando gel Criterion al 15 % (Bio-Rad);
- 5 La FIG. 4 muestra los resultados de cromatografía de un fragmento Fc de inmunoglobulina obtenido por escisión de una inmunoglobulina con papaína;
- La FIG. 5 muestra los resultados de SDS-PAGE de un fragmento Fc de inmunoglobulina purificado (M: marcador de tamaño molecular, carril 1: IgG, carril 2: Fc
- 10 La FIG. 6 muestra los resultados de SDS-PAGE de conjugados IFN α -PEG-Fc (A), ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y EPO-PEG-Fc (C), que se generan por una reacción de acoplamiento (M: marcador de tamaño molecular, carril 1: Fc, carril 2: proteína fisiológicamente activa, carril 3: conjugado proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc);
- La FIG. 7 muestra los resultados de cromatografía de exclusión por tamaño de un conjugado IFN α -PEG-Fc que se purifica después de una reacción de acoplamiento;
- La FIG. 8 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado EPO-PEG-Fc;
- 15 Las FIG. 9a y 9b muestran los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis SDS-PAGE, respectivamente, de una inmunoglobulina Fc natural y una inmunoglobulina Fc desglucosilada (DG Fc) ;
- La FIG. 10 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado IFN α -PEG-Fc y un conjugado IFN α -PEG-DG Fc;
- 20 Las FIG. 11a a 11c muestran los resultados de HPLC de fase inversa de los conjugados IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc y IFN α -PEG-derivado AG Fc recombinante;
- La FIG. 12 es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacocinético de un IFN α natural, un complejo IFN α -40K PEG, un conjugado IFN α -PEG-albúmina y un conjugado IFN α -PEG-Fc;
- La FIG. 13 es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacocinético de una EPO natural, una EPO altamente glucosilada, un conjugado EPO-PEG-Fc y un conjugado EPO-PEG-AG Fc;
- 25 La FIG. 14 es un gráfico que muestra los resultados del análisis farmacocinético de conjugados IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc y IFN α -PEG-AG Fc recombinante;
- La FIG. 15 es un gráfico que muestra la farmacocinética de un Fab', un complejo Fab'-S-40K PEG, un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc;
- 30 La FIG. 16 es un gráfico que muestra las actividades in vivo de Fab', un complejo Fab'-S-40K PEG, un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado Fab'-S-PEG-N-Fc;
- La FIG. 17 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación de las subclases de IgG humana para determinar la afinidad de unión con el complemento C1q; y
- La FIG. 18 es un gráfico que muestra los resultados de la comparación de un Fc glucosilado, un DG Fc enzimáticamente desglucosilado y un conjugado interferón-PEG-vehículo en el que el vehículo es AG Fc producido por *E. coli* para determinar su afinidad de unión con el complemento C1q.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

- En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina G útil como vehículo de fármaco polipeptídico, y más preferentemente fragmentos Fc de IgG2 y Fc IgG4.
- 40 El término "vehículo", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia unida a un fármaco, que típicamente incrementa, disminuye o elimina la actividad fisiológica del fármaco al unirse al fármaco. Sin embargo, con respecto a los objetivos de la presente invención, se emplea un vehículo en la presente invención para minimizar una disminución en la actividad fisiológica de un fármaco de interés, unido al vehículo, mientras se potencia la estabilidad in vivo del fármaco.
- 45 Se estudió un gran número de sustancias, tales como lípidos y polímeros, para determinar su idoneidad como vehículos de fármaco. Sin embargo, se desconocen técnicas que empleen un fragmento Fc de inmunoglobulina como vehículo de fármaco. Esto es, la presente invención se caracteriza por proporcionar en particular un fragmento Fc de IgG entre varias sustancias disponibles como vehículos para mejorar la duración de acción in vivo de un fármaco al que se conjuga el vehículo y minimizar una disminución en la actividad in vivo del fármaco, y más preferentemente fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4.

El término "inmunoglobulina G (a continuación en el presente documento, usado de manera intercambiable con "IgG")", como se usa en el presente documento, quiere decir en conjunto proteínas que participan en la inmunidad protectora del cuerpo actuando de forma selectiva contra antígenos, y se pueden derivar de seres humanos y de animales. Las inmunoglobulinas tienen la siguiente estructura general. Las inmunoglobulinas están compuestas de dos cadenas ligeras idénticas y dos cadenas pesadas idénticas. Las cadenas ligeras y pesadas comprenden regiones variables y constantes. Existen cinco tipos distintos de cadenas pesadas en base a diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: gamma (γ), mu (μ), alfa (α), delta (δ) y epsilon (ϵ), y las cadenas pesadas incluyen las siguientes subclases: gamma 1 ($\gamma 1$), gamma 2 ($\gamma 2$), gamma 3 ($\gamma 3$), gamma 4 ($\gamma 4$), alfa 1 ($\alpha 1$) y alfa 2 ($\alpha 2$). Además, existen dos tipos de cadenas ligeras en base a las diferencias en las secuencias de aminoácidos de sus regiones constantes: los tipos kappa (κ) y lambda (λ) (Coleman et al., *Fundamental Immunology*, 2ª Ed., 1989, 55-73). De acuerdo con las características de las regiones constantes de las cadenas pesadas, las inmunoglobulinas se clasifican en cinco isotipos: IgG, IgA, IgD, IgE y IgM. La IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

Además, se sabe que las inmunoglobulinas generan varios fragmentos estructuralmente diferentes, que incluyen Fab, F (ab'), F (ab')₂, Fv, scFv, Fd y Fc. Entre los fragmentos de inmunoglobulina, Fab contiene las regiones variables de la cadena ligera y la cadena pesada, la región constante de la cadena ligera y la primera región constante (C_{H1}) de la cadena pesada, y tiene un único sitio de unión a antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen la región bisagra que contiene uno o más residuos de cisteína en el extremo C terminal (extremo carboxilo) del dominio Ch1 de cadena pesada. Los fragmentos F (ab')₂ se producen como un par de fragmentos Fab' por puente disulfuro formado entre los residuos de cisteína de las regiones bisagra de los fragmentos Fab'. Fv es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene sólo la región variable de la cadena pesada y la región variable de la cadena ligera. Los fragmentos scFv (Fv monocatenario) comprenden tanto la región variable de la cadena pesada como la región variable de la cadena ligera que están unidos entre sí por un enlazador peptídico y, por tanto, están presentes en una única cadena polipeptídica. Los fragmentos Fd comprenden sólo la región variable y el dominio C_{H1} de la cadena pesada.

Entre los diversos tipos conocidos de inmunoglobulinas y sus fragmentos funcionales y estructurales, como se describe anteriormente, la presente invención se caracteriza proporcionando un fragmento Fc de IgG útil como vehículo de fármaco, y más preferentemente fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4.

El término "fragmento Fc de inmunoglobulina G (a continuación en el presente documento, usado de manera intercambiable con "fragmento Fc de IgG" o "fragmento Fc de la presente invención")", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región constante de cadena pesada 2 (C_{H2}) y la región constante de cadena pesada 3 (C_{H3}) de una inmunoglobulina G, y no las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras, la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}) de la inmunoglobulina G. También puede incluir la región bisagra en la región constante de cadena pesada. Además, el fragmento Fc de IgG de la presente invención puede contener una porción o toda la región constante de la cadena pesada 1 (C_{H1}) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (C_{L1}), excepto para las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras. Además, mientras tenga una función fisiológica sustancialmente similar a o mejor que la proteína natural, el fragmento Fc de IgG puede ser un fragmento con una delección en una porción relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C_{H2} y/o C_{H3}.

El fragmento Fc de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos natural 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 natural debido a una delección, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora o combinaciones de las mismas de uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en un Fc de IgG, se pueden usar residuos de aminoácidos que se sabe que son importantes para la unión, en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331, como diana adecuada para la modificación. Además, son posibles otros derivados diversos, incluyendo uno en el que se elimina una región que puede formar un puente disulfuro, o se eliminan determinados residuos de aminoácidos del extremo N terminal de una forma Fc natural o se añade a la misma un residuo de metionina. Además, para retirar funciones efectoras, se puede producir una delección en un sitio de unión del complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio de ADCC. Se divulgan técnicas de preparación de dichos derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina en las publicaciones de patente internacional n.º WO 97/34631 y WO 96/32478.

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

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

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

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

Además, el fragmento Fc de la presente invención puede estar en una forma que posea cadenas de azúcar naturales, un aumento de cadenas de azúcar en comparación con una forma natural o una disminución de cadenas de azúcar en comparación con la forma natural, o puede estar en una forma desglucosilada. El aumento, la disminución o la retirada de las cadenas de azúcar del fragmento Fc se puede lograr por procedimientos comunes en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética usando un microorganismo. La retirada de cadenas de azúcar de un fragmento Fc da como resultado una disminución pronunciada de la afinidad de unión a la parte de C1q del primer componente del complemento C1 y a una disminución o pérdida de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC), por lo que no se inducen respuestas inmunitarias innecesarias in vivo. A este respecto, un fragmento Fc de inmunoglobulina en forma desglucosilada o aglucosilada puede ser más adecuado para el objetivo de la presente invención como vehículo de fármaco.

Como se evidencia en la FIG. 18, un Fc aglucosilado tiene una actividad de CDC más fuerte que un Fc aglucosilado y por tanto, tiene un riesgo elevado de inducir respuestas inmunitarias. Por tanto, con los objetivos de la presente invención, es preferente un fragmento Fc aglucosilado o desglucosilado. Son más preferentes fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4 aglucosilados, combinaciones de los mismos e híbridos de los mismos.

Tal como se usa en el presente documento, el término "desglucosilación" se refiere a retirar enzimáticamente restos de azúcar de un fragmento Fc, y el término "aglucosilación" quiere decir que se produce un fragmento Fc en forma no glucosilada por un procarionta, preferentemente *E. coli*.

Por otra parte, el término "combinación", como se usa en el presente documento, quiere decir que los polipéptidos que codifican fragmentos Fc de inmunoglobulina monocatenarias del mismo origen se unen a un polipéptido monocatenario de origen diferente para formar un dímero o multímero. Esto es, se puede formar un dímero o un multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

El término "híbrido", como se usa en el presente documento, quiere decir que, en un Fc de inmunoglobulina monocatenaria están presentes secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de origen diferente. En la presente invención, son posibles diversos tipos de híbridos. Esto es, los dominios híbridos pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4, y pueden incluir la región bisagra.

Por otra parte, como se muestra en los dibujos adjuntos de la presente invención, las fig. 17 y 18, entre las diversas subclases de IgG, IgG4 tiene la afinidad de unión más baja para el complemento C1q. La disminución en la afinidad de unión al complemento da como resultado una disminución en o una retirada de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), y por tanto, no se inducen in vivo respuestas inmunitarias innecesarias. Los fragmentos Fc de IgG2 e IgG4 tiene una afinidad de unión más débil para C1q que IgG1, y el fragmento Fc de IgG4 tiene la actividad más débil. Por lo tanto, para usar como vehículo de fármaco, el fragmento Fc unido a un fármaco tiene preferentemente actividades de función efectora más débiles tales como ADCC y CDC, con respecto a los objetivos de la presente invención, son preferentes los fragmentos Fc de IgG2 y Fc de IgG4, es más preferente el fragmento Fc de IgG4, y los más preferentes son los fragmentos Fc que tienen las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs. 8, 10 y 23.

La presente invención describe un gen que codifica un fragmento Fc de IgG, preferentemente genes que codifican fragmentos Fc de IgG2 e IgG4, y más preferentemente genes que codifican las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NOs. 8, 10 y 23. Un gen de este tipo que codifica el Fc de la presente invención incluye una secuencia de nucleótidos natural y derivados de secuencia de la misma. Un derivado de secuencia de nucleótidos quiere decir que posee una secuencia diferente por una delección, una inserción, una sustitución conservadora o no conservadora en uno o más residuos de nucleótidos de una secuencia de nucleótidos natural, o combinaciones de la misma.

En la presente invención, un gen que codifica un fragmento de Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 8 es preferentemente un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 4. Un gen que codifica un fragmento de Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 10 es preferentemente un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 9. Un gen que codifica un fragmento de Fc que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 23 es preferentemente un gen que tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 22.

Las secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos Fc de la presente invención se pueden alterar por una sustitución, una delección o una inserción de una o más bases, o combinaciones de las mismas. Las secuencias de nucleótidos se pueden aislar de forma natural o se pueden sintetizar de forma artificial, o se pueden preparar por un procedimiento de recombinación genética.

- 5 Las secuencias de nucleótidos que codifican los fragmentos Fc de la presente invención se proporcionan por vectores que los expresan.

La presente invención describe un vector recombinante que comprende un fragmento Fc de IgG.

10 El término "vector", como se usa en el presente documento, quiere decir un vehículo para introducir una molécula de ADN en una célula huésped para expresar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El vector útil en la presente invención incluye vectores plasmídicos, vectores cósmidos, vectores bacteriófagos, y vectores víricos tales como vectores de adenovirus $\alpha 3$, vectores de retrovirus y vectores de virus adeno-asociados. El vector plasmídico es preferente. Con respecto a los objetivos de la presente invención, un vector de expresión puede incluir elementos reguladores de expresión, tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de detención, una señal de poliadenilación y un potenciador, y una secuencia señal para dirección a o secreción de membrana.

15 El término "secuencia señal", como se usa en el presente documento, se refiere a una secuencia de aminoácidos específica que permite el transporte y la secreción de una proteína al exterior del citosol. Son conocidos varios tipos de estas secuencias señal en la técnica, pero, puesto que la presente invención usa preferentemente *E. coli* como célula huésped, la secuencia señal de la presente invención es preferentemente una secuencia señal derivada de *E. coli*, que posee una proteína secretora de *E. coli*. Ejemplos de secuencias señal derivadas de *E. coli* incluyen alcalino fosfatasa, penicilinas, Ipp, enterotoxina resistente al calor II, LamB, PhoE, PelB, OmpA y proteína de unión a maltosa. Lo más preferentemente es enterotoxina resistente al calor II.

25 Por otra parte, se considera que los codones de iniciación y detención son, en general, una porción de una secuencia de nucleótidos que codifican una proteína diana inmunógena, es necesario que sean funcionales en un individuo al que se le ha administrado una construcción genética, y deben estar en marco con la secuencia codificante. En general, los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Los ejemplos no limitantes de promotores disponibles en células procariontas incluyen promotores lac, tac, T3 y T7. Los ejemplos no limitantes de promotores disponibles en células eucariotas incluyen el promotor de virus de simio 40 (SV40), promotor del virus de tumor mamario de ratón (MMTV), promotor del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) tal como el promotor de repetición terminal larga VIH (LTR), promotor del virus de Moloney, promotor del citomegalovirus (CMV), promotor del virus de Epstein-Barr (EBV),
30 promotor del virus de sarcoma de Rous (RSV), así como promotores de genes humanos tales como β -actina humana, hemoglobina humana, creatina muscular humana y metalotioneína humana. Además, los vectores de expresión incluyen un marcador seleccionable que permite la selección de células huésped que contienen el vector, y los vectores de expresión replicables incluyen un origen de replicación. En general, se usan genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos como marcadores seleccionables. El gen β -lactamasa (resistencia a ampicilina) y el gen Tet (resistencia a tetraciclina) se pueden usar en células procariontas, y los genes resistentes a neomicina (G418 o Geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina e higromicina se pueden usar en células eucariotas. El gen marcador de dihidrofolato reductasa se puede seleccionar para metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican productos génicos, de marcadores auxotróficos de huéspedes, por ejemplo, LEU2, URA3 y HIS3, se usan a menudo como marcadores seleccionables en levaduras. Además, están disponibles virus (por ejemplo, vaculovirus) o vectores de fagos, y vectores que se pueden integrar en el genoma de células huésped, tales como los vectores de retrovirus.

35 Para preparar un fragmento Fc de IgG que coincida con los objetivos de la presente invención, se usa un vector, que lleva un gen que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 8, 10 o 23. En la presente invención, que usa pT14SISH-4T20V22Q (patente coreana n.º 38061) como vector de iniciación, se construyen los siguientes dos vectores: pSTIIIdCG2Fc que lleva un gen designado como SEQ ID No. 22 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 23, y pSTIIIdCG4Fc que lleva un gen designado como SEQ ID No. 4 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 8. Además, al realizar una PCR usando el plásmido pSTUdCG4Fc, se obtiene un gen designado como SEQ ID No. 9 que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 10, el gen tiene una delección en la región bisagra requerida para la formación de dímero a partir de un gen amplificado por la PCR, y a continuación
50 se construye un vector pSTIIIG4Mo que lleva el gen.

La presente invención describe un transformante transformado con el vector recombinante.

55 Puesto que los niveles de expresión y la modificación de proteínas varían dependiendo de las células huésped, se puede seleccionar la célula huésped más adecuada de acuerdo con el uso destinado. Las células huésped disponibles incluyen, pero sin limitarse a, células procariontas tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis* o *Staphylococcus*. Además, como células huésped son útiles células eucariotas inferiores, tales como hongos (por ejemplo, *Aspergillus*) y levaduras (por ejemplo, *Pichia pastoris*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces*, *Neurospora crassa*), células de insectos, células vegetales, y células derivadas de eucariotas incluyendo mamíferos. Sin embargo, puesto que el fragmento Fc de inmunoglobulina está ventajosamente en forma aglucosilada con respecto a los objetivos de la presente invención, son preferentes las células huésped

procariotas, y en particular, E. coli es lo más preferentemente.

En la presente invención, "transformación" y/o "transfección" en células huésped incluye cualquier procedimiento por el que se puedan introducir ácidos nucleicos en organismos, células, tejidos u órganos, y, como se conoce en la técnica, se puede llevar a cabo seleccionando técnicas estándar adecuadas de acuerdo con las células huésped. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, electroporación, fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio (CaPO₄), precipitación con cloruro de calcio (CaCl₂), y agitación con fibra de carburo de silicio, transformación mediada por agrobacterias, y transformación mediada por PEG, sulfato de dextrano, lipofectamina y desecación/inhibición. Por ejemplo, el tratamiento de calcio usando cloruro de calcio o electroporación se usa, en general en células procariotas (Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)). Se usa la transfección usando Agrobacterium tumefaciens para la transformación de células vegetales específicas (Shaw et al., 1983, gen, 23:315; publicación de patente internacional n.º WO 89/05859). Para células de mamífero que no tienen paredes celulares, se puede usar precipitación con fosfato de calcio (Graham et al, 1978, Virology, 52:456-457). Los procedimientos y características generales de transformación en células huésped de mamífero se describen en la patente de los EE. UU. No. 4.399.216. Típicamente, la transformación en levaduras se lleva a cabo con los procedimientos descritos por Van Solingen et al., J. Bact., 1977, 130:946, y Hsiao et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 1979, 76:3829.

Los vectores de expresión de acuerdo con la presente invención se transforman en células huésped, y los transformantes resultantes de la presente invención se designan como HM10932 (transformante introducido por pSTIIIdCG4Fc), HM10933 (transformante introducido por pSTIIIdG4Mo) y HM10936 (transformante introducido por pSTIIIdCG2Fc).

La presente invención describe un procedimiento de preparación de un fragmento de inmunoglobulina, que comprende cultivar un transformante transformado con un vector que puede expresar un fragmento Fc de IgG, y preferentemente un fragmento Fc de IgG2 o Fc de IgG4, o una combinación de los mismos o un híbrido de los mismos, en condiciones adecuadas.

En el procedimiento de preparación del fragmento de inmunoglobulina, se puede llevar a cabo el cultivo del transformante usando un medio adecuado en condiciones de cultivo adecuadas, que son conocidas en la técnica. Este procedimiento de cultivo se puede ajustar fácilmente de acuerdo con las cepas seleccionadas por los expertos en la técnica.

El fragmento de inmunoglobulina de la presente invención, obtenido cultivando el transformante, se puede usar en forma purificada, o se puede usar después de purificarse con purezas altas usando varios procedimientos generales, por ejemplo, diálisis, precipitación salina y cromatografía. Entre ellos, la cromatografía se usa más comúnmente. Ya que no se puede aplicar ninguna regla a cualquier caso en la selección del tipo y secuencia de las columnas de uso, se puede seleccionar la cromatografía de acuerdo con las propiedades y el procedimiento de cultivo de las proteínas diana de los anticuerpos, por ejemplo, de cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía por afinidad y cromatografía en columna por afinidad de proteína-A. En modos de realización preferentes de la presente invención, el fragmento de inmunoglobulina se purifica usando una columna de afinidad de proteína-A, una columna SP sepharose FF, y similares.

Cuando el fragmento Fc así obtenido está en su forma libre, se puede convertir en una forma salina por un procedimiento conocido *per se* o un procedimiento modificado. Por el contrario, cuando se obtiene una forma salina, la sal se puede convertir en la forma libre u otra sal por un procedimiento conocido *per se* o un procedimiento modificado. Además, el fragmento Fc como se produce por un transformante se puede tratar antes o después de la purificación con una enzima modificadora de proteína apropiada para la modificación arbitraria o retirada de polipéptido parcial. Los ejemplos de la enzima modificadora de proteína útil en la presente invención incluyen tripsina, quimotripsina, arginina endopeptidasa, proteína cinasa y glucosidasa.

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

El término "fármaco conjugado" o "conjugado", como se usa en el presente documento, quiere decir que uno o más fármacos se unen con uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina.

El término "fármaco", como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia polipeptídica que presenta una actividad terapéutica cuando se administra a seres humanos o animales.

Los términos "polipéptido fisiológicamente activo", "proteína fisiológicamente activa", "polipéptido activo" "fármaco de polipéptido" y "fármaco de proteína", como se usan en el presente documento, son intercambiables en sus significados, y se caracterizan por que están en una forma fisiológicamente activa que presenta varias funciones fisiológicas in vivo.

El fármaco de polipéptido tiene la desventaja de no poder mantener una acción fisiológica durante un periodo de tiempo largo debido a su propiedad de desnaturalizarse o degradarse fácilmente por enzimas proteolíticas presentes en el cuerpo. Sin embargo, cuando el fármaco de polipéptido se conjuga con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la

5 presente invención para formar un conjugado, el fármaco presenta un incremento en la estabilidad estructural y en la semivida de degradación. Además, el polipéptido conjugado al fragmento Fc tiene una disminución mucho más pequeña en su actividad fisiológica que otras formulaciones de fármacos de polipéptidos conocidas. Por lo tanto, en comparación con la biodisponibilidad in vivo de los fármacos de polipéptidos convencionales, el conjugado del polipéptido y el fragmento Fc de acuerdo con la presente invención se caracteriza por tener una mejora marcada en su biodisponibilidad in vivo. Esto también se describe claramente por medio de modos de realización de la presente invención. Esto es, cuando se unen al fragmento Fc de la presente invención, IFN α , G-CSF, hGH y otros fármacos de proteína presentaron un incremento de aproximadamente dos a seis veces en la biodisponibilidad in vivo en comparación con sus formas convencionales conjugadas a PEG solo o tanto a PEG como a albúmina (tablas 8, 9 y 10).

10 Por otra parte, el enlace de una proteína y el fragmento Fc de la presente invención se caracteriza por que no es una fusión por un procedimiento de recombinación convencional. Se obtiene una forma de fusión del fragmento Fc de inmunoglobulina y un polipéptido activo usado como fármaco por un procedimiento de recombinación de tal modo que el polipéptido está unido al extremo N terminal o al extremo C terminal del fragmento Fc, y por tanto se expresa y se pliega como un polipéptido individual de una secuencia de nucleótidos que codifica la forma fusionada.

15 Esto provoca una disminución brusca en la actividad de la proteína de fusión resultante debido a que la actividad de una proteína como sustancia fisiológicamente funcional se determina por la conformación de la proteína. Por lo tanto, cuando se fusiona un fármaco de polipéptido con Fc por un procedimiento de recombinación, no hay efectos con respecto a la biodisponibilidad in vivo aún cuando la proteína de fusión ha incrementado la estabilidad estructural. Además, puesto que a menudo una proteína de fusión de este tipo está mal plegada y por tanto se expresa como cuerpos de inclusión, el procedimiento de fusión no es económico en el rendimiento de la producción y el aislamiento de proteínas. Además, cuando la forma activa de un polipéptido está en forma glucosilada, de debe expresar el polipéptido en células eucariotas. En este caso, el Fc también está glucosilado, y esta glucosilación puede provocar respuestas inmunitarias inadecuadas in vivo.

20 Esto es, sólo la presente invención hace posible la producción de un conjugado de un polipéptido activo glucosilado y un fragmento Fc de inmunoglobulina aglucosilado, y supera todos los problemas anteriores, incluyendo la mejora en el rendimiento de la producción de proteína, debido a que dos componentes del complejo se preparan y se aíslan individualmente por los mejores sistemas.

25 Los ejemplos no limitantes de fármacos de proteína que se pueden conjugar con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención incluyen hormona del crecimiento humano, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferones (por ejemplo, interferón- α , - β y - γ , receptor de interferón tipo I soluble en agua, etc.), factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), péptidos tipo glucagón (por ejemplo, GLP-1, etc.), receptor acoplado a proteína G, interleucinas (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, factor activador plaquetario acetilhidrolasa, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucina y citocina (por ejemplo, IL-18bp, proteína de unión a TNF, etc.), factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, alfa-lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factor VII, factor VIIa, factor VIII, factor IX, factor XIII, factor activador de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, urocinasa, estreptocinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado plaquetario, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angioestatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimuladora ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conectivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona estimuladora de folículo, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de axogénesis 1, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado glial, netrina, factor inhibidor neurotrófico, factor neurotrófico, neuturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento tipo insulina, hormona adrenocorticoide, glucagón, colecistocinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimuladora tiroidea, autotaxina, lactoferrina, mioestatina, receptores (por ejemplo, TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor del factor de activación de linfocitos B, etc.), antagonistas de receptores (por ejemplo, ILI-Ra etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ y Fd), y antígenos de vacuna derivados de virus. Un fragmento de anticuerpo puede ser Fab, Fab', F(ab')₂, Fd o scFv, que se puede unir a un antígeno específico, y preferentemente Fab'.

60 En particular, son preferentes como polipéptidos fisiológicamente activos los que requieren una dosificación frecuente después de su administración al cuerpo para tratamiento o prevención de enfermedades, que incluyen hormona del crecimiento humano, interferones (interferón- α , - β , - γ , etc.), factor estimulador de colonias de granulocitos,

eritropoyetina (EPO) y fragmentos de anticuerpos. Además, se incluyen determinados derivados en el alcance de los polipéptidos fisiológicamente activos de la presente invención siempre que tengan una función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idéntica a o mejorada en comparación con las formas naturales de los polipéptidos fisiológicamente activos. En la presente invención, el fármaco de polipéptido más preferente es interferón-alfa.

5 El enlazador es un enlazador no peptídico. Este enlazador es poli(etilenglicol) (PEG).

El conjugado de la presente invención, fragmento Fc-fármaco o fragmento Fc-enlazador-fármaco, se prepara en varias proporciones molares. Esto es, el número de fragmento Fc y/o enlazador unido a un único fármaco de polipéptido no está limitado. Sin embargo, preferentemente, en el conjugado de fármaco de la presente invención, el fármaco y el fragmento Fc se conjugan entre sí en una proporción molar de 1:1 a 10:1, y preferentemente de 1:1 a 2:1.

10 Además, se pueden unir entre sí el fragmento Fc de la presente invención, un enlazador de PEG y un determinado fármaco en un determinado sitio del fármaco. Por otra parte, se pueden unir entre sí el fragmento Fc de la presente invención y un fármaco de polipéptido en un extremo N terminal o C terminal, y preferentemente en un grupo libre, y se forma fácilmente un enlace covalente entre el fragmento Fc y el fármaco en especial en un extremo amino terminal, un grupo amino de un residuo de lisina, un grupo amino de un residuo de histidina, o un residuo de cisteína libre.

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

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

25 Por otra parte, el conjugado del fragmento Fc novedoso de la presente invención y un fármaco puede ofrecer un determinado número de composiciones farmacéuticas.

El término "administración", como se usa en el presente documento, quiere decir la introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente por un procedimiento adecuado determinado. El conjugado de la presente invención se puede administrar por medio de cualquiera de las rutas comunes, siempre que pueda alcanzar un tejido deseado. Se contemplan una variedad de modos de administración, incluyendo administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración ejemplificados. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren después de su administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deberían estar recubiertos o formulados para su protección frente a la degradación en el estómago.

30 Preferentemente, se puede administrar la presente composición en forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención se puede administrar usando un determinado aparato que pueda transportar los ingredientes activos al interior de la 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 dispersantes, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes colorantes y perfumes. Para preparaciones inyectables, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir agentes tamponadores, agentes conservantes, analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos y estabilizantes. Para preparaciones para administración tópica, el vehículo farmacéuticamente aceptable puede incluir bases, excipientes, lubricantes y agentes de conservación. La composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en una variedad de formas de dosificación en combinación con los vehículos farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para su administración oral, la composición farmacéutica se puede formular como comprimidos, pastillas para chupar, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u 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 forma de dosificación de dosis individual. La composición farmacéutica también se puede formular como soluciones, suspensiones, comprimidos, pastillas, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

40 45 50

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 arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir también cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, emulsionantes y antisépticos.

55

Una dosificación sustancial de un fármaco en combinación con el fragmento Fc de la presente invención como

vehículo se puede determinar por varios factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades que se van a tratar, vías de administración, la edad del paciente, género, peso y gravedad de la enfermedad, así como por los tipos del fármaco como componente activo. Puesto que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una duración de acción muy larga in vivo, tiene la ventaja de reducir en gran medida la frecuencia de administración de los fármacos farmacéuticos.

Se puede obtener una mejor comprensión de la presente invención por medio de los siguientes ejemplos, que se exponen para ilustrar, pero no deben interpretarse como límite de la presente invención.

Ejemplos

Preparación de fragmentos Fc de inmunoglobulina

10 Ejemplo 1: Construcción del vector de expresión de Fc de inmunoglobulina IgG4 humana

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

Para clonar un gen que codifica la región de Fc de inmunoglobulina IgG4 humana, se llevó a cabo una RT-PCR usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde, como sigue. En primer lugar, se aisló ARN total de aproximadamente 6 ml de sangre usando un kit para sangre Qiamp RNA (Qiagen), y se realizó la amplificación génica usando el ARN total como molde y un kit de RT-PCR de una etapa (Qiagen). Para obtener una secuencia génica deseada, se usó un par de cebadores representados por SEQ ID NOs. 1 y 2. SEQ ID NO. 1 es una secuencia de nucleótidos que empieza desde el 10º residuo, serina, de 12 residuos aminoacídicos de la región bisagra de IgG4 (Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro: SEQ ID NO. 3: SEQ ID NO. 2 se diseñó para tener un sitio de reconocimiento BamHI que contiene un codón de detención. Se identificó el gen amplificado que usa el conjunto de cebadores por tener la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO. 4 y contener un extremo amino terminal, comenzando con la secuencia Ser-Cys-Pro de la región bisagra de una secuencia génica de Fc de IgG4 de longitud completa, y los dominios CH2 y CH3. Para clonar el fragmento génico de Fc de IgG4 amplificado en un vector de expresión que contiene una secuencia señal de E. coli, se usó un vector de expresión pT14SISH-4T20V22Q (patente coreana n.º 38061), desarrollado previamente por los presentes inventores, como vector de iniciación. Este vector de expresión contiene un derivado de secuencia señal de enterotoxina resistente al calor de E. coli que tiene la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO. 5. Para facilitar la clonación, se insertó un sitio de reconocimiento StuI en un extremo del derivado de la secuencia señal de enterotoxina resistente al calor de E. coli del plásmido pT14SISH-4T20V22Q por medio de mutagénesis dirigida a sitio usando un par de cebadores representados por SEQ ID NOs. 6 y 7 para inducir mutagénesis para introducir el sitio StuI en una secuencia de nucleótidos que codifican el último residuo aminoacídico de la secuencia señal. Se identificó esta inserción del sitio StuI por ser exitosa para la secuenciación de ADN. El plásmido pT14SISH-4T20V22Q resultante que contiene un sitio StuI se diseñó como "pmSTII". Se trató el plásmido prnSTII con StuI y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un gran fragmento (4,7 kb), que contiene el derivado de secuencia señal de enterotoxina resistente al calor de E. coli. A continuación, se digirió el fragmento de gen de Fc de IgG4 amplificado con BamHI y se ligó con el vector de expresión linealizado, proporcionando así un plásmido pSTIIIdCG4Fc. Este vector expresa una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8 y está presente en una forma dimérica por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en la región bisagra. Se transformó el vector de expresión final en BL21 (DE3) de E. coli, y el transformante resultante se designó como "BL21/pSTIIIdCG4Fc (HM10932)", que se depositó en Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se le asignó el número de acceso KCCM-10597.

40 <1-2> Construcción del vector de expresión de Fc de IgG4 monomérico

Para clonar un fragmento Fc de IgG4 que se va a expresar en una forma monómera, se llevó a cabo una PCR usando un par de cebadores representados por SEQ ID NOs. 9 y 2 y se preparó el plásmido pSTIIIdCG4Fc en el apartado <1-1> anterior como molde. Para permitir que un gen amplificado se exprese en una forma monómera, se designó la PCR para que un producto de PCR tenga una delección en la región bisagra requerida para la formación del dímero de la secuencia de Fc de IgG4, y por tanto, sólo se amplificaron los dominios CH2 y CH3 de Fc de IgG4 Fc. Se clonó el producto de PCR en un vector de expresión, pmSTII, de acuerdo con el mismo procedimiento del apartado <1-1> anterior, proporcionando así un plásmido pSTIIIG4Mo. Se transformó este vector de expresión en BL21 (DE3) de E. coli, y se designó el transformante resultante como "BL21/pSTIIIG4Mo (HM10933)", que se depositó en Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se le asignó el número de acceso KCCM-10598. Una proteína expresada por el vector de expresión tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 10, y se expresa a partir del dominio CH2 y está presente en forma monómera ya que no tiene región bisagra.

Ejemplo 2: Construcción del vector de expresión de Fc de inmunoglobulina IgG1 humana

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

Para clonar un gen que codifica la región Fc de IgG1 humana, se llevó a cabo la RT-PCR de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado <1-1> del ejemplo 1 usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde usando un kit de RT-PCR en una etapa (Qiagen). Para obtener una secuencia génica deseada, se usó un par de cebadores representados por SEQ ID NOs. 11 y 12.

SEQ ID NO. 11 es una secuencia de nucleótidos que empieza desde el 13º residuo, prolina, de 15 residuos aminoácidos de la región bisagra (Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro: SEQ ID NO. 13).

5 Se descubrió que el gen amplificado usando el par de cebadores representado por SEQ ID NOs. 11 y 12 contiene un extremo amino terminal que empezaba con la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra y los dominios CH2 y CH3, entre una secuencia génica de Fc de IgG1 de longitud completa, y tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 14.

10 Para clonar el gen de Fc de IgG1 amplificado en un vector de expresión que contiene la secuencia señal de E. coli, se usó el vector pmSTII mencionado anteriormente. De acuerdo con un procedimiento de clonación similar al del apartado <1-1> del ejemplo 1, se trató el plásmido pmSTII con Stul y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un gran fragmento (4,7 kb), que contiene el derivado de secuencia señal de enterotoxina resistente al calor de E. coli. A continuación, se digirió el gen de Fc de IgG1 amplificado con BamHI y se ligó con el vector de expresión linealizado, proporcionando así el pSTIIIdCGIFc. Este vector expresa en una célula huésped una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 15 y está presente en una forma dimérica por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en la región bisagra. Se transformó el vector de expresión final en BL21 (DE3) de E. coli, y se designó el transformante resultante como "BL21/pSTIIIdCGIFc (HM10927)", que se depositó en Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se le asignó el número de acceso KCCM-10588.

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

20 Para preparar un fragmento Fc de IgG1 que se va a expresar en una forma monómera, se llevó a cabo una PCR usando un par de cebadores representados por SEQ ID NOs. 16 y 12 y se preparó el plásmido pSTIIIdCG1Fc en el apartado <2-1> del ejemplo 2 como molde. Se clonó el producto PCR en un vector de expresión, pmSTII, de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado <2-1> del ejemplo 2, proporcionando así un plásmido pSTIIIG1Mo que contiene la secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID No. 17. Se transformó este vector de expresión en BL21 (DE3) de E. coli, y se designó el transformante resultante como "BL21/pSTIIIG1Mo (HM10930)", que se depositó en Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se le asignó el número de acceso KCCM-10595. Una proteína expresada por el vector de expresión se expresa a partir del dominio CH2 y se presenta en forma monómera ya que se eliminó de la región bisagra que contiene los residuos de cisteína permitiendo la formación del dímero, y tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID No. 18.

Ejemplo 3: Construcción del vector de expresión de Fc de inmunoglobulina IgG2 humana

30 Para clonar un gen que codifica la región Fc de IgG2 humana, se llevó a cabo la RT-PCR de acuerdo con el mismo procedimiento que en el apartado <1-1> del ejemplo 1 usando ARN aislado de células sanguíneas humanas como molde usando un kit de RT-PCR de una etapa (Qiagen). Para obtener una secuencia génica deseada, se usó un par de cebadores representados por SEQ ID NOs. 19 y 20. SEQ ID NO. 19 es una secuencia de nucleótidos que empieza desde el 10º residuo, prolina, de 12 residuos aminoácidos de la región bisagra (Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro: SEQ ID NO. 21: Se identificó que el gen amplificado usando el par de cebadores representado por SEQ ID NOs. 19 y 20 contiene un extremo amino terminal, que empieza con la secuencia Pro-Cys-Pro de la región bisagra de una secuencia génica de Fc de IgG2 de longitud completa, y los dominios CH2 y CH3, y tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID No. 22. Para clonar el fragmento del gen de Fc de IgG2 amplificado en un vector de expresión que contiene la secuencia señal de E. coli, se usó el vector pmSTII mencionado anteriormente. De acuerdo con un procedimiento de clonación similar al del apartado <1-1> del ejemplo 1, se trató el plásmido pmSTII con Stul y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un gran fragmento (4,7 kb), que contiene el derivado de secuencia señal de enterotoxina resistente al calor de E. coli. A continuación, se digirió el fragmento del gen de Fc de IgG1 amplificado con BamHI y se ligó con el fragmento del vector de expresión linealizado, proporcionando así el pSTIIIdCG2Fc. Este vector expresa en una célula huésped una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 23 y está presente en una forma dimérica por enlaces disulfuro entre residuos de cisteína en la región bisagra. Se transformó el vector de expresión final en BL21 (DE3) de E. coli, y se designó el transformante resultante como BL21/pSTIIIdCG2Fc (HM10936).

Ejemplo 4: Expresión y purificación de inmunoglobulina Fc

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

50 Se inocularon individualmente los transformantes bacterianos preparados en los ejemplos 1, 2 y 3 en un fermentador (Marubishi Company) y se dejó que fermentaran, y se evaluaron para determinar si expresan los fragmentos de Fc de inmunoglobulina.

55 En primer lugar, se hizo crecer cada transformante en 100 ml de medio LB con agitación durante la noche y se inoculó en el fermentador para un cultivo a gran escala. Se mantuvo el fermentador a 30 °C o 35 °C. Para evitar la conversión de un entorno aerobio a uno anaerobio, se airearon los cultivos con 20 vvm de aire y se agitó a 500 rpm. Para compensar la insuficiencia de nutrientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, se complementaron los cultivos con glucosa y extractos de levaduras 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 en una cantidad de 20 µM a 4 mM para inducir la expresión de proteínas. Se cultivaron los cultivos adicionalmente durante de 40 a 45 h hasta que

el valor de DO a 600 nm se incrementó hasta de 100 a 120.

La expresión del Fc de inmunoglobulina en los transformantes de *E. coli* y los sitios expresados, solubilidad en agua y formación de dímeros del Fc de Ig expresado se examinaron como sigue. Para determinar si se secreta un producto expresado al fluido de fermentación o al espacio periplásmico de *E. coli* por la secuencia señal fusionada al vector de expresión, se centrifugó el fluido de fermentación para obtener un fluido de fermentación libre de células y se recogen las células. El fluido de fermentación libre de células y la solución de espacio periplásmico obtenida por choque osmótico de las células recogidas se sometieron a análisis de bandas western. Como resultado, se detectó una cantidad más pequeña de Fc de inmunoglobulina. Para investigar la expresión intracelular de Fc de Ig, se rompieron las células usando un ultrasonicador (Misonix Company). Se centrifugó el lisado celular resultante para separar las sustancias solubles en agua de las sustancias insolubles en agua, y se sometieron las sustancias solubles en agua a análisis de bandas western, como sigue. Se mezclaron las sustancias solubles en agua con un tampón de muestra de proteína que no contenía un agente reductor tal como DTT o β -mercaptoetanol, y se separaron en un gel SDS-PAGE al 15 % (Criterion Gel, Bio-Rad). A continuación, se transfirieron las proteínas en una membrana de nitrocelulosa y se detectó con un anticuerpo anti-Fc humano conjugado con HRP (Sigma). Como se muestra en la fig. 1, se sobreexpresó el Fc de inmunoglobulina en forma soluble en agua y se localizó en el citosol de *E. coli*. Además, los productos, expresados por transformantes transformados con vectores de expresión que expresan Fc de Ig con una porción de una región bisagra, se expresaron como dímeros. En la FIG. 1, los carriles 1, 2 y 3 muestran productos expresados en HM10927, HM10932 y HM10936, respectivamente, y el carril 4 muestra el Fc generado por tratamiento con papaína de inmunoglobulinas producidas en células animales, que mostró un tamaño ligeramente mayor debido a sus restos de azúcar en el gel SDS-PAGE que los producidos en *E. coli*.

<4-2> Análisis de secuencia N terminal

Los fragmentos Fc de Ig diméricos solubles en agua, que estaban localizados en el citosol de *E. coli* como se demostró en el apartado <4-1> anterior, se designaron para traducirse en forma fusionada a una secuencia señal. Por tanto, para determinar si los fragmentos de Fc de Ig están localizados en el citosol de *E. coli* en forma fusionada a la secuencia señal cuando no se secretan sin procesamiento de la secuencia señal, se determinaron las secuencias de aminoácidos N terminales de los fragmentos Fc de Ig por el Basic Science Research Institute, Seoul, Corea. Las muestras usadas en el análisis de secuencia de aminoácidos N terminal se prepararon como sigue.

En primer lugar, se sumergió una membrana de PVDF (Bio-Rad) en metanol durante aproximadamente 2-3 s para activarse, y se humedeció suficientemente con un tampón de bloqueo (glicina 170 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), metanol al 20 %). Las muestras de proteína separadas en un gel SDS-PAGE no reductor, preparadas en el apartado <4-1> anterior, se sometieron a transferencia de bandas sobre una membrana de PVDF durante aproximadamente una hora usando un kit de transferencia de bandas (Hoefer Semi-Dry Transfer unit, Amersham). Las proteínas transferidas sobre la membrana de PVDF se tiñeron con un colorante de proteína, Coomassie Blue R-250 (Amresco), durante 3-4 s, y se lavaron con una solución de decoloración (agua:ácido acético:metanol =5: 1: 4). A continuación, se cortaron las regiones que contienen las proteínas de la membrana con tijeras y se sometieron a análisis de secuencia N terminal.

Como resultado, se descubrió que la proteína de Fc de IgG1 tenía una secuencia N terminal de Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Leu-Leu-Gly-Gly, la proteína de Fc de IgG4 tenía una secuencia N terminal de Ser-Cys-Pro-Ala-Pro-Glu-Phe-Leu-Gly-Gly, y la proteína de Fc de IgG2 tenía una secuencia N terminal de Pro-Cys-Pro-Ala-Pro-Pro-Val-Ala-Gly-Pro. Como es evidente de estos resultados, se descubrió que los fragmentos Fc expresados por los transformantes de *E. coli* de la presente invención tienen una secuencia N terminal exacta. Estos resultados indican que, cuando se expresan en una forma fusionada a una secuencia señal, los fragmentos Fc no se secretan a la membrana extracelular o al espacio periplásmico, se procesan de forma precisa en la secuencia señal aún después de la sobreexpresión y están presentes en una forma soluble en agua en el citosol.

<4-3> Purificación de Fc de inmunoglobulina

Se purificó el Fc de inmunoglobulina usando una columna de afinidad e proteína A conocida por tener una fuerte afinidad con inmunoglobulinas, como sigue.

Se rompieron células de *E. coli* recogidas centrifugando fluidos de fermentación por un microfluidizador (Microfluidics) para obtener lisados celulares. Los lisados celulares se sometieron a una cromatografía en columna en dos etapas para purificar los fragmentos de Fc de inmunoglobulina recombinante presentes en el citosol. Se equilibraron 5 ml de una columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) con PBS, y se cargaron los lisados celulares en la columna a un caudal de 5 ml/min. Se separaron por lavado las proteínas no unidas con PBS, y se eluyeron las proteínas unidas con citrato 100 mM (pH 3,0). Se desalaron las fracciones recogidas usando una columna de desalado HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). A continuación, se llevó a cabo una cromatografía en columna de intercambio aniónico secundaria usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Se cargaron las fracciones de Fc de inmunoglobulina recombinante purificadas primarias en la columna Q-Sepharose HP 26/10, y se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0,2 M en tampón Tris 10 mM (pH 8,0), proporcionando así fracciones altamente puras. Después de purificarse parcialmente usando la columna de afinidad de proteína A, se determinaron los niveles de expresión de los fragmentos Fc de Ig recombinante como sigue.

Vectores de expresión	Transformantes	Niveles de expresión de proteína después de la purificación de proteína A (mg/l)
pSTIIdCG1Fc	HM10927	400
pSTIIG1Mo	HM10930	500
pSTIIdCG4Fc	HM10932	400
pSTIIG4Mo	HM10933	600
pSTIIdCG2Fc	HM10936	100

Puesto que las proteínas de Fc de inmunoglobulina así obtenidas están presentes una forma monómera o dimérica de la cadena pesada, tienen patrones de migración diferentes en SDS-PAGE reductor y SDS-PAGE no reductor. Los resultados del análisis SDS-PAGE, realizado para determinar las perezas de proteína después de purificar los productos expresados, se dan en las FIG. 2 y 3

5 Las FIG. 2 y 3 muestran los resultados del análisis SDS-PAGE de los fragmentos Fc de inmunoglobulina purificados en forma monómera o dimérica en condiciones reductoras y no reductoras usando un gel Criterion (Bio-Rad), en el que se evaluaron los fragmentos Fc para determinar la migración diferencial en geles reductores frente a no reductores. En la FIG. 2, la región A muestra proteínas separadas en un gel SDS-PAGE no reductor, y la región B muestra proteínas en un gel SDS-PAGE reductor. El carril M indica un marcador de proteína estándar de bajo intervalo preteñido (Bio-Rad), y los carriles 1 a 4 indican muestras de proteínas para Fc de inmunoglobulina producidas por transformantes de *E. coli*, HM10927, HM10928 (depositado en Korean Culture Center of Microorganisms (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y asignado con el número de acceso KCCM-10589), HM10929 (depositado en KCCM el 15 de septiembre de 2004 y asignado con el número de acceso KCCM-10594) y HM10932, respectivamente. Como se muestra en la FIG. 2, en el SDS-PAGE reductor, los fragmentos Fc de Ig estaban presentes en forma monómera ya que se redujeron los enlaces disulfuro formados entre los residuos de cisteína de la región bisagra, y por tanto migraron a la distancia monómera. En contraste, en el SDS-PAGE no reductor, los fragmentos Fc de Ig estaban presentes en forma dimérica por enlaces disulfuro y por tanto tenían una distancia de migración de aproximadamente 42 kDa.

En la FIG. 3, la región A muestra proteínas separadas en un gel SDS-PAGE no reductor, y la región B muestra proteínas en un gel SDS-PAGE reductor. El carril M indica el marcador de proteína estándar, y los carriles 1 y 2 indican muestras de proteínas para Fc de inmunoglobulina producido por transformantes de *E. coli*, HM10930 y HM10933, respectivamente. Como se muestra en la FIG. 3, las proteínas no mostraron una gran diferencia en la migración en geles reductores frente a no reductores, y sólo presentaron una migración ligeramente diferente debido a la reducción de enlaces disulfuro intramoleculares.

Preparación del conjugado de inmunoglobulina Fc y fármaco

25 Ejemplo 5: Preparación I del conjugado IFN α -PEG-fragmento Fc de inmunoglobulina

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

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

<Etapa 2> Preparación del complejo IFN α -PEG

Se mezcló polietilenglicol 3,4 kDa con un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), con interferón alfa-2b humano (hIFN α -2b, MW: 20 kDa) disuelto en tampón fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml en una proporción molar IFN α : PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla, se le añadió un agente reductor, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃, Sigma), a una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionaran a 4 °C durante 3 h agitación suave para dejar que el PEG se una al extremo amino terminal del interferón alfa. Para obtener

un complejo 1:1 de PEG e interferón alfa, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia). Se eluyó el complejo IFN α -PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se retiraron el interferón alfa no unido a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dímeros donde PEG se unió a dos moléculas de interferón alfa. Se concentró el complejo purificado IFN α -PEG hasta 5 mg/ml. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para IFN α con respecto a PEG, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

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

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

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

Después de la reacción de la etapa 3 anterior, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión por tamaño Superdex para eliminar sustancias que no han reaccionado y subproductos y para purificar el conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc producido. Después de que la mezcla de reacción se concentrara y se pasara en una columna Superdex, se pasó tampón fosfato 10 mM (pH 7,3) a través de la columna en un caudal de 2,5 ml/min para retirar el Fc no unido y las sustancias que no han reaccionado, seguido de la elución de la columna para recoger las fracciones de conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc. Puesto que las fracciones de conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc recogidas contenían una pequeña cantidad de impurezas, Fc sin reaccionar y dímeros de interferón alfa, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico para retirar las impurezas. Se cargaron las fracciones de conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc en una columna PolyCAT LP (PolyLC) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), y se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en un tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M. Finalmente, se purificó el conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc usando una columna de intercambio aniónico. Se cargaron las fracciones de conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc en una columna PolyWAX LP (PolyLC) equilibrada con Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), y a continuación se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0,3 M en Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) usando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc en una forma altamente pura.

Ejemplo 6: Preparación II del conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc

<Etapa 1> Preparación del complejo Fc-PEG

Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa con un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), con el fragmento Fc de inmunoglobulina preparado en la etapa 1 del ejemplo 5 en las proporciones molares 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 fosfato 100 mM en una cantidad de 15 mg/ml. A esta mezcla, se le añadió un agente reductor, NaCNBH₃ (Sigma), a una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionaran a 4 °C durante 3 h agitación suave. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y Fc, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia). Se eluyó el complejo Fc-PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se retiraron el fragmento Fc de inmunoglobulina no unido a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dímeros donde PEG se unió a dos moléculas de fragmento Fc de inmunoglobulina. Se concentró el complejo purificado Fc-PEG hasta aproximadamente 15 mg/ml. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar de reacción óptima para Fc con respecto a PEG, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:3 a 1:10.

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

Para unir el complejo Fc-PEG purificado en la etapa 1 anterior al extremo N terminal de IFN α , se mezcló el complejo Fc-PEG con IFN α disuelto en tampón fosfato 10 mM en las proporciones molares de complejo Fc-PEG: IFN α de 1:1, 1:1,5, 1:3 y 1:6. Después de que se ajustara la concentración de tampón fosfato de la solución de reacción a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Después de que se completara la reacción, se retiraron las sustancias sin reaccionar y los subproductos de acuerdo con el mismo procedimiento de purificación que en la etapa 4 del ejemplo 5, aislando así el conjugado de proteínas Fc-PEG-IFN α en una forma altamente pura.

Ejemplo 7: Preparación del conjugado hGH-PEG-Fc

Se preparó un conjugado hGH-PEG-Fc y se purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, excepto que se usó un fármaco distinto de interferón alfa, la hormona del crecimiento humano (hGH, MW: 22 kDa) y

una proporción molar hGH:PEG de 1:5.

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

5 Se preparó un conjugado (G-CSF)-PEG-Fc y se purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, excepto que se usó un fármaco distinto de interferón alfa, el factor estimulador de colonias de granulocitos humano (G-CSF), y una proporción molar G-CSF: PEG de 1:5.

Por otra parte, se preparó un conjugado de proteínas ¹⁷S-G-CSF-PEG-Fc y se purificó de acuerdo con el mismo procedimiento como se describe anteriormente usando un derivado de G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, que tiene una sustitución de serina en el residuo aminoacídico decimoséptimo del G-CSF natural.

Ejemplo 9: Preparación del conjugado EPO-PEG-Fc

10 Se preparó un conjugado EPO-PEG-Fc y se purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en el ejemplo 5, excepto que se usó un fármaco distinto de interferón alfa, eritropoyetina humana (EPO), y una EPO: PEG de 1:5.

Ejemplo 10: Preparación del conjugado de proteínas usando PEG con un grupo reactivo diferente

15 Se preparó un conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc usando PEG con un grupo reactivo propionato de succinimidilo (SPA) en ambos extremos, como sigue. Se mezcló polietilenglicol 3,4 kDa, SPA-PEG-SPA (Shearwater), con 10 mg de interferón alfa disuelto en tampón fosfato 100 mM en proporciones molares de IFN α :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. A continuación, se dejó 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 IFN α -PEG), en el que PEG estaba unido selectivamente al grupo amino de un residuo lisina de interferón alfa, se sometió la mezcla de reacción a una cromatografía de exclusión por tamaño Superdex. Se eluyó el complejo IFN α -PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se retiraron el interferón alfa no unido a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dímeros en los que dos moléculas de interferón alfa estaban unidas en ambos extremos de PEG. Para unir el complejo IFN α -PEG al grupo amino de un residuo lisina de Fc de inmunoglobulina, se concentró el complejo IFN α -PEG a aproximadamente 5 mg/ml, y se preparó un conjugado IFN α -PEG-Fc y se purificó de acuerdo con los mismos procedimientos que en las etapas 3 y 4 del ejemplo 5. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para IFN α con respecto a PEG, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

20

25

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

30 Ejemplo 11: Preparación del conjugado de proteínas usando PEG con un peso molecular diferente

Se preparó un complejo IFN α -PEG 10K usando polietilenglicol 10 kDa con un grupo reactivo aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater). Se preparó este complejo y se purificó de acuerdo con el mismo procedimiento que en la etapa 2 del ejemplo 5. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para IFN α con respecto a PEG 10 kDa, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5. Se concentró el complejo purificado IFN α -PEG 10K hasta aproximadamente 5 mg/ml, y, usando este concentrado, se preparó un conjugado IFN α -PEG 10K-Fc y se purificó de acuerdo con el mismo procedimientos que en las etapas 3 y 4 del ejemplo 5.

35

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

<Etapa 1> Expresión y purificación de Fab'

40 Se hizo crecer un transformante de E. coli, BL21/poDLHF (número de acceso: KCCM-10511), que expresa el anti-factor de necrosis tumoral alfa Fab', en 100 ml de medio LB durante la noche con agitación, y se inoculó en un fermentador de 5 l (Marubishi) y se cultivó a 30 °C y 500 rpm y a un caudal de aire de 20 vvm. Para compensar la insuficiencia de nutrientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, se complementaron los cultivos con glucosa y extractos de levaduras 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 proteínas. Se cultivaron los cultivos adicionalmente durante de 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm se incrementó hasta de 120 a 140. Se centrifugó el fluido de fermentación así obtenido a 20.000xg durante 30 min. Se recogió el sobrenadante y se desechó el sedimento.

45

Se sometió el sobrenadante a la siguiente cromatografía en columna en tres etapas para purificar el anti-factor de necrosis tumoral alfa Fab'. Se cargó el sobrenadante en una columna de proteína G HiTrap (5 ml, Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), y se eluyó la columna con glicina 100 mM (pH 3,0). A continuación, se cargaron las fracciones Fab' recogidas en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (PBS, pH 7,3), y se eluyó esta columna con el mismo tampón. Finalmente, se cargaron las segundas fracciones Fab' en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y se eluyó esta columna con un gradiente lineal de NaCl de

50

0,15-0,4 M en tampón acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando así fracciones de anti-factor de necrosis tumoral alfa Fab' altamente puras.

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

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

10 Después de que se completara la reacción, se intercambié el tampón de reacción con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0) para retirar el NHS-PEG-MAL no unido. A continuación, se cargó la mezcla de reacción en una columna polyCAT (PolyLC). Se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,5 M en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). Durante esta elución, el complejo Fc inmunoglobulina-PEG se eluyó antes de Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, y el Fc de Ig sin reaccionar se eluyó después, eliminando de este modo las moléculas de Fc de Ig sin reaccionar.

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

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

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

Ejemplo 13: Preparación del conjugado Fab' -N-PEG-N-Fc (N terminal)

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

Se disolvieron 40 mg del Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 12 en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 5 mg/ml, y se mezcló con butil ALD-PEG-butyl ALD (3,4 kDa, Nektar) en una proporción molar Fab': PEG de 1:5. Se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la mezcla de reacción en una concentración final de 20 mM, y a continuación se dejó que la mezcla de reacción reaccionara a 4 °C durante 2 h con agitación suave.

35 Después de que se completara la reacción, se intercambié el tampón de reacción con tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). A continuación, se cargó la mezcla de reacción en una columna polyCAT (PolyLC). Se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl de 0,15-0,4 M en tampón acetato 20 mM (pH 4,5). Durante esta elución de columna, el complejo Fab'-PEG que comprende el enlazador de PEG unido al extremo N terminal del Fab' se eluyó antes que el Fab' sin reaccionar, y el Fab' sin reaccionar se eluyó después, eliminando de este modo las moléculas Fab' sin reaccionar.

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

45 Para unir el complejo Fab' -PEG purificado en la etapa 1 anterior al extremo N terminal de un Fc de inmunoglobulina, se disolvió el complejo Fab'-PEG en tampón 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 en una proporción molar de complejo Fab'-PEG: Fc de 1:5. Después de que se concentrara la mezcla de reacción hasta una concentración de proteína final de 50 mg/ml, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la mezcla de reacción en una concentración final de 20 mM, y a continuación, se hizo reaccionar la mezcla de reacción a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

50 Después de que se completara la reacción, se cargó la mezcla de reacción en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3), y se eluyó la columna con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. Se eluyó el conjugado acoplado Fab'-N-PEG-N-Fc relativamente antes debido a su alto peso molecular, y el Fc de inmunoglobulina Fc y el complejo Fab' -PEG sin reaccionar se eluyeron después, eliminando de este modo las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente las moléculas de Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, se cargaron de nuevo las fracciones de conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc recogidas en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y se eluyó esta columna con un gradiente lineal NaCl de 0,15-0,5 M en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0), proporcionando así un conjugado Fab'-N-PEG-N-Fc puro que comprende el complejo Fc inmunoglobulina-PEG

55

unido al extremo N terminal del Fab'.

Ejemplo 14: Preparación y purificación de Fc de inmunoglobulina desglucosilada

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

10 Ejemplo 15: Preparación del conjugado IFN α -PEG-Fc DG

Para unir el Fc de inmunoglobulina desglucosilada preparado en el ejemplo 14 al complejo IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del ejemplo 5, se mezcló el complejo IFN α -PEG con Fc DG disuelto en tampón fosfato 10 mM en proporciones molares de complejo IFN α -PEG: Fc DG de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que se ajustara la concentración de tampón fosfato de la solución de reacción a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para el complejo IFN α -PEG con respecto a Fc DG, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2.

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

Ejemplo 16: Preparación del conjugado de complejo IFN α -PEG y derivado de Fc AG recombinante

De acuerdo con los mismos procedimientos que en los ejemplos 5 y 15, se unió el complejo IFN α -PEG al extremo N terminal de IgG4 delta-Cys como un derivado de Fc AG preparado en el ejemplo 1. Después de la reacción de acoplamiento, se retiraron las sustancias sin reaccionar y subproductos de la mezcla de reacción, y se purificó primariamente el conjugado de proteína (I) IFN α -PEG-AG Fc así obtenido usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) y se purificó adicionalmente por un ensayo cromatográfico líquido a alta presión usando una columna polyCAT 21,5x250 (polyLC), purificando así el conjugado hasta un alto grado. Se desaló la solución de reacción de acoplamiento 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 después en 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) en un caudal de 8 ml/min, y esta columna se eluyó con un gradiente lineal de NaCl de 0-0,2 M para obtener las fracciones deseadas. Se cargaron de nuevo las fracciones recogidas en una columna polyCAT 21,5x250 equilibrada con tampón acetato 10 mM (pH 5,2) en un caudal de 15 ml/min, y se eluyó esta columna con un gradiente lineal NaCl de 0,1-0,3 M, proporcionando así fracciones altamente puras. De acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente, se preparó otro conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc AG (II) usando otro derivado Fc AG preparado en el ejemplo 12, el monómero IgG4.

Ejemplo 17: Preparación del conjugado EPO-PEG-derivado Fc AG recombinante

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

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

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

Se usó una columna Sephadex G-25 (Pharmacia) para retirar el PEG sin reaccionar y se intercambié el tampón por otro tampón. En primer lugar, se equilibró esta columna con dos volúmenes de columna (VC) de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), y se cargó con la mezcla de reacción. Se detectaron los flujos directos midiendo la absorbancia a 260 nm usando un espectrofotómetro UV. Se eluyó la columna con el mismo tampón, el interferón alfa modificado añadiendo PEG con un alto peso molecular en su extremo N terminal se eluyó antes, y el PEG sin reaccionar se eluyó después, permitiendo así el aislamiento sólo de IFN α -PEG 40K.

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

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

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

Para unir el complejo IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del ejemplo 1 al extremo N terminal de albúmina, se mezcló el complejo IFN α -PEG con seroalbúmina humana (HSA, aproximadamente 67 kDa, Green Cross) disuelta en tampón fosfato 10 mM en una proporción molar de complejo IFN α -PEG:albúmina de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Después de que la concentración de tampón fosfato de la solución de reacción se ajustara a 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la solución de reacción en una concentración final de 20 mM y se dejó que reaccionara a 4 °C durante 20 h con agitación suave. Por medio de este experimento, se descubrió que la proporción molar óptima para el complejo IFN α -PEG con respecto a albúmina, que proporciona la mayor reactividad y que genera la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2.

Después de la reacción de acoplamiento, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex^R (Pharmacia) para eliminar las sustancias sin reaccionar y los subproductos y para purificar el conjugado de proteínas IFN α -PEG-albúmina producido. Después de que la mezcla de reacción se concentrara y se cargara en la columna, se pasó tampón fosfato de sodio 10 mM a través de la columna en un caudal de 2,5 ml/min para retirar la albúmina no unida y las sustancias sin reaccionar, seguido de elución de columna para purificar sólo el conjugado de proteínas IFN α -PEG-albúmina. Puesto que las fracciones de conjugado de proteínas IFN α -PEG-albúmina recogidas contenían una pequeña cantidad de impurezas, albúmina sin reaccionar y dímeros de interferón alfa, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio catiónico para retirar las impurezas. Se cargaron las fracciones de conjugado de proteínas IFN α -PEG-albúmina en una columna SP5PW (Waters) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), y se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en tampón acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteínas IFN α -PEG-albúmina en una forma altamente pura.

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

Ejemplo comparativo 3: Preparación del complejo Fab'-S-PEG 40K

Se activó el residuo cisteína libre del Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 8 por incubación en un tampón de activación (acetato de sodio 20 mM (pH 4,0), DTT 0,2 mM) durante 1 h. Después de que se intercambiara el tampón por un tampón de modificación de PEG, se añadió fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5), maleimida-PEG (MW: 40 kDa, Shearwater) a esto en una proporción molar de Fab':PEG 40-kDa de 1:10 y se dejó que reaccionara a 4 °C durante 24 h con agitación suave.

Después de que se completara la reacción, se cargó la solución de reacción en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3), y se eluyó la columna con el mismo tampón a un caudal de 1 ml/min. Se eluyó el PEG 40 kDa conjugado con Fab' (Fab'-PEG 40K) relativamente antes debido a su alto peso molecular, y el Fab' sin reaccionar se eluyó después, eliminando de este modo el Fab' sin reaccionar. Para eliminar completamente el Fab' sin reaccionar, se cargaron de nuevo las fracciones del complejo Fab'-PEG 40K recogidas en una columna polyCAT 21x250 (PolyLC), y se eluyó esta columna con un gradiente lineal NaCl de 0,15-0,5 M en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 4,5), proporcionando así un complejo Fab'-S-PEG 40K puro que comprende PEG 40 kDa unido a un grupo -SH del Fab'.

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

<1-1> Identificación de los conjugados de proteínas

Se analizaron los conjugados de proteínas preparados en los ejemplos anteriores por SDS-PAGE no reductor usando un gel de gradiente al 4-20 % y un gel al 12 % y ELISA (R&D System). Como resultado del análisis SDS-PAGE, como se muestra en la FIG. 6, una reacción de acoplamiento de un polipéptido fisiológico, un polímero no peptídico, PEG, y un fragmento Fc de inmunoglobulina dio como resultado la producción exitosa de un conjugado IFN α -PEG-Fc (A), un conjugado ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y un conjugado EPO-PEG-Fc (G).

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

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

Se cuantificaron los conjugados de proteínas preparados en los ejemplos anteriores por cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) y tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, donde se comparó un área de pico de cada conjugado de proteínas con la de un grupo de control. Los estándares analizados de forma cuantitativa 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. Se cometió una cantidad predeterminada de cada conjugado de proteínas a la misma cromatografía de exclusión por tamaño. Restando el área de pico correspondiente a un fragmento Fc de inmunoglobulina del área de pico así obtenida, se determinó un valor cuantitativo para una proteína fisiológicamente activa presente en cada conjugado de proteínas. La FIG. 7 muestra el resultado de la cromatografía de exclusión por tamaño del conjugado IFN α -PEG-Fc purificado, donde se observó un único pico. Este resultado indica que el conjugado de proteínas purificado no contiene impurezas multiméricas tales como un dímero, un trímero o un mayor número de monómeros.

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

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

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

Por otra parte, se llevó a cabo una HPLC de fase inversa para determinar impurezas de los conjugados de proteínas preparados en los ejemplos 5, 15 y 16, IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-Fc DG y IFN α -PEG-derivado Fc AG recombinante. Se usó una columna de fase inversa (columna 259 VHP54, Vydac). Se eluyó la columna con un gradiente de acetonitrilo al 40-100 % con TFA al 0,5 %, y se analizaron las purezas midiendo la absorbancia a 280 nm. Como resultado, como se muestra en la FIG. 11, las muestras no contienen interferón no unido o Fc de inmunoglobulina, y se descubrió que todos los conjugados de proteínas, IFN α -PEG-Fc (A), IFN α -PEG-Fc DG (B) y IFN α -PEG-derivado Fc AG recombinante (C), tienen una pureza mayor de un 96 %.

Para determinar pesos moleculares precisos de los conjugados de proteínas purificados, se analizó la masa de cada conjugado usando un espectrofotómetro de masas MALDI-TOF de alto rendimiento (Voyager DE-STR, Applied Biosystems). Se usó ácido sinapínico como matriz. Se recubrieron 0,5 μ l de cada muestra de prueba sobre un portaobjetos de muestra y se secó al aire, de nuevo se mezcló con un volumen igual de solución de matriz y se secó al aire, y se introdujo en una fuente de iones. Se llevó a cabo la detección de forma positiva usando un analizador TOF de modo lineal. Se aceleraron los iones con una fuente de extracción de división que funcionaba con extracción retardada (DE) usando un tiempo de extracción retardada de 750 ns a 1500 ns a un voltaje de aceleración total de aproximadamente 2,5 kV.

Los pesos moleculares observados por la espectrometría de masas MALDI-TOF para los conjugados de proteínas Fc preparados en los ejemplos se dan en la tabla 1, a continuación. La FIG. 8 muestra el resultado de la espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado EPO-PEG-Fc, y la FIG. 10 muestra los resultados de la espectrometría de masas MALDI-TOF de los conjugados IFN α -PEG-Fc y IFN α -PEG-Fc DG. Como resultado, se descubrió que el conjugado de proteínas EPO-PEG-Fc tiene una pureza de más de un 95 % y un peso molecular muy próximo a un MW teórico. Además, se descubrió que EPO se acopla al fragmento Fc de inmunoglobulina en una proporción de 1:1.

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-CSF derivado-PEG-Fc (E.4)	75,0	75,9
EPO-PEG-Fc (E.5)	91,4	91,0

Además, cuando se examinaron Fc y Fc DG preparados en el ejemplo 14 para determinar sus pesos moleculares por espectrometría de masas MALDI-TOF, se descubrió que el Fc DG era de 50 kDa, lo que es aproximadamente 3 kDa menos que el Fc natural (FIG. 9a). Puesto que el MW de 3 kDa corresponde al tamaño teórico de los restos de azúcar, los resultados demuestran que los restos de azúcar se retiraron completamente.

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

Tabla 2

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

Ejemplo experimental 2: Análisis farmacocinético I

Las formas naturales de las proteínas fisiológicamente activas (controles) y los complejos de proteínas preparados en los ejemplos y ejemplos comparativos, complejos de -PEG 40K, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-Fc DG y conjugados de -PEG-derivado Fc AG recombinante, se evaluaron para determinar la estabilidad en suero y los parámetros farmacocinéticos en ratas SD (cinco ratas por grupo). Los controles, y los complejos de -PEG 40K, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-Fc DG y conjugados de -PEG-derivado Fc AG recombinante (grupos de prueba) se inyectaron por vía subcutánea a una dosis de 100 μ g/kg. Después de la inyección subcutánea, se recogieron las 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 prueba, a 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 288 h. Se recogieron las muestras de sangre en tubos con un anticoagulante, heparina, y se centrifugó durante 5 min usando un microcentrifugador de alta velocidad Eppendorf para retirar las células de sangre. Se midieron los niveles de proteína en suero por ELISA usando anticuerpos específicos para las proteínas fisiológicamente activas.

Los resultados de los análisis farmacocinéticos de las formas naturales de IFN α , hGH, G-CSF y EPO, y complejos de -PEG 40K de los mismos, conjugados de -PEG-albúmina de los mismos, conjugados de -PEG-Fc de los mismos y conjugados de -PEG-Fc DG de los mismos, se dan en las tablas 3 a 7, a continuación. En las siguientes tablas, T_{max} indica el tiempo que tarda en alcanzar la concentración máxima de fármaco 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 cuerpo.

Tabla 3

Farmacocinética de interferón alfa

	IFN α natural	IFN α -PEG 40K (C.E.1)	IFN α -PEG-albúmina (C.E.2)	IFN α -PEG-Fc (E.5)	IFN α -PEG-Fc DG (E.15)	IFN α -PEG-derivado Fc AG recombinante (I) (E.16)	IFN α -PEG-derivado Fc AG recombinante (II) (E.16)
T _{max} (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

5

Farmacocinética del factor de crecimiento humano

	hGH natural	hGH-PEG 40K (C.E.1)	hGH-PEG-albúmina (C.E.2)	hGH-PEG-Fc (E.7)
T _{max} (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 natural	G-CSF-PEG 40K (C.E.1)	G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2)	G-CSF-PEG-Fc (E.8)
T _{max} (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

10

TABLA 6

Farmacocinética de derivado ¹⁷S-G-CSF

	Derivado ¹⁷ S-G-CSF natural	¹⁷ S-G-CSF-PEG 40K (C.E.1)	¹⁷ S-G-CSF-PEG-albúmina (C.E.2)	¹⁷ S-G-CSF-PEG-Fc (E.8)
T _{max} (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 natural	EPO altamente glucosilada	EPO-PEG-Fc (E.9)	EPO-PEG-derivado Fc AG recombinante (E.17)
T _{max} (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

Como se muestra en los datos de la tabla 13 y el gráfico farmacocinético de la FIG. 12, el conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc tenía una semivida en suero de 90,4 h, que era aproximadamente 50 veces mayor que el IFN α natural y aproximadamente 2,5 veces mayor que la de IFN α -PEG 40K con una semivida de 35,8 h, preparado en el ejemplo comparativo 1. Además, se descubrió que el conjugado de proteínas IFN α -PEG-Fc de la presente invención era superior en la semivida en suero a IFN α -PEG-albúmina, que tiene una semivida de 17,1 h.

Por otra parte, como se muestra en la tabla 3 y en la FIG. 14, el conjugado de IFN α -PEG-Fc DG tenía una semivida en suero de 71,0 h, que era casi la misma que el conjugado IFN α -PEG-Fc, lo que indica que la desglucosilación de Fc no afecta mucho a la estabilidad in vivo del conjugado IFN α -PEG-Fc DG. Además, se descubrió que el conjugado preparado usando el derivado Fc AG recombinante producido por un procedimiento recombinante tiene un efecto idéntico al de Fc DG derivado de la forma natural. Sin embargo, la semivida en suero del complejo acoplado a un monómero de Fc era aproximadamente la mitad de la de un complejo acoplado a un dímero de Fc normal.

Como se muestra en la tabla 4, la hormona del crecimiento humano también mostró una semivida en suero extendida cuando se conjugó al fragmento Fc de IgG de acuerdo con la presente invención. Esto es, en comparación con la forma natural (1,1 h), el complejo hGH-PEG 40K y el conjugado hGH-PEG-albúmina tenían semividas ligeramente incrementadas de 7,7 h y 5,9 h, respectivamente, mientras que el conjugado de proteínas hGH-PEG-Fc de la presente invención presentó una semivida en suero muy extendida de 11,8 h.

Como es evidente a partir de los datos farmacocinéticos de G-CSF y su derivado en la tabla 5 y 6, los conjugados G-CSF-PEG-Fc y ¹⁷S-G-CSF-PEG-Fc presentaron una semivida en suero mucho mayor que el complejo -PEG 40K y el conjugado de -PEG-albúmina. Se descubrió que el fragmento Fc de inmunoglobulina en el suero prolonga la duración de acción de proteínas fisiológicamente activas en formas naturales, así como en sus derivados con alteraciones de determinados residuos aminoacídicos en niveles similares a las formas naturales. A partir de estos resultados, es fácilmente predecible que el procedimiento de la presente invención tendrá un efecto similar en otras proteínas y sus derivados.

Como se muestra en la tabla 7 y en la FIG. 13, la conjugación de la EPO glucosilada natural con el fragmento Fc también dio como resultado un incremento en la semivida en suero. Esto es, la EPO tenía una semivida en suero de 9,4 h en la forma natural, y una semivida en suero prolongada de 18,4 h en darbepoyetina α (Aranesp, Amgen), que está altamente glucosilada para mejorar la estabilidad en suero. El conjugado EPO-PEG-Fc, que comprende EPO acoplada al fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con la presente invención, presentó una semivida en suero marcadamente prolongada de 61,5 h. Además, cuando se conjugó al derivado de Fc aglucosilado (AG) recombinante derivado de E. coli, la semivida de EPO se incrementó hasta 87,9 h, lo que indica que la aglucosilación del fragmento Fc permite que la preparación de un conjugado de proteínas no afecte a la estabilidad en suero de la proteína sin funciones de anticuerpo.

Como es evidente de los resultados anteriores, los conjugados de proteínas unidos covalentemente al fragmento Fc de inmunoglobulina por medio de un polímero no peptídico de acuerdo con la presente invención presentaron incrementos en las semividas en suero de hasta varias decenas con respecto a la forma natural. Además, cuando el Fc de inmunoglobulina se aglucosiló por la producción en E. coli o se desglucosiló por tratamiento enzimático, su efecto de incrementar la semivida en suero de su conjugado de proteína se mantuvo en un nivel similar.

En particular, en comparación con proteínas modificadas con PEG 40 kDa que tienen la mayor duración de acción entre las moléculas de PEG para incrementar la duración de acción de proteínas en el suero, los conjugados de proteínas de Fc de inmunoglobulina tenían una estabilidad en suero muy superior. Además, en comparación con los conjugados de proteínas acoplados con albúmina en lugar del Fc de inmunoglobulina, los conjugados de proteínas de la presente invención presentaron una estabilidad en suero excelente, lo que indica que los conjugados de proteínas de la presente invención son eficaces en el desarrollo de formas de acción prolongada de fármacos de proteínas. Estos resultados, que los presentes conjugados de proteínas tienen efectos excelentes en la estabilidad en suero y el TRM en un amplio rango de proteínas incluyendo derivados de factores estimuladores de colonias por mutación puntual en comparación con proteínas conjugadas a PEG o albúmina, indican que los efectos de estabilidad y de extensión de la duración de los presentes conjugados de proteínas son aplicables a otros polipéptidos fisiológicamente activos.

Por otra parte, cuando se evaluó el conjugado de proteínas IFN α -PEG 10K-Fc (ejemplo 11) preparado usando un polímero no peptídico, PEG 10 kDa, para determinar su semivida en suero de acuerdo con el mismo procedimiento descrito anteriormente, 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 proteínas preparado usando PEG 3,4 kDa.

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

Aún cuando el grupo reactivo de PEG se intercambió con un grupo reactivo distinto del grupo aldehído, los conjugados de proteínas con el PEG mostraron patrones similares en peso molecular aparente y semivida en suero a los

acoplados a PEG con un grupo reactivo aldehído.

Ejemplo experimental 3: Análisis farmacocinético II

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

Como se muestra en la FIG. 15, los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc presentaron una semivida en suero prolongada dos o tres veces en comparación con Fab' o el complejo Fab'-S-PEG 40K.

Ejemplo experimental 4: Evaluación de la actividad intracelular de los conjugados de proteínas

10 <4-1> Comparación de los conjugados de proteínas de IFN α para determinar la actividad intracelular

15 Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteínas de IFN α , se evaluaron el IFN α -PEG-Fc (ejemplo 5), IFN α -PEG-DG Fc (ejemplo 15), IFN α -PEG-derivado Fc AG recombinante (ejemplo 16), IFN α -PEG 40K (ejemplo comparativo 1) y IFN α -PEG-albúmina (ejemplo comparativo 2) para determinar la actividad antivírica por un bioensayo de cultivo celular usando células de riñón de bovino Madin-Darby (MDBK) (ATCC CCL-22) infectadas con virus de estomatitis vesicular. Se usó interferón alfa-2b no pegilado, disponible de National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC), como material estándar.

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

30 Después de que se retirara el medio de cultivo, se añadieron 100 μ l de una solución de rojo neutro a la placa para teñir las células viables, seguido de incubación durante 2 h a 37°C en condiciones de CO₂ al 5 %. Después de que se retiraran los sobrenadantes, 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 un mezclado completo para disolver todos los cristales de rojo neutro eluidos de las células teñidas, se midió la absorbancia a 540 nm. Se usó el control negativo como blanco, y se calcularon los valores de DE₅₀ (dosis que provocan el 50 % de la inhibición del crecimiento celular), donde se fijó el crecimiento celular del control positivo en el 100 %.

Tabla 8

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica (UI/mg)	Actividad relativa (%) para IFN α natural
IFN α natural	100	4,24E+08	100
IFN α -PEG 40K	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-Fc DG	100	1,09E+08	25,7
IFN α -PEG-derivado Fc AG recombinante	100	9,58E+07	22,6

35 Como se muestra en la tabla 8, el IFN α -PEG 40K disminuyó en su actividad hasta un 4,8 % del IFN α natural. En especial, a medida que se incrementa el tamaño de los restos PEG, un conjugado de proteínas presenta una mejora en su estabilidad en suero pero una disminución gradual de su actividad. Se informó que el interferón alfa tiene actividades in vitro de un 25 % cuando se modifica con PEG 12 kDa y de aproximadamente un 7 % cuando se modifica con PEG 40 kDa (P. Bailon et al., Bioconjugate Chem. 12: 195-202, 2001). Esto es, puesto que un conjugado de proteínas tiene una semivida mayor pero disminuye bruscamente en su actividad biológica a medida que el peso molecular de los restos de PEG se incrementa, existe una necesidad de desarrollar un conjugado de proteínas que tenga una semivida en suero mayor y una actividad más fuerte. Además, el conjugado IFN α -PEG-albúmina presentó una actividad débil de aproximadamente un 5,2 % en comparación con el IFN α natural. En contraste, los conjugados IFN α -PEG-Fc y IFN α -PEG-Fc DG de la presente invención presentaron una mejora marcada en la actividad relativa de un 28,1 % y un 25,7 % en comparación con el IFN α natural. Además, la conjugación de IFN α con el derivado de Fc AG recombinante dio como resultado un incremento similar en la actividad. A partir de estos resultados, se espera que el interferón alfa conjugado con el fragmento de Fc de inmunoglobulina tenga un incremento marcado en la semivida en

suero y una gran mejora en la eficacia farmacéutica in vivo.

<4-2> Comparación de conjugados de proteínas de la hormona del crecimiento humano para determinar la actividad intracelular

5 Para comparar la actividad intracelular de conjugados de proteínas de hormona del crecimiento humano, se compararon los hGH-PEG-Fc, hGH-PEG 40K y hGH-PEG-albúmina para determinar su actividad intracelular.

Se midieron las actividades intracelulares de los conjugados de hGH por un ensayo in vitro usando una línea celular de linfoma nodular de rata, Nb2 (European Collection of Cell Cultures (ECACC) n.º 97041101), que desarrolla mitogénesis dependiente de la hormona del crecimiento humano.

10 Se cultivaron células Nb2 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 contaron las células cultivadas, y se tomaron alícuotas de aproximadamente 2x10⁴ células en cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se diluyeron el hGH-PEG-Fc, el hGH-PEG 40K, el hGH-PEG-albúmina, un estándar disponible de National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) como control, y hormona del crecimiento humano natural (HM-hGH) y se añadieron a cada pocillo en varias concentraciones, seguido de incubación durante 48 h a 37 °C en condiciones de CO₂ al 5 %. Después de esto, para medir la actividad de proliferación celular determinando el número de células en cada pocillo, se añadieron a cada pocillo 25 µl del reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega), y se cultivaron adicionalmente las células durante 4 h. Se midió la absorbancia a 490 nm, y se calculó un título para cada muestra. Los resultados se dan en la Tabla 9, a continuación.

20 Tabla 9

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica* (U/mg)	Actividad relativa (%) para HM-hGH natural
hGH natural	100	2,71E+06	100
hGH (estándar disponible de NIBSC)	100	2,58E+06	95,2
hGH-PEG 40K	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/DE₅₀ × 10⁶ (DE₅₀: cantidad de proteína requerida para un 50 % del crecimiento celular máximo)

25 Como se muestra en la tabla 9, también en el caso de la hormona del crecimiento humano, la conjugación a PEG 40 kDa (hGH-PEG 40K) dio como resultado una disminución en la actividad hasta aproximadamente un 7,6 % de la forma natural, y el conjugado hGH-PEG-albúmina presentó una baja actividad in vitro que era aproximadamente un 5,2 % de la hGH natural. Sin embargo, el conjugado hGH-PEG-Fc de la presente invención tuvo un incremento marcado en la actividad relativa hasta más de un 28 % en comparación con la hGH natural. A partir de estos resultados, se espera que la hormona del crecimiento humano unida al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga un incremento marcado en la semivida en suero y una gran mejora en la eficacia farmacéutica in vivo. Además, se cree que el incremento en la actividad de los conjugados de proteínas de Fc de inmunoglobulina de la presente invención es debido al incremento en la estabilidad en suero y la preservación de la afinidad de unión a receptores debido al Fc de inmunoglobulina o debido al espacio formado por el polímero no peptídico. Se prevé que estos efectos sean aplicables a conjugados de proteínas de Fc de inmunoglobulina acoplados a otras proteínas fisiológicamente activas.

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

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

40 En primer lugar, se cultivó una línea celular mielógena humana, HL-60 (ATCC CCL-240, paciente con leucemia promielocítica de 36 años de edad, mujer caucásica), en medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %. Se suspendieron las células cultivadas a una densidad de aproximadamente 2,2x10⁵ células/ml, y se añadió DMSO (dimetilsulfóxido, calidad para cultivo, Sigma) a las mismas en una concentración final de un 1,25 % (v/v). A continuación, se sembraron 90 µl de la suspensión celular en cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Corning/ placa de 96 pocillos de baja evaporación), proporcionando así una densidad de aproximadamente 2x10⁴ células por pocillo, y se cultivó en una incubadora a 37 °C con CO₂ al 5 % durante aproximadamente 72 h.

Se diluyó cada muestra, con una concentración de proteína que se determinó usando un kit ELISA G-CSF (R&D systems), con RPMI 1640 hasta una concentración idéntica de 10 µg/ml, y se diluyó adicionalmente dos veces con RPMI 1640 diecinueve veces. Se añadieron individualmente las diluciones de dos veces en serie a cada pocillo que contenía células HL-60 en un volumen de 10 µl, de modo que la concentración de cada muestra comenzó a 1 µg/ml. A continuación, se cultivaron las células en una incubadora a 37 °C durante 72 h.

Se sometió a ensayo la proliferación de células HL-60 usando Cell Titer 96™ (n.º cat. G4100, Promega), y se determinó el incremento en el número de células midiendo la absorbancia a 670 nm.

Tabla 10

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

Como se muestra en la tabla 10, los conjugados de proteínas de Fc de inmunoglobulina acoplados a un derivado de G-CSF con una sustitución aminoacídica, ¹⁷Ser-G-CSF, también presentaron efectos similares a los conjugados de proteínas acoplados a G-CSF natural. Previamente se informó que ¹⁷Ser-G-CSF-PEG presentaba un incremento relativo en su semivida en suero pero una disminución en la actividad en comparación con ¹⁷Ser-G-CSF no pegilado (publicación de patente coreana abierta a inspección pública n.º 2004-83268). En especial, a medida que se incrementa el tamaño de los restos PEG, un conjugado de proteínas presenta un incremento en su estabilidad en suero pero una disminución gradual de su actividad. El ¹⁷Ser-G-CSF-PEG 40K mostró una actividad muy baja de menos de aproximadamente un 10 % en comparación con la forma natural. Esto es, puesto que un conjugado de proteínas tiene una semivida en suero extendida pero una actividad que disminuye bruscamente a medida que el peso molecular de los restos de PEG se incrementa, existe la necesidad de desarrollar un conjugado de proteínas que tenga una semivida en suero larga y una fuerte actividad. El ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-albúmina también mostró una actividad baja de aproximadamente un 23 % en comparación con el G-CSF natural. En contraste, el ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc presentó una gran mejora en su actividad relativa hasta más de un 51 % en comparación con el G-CSF natural. A partir de estos resultados, se espera que ¹⁷Ser-G-CSF unido al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga un incremento marcado en la semivida en suero y una gran mejora en la eficacia farmacéutica in vivo.

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

Se llevó a cabo un ensayo de actividad in vitro usando los conjugados Fab'-S-PEG-N-Fc y Fab'-N-PEG-N-Fc preparados en el ejemplo 8 y 9 y el complejo Fab'-S-PEG 40K preparado en el ejemplo comparativo 3. Por medio de un ensayo de citotoxicidad basado en la medida de la citotoxicidad mediada por TNFα, se evaluaron los conjugados de Fab' para determinar si neutralizan la apoptosis inducida por TNFα en una línea celular de fibroblastos de ratón, L929 (ATCC CRL-2148).

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

Como se muestra en la FIG. 16, todos los conjugados de proteínas usados en esta prueba tenían un título similar al Fab'. Estos resultados indican que, cuando se prepara un conjugado de proteínas uniendo un Fc de inmunoglobulina a un residuo de cisteína libre próximo al extremo N terminal o C terminal de un Fab' por medio de PEG, el Fab' presenta un incremento marcado en la semivida en suero y una alta actividad in vivo.

<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 las inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes de E. coli y purificadas, se unen a C1q humana, se llevó a cabo un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) como sigue. Como grupos de prueba, se usaron regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM10932 y HM10927 y los

derivados preparados en los ejemplos anteriores. Como estándares, se usaron una inmunoglobulina glucosilada (IVIG-globulin S, Green Cross PBM) y varios anticuerpos comercialmente disponibles usados como anticuerpos terapéuticos. Se prepararon muestras de prueba y estándar en tampón carbonato 10 mM (pH 9,6) a una concentración de 1 µg/ml. Se tomaron alícuotas de las muestras en una placa de 96 pocillos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pocillo, y se recubrió la placa durante la noche a 4 °C. A continuación, se lavó tres veces cada pocillo con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, Tween 20 al 0,05 %), se bloqueó con 250 µl de un tampón de bloqueo (seroalbúmina bovina al 1 % en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 h, y se lavó de nuevo con el mismo PBS-T tres veces. Se diluyeron las muestras estándar y de prueba en PBS-T hasta una concentración predeterminada y se añadieron a pocillos recubiertos de anticuerpo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó con PBS-T tres veces. Después de esto, se añadieron 2 µg/ml de C1q (R&D Systems) a la placa y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h, y se lavó la placa con PBS-T seis veces. Se añadieron a cada pocillo 200 µl de un dilución 1:1000 de un conjugado anticuerpo anti-C1q humana humano-peroxidasa (Biogenesis, EE. UU.) en el tampón de bloqueo y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h. Después de que se lavara cada pocillo con PBS-T tres veces, se mezclaron volúmenes iguales de reactivos colorantes A y B (Color A: peróxido estabilizado y Color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems), y se añadieron 200 µl de la mezcla a cada pocillo, seguido de incubación durante 30 min. A continuación, se añadieron a cada pocillo 50 µl de una solución de terminación de reacción, ácido sulfúrico 2 M. Se leyó la placa usando un lector de microplacas (Molecular Device). Se midió la absorbancia de las muestras estándar y de prueba a 450 nm, y los resultados se dan en las FIG. 17 y 18, respectivamente.

20 Cuando se compararon las subclases de inmunoglobulinas entre sí para determinar la actividad de complemento en su fragmento Fc de inmunoglobulina, se encontró la afinidad de unión más alta para C1q en la inmunoglobulina humana IgG1 (Fitzgerald), la siguiente en IgG2 (Fitzgerald) y después IgG4 (Fitzgerald), lo que indica que existe una diferencia entre las subclases en la actividad de complemento. La IVIG usada en esta prueba, que es un conjunto de subclases de IgG, presentó casi la misma afinidad de unión a C1q que la IgG1 purificada debido a que la IgG1 equivale a la mayoría de la IVIG. En comparación con estos estándares, con respecto a los cambios en la afinidad de unión a C1q por aglucosilación, el Fc IgG1 Fc con la actividad de complemento más fuerte presentó una disminución marcada cuando se aglucosiló. El Fc de IgG4, que se sabe que no induce la activación complemente, rara vez tuvo afinidad de unión a C1q, lo que indica que el Fc de IgG4 se usa como vehículo recombinante excelente sin actividad de complemento (FIG. 17).

30 Para determinar si el vehículo mantiene su propiedad de no tener afinidad de unión a C1q aún después de conjugarse a un péptido fisiológicamente activo, se prepararon conjugados de IFN alfa-Fc usando Fc glucosilado, Fc enzimáticamente glucosilado y Fc recombinante aglucosilado como vehículos para IFN alfa y se evaluaron para determinar su afinidad de unión a C1q. Un conjugado de INF alfa acoplado a Fc glucosilado (IFNα-PEG-Fc: IgG1Fc glucosilado) mantuvo una afinidad de unión a C1q alta. En contraste, cuando el interferón alfa se acopló a un Fc desglucosilado usando PNGasa F y otras enzimas, el conjugado resultante (IFNα-PEG-DGFc: IgG1Fc desglucosilado) presentó una disminución marcada en la afinidad de unión a C1q, que era similar a la del conjugado de Fc aglucosilado derivado de E. coli. Además, cuando el resto de IgG1 del conjugado de interferón alfa acoplado con Fc de IgG1 aglucosilado (IFNα-PEG-AGFcGl: IgG1Fc aglucosilado) se intercambió con el resto de IgG4, se descubrió que el conjugado de interferón resultante (derivado IFNα-PEG-FcG4 1: IgG4Fc aglucosilado) perdía completamente su afinidad de unión a C1q. Cuando el resto de Fc de IgG1 se intercambió con el monómero Fc de IgG4, el conjugado resultante (derivado IFNα-PEG-FcG4 2: IgG4Fc aglucosilado). Estos resultados indican que dichas formas del fragmento Fc de IgG4 son útiles como vehículos excelentes que no tienen las funciones efectoras de los fragmentos de anticuerpo (FIG. 18).

Aplicación industrial

45 Como se describe anteriormente en el presente documento, los fragmentos Fc de IgG de la presente invención incrementan las semividas en suero de los fármacos y mantienen la actividad in vivo de los fármacos cuando se usan como vehículos. En particular, los presentes fragmentos Fc de IgG incrementan las semividas en suero de fármacos polipeptídicos hasta niveles mayores que cualquier proteína modificada convencional, y superan la desventaja más significativa de las formulaciones de acción prolongada convencionales, disminuye los títulos, teniendo así un tiempo de circulación en sangre y una actividad in vivo superiores a la albúmina, conocida previamente por ser la más eficaz. Además, los presentes fragmentos Fc de IgG no presentan riesgo de inducir respuestas inmunitarias. Debido a estas ventajas, los presentes fragmentos Fc de IgG son útiles para desarrollar formulaciones de acción prolongada de fármacos de proteína. Además, las formulaciones de acción prolongada de fármacos de proteína de acuerdo con la presente invención pueden reducir el dolor del paciente de las inyecciones frecuentes, y mantener concentraciones en suero de polipéptidos activos durante un periodo de tiempo prolongado, proporcionando así de forma estable eficacia farmacéutica.

<110> HANMI PHARM. IND. CO., LTD.

<120> FRAGMENTO Fc DE IgG PARA UN VEHÍCULO DE FÁRMACO Y PROCEDIMIENTO PARA LA PREPARACIÓN DEL MISMO

5 <150> KR 10-2003-0080299
<151> 2003-11-13

<160> 23

<170> KopatentIn 1.71

10 <210> 1
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> cebador

<400> 1
cgctcatgcc agcacctgag ttctctggggg gacca 35

20 <210> 2
<211> 42
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> cebador

<400> 2
gggggatcct catttaccca gagacaggggagggtcttc tg 42

30 <210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35 <400> 3
Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro
1 5 10

40 <210> 4
<211> 663
<212> ADN
<213> homo sapiens

<400> 4
tcatgccag caccigagtt cctggggga ccatcagtct tctctgtccc cccaaaaccc 60
aaggacactc tcatgatctc cgggacccct gaggcacgt gctgtgggt ggcgtgagc 120
caggagacc ccgaggtcca gtccaactgg tacgtggatg gctgtgggt gcataatgcc 180
aagacaagc cgggggagga gcagttcaac agcacgtacc gttgtgtcag cgtcctcacc 240
gtcctgcacc aggaactggt gaaccgcaag gactacaagt gcaaggctc caacaaggc 300
ctcccgtcct ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaag ggcagcccc agagccacag 360
gtgtlacacc tcccccaic ccaggaggag atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc 420
ctgttcaag gcttctacc cagcagatc gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccc 480
gagaacaact acaagaccac gccctccgtg ctggactccg accgctcctt ctctctctac 540
agcaggctaa ccgtggaca gagcaggtgg caggagggga atgtctctc atgtccgtg 600
atgatgag cctctcaca ccactacaca cagaagagcc tctcccgtc tctgggtaaa 660

ES 2 454 666 T3

tga 663

<210> 5
 <211> 69
 <212> ADN
 5 <213> homo sapiens

<400> 5

atgaaaaaga caatcgcatt tcttcttgca tctatgttcg tttttctat tgctacaaat 60

gcccaggcg 69

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

15 <220>
 <223> cebador

<400> 6

tctattgcta caaatgccca ggccttccca accattccct tatcc 45

20 <210> 7
 <211> 45
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> cebador

<400> 7

agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tggtaagga atagg 45

30 <210> 8
 <211> 220
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 8
 Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 35 40 45
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 50 55 60
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 85 90 95
 Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 100 105 110
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln
 115 120 125
 Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 130 135 140

35 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro

ES 2 454 666 T3

130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 210 215

- <210> 11
- <211> 33
- <212> ADN
- 5 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> cebador

- 10 <400> 11
- cgccgtgcc agcacctgaa ctctggggg gac 33

- <210> 12
- <211> 33
- <212> ADN
- 15 <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> cebador

- 20 <400> 12
- gggggatcct cattacccg gagacagga gag 33

- <210> 13
- <211> 15
- <212> PRT
- 25 <213> homo sapiens

- <400> 13

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

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

- <400> 14
- ccgtgccag caccigaact cctggggga cgtcagttc tcclcttccc cccaaaacc 60
- aaggacacc tcattgatc cggaccct gaggtcacat gctgggtgt ggcgtgago 120
- caccgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggagc gctggaggt gcataatgc 180
- aagacaaagc cgcgggagga gcagtaaac agcactacc gtlgttcag cgtctctacc 240
- gtctgtcacc aggactggt gaatggcaag gattacaagt gcaaggtct caacaaagc 300
- ctccagccc caatcgaga aaccatctcc aaagccaaag ggcagcccc agagccacag 360
- gtgtacacc tgcctcacc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag cctgacctc 420
- ctatcaaa acitctatcc caaccatc acctggagt gggagagca tggcagccg 480

gagaacaact acaagaccac gccctccgig ctggactccg acggctcctt ctctctctac 540
 agcaagctca ccgltggaca gagcaggig cagcagggga acgtctctc atgciccgig 600
 atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg cagaagagoc tctccctgic tccgggtaaa 660
 660

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

<400> 15
 Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe
 1 5 10 15
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
 35 40 45
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro
 50 55 60
 Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr
 65 70 75 80
 Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val
 85 90 95
 Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala
 100 105 110
 Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg
 115 120 125
 Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 130 135 140
 Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
 145 150 155 160
 Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser
 165 170 175
 Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln
 180 185 190
 Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
 195 200 205
 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215 220

5 <210> 16
 <211> 26
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> cebador

<400> 16

cggcacctga actcctgggg ggaccg

26

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

<400> 17
 gcaccctgaa tccctggggg accctcagtc ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc 60
 ctcatgatct cccggaccoc tgaggicaca tgcctggtgg tggacgtgag ccaogaagac 120
 cctgaggica agttcaectg gtaccgtggac ggcctggagg tgcataatgc caagacaaag 180
 ccgcgggagg agcagtaaca cagcacgtac cgtctggica gctctctcac cgtctctcac 240
 caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag tgcaaggict ccaacaaagc cctcccagcc 300
 cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc 360
 ctgccccat cccgggatga gctgaccaag aaccaggica gctgacctg cctggtcaaa 420
 ggttctatc ccagccatc cccctgtgag tggagagca atggcagccg ggagaacaac 480
 tacaagacca cgcctccctg gctggactcc gacggtctct tcttctctc cagcaagctc 540
 accgtggaca agagcaggig gcagcagggg aaccgtctct calgtccctg gatgcatgag 600
 gctctgcaca accaciacac gcagaagagc ctctccctgt ctccgggtaa a 651

<210> 18
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 18
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 1 5 10 15
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 20 25 30
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 35 40 45
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 50 55 60
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 65 70 75 80
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 85 90 95
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 100 105 110
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
 115 120 125
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 130 135 140
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 145 150 155 160
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 165 170 175
 Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
 180 185 190
 Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
 195 200 205
 Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

<210> 19
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

<400> 19

5

10

cgccgtgcc agcacctccg gtggcgga 29

<210> 20
 <211> 33
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> cebador

10 <400> 20

gggggatcct cattaccgcg gagacagga gag 33

<210> 21
 <211> 12
 <212> PRT
 15 <213> homo sapiens

<400> 21

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

20 <210> 22
 <211> 657
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 22
 Cys Cys Gly Thr Gly Cys Cys Cys Ala Gly Cys Ala Cys Cys Thr Cys
 1 5 10 15
 Cys Gly Gly Thr Gly Gly Cys Gly Gly Gly Ala Cys Cys Gly Thr Cys
 20 25 30
 Ala Gly Thr Cys Thr Thr Cys Cys Thr Cys Thr Thr Cys Cys Cys
 35 40 45
 Cys Cys Ala Ala Ala Ala Cys Cys Cys Ala Ala Gly Gly Ala Cys Ala
 50 55 60
 Cys Cys Cys Thr Cys Ala Thr Gly Ala Thr Cys Thr Cys Cys Cys Gly
 65 70 75 80
 Gly Ala Cys Cys Cys Cys Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Ala Cys Ala
 85 90 95
 Thr Gly Cys Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly
 100 105 110
 Thr Gly Ala Gly Cys Cys Ala Cys Gly Ala Ala Gly Ala Cys Cys Cys
 115 120 125
 Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Cys Ala Gly Thr Thr Cys Ala Ala Cys
 130 135 140
 Thr Gly Gly Thr Ala Cys Gly Thr Gly Gly Ala Cys Gly Gly Cys Gly
 145 150 155 160
 Thr Gly Gly Ala Gly Gly Thr Gly Cys Ala Thr Ala Ala Thr Gly Cys
 165 170 175

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

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

Ala

<210> 23
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 23
 Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 20 25 30
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn
 35 40 45
 Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
 50 55 60
 Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
 65 70 75 80
 Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
 85 90 95
 Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys
 100 105 110
 Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
 115 120 125
 Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
 130 135 140
 Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
 145 150 155 160
 Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 165 170 175
 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 180 185 190
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 195 200 205
 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 210 215

REIVINDICACIONES

1. Uso de un fragmento de Fc como vehículo de fármaco, en el que el fragmento Fc es Fc de IgG, que está unido covalentemente a un fármaco a través de un polímero no peptídico, en el que el polímero no peptídico es poli(etilenglicol)(PEG), en el que el fármaco es un fármaco de polipéptido, y el fragmento Fc no incluye un fragmento de Fc con una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 8.
2. El uso como se establece en la reivindicación 1, en el que la IgG es IgG2 o IgG4.
3. El uso como se establece en la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc está aglucosilado.
4. El uso como se establece en la reivindicación 4, en el que el fragmento Fc es un fragmento Fc de IgG4 aglucosilado.
5. El uso como se establece en la reivindicación 5, en el que el fragmento Fc es un fragmento Fc de IgG4 aglucosilado derivado de humano.
6. El uso como se establece en la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc tiene una secuencia de aminoácidos representada por SEQ ID NO: 10 o 23.
7. El uso como se establece en la reivindicación 6, en el que el fragmento Fc está codificado por un gen que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO: 9 o 22.
8. El uso como se establece en la reivindicación 1, en el que el fragmento Fc está contenido en una composición farmacéutica.

FIG. 1

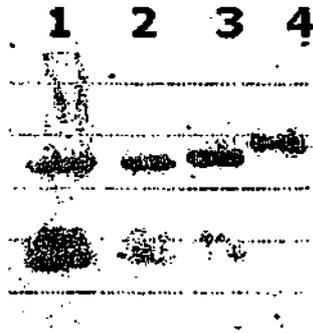


FIG. 2

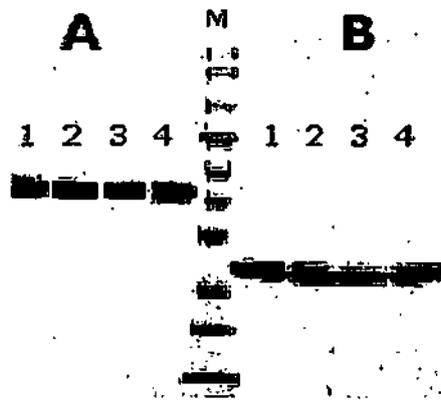


FIG. 3

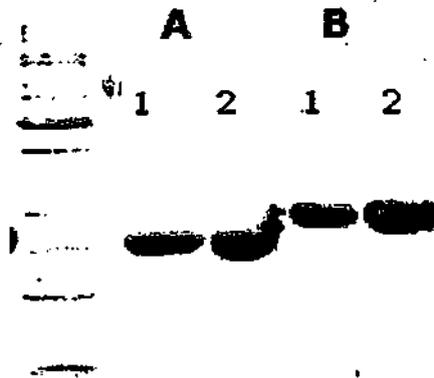
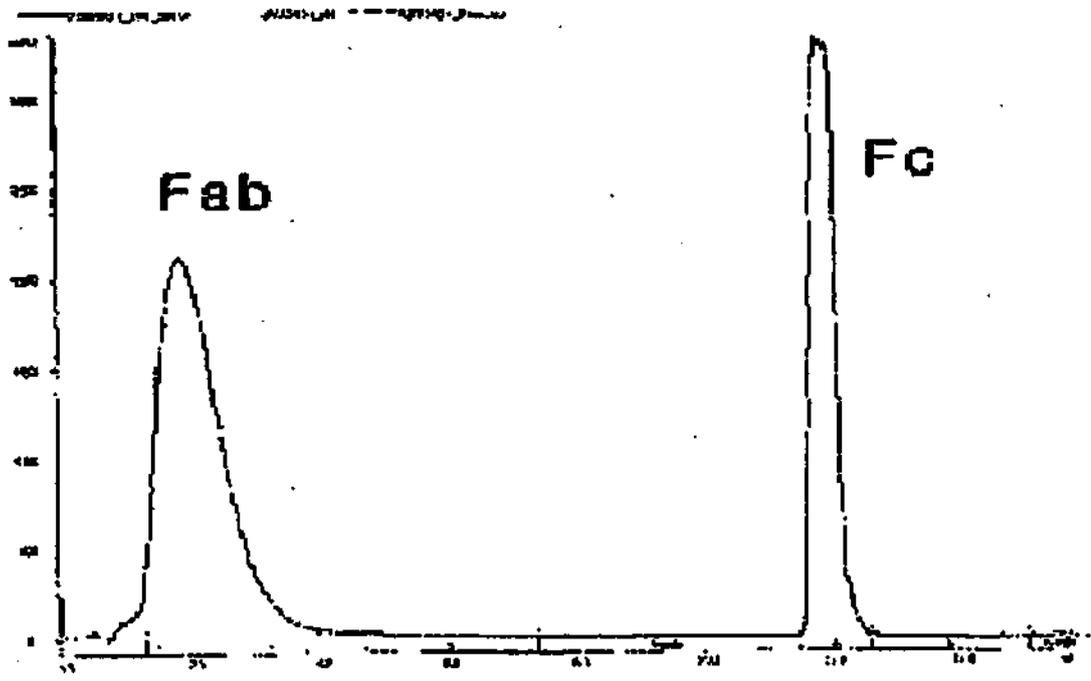


FIG. 4

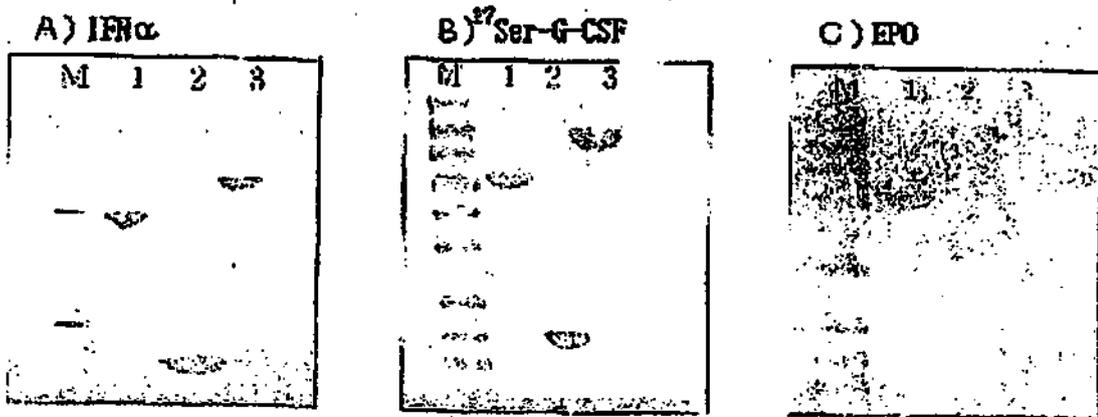


Proteína A (elución de pH por etapas)

FIG. 5



FIG. 6



M- Marcador de tamaño molecular

Carril 1: Fc

Carril 2: Proteína fisiológicamente activa

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

FIG. 9a

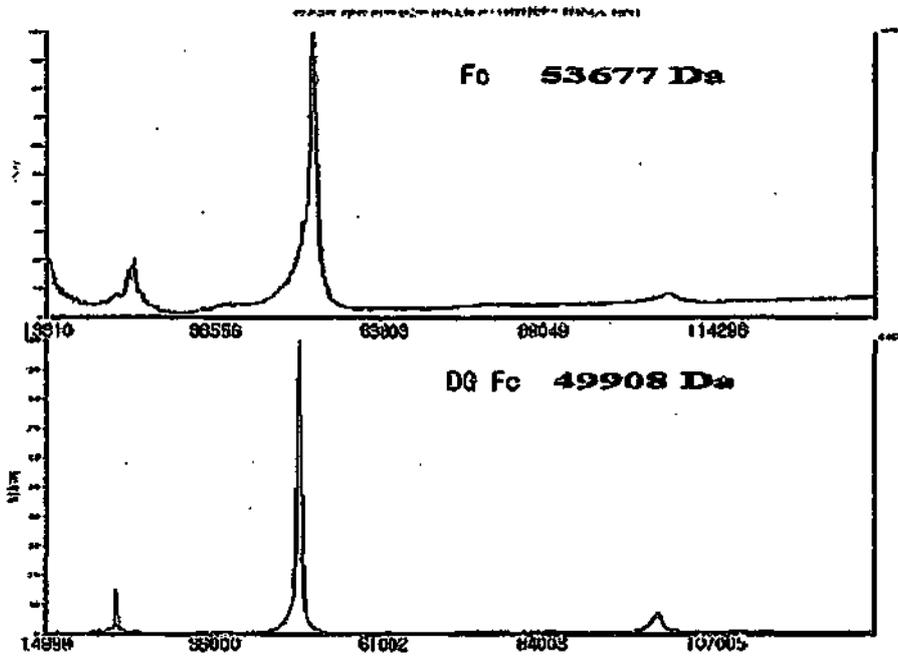


FIG. 9b

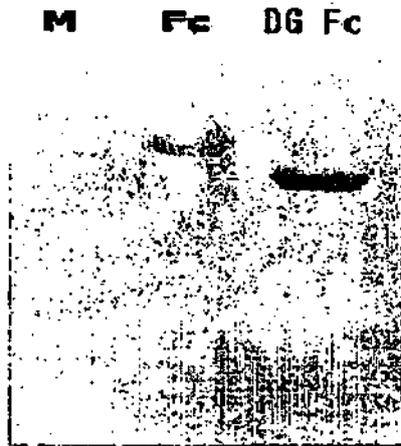


FIG. 10

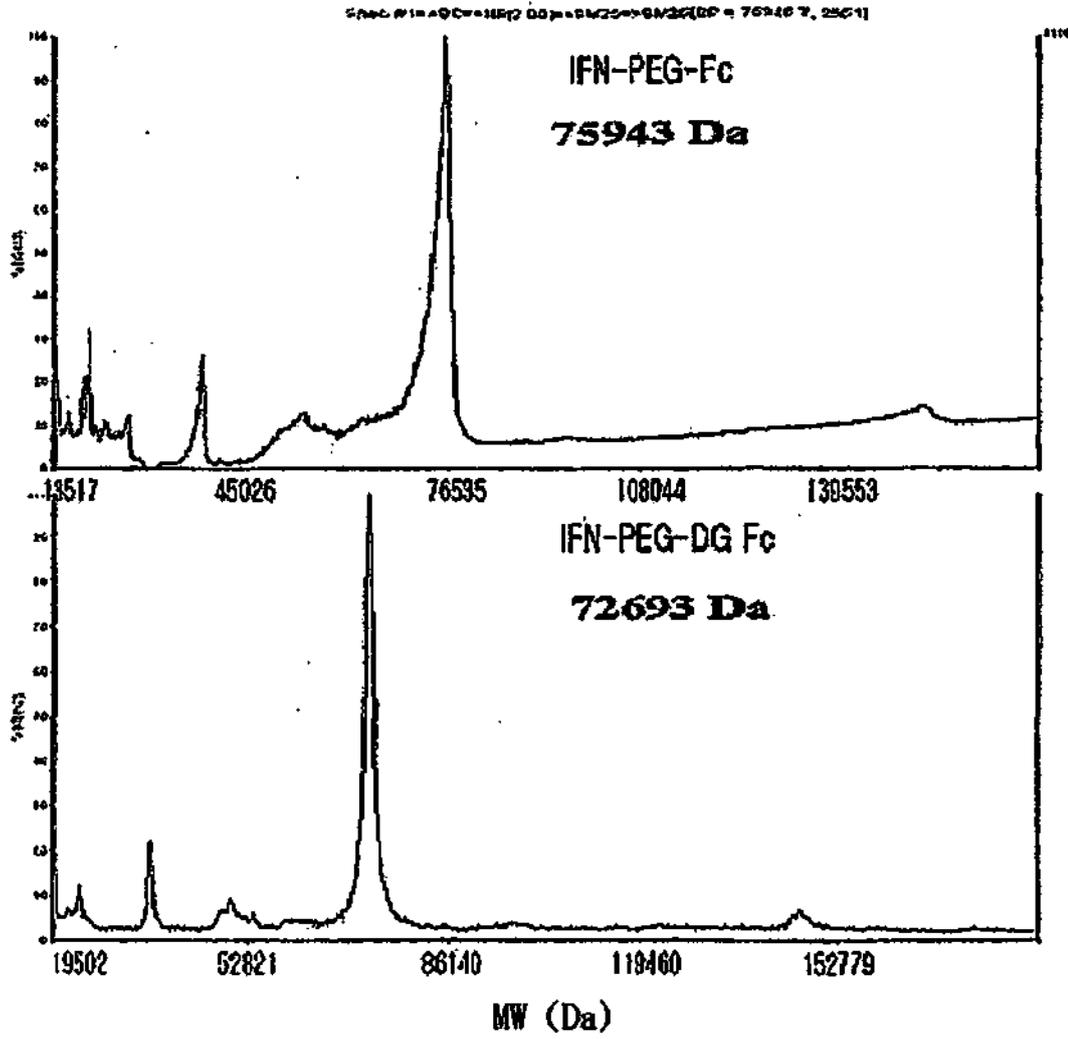


FIG. 11a

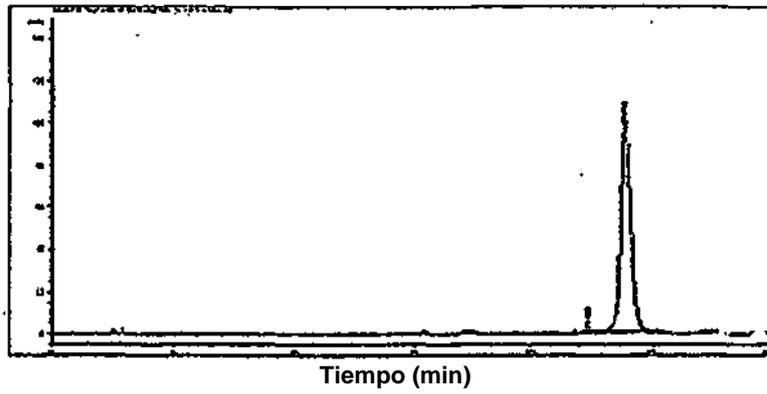


FIG. 11b

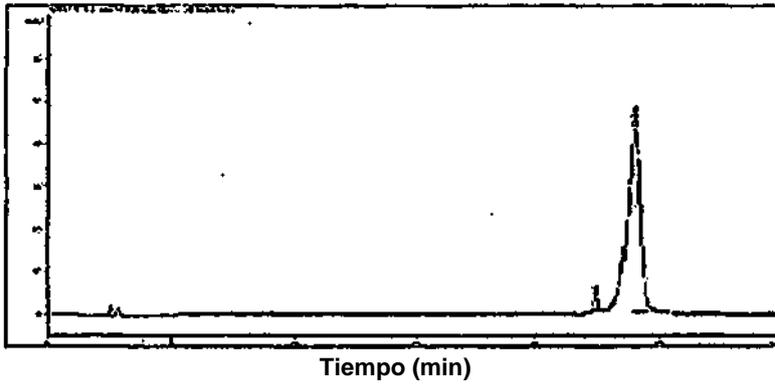


FIG. 11c

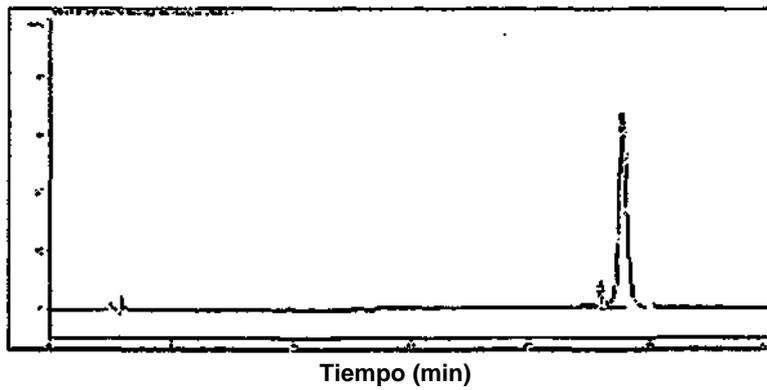


FIG. 12

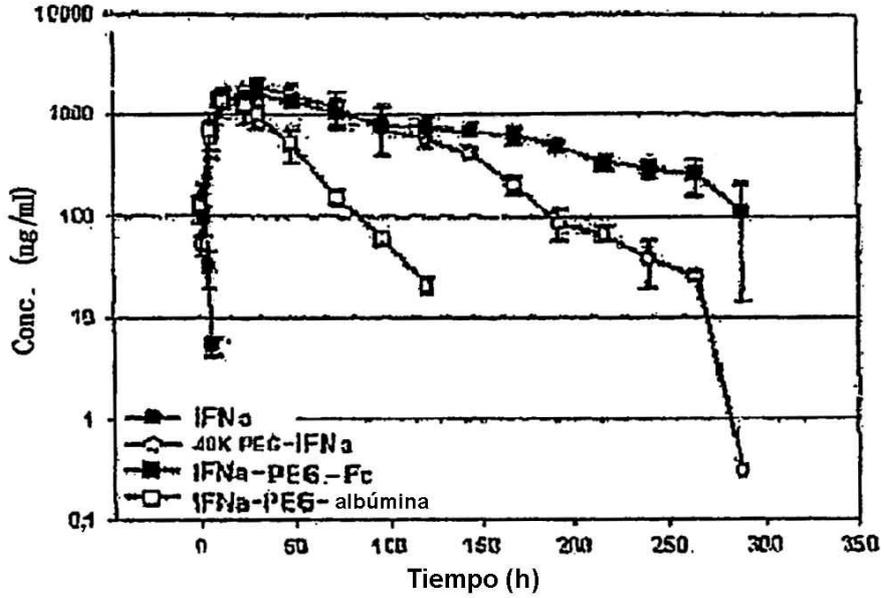


FIG. 13

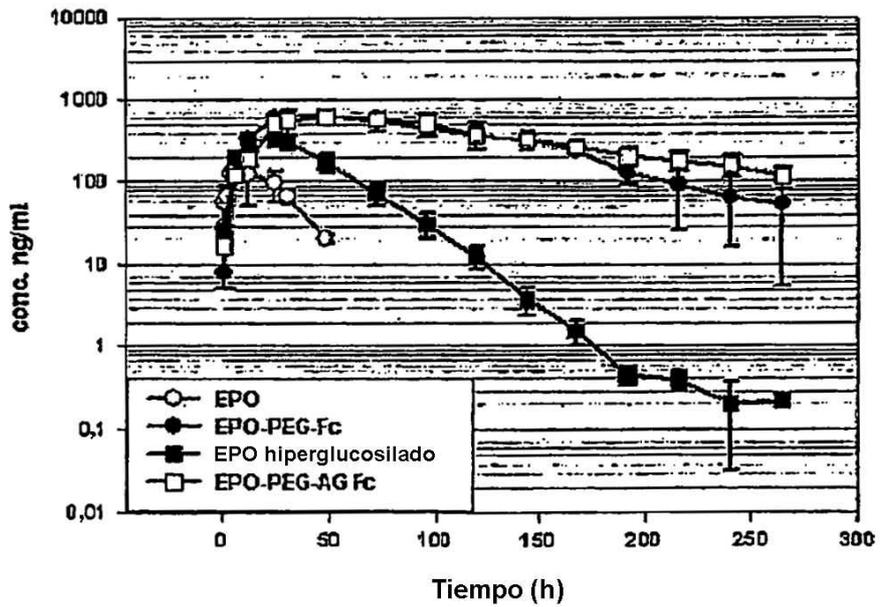


FIG. 14

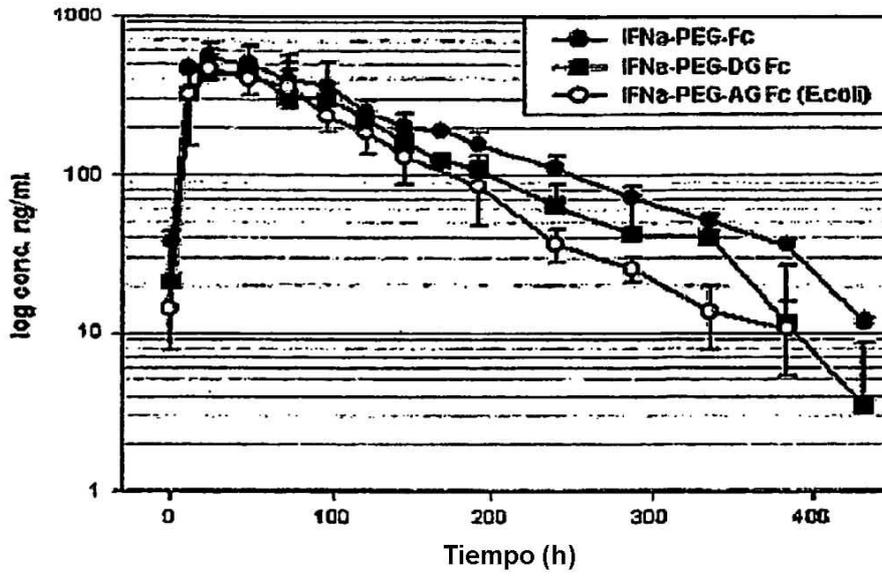


FIG. 15

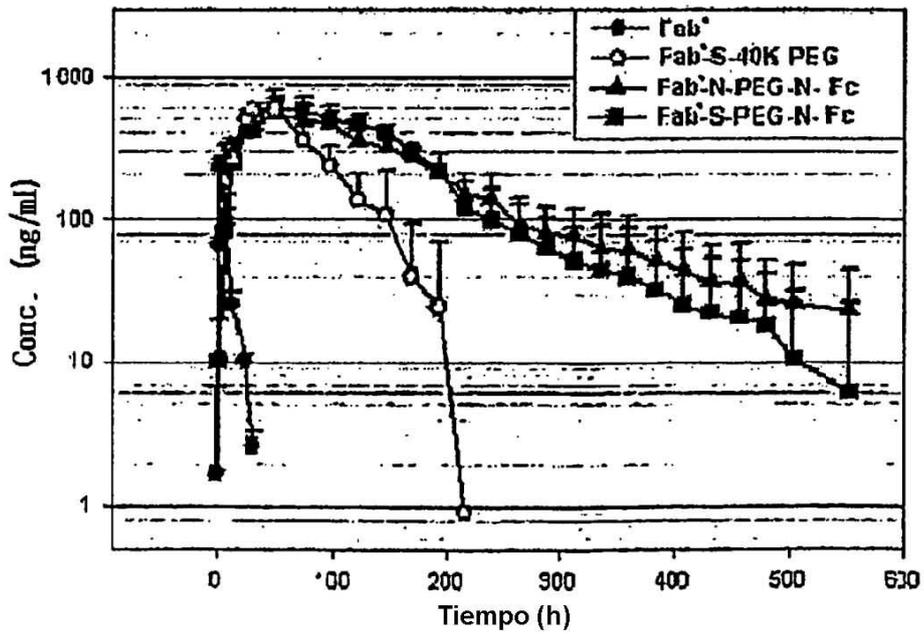


FIG. 16

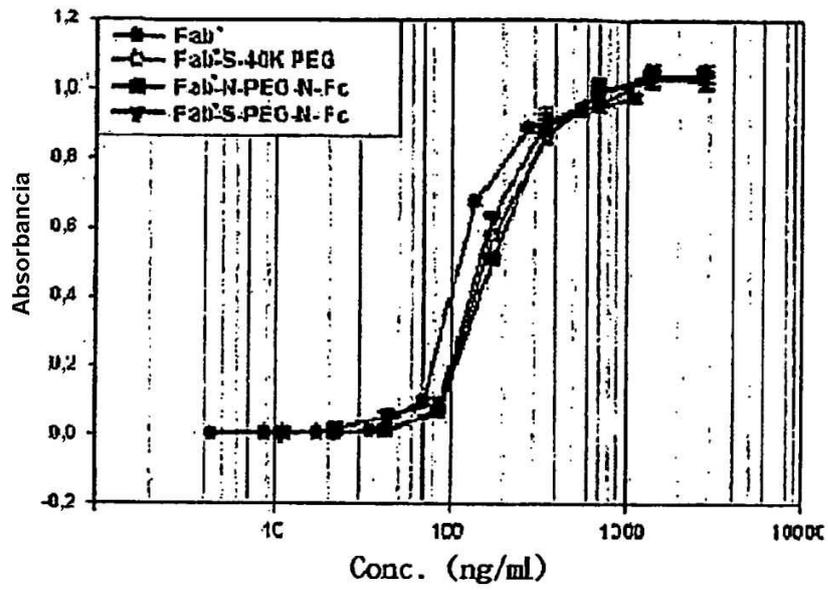


FIG. 17

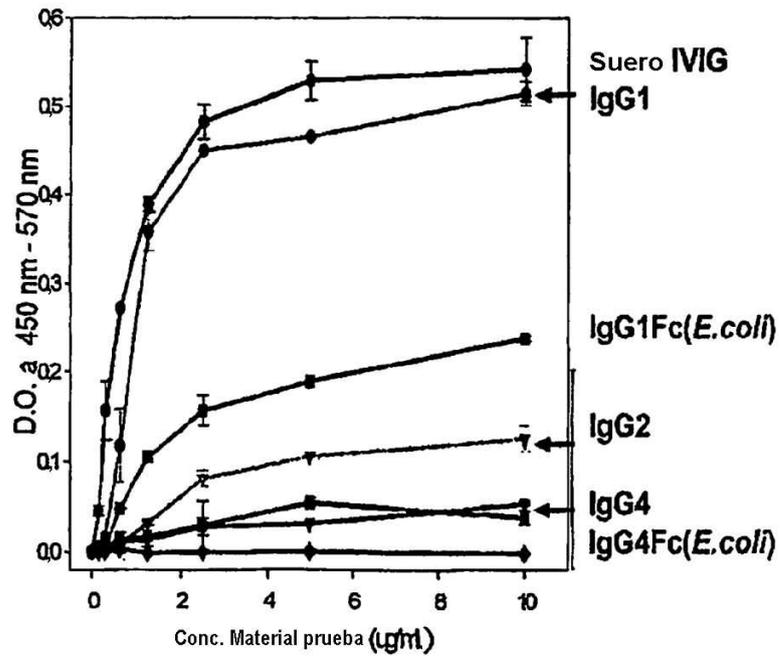


FIG 18

