

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 523 043**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.2009 E 09800577 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.08.2014 EP 2300501**

54 Título: **Un complejo polipeptídico que comprende un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales**

30 Prioridad:

23.07.2008 KR 20080071766

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

20.11.2014

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**SONG, DAE HAE;
SHIN, JAE HEE;
LEE, MI JI;
HONG, SUNG HEE;
KWON, SE CHANG y
LEE, GWAN SUN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 523 043 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

Un complejo polipeptídico que comprende un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales

5 Campo técnico

La presente invención se refiere a un complejo proteico que permite la actividad de acción prolongada de un polipéptido fisiológicamente activo con una proteína dimérica. Más particularmente, la presente invención se refiere a un complejo proteico en el que un polipéptido fisiológicamente activo y una proteína dimérica están unidos a un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales (3 brazos) a través de un enlace covalente respectivo, y un método para preparar el mismo.

Antecedentes técnicos

15 Debido a la baja estabilidad, los polipéptidos generalmente son adecuados para desnaturalizarse y ser degradados por proteinasas y pierden su actividad. Por otra parte, los péptidos son relativamente pequeños de tamaño de modo que se excretan fácilmente a través del riñón.

20 Para mantener las concentraciones de niveles en sangre deseadas y títulos de las mismas, por tanto, los medicamentos proteicos que comprenden polipéptidos o péptidos como principios activos necesitan ser administrados con frecuencia. Sin embargo, debido a que los medicamentos proteicos están, en la mayor parte, en una forma adecuada para inyecciones, el mantenimiento de los polipéptidos o péptidos fisiológicamente activos a niveles en sangre apropiados requiere inyecciones frecuentes, lo que produce dolor significativo al paciente. Para superar estos problemas, se han hecho intentos de proporcionar efectos medicinales máximos aumentando la estabilidad de medicamentos proteicos en la sangre y manteniendo niveles de medicamento en sangre altos durante un periodo de tiempo largo. Estos agentes medicinales proteicos de larga duración se requieren no solo para aumentar la estabilidad de los medicamentos proteicos y mantener títulos suficientes de los medicamentos mismos, sino también para no producir respuestas inmunitarias en los pacientes.

30 Convencionalmente, los polímeros muy solubles tal como polietilenglicol (PEG) se injertan químicamente en la superficie de proteínas con el fin de estabilizar las proteínas, prevenir el contacto de proteinasas con las proteínas, y suprimir la pérdida renal de los péptidos de pequeño tamaño. Injertado a sitios específicos o una variedad de sitios diferentes, PEG es útil para la estabilización y prevención de la hidrólisis de proteínas sin crear efectos secundarios notables. Además, el PEG injertado aumenta el peso molecular de las proteínas, conteniendo de esta manera la pérdida renal de las proteínas y manteniendo la actividad fisiológica de las proteínas.

35 Por ejemplo, el documento WO 2006/076471 describe el uso de péptido natriurético de tipo B (BNP) en el tratamiento de insuficiencia cardíaca congestiva. BNP se une al receptor de péptido natriurético A (NPR-A) para desencadenar la síntesis de GMPC, reduciendo de esta manera la presión sanguínea arterial. Cuando está PEGilado, se describe que BNP alarga la actividad fisiológica del mismo durante un periodo de tiempo largo. La patente en EE UU No. 6.924.264 también divulga un aumento en el periodo activo de exendina-4 por injerto de PEG en un residuo de lisina.

45 Para aumentar la actividad fisiológica del mismo, un polipéptido medicinal se une a ambos de los terminales de PEG en forma de un bis-conjugado (patente en EE UU No. 5.738.846). Por otra parte, dos proteínas medicinales diferentes se unen a terminales respectivos de PEG para formar un complejo proteico que tiene dos actividades fisiológicas diferentes (documento WO 92/16221). Sin embargo, no se encontró significancia en estos fármacos proteicos en términos de mantenimiento de la actividad.

50 Además, se describió que una proteína de fusión en la que G-CSF y albúmina humana se unieron a un PEG aumentó en estabilidad (Kinstler et al., *Pharmaceutical Research* 12(12): 1883-1888, 1995). Sin embargo, se encontró que el fármaco modificado con una estructura G-CSF-PEG-albúmina aumentaba el tiempo de residencia en solo aproximadamente cuatro veces, comparado con fármacos naturales solos, y que solo estaba ligeramente aumentado en semivida en suero. Por tanto, el fármaco modificado no se aplica prácticamente como un agente que dura.

55 Cuando se acoplan con PEG, los péptidos se vuelven más estables de modo que se alarga la persistencia de los mismos in vivo. Sin embargo, cuando le da alto peso molecular, PEG hace el título del péptido fisiológico activo significativamente bajo y disminuye la reactividad con péptidos, lo que produce un bajo rendimiento.

60 Una alternativa para aumentar la estabilidad de proteínas fisiológicamente activas in vivo recurre a la recombinación génica. Un gen que codifica una proteína muy estable en la sangre se une a un gen que codifica una proteína fisiológicamente activa de interés, seguido por transformación en células animales que después se cultivan para producir una proteína de fusión.

65

Por ejemplo, se ha descrito una proteína de fusión en la que la albúmina o un fragmento de la misma, que se sabe que es la más eficaz en estabilizar proteínas hasta ahora, se fusiona a una proteína fisiológica activa de interés (documentos WO 93/15199 y 93/15200, Publicación EP No. 413.622). Además, una proteína de fusión de interferón alfa y albúmina, producida en levadura por Human Genome Sciences (nombre comercial: Albuferon™) aumentó su semivida en suero de 5 horas a 93 horas, pero padece la crítica desventaja de estar disminuida en bioactividad a menos del 5% de la del interferón nativo (Osborn et al., J. Phar. Exp. Ther. 303(2): 540-548, 2002).

Respecto a los péptidos, sus modificaciones se mencionan en el documento WO 02/46227 que divulga que GLP-1, exendina-4 y análogos de las mismas se fusionan a seroalbúmina humana o fragmentos de inmunoglobulina (Fc) usando técnicas de recombinación genética y en la patente en EE UU No. 6.756.480 que divulga proteínas de fusión de la hormona paratiroidea (PTH) o análogos de la misma y fragmentos de inmunoglobulinas (Fc). Estos enfoques pueden superar el bajo rendimiento de la pegilación y la no especificidad, pero son desventajosos en que la semivida en suero no aumenta significativamente y en algunos casos, se producen bajos títulos. Se usan varios enlazadores peptídicos para aumentar máximamente la semivida en suero, pero muestran la alta posibilidad de producir respuestas inmunitarias. Cuando se da, un péptido que tiene un enlace disulfuro, tal como BNP, es muy probable que induzca mal plegamiento y por tanto es difícil de aplicar.

El documento WO 94/11399 A1 enseña el entrecruzamiento específico de sitio de las subunidades β de la hemoglobina en la posición lys-82 de cada subunidad en su forma tetramérica más estable con un entrecruzador trifuncional tal como tris (3,5-dibromosalicilato) de trimesoilo (TTDS). Ahrends, Nucleic Acids Research, vol. 34, no. 10, 3169-3180, 2006 identifica el fotoentrecruzamiento formado entre la cisteína única de la variante MutH A223C, marcada con el entrecruzador trifuncional en la hélice C-terminal y su proteína activadora MutL para investigar las interacciones proteína-proteína. El documento WO 2007/062177 A1 describe el entrecruzamiento de dos subunidades entre sí y un conjugado de anticuerpo para el fin de proporcionar sensibilidad y especificidad de tinción excepcional en ensayos inmunohistoquímicos y de hibridación *in situ*. Los documentos WO 93/02105 A1 A1, WO 2004/054615 A1 y Studdert et al., PNAS, vol. 102, no. 43, 15623-15628, 2006 enseñan todos tres proteínas entrecruzadas por un agente entrecruzador trifuncional. El documento WO 2008/082274 A1 divulga conjugados de proteína que comprenden un dominio Fc.

También se sabe otras varias proteínas de fusión que se preparan por unión del dominio Fc de la inmunoglobulina a interferón (publicación de patente coreana No. 2003-9464), receptor de interleuquina-4, receptor de interleuquina-7 o receptor de eritropoyetina (patente coreana No. 249572) mediante recombinación genética. La publicación de patente PCT No. WO 01/03737 divulga una proteína de fusión en la que una citoquina o un factor de crecimiento se unen a través de un enlazador oligopeptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La patente en EE UU No. 5.116.964 describe LHR (glucoproteína de superficie celular de linfocitos) o proteína CD4 que se fusiona al extremo amino o carboxi de un dominio Fc de inmunoglobulina usando una técnica de recombinación genética. Además, la patente en EE UU No. 5.349.053 divulga una proteína de fusión en la que IL-2 se une a un dominio Fc de inmunoglobulina. Se divulgan muchas otras proteínas de fusión de Fc construidas usando técnicas de recombinación genética, ejemplos de las cuales incluyen una proteína de fusión de un dominio Fc de inmunoglobulina con interferón beta o un derivado del mismo (Publicación de patente PCT No. WO 00/23472), un dominio Fc de inmunoglobulina con un receptor de IL-5 (patente en EE UU No. 5.712.121), un dominio Fc de inmunoglobulina G4 con interferón alfa (patente en EE UU No. 5.723.125) y un dominio Fc de inmunoglobulina G2 con una proteína CD4 (patente en EE UU No. 6.451.313). Por otra parte, la patente en EE UU No. 5.605.690 enseña el uso de un dominio Fc de inmunoglobulina modificado en la producción de proteínas de fusión. Por ejemplo, se usa Fc de inmunoglobulina con residuos de aminoácido modificados particularmente para complementar sitios de unión o sitios de unión del receptor para producir una proteína de fusión TNFR-Fc de IgG1 usando un método de recombinación genética. Otras proteínas de fusión del dominio Fc de inmunoglobulina modificado que se producen usando técnicas de recombinación genética se divulgan en la patentes en EE UU Nos. 6.277.375, 6.410.008 y 6.444.792.

Las inmunoglobulinas funcionan como anticuerpos, que muestran citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (CCDA) o citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y se describe que las cadenas de azúcares presentes en el dominio Fc de inmunoglobulina desempeñan un papel importante en CCDA y CDC (Burton D., Molec. Immun. 22, 161-206, 1985). Las inmunoglobulinas mismas, cuando están libres de cadenas de azúcares, se sabe que son similares en semivida en suero a las inmunoglobulinas que tienen cadenas de azúcares, pero que tienen una disminución de 10 a 1000 veces en la fuerza de unión al complemento y la fuerza de unión al receptor (Waldman H., Eur. J. Immunol. 23, 403-411, 1993; Morrison S., J. Immunol. 143, 2595-2601, 1989).

La patente en EE UU No. 6.660.843 divulga la fusión de un dominio Fc con un péptido de interés a través de un enlazador y la producción de la proteína de fusión en *E. coli* usando una técnica de recombinación génica. Para su uso en la preparación de complejos, un enlazador permite la selección de los sitios de conjugación entre dos proteínas de interés y la orientación de las mismas, y permite la producción de complejos en forma de monómeros, dímeros o multímeros homogéneos o heterogéneos. Además, cuando se usa este método, los complejos se pueden producir a un coste menor que cuando se usan células de mamífero. Además, los complejos se pueden producir en formas libres de cadenas de azúcares. Debido a la producción concomitante de tanto la proteína de interés y el dominio Fc de inmunoglobulina en *E. coli*, sin embargo, este método es difícil de aplicar a una proteína diana cuando

la forma nativa de la proteína diana tiene una cadena de azúcar. Tomando ventaja de los cuerpos de inclusión, este método es muy adecuado para inducir mal plegamiento. En las proteínas de fusión de Fc producidas usando las técnicas de recombinación genética, la fusión es posible solo en sitios específicos, es decir, un extremo amino o carboxi del dominio Fc de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión de Fc se expresan solo en formas diméricas homogéneas, pero no en formas monoméricas. Además, la fusión es posible solo entre proteínas glucosiladas o entre proteínas aglucosiladas, pero imposible entre proteínas glucosiladas y proteínas aglucosiladas. Si está presente, una secuencia de aminoácidos recién formada como resultado de la fusión puede inducir una respuesta inmunitaria. Además, el enlazador puede ser sensible a degradación enzimática.

En el desarrollo de proteínas de fusión usando dominios Fc de inmunoglobulinas, en ningún sitio se ha hecho un intento de dar complejos de proteínas diana con Fc nativo humano mediante un entrecruzador en artículos previos. Los dominios Fc de inmunoglobulinas se pueden producir en células de mamífero o E. coli usando técnicas de recombinación genética, pero en ningún sitio se ha hecho un intento de producir solo dominios Fc de inmunoglobulinas nativos libres de proteínas diana en alto rendimiento y de aplicarlos a formas que duran en artículos previos. Además, no se han hecho intentos de producir complejos del Fc de inmunoglobulina recombinante con proteínas diana mediante entrecruzadores.

Como tal, se han realizado una variedad de métodos diferentes para conjugar polipéptidos fisiológicamente activos con polímeros. En métodos convencionales, los polipéptidos se pueden mejorar en estabilidad, pero con reducción significativa en actividad, o se pueden mejorar en actividad independientemente de la estabilidad. Por tanto, todavía hay una necesidad para un método que pueda aumentar la estabilidad de medicamentos proteicos con una reducción mínima en la actividad inducida por la modificación.

En este contexto, los presentes inventores desarrollaron un complejo proteico que mejora en semivida en suero con alta actividad por unión de una inmunoglobulina y un polipéptido fisiológicamente activo respectivamente a extremos opuestos de un enlazador no peptidílico como se divulga en las patentes coreanas No. 10-0725315 y 10-0775343.

Un complejo proteico en el que una inmunoglobulina y un polipéptido fisiológicamente activo están unidos respectivamente a extremos opuestos de un polímero no peptidílico se prepara convencionalmente por unión de un polímero no peptidílico preferentemente con un polipéptido fisiológicamente activo y después con un dominio Fc de inmunoglobulina. Sin embargo, este método de preparación convencional produce muchas impurezas indeseables, así como, produce pérdida de una gran cantidad del polipéptido fisiológicamente activo. Es decir, el método convencional es económicamente desfavorable en la aplicación industrial del mismo y el complejo resultante se debe purificar de alguna manera algo complicada. En el caso donde el polipéptido fisiológicamente activo está en forma de dímero, produce una forma en puente con un polímero no peptidílico en ambos extremos de modo que no puede formar complejos con un Fc de inmunoglobulina o puede formar complejos pero en un rendimiento muy bajo. Por otra parte, cuando un dominio Fc de inmunoglobulina se une primero a un polímero no peptidílico, se producen también problemas similares. Debido a que un Fc de inmunoglobulina es un homodímero con dos extremos N muy próximos entre sí, los enlaces respectivos se forman entre los dos extremos N del Fc de inmunoglobulina y los extremos opuestos de polímero no peptidílico para producir una forma en puente, de modo que no permanecen extremos funcionales para reaccionar con el polipéptido fisiológicamente activo. Según esto, el rendimiento de producción disminuye significativamente.

Divulgación

Problema técnico

Produciendo la presente invención, investigación profunda y completa en complejos de proteínas, realizada por los presentes inventores, destinada a superar los problemas encontrados en el estado de la técnica, produjo el descubrimiento de que el uso de un polímero no peptidílico de 3 brazos como enlazador en la preparación de un complejo proteico compuesto de una proteína dimérica de dominio Fc de Ig y un polipéptido fisiológicamente activo previene la pérdida del polipéptido fisiológicamente activo a un aumento significativo del rendimiento de producción, permite que el complejo se purifique con un método sencillo, y da estabilidad estructural al complejo proteico para extender la semivida en suero mientras que al mismo tiempo mantiene la actividad biológica del mismo.

Solución técnica

Por tanto es un objeto de la presente invención proporcionar un complejo proteico en el que un polipéptido fisiológicamente activo, un polímero no peptidílico de 3 brazos y una proteína dimérica de dominio Fc de Ig se unen a través de enlaces covalentes, y un método para preparar el mismo.

La presente invención permite proporcionar un agente farmacéutico proteico sostenido que comprende un complejo proteico que extiende la semivida en suero de un polipéptido fisiológicamente activo mientras que mantiene la actividad biológica del mismo.

Efectos ventajosos

Al tener una estructura en que un polipéptido fisiológicamente activo y una proteína dimérica se unen a un polímero no peptídico de 3 brazos a través de enlaces covalentes, el complejo proteico de la presente invención puede mantener una alta concentración en sangre del polipéptido activo durante un periodo de tiempo largo lo que produce efectos medicinales estables.

Además, el método para preparar el complejo proteico según la presente invención puede reducir mucho la cantidad de polipéptido fisiológicamente activo requerido por el método convencional que usa un polímero no peptídico de 2 brazos y disfruta, sobre el método convencional, de la ventaja de introducir métodos de purificación más sencillos y aumentar significativamente el rendimiento de producción. Especialmente, los complejos proteicos persistentes con polipéptidos fisiológicamente activos, diméricos se prepararon preferiblemente usando el método de la presente invención.

Descripción de las figuras

La figura 1 muestra una figura representativa de un complejo proteico usando un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales (3 brazos).

La figura 2 muestra las eficacias in vivo del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido (N) en gráficos (HM11760B: complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido (N), Sandostatin-LAR: una formulación de liberación sostenida de octreótido).

Las figura 3 muestra la eficacia in vivo del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH (N) (HM12160A: complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 2 brazos-FSH (N), HM12160B: complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH (N)).

Mejor modo

Según un aspecto de la misma, la presente invención se dirige a un complejo proteico en el que un polipéptido fisiológicamente activo y un dominio Fc de Ig se unen covalentemente a un polímero no peptídico de 3 brazos.

Como se usa en el presente documento, el término "complejo proteico" o "complejo" se pretende que se refiera a una estructura compuesta de al menos un polipéptido fisiológicamente activo, al menos un polímero no peptídico de 3 brazos y al menos una proteína dimérica, con interconexión a través de enlaces covalentes entre ellos. Para diferenciarse a si mismo de un "complejo", el término "conjugado" se usa en el presente documento para referirse a una estructura en la que solo pares del polipéptido fisiológicamente activo, el polímero no peptídico y la proteína dimérica están interconectados a través de un enlace covalente.

El complejo proteico de la presente invención es un fármaco proteico que se modifica para aumentar la persistencia del mismo in vivo y reducir mínimamente la actividad biológica del mismo. La presente invención presenta el uso de un polímero no peptídico de 3 brazos para conectar un polipéptido fisiológicamente activo y un dominio Fc de Ig a través del mismo para formar un complejo proteico, permitiendo de esta manera la aplicación de un método de preparación mediante el cual la pérdida del polipéptido fisiológicamente activo se puede prevenir y el complejo proteico también puede ser tan estructuralmente estable como ser purificado sencillamente.

Como se usa en el presente documento, el término "proteína dimérica" significa una proteína con dos extremos N. Se prefiere un dominio Fc de inmunoglobulina que se puede usar como un soporte. También se incluyen homodímeros o heterodímeros fisiológicamente activos en el ámbito de la proteína dimérica.

Un dominio Fc de inmunoglobulina es lo suficiente estable para ser usado como soporte para un fármaco porque es un polipéptido biodegradable que se metaboliza in vivo. Además, gracias a los pesos moleculares relativamente pequeños, el dominio Fc de inmunoglobulina tiene ventajas sobre las moléculas de inmunoglobulina totales en términos de la preparación, purificación y rendimiento del complejo. Además, debido a que está libre de Fab que es muy diferente en secuencia de aminoácidos de un anticuerpo a otro, Fc fomenta fuertemente la homogeneidad del complejo y se espera que reduzca la inducción de antigenicidad.

El término "dominio Fc de inmunoglobulina", como se usa en el presente documento, se pretende que indique el dominio constante 2 de la cadena pesada (C_{H2}) y el dominio constante 3 de la cadena pesada (C_{H3}) que está libre de los dominios variables de la cadena pesada y ligera, dominio constante 1 de la cadena pesada (C_{H1}) y dominio constante 1 de la cadena ligera (C_{L1}) y puede comprender una región bisagra. El dominio Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser un dominio Fc extendido que comprende además una parte o el dominio constante 1 de la cadena pesada (C_{H1}) total y/o el dominio constante 1 de la cadena ligera (C_{L1}) y está libre de los dominios variables de la cadena pesada y ligera si garantiza un efecto sustancialmente igual a o mayor que el de la forma nativa. Alternativamente, el dominio Fc puede ser una forma truncada de C_{H2} y/o C_{H3} que carece de una parte significativa de la secuencia de aminoácidos correspondiente. Para resumir, el dominio Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede ser 1) dominio C_{H1} , dominio C_{H2} , dominio C_{H3} y dominio C_{H4} , 2) dominio C_{H1} y dominio

C_H2, 3) dominio C_H1 y dominio C_H3, 4) dominio C_H2 y dominio C_H3, 5) una combinación de uno o más dominios y una región bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la bisagra) o 6) un dímero compuesto de cada dominio constante de la cadena ligera y un dominio constante de la cadena ligera.

5 Además, el término “dominio Fc de inmunoglobulina”, como se usa en el presente documento, se pretende que cubra no solo las secuencias nativas de aminoácidos sino también mutantes de las mismas. El mutante de la secuencia de aminoácidos significa una secuencia de aminoácidos diferente de la secuencia nativa por delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora de uno o más residuos de aminoácidos o combinaciones de las mismas. Por ejemplo, los residuos de aminoácidos en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331 de Fc de IgG, que se sabe que desempeñan un papel importante en la unión del anticuerpo, se pueden modificar de modo que se usen como sitios de unión adecuados. Además, son posibles varios mutantes que, por ejemplo, carecen de un residuo que forma un enlace disulfuro o varios aminoácidos N-terminales del Fc nativo, o tienen un residuo de metionina adicional en el extremo N del Fc nativo. Además, se pueden eliminar las funciones efectoras eliminando un motivo de unión al complemento, por ejemplo, el motivo de unión a C1q, o un motivo de CCDa (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo). Se puede hacer referencia a los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478 respecto a la preparación de mutantes de la secuencia de aminoácidos de dominios Fc de inmunoglobulinas.

20 Las sustituciones de aminoácidos que no alteran la actividad de las proteínas o péptidos nativos como un todo se conocen en la técnica (H. Neurath, R. L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, Nueva York, 1979). Las sustituciones más típicas se producen entre 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. Si es necesario, los aminoácidos pueden experimentar una modificación, tal como fosforilación, sulfatación, acrilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, etc.

25 Los mutantes de Fc descritos anteriormente son preferiblemente equivalentes funcionales a sus formas naturales, siendo por tanto similares en actividad biológica, con una mejora en la estabilidad estructural contra el calor y el pH.

30 El dominio Fc puede ser una forma nativa aislada de seres humanos y otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o puede ser un recombinante o un derivado de la misma, obtenido de células animales o microorganismos transformados. En el primer caso, la inmunoglobulina total se aísla de seres humanos o animales, seguido por tratamiento con proteasa. Cuando se trata con papaína, la inmunoglobulina total se divide en Fab y Fc. La pepsina corta la inmunoglobulina total en pF'c y F(ab)₂. De estos fragmentos, Fc o pF'c se pueden separar usando cromatografía de exclusión molecular. Se prefiere un dominio Fc de inmunoglobulina recombinante derivado del dominio Fc humano en microorganismos.

35 El dominio Fc de inmunoglobulina útil en la presente invención puede tener una cadena de azúcar menor que, igual a, o más larga en longitud que el dominio Fc nativo, o puede no tener cadenas de azúcar. La adición, reducción o eliminación de la cadena de azúcar del Fc de inmunoglobulina se puede lograr usando una técnica típica, tal como una técnica química, una técnica enzimática o una técnica de recombinación genética usando un microorganismo. Un dominio Fc de inmunoglobulina desglucosilado está significativamente reducido en la fuerza de unión del complemento (C1q) y tiene poca o ninguna citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo o citotoxicidad dependiente del complemento, y por tanto no induce respuestas inmunitarias innecesarias. En este contexto, los dominios Fc de inmunoglobulinas desglucosilados o aglucosilados preferentemente coinciden con la función deseada como soportes de fármacos.

40 Como se usa en el presente documento, el término “desglucosilación” se refiere a la eliminación enzimática de una cadena de azúcar del Fc nativo. El término “aglucosilación” se refiere a la ausencia de cadenas de azúcar en el dominio Fc porque se produce en eucariotas y preferiblemente en *E. coli*.

50 El dominio Fc de inmunoglobulina se puede originar de animales incluyendo seres humanos, vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas con una preferencia por el origen humano. Además, el dominio Fc de inmunoglobulina útil en la presente invención puede derivar de entre IgG, IgA, IgD, IgE, IgM y combinaciones de las mismas o híbridos de las mismas. Preferiblemente, deriva de IgG o IgM, que son más abundantes que los otros tipos de inmunoglobulina, y lo más preferiblemente de IgG que se sabe que extiende la semivida en suero de las proteínas de unión a ligandos.

55 Además, el dominio Fc de inmunoglobulina puede estar en forma de dímeros o multímeros (combinaciones de Fc de inmunoglobulina), que cada uno comprende inmunoglobulinas glucosiladas compuestas de dominios del mismo origen.

60 El término “combinación”, como se usa en el presente documento, significa que polipéptidos que codifican fragmentos Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla del mismo origen se unen a un polipéptido de cadena sencilla de diferente origen para formar un dímero o multímero. Es decir, se puede preparar un dímero o multímero combinando dos o fragmentos seleccionados entre los fragmentos Fc de Fc de IgG, Fc de IgA, Fc de IgM, Fc de IgD y Fc de IgE.

El término "híbrido", como se usa en el presente documento, significa que las secuencias que codifican dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferentes orígenes están presentes en un fragmento Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente invención, son posibles varias formas híbridas. Por ejemplo el dominio Fc está compuesto de uno a cuatro dominios diferentes seleccionados entre C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4 de Fc de IgG, Fc de IgM, Fc de IgA, Fc de IgE y Fc de IgD y puede comprender una región bisagra.

IgG se divide además en las subclases de IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 y sus combinaciones o híbridos están permitidos en la presente invención. Es preferible un dominio Fc de IgG2 o IgG4, dándose la mayor preferencia a un dominio Fc de IgG4 libre de funciones efectoras tal como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

Según esto, un dominio Fc aglucosilado de IgG4 humana es el soporte de fármaco más altamente preferido. El dominio Fc de origen humano es ventajoso sobre el de origen no humano porque el último puede actuar como un antígeno en el cuerpo, induciendo la producción de anticuerpos contra el mismo.

La presente invención presenta la unión de un fármaco proteico a una proteína dimérica a través de un polímero no peptídico.

En la presente invención, el polímero no peptídico significa un polímero biocompatible compuesto de dos o más unidades de repetición que están unidas entre sí a través de un enlace covalente diferente de un enlace peptídico.

Los enlazadores peptídicos convencionales usados en las proteínas de fusión preparadas mediante fusión en el mismo marco de lectura padecen la desventaja de ser fácilmente cortadas in vivo por proteinasas fracasando en garantizar la semivida en suero del fármaco activo tanto como se esperaría cuando el soporte permanece intacto. En contraste, el polímero de la presente invención es resistente a degradación enzimática, manteniendo la semivida en suero del fármaco tanto como la garantizada cuando el soporte permanece intacto. Siempre que actúe como se ha mencionado anteriormente, es decir, sea resistente in vivo a proteinasas, se puede usar cualquier polímero en la presente invención sin limitaciones impartidas al mismo. El polímero no peptídico útil en la presente invención varía en peso molecular desde 1 a 100 kDa y preferiblemente desde 1 a 20 kDa. El polímero no peptídico de la presente invención que se conjuga con un dominio Fc de inmunoglobulina puede ser un polímero o una combinación de diferentes polímeros.

Los ejemplos del polímero no peptídico útil en la presente invención incluyen polímeros biodegradables tal como polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, poliol polioxiatoxilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido poliláctico-glicólico), lipopolímeros, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos, con una preferencia por polietilenglicol. Además, sus derivados que se conocen en la técnica o que se pueden preparar fácilmente usando una técnica típica están en el ámbito de la presente invención.

Los polímeros no peptídicos usados en la presente invención tienen grupos funcionales a los que se pueden unir el dominio Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico.

En contraste con el método anterior para preparar un complejo proteico usando un polímero no peptídico que tiene dos extremos funcionales (2 brazos) (patente coreana No. 10-0725315), la presente invención emplea un polímero no peptídico de 3 brazos. Diferente del polímero no peptídico convencional que tiene un extremo funcional y ramas desde una molécula central, el polímero no peptídico útil en la presente invención tiene tres extremos funcionales en el que dos son responsables de la formación de los enlaces covalentes con una proteína dimérica mientras que el otro está covalentemente unido a un polipéptido fisiológicamente activo.

En mayor detalle, puesto que un Fc de inmunoglobulina es un homodímero con dos extremos N muy próximos entre sí, se forman los respectivos enlaces entre los dos extremos N del Fc de inmunoglobulina y los extremos opuestos del polímero no peptídico. Por tanto, cuando el polímero no peptídico de 2 brazos primero forma enlaces covalentes con el dominio Fc de inmunoglobulina, no quedan extremos funcionales que puedan reaccionar con el polipéptido fisiológicamente activo, lo que produce una disminución significativa en el rendimiento de producción. Por tanto, el polipéptido fisiológicamente activo, antes que con el polímero no peptídico de 2 brazos, se hace reaccionar con el dominio Fc de inmunoglobulina. Sin embargo, cuando el polipéptido fisiológicamente activo se hace reaccionar de antemano, se producen muchas impurezas indeseables, dando lugar de esta manera a la pérdida del polipéptido fisiológicamente activo. En contraste, es posible hacer reaccionar el polímero no peptídico de 3 brazos con el dominio Fc de inmunoglobulina antes de la reacción con el polipéptido fisiológicamente activo porque dos de sus tres extremos funcionales son responsables para los dos extremos N del Fc de inmunoglobulina mientras que el otro extremo funcional del mismo puede cubrir el polipéptido fisiológicamente activo. Por tanto, el complejo proteico se puede producir en alto rendimiento. En la práctica, se encuentra que el rendimiento de producción aumenta en dos ~ nueve veces más que cuando se usan polímeros no peptídicos de 2 brazos.

Los tres grupos funcionales terminales del polímero no peptídico se pueden unir a residuos de lisina, histidina o cisteína libres N-terminales del dominio Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo.

Preferiblemente, los tres grupos funcionales terminales del polímero no peptídico se seleccionan de entre grupos aldehído, grupos propionaldehído, grupos butil aldehído, grupos maleimida y derivados de succinimida. Los ejemplos de los derivados de succinimida útiles en la presente invención incluyen propionato de succinimidilo, hidroxisuccinimidilo, succinimidil carboximetilo y carbonato de succinimidilo. Se prefieren los grupos aldehído. Cuando están presentes en los tres extremos del polímero no peptídico, los grupos aldehído reactivos pueden minimizar las reacciones no específicas y son eficaces en formar enlaces tanto con el polipéptido fisiológicamente activo como con la proteína dimérica. Además, el producto final formado por alquilación reductora con aldehído es mucho más estable que el producto formado con enlaces amida. Generalmente, los grupos funcionales aldehído reaccionan selectivamente con extremos amino a un pH bajo mientras que forman un enlace covalente con un residuo de lisina a alto pH, por ejemplo, pH 9,0. Los tres grupos funcionales terminales del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Según la presente invención, el conjugado de la proteína dimérica con el polímero no peptídico se une a un polipéptido fisiológicamente activo para formar un complejo proteico.

En el presente documento, el término "polipéptido fisiológicamente activo", "proteína fisiológicamente activa", "proteína activa", "polipéptido activo" o "fármaco proteico" significa un polipéptido, un péptido o una proteína que tiene algún tipo de actividad antagónica a un hecho fisiológico in vivo y estos términos se pueden usar de forma intercambiable.

Los polipéptidos fisiológicamente activos aplicables al complejo proteico de la presente invención se pueden ejemplificar por hormonas, citoquinas, interleuquinas, proteínas que se unen a interleuquinas, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores de transcripción, factores sanguíneos, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligandos, receptores, antígenos de superficie celular, antagonistas de receptores y derivados o análogos de los mismos.

Los ejemplos concretos de polipéptidos fisiológicamente activos útiles en la presente invención incluyen hormonas de crecimiento humanas, hormonas liberadoras de la hormona de crecimiento, péptidos liberadores de la hormona de crecimiento, interferones y receptores de interferón (por ejemplo, interferón- α , - β y - γ , receptores de interferón de tipo I solubles), factores estimulantes de colonias, péptidos similares a glucagón (GLP-1, etc.), péptidos de extendina-4, ANP, BNP, CNP, DNP, receptores acoplados a proteínas G, interleuquinas (por ejemplo, interleuquina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30) y receptores de interleuquinas (por ejemplo, receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, α -galactosidasa-A, α -L-iduridasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, factor activador de plaquetas acetilhidrolasa, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas que unen a interleuquina y citoquina (por ejemplo, IL-18bp, proteína que se une a TNF, etc.), factores activadores de macrófagos, péptidos de macrófagos, factores de células B, factores de células T, proteína A, inhibidores de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxinas, linfotoxinas, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento transformante, alfa-1 antitripsina, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína E, eritropoyetina, eritropoyetina glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptidos activadores de los receptores de trombina, trombomodulina, factor sanguíneo VII, VIIa, VIII, IX y XIII, activadores de plasminógeno, péptidos que se unen a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimuladora del hueso, calcitonina, insulina, somatostatina, octreótido (agonista de somatostatina), atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conjuntivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nerviosos (por ejemplo, factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, factor de axogénesis 1, péptidos similares de glucagón (GLP-1), péptidos de extendina-4, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado de glía, netrina, factor inhibidor de neutrófilos, neurturina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento de tipo insulínico, hormona corticosuprarrenal, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante del tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores (por ejemplo TNFR(P75), TNFR(P55), receptor de IL-1, receptor de VEGF, receptor activador de células B, etc.), antagonistas de receptores, (por ejemplo, IL1-Ra, etc.), antígenos de superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, F(ab')₂ y Fd) y antígenos de vacunas derivadas de virus. Preferiblemente, el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona de entre hormonas de crecimiento humanas, interferón alfa, interferón beta, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, extendina-4, péptido de imidazol acetil extendina-4 (agonista de extendina-4), calcitonina, octreótido (agonista de calcitonina), BNP y Fab'.

Desventajosamente, estos fármacos proteicos no pueden mantener su actividad biológica in vivo durante un tiempo largo porque son muy adecuados para desnaturalizarse o se degradan fácilmente con proteinasas. Sin embargo, el complejo de la presente invención en el que una proteína dimérica y un polipéptido se conjugan a través de un polímero no peptídico aumenta tanto la estabilidad estructural como el tiempo de semidepuración del fármaco. La

reducción de la actividad biológica del polipéptido debido a la conjugación con la proteína dimérica es muy insignificante, comparada con la generada en complejos convencionales. Por tanto, el complejo del polipéptido y el dominio Fc de la inmunoglobulina según la presente invención se caracteriza por tener una biodisponibilidad significativamente mejorada, comparada con la de los agentes fármacos polipeptídicos convencionales.

Según otro aspecto de la misma, la presente invención se refiere a un método para preparar un complejo proteico en el que un dominio Fc de Ig se conjuga con un polipéptido fisiológicamente activo a través de un polímero no peptidílico de 3 brazos, que comprende: (1) unir covalentemente dos brazos del polímero no peptidílico de 3 brazos a grupos amino N-terminales opuestos del dominio Fc de Ig para formar un conjugado, (2) aislar de la mezcla de reacción del paso (1) el conjugado en el que el dominio Fc de Ig está unido covalentemente en los extremos N del mismo con el polímero no peptidílico y (3) unir covalentemente el polipéptido fisiológicamente activo a un brazo libre del polímero no peptidílico del conjugado aislado.

En otra forma de realización preferida, los tres brazos del polímero no peptidílico del paso (1) tienen respectivos grupos funcionales aldehídos en los extremos del mismo. Más preferiblemente, el polímero no peptidílico se une al grupo amino N-terminal del polipéptido fisiológicamente activo a pH 6,0.

En el paso (1), el dominio Fc de Ig se hace reaccionar en una proporción molar de 1:2 a 1:5 con el polímero no peptidílico. En el paso (3), la proporción molar del conjugado aislado por el paso (2):el polipéptido fisiológicamente activo preferiblemente varía de 1:0,5 a 1:0,05.

Las reacciones en los pasos (1) y (3) dependen de los tres grupos terminales del polímero no peptidílico. Si se requiere, las reacciones se pueden realizar en presencia de un agente reductor. Los ejemplos preferidos del agente reductor incluyen cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), borohidruro de sodio, borato de dimetilamina y borato de piridina.

La unión entre el dominio Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo se alcanza no por fusión basada en recombinación genética, sino a través de enlace covalente.

Según un aspecto adicional de la misma, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende el complejo proteico de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable, que muestra una mejora en la sostenibilidad in vivo de un polipéptido fisiológicamente activo.

A través de una ruta apropiada, la composición farmacéutica de la presente invención se debe introducir en un tejido u órgano de interés. Siempre que se administre al tejido diana, se puede usar cualquier ruta para la administración de la composición farmacéutica de la presente invención. Por ejemplo, la administración se puede llevar a cabo a través de vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, local, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero no está limitada a las mismas. Preferiblemente, la composición farmacéutica de la presente invención se administra en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica se puede administrar con la ayuda de un dispositivo a través del cual se administra el material activo a células diana.

La composición farmacéutica basada en el complejo de la presente invención puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. Para su uso como un vehículo farmacéuticamente aceptable en formas farmacéuticas orales, se seleccionan un aglutinante, un lubricante, un disgregante, un excipiente, un solubilizante, un dispersante, un estabilizante, un agente de suspensión, un colorante y/o un fragmento. Cuando la composición farmacéutica de la presente invención se formula en inyecciones, se pueden usar un tampón, un conservante, un agente que alivia el dolor, un solubilizante, un isotónico, y un estabilizante solos o en combinación. Para la aplicación local, se pueden usar una base, un excipiente, un lubricante, y un conservante. Para uso práctico, la composición farmacéutica de la presente invención se puede formular en combinación con el vehículo farmacéuticamente aceptable en varias formas farmacéuticas. Para las formas farmacéuticas, por ejemplo, se puede formular en comprimidos, pastillas, cápsulas, elixir, suspensiones, jarabes, obleas, etc. Con respecto a las inyecciones, pueden estar en forma de ampollas de dosis única o dosis múltiples. Otras formas disponibles incluyen soluciones, suspensiones, píldoras, polvos, cápsulas y agentes de liberación sostenida. Los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes útiles en la formulación incluyen lactosa, dactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa amorfa, polivinilpirrolidona, agua, metilhidroxibenzoato, propilhidroxibenzoato, talco, estearato de magnesio y vaselina líquida. Además, son útiles un relleno, un agente antiaglomerante, un lubricante, una fragancia, un emulsionante y un conservante.

La cantidad farmacéuticamente eficaz del complejo proteico de la presente invención varía dependiendo del tipo de enfermedades que se van a tratar, la vía y frecuencia de administración, la edad, sexo y peso del paciente, y la gravedad de la enfermedad, así como el tipo de los polipéptidos fisiológicamente activos. La superioridad del complejo proteico en la persistencia y título in vivo hace posible reducir la dosis y frecuencia de administración de la composición farmacéutica de la presente invención.

Como se divulga en las patentes coreanas No. 10-0725315 y 10-0775343, se proporciona un complejo proteico en que un dominio constante de inmunoglobulina y un polipéptido fisiológicamente activo se unen respectivamente a extremos opuestos de un polímero no peptidílico. Este complejo proteico se prepara uniendo el polímero no peptidílico con el polipéptido fisiológicamente activo para formar un conjugado y después con el Fc de inmunoglobulina. El proceso de preparación es desventajoso en que el polipéptido fisiológicamente activo se pierde en una gran cantidad durante la preparación. En contraste, el uso de un polímero no peptidílico de 3 brazos en la preparación de un complejo proteico puede reducir excepcionalmente la pérdida del polipéptido fisiológicamente activo. Además, el complejo proteico se puede aislar usando un método de purificación sencillo.

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

Modo para la invención

15 EJEMPLO 1: Preparación del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N)

Para la pegilación de un Fc de inmunoglobulina en su extremo N, se hicieron reaccionar 10 mg/ml de Fc de inmunoglobulina en una proporción molar de 1:2 con 5K PropionALD(3) PEG (PEG con tres grupos propionaldehído, NOF, Japón) a 4°C durante 4,5 horas. La reacción se realizó en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, en presencia de SCB (NaCNBH₃) 20 mM como agente reductor. Usando SOURCE Q (XK 16 ml, GE Healthcare), se purificó Fc de inmunoglobulina monopegilado de la mezcla de reacción. A continuación, se hizo reaccionar octreótido en una proporción molar de 1:2 con el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG a 4°C durante 20 horas, con la concentración total de proteína ajustada a 25 mg/ml. Esta reacción de acoplamiento se llevó a cabo en fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, en presencia del agente reductor SCB 20 mM. La mezcla de la reacción de acoplamiento se purificó a través de una columna de purificación SP HP. Usando un tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,4) como tampón de unión, el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que no experimento la reacción de acoplamiento no se unió a una columna SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare), sino que se separó por carga a través de la columna, mientras que inmunoglobulina-PEG-octreótido (HM11760B) se unió ligeramente a la columna y después se eluyó con un gradiente de sal de NaCl 1 M.

Columna: SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

Gradiente: A 0 → 20% 60 min B (A: Na-P 10 mM pH 5,4, B: A + NaCl 1 M).

35 EJEMPLO 2: Preparación del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-calcitonina(N)

Se hizo reaccionar Fc de inmunoglobulina en sus extremos N con 5K PropionALD(3) PEG de la misma manera que en el ejemplo 1, después de lo cual solo el Fc de inmunoglobulina monopegilado se purificó y acopló con calcitonina. A este respecto, la calcitonina se hizo reaccionar en una proporción molar de 1:2 con el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG a 4°C durante 20 horas, con la concentración total de proteína ajustada a 25 mg/ml. Para uso como medio en esta reacción de acoplamiento, el tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, se suplementó con el agente reductor SCB (NaCNBH₃) 20 mM. La mezcla de la reacción de acoplamiento se purificó a través de una columna de purificación SP HP. Primero, se usó una columna SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare) para eliminar el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que permaneció sin acoplar con calcitonina. Usando un tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 5,4) como tampón de unión, el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que no experimentó la reacción de acoplamiento no se unió a una columna SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare), sino que se separó por carga a través de la columna, mientras que inmunoglobulina-PEG-calcitonina se unió ligeramente a la columna y después se eluyó con un gradiente de sal de NaCl 1 M.

Columna: SP HP (XK 16 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 2,0 ml/min

Gradiente: A 0 → 20% 60 min B (A: Na-P 10 mM pH 5,4, B: A + NaCl 1 M).

55 EJEMPLO 3: Comparación del rendimiento de producción y la sencillez del proceso de purificación entre un complejo de PEG de 3 brazos (ejemplo 1 y 2) y un complejo PEG de 2 brazos

Se comparó el rendimiento de producción de un complejo PEG de 3 brazos y un complejo PEG de 2 brazos usando el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) y el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-calcitonina(N) preparados en el ejemplo 1 y 2, respectivamente (tabla 1).

Se preparó un complejo PEG de 2 brazos como grupo control uniendo octreótido o calcitonina como polipéptido fisiológicamente activo a la región Fc de inmunoglobulina a través de un PEG de 2 brazos (PEG con dos grupos propionaldehído, IDB, Corea de Sur) como enlazador. Particularmente, se acopló un PEG de 2 brazos con octreótido o calcitonina y después con un dominio Fc de inmunoglobulina a través de un enlace covalente (documento KR 10-0725315).

Tabla 1

Principio farmacéutico activo (API)	Forma de PEG	Rendimiento de producción (basado en API)
Octreótido	2 brazos	9%
	3 brazos	33%
Calcitonina	2 brazos	18%
	3 brazos	30%

Se analizaron la sencillez de los procesos para purificar el complejo de la mezcla de la reacción de acoplamiento y el tamaño de la columna principal y los resultados se resumen en la tabla 2, a continuación.

5

Tabla 2

API	Forma de PEG	Proceso de purificación	Tamaño de la columna principal
Octreótido	2 brazos	Source Q → Source ISO	5
	3 brazos	SP HP	1
Calcitonina	2 brazos	Source Q → Source ISO	4
	3 brazos	SP HP	1

10 Cuando se usa un complejo PEG de 2 brazos, todo el Fc de inmunoglobulina que permaneció sin acoplar se unió a la columna para separarse a sí mismo de Fc de inmunoglobulina-PEG de 2 brazos-octreótido o Fc de inmunoglobulina-PEG de 2 brazos-calcitonina. En contraste, cuando se usa el complejo de PEG de 3 brazos, la separación entre el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que permaneció sin acoplar con el polipéptido fisiológicamente activo y el Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido o el Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-calcitonina se logró de tal manera que el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG se eliminó por carga a través de la columna mientras que el Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido o el Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-calcitonina se unió a la columna. Por tanto, no solo se redujo el proceso de purificación de dos a 15 pasos a uno, sino que también la columna se redujo 1/5 en tamaño.

EJEMPLO 4: Preparación del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N)

20 Se hizo reaccionar Fc de inmunoglobulina en sus extremos N con 5K PropionALD(3) PEG de la misma manera que en el ejemplo 1, después de lo cual solo el Fc de inmunoglobulina monopegilado se purificó y acopló con FSH. A este respecto, FSH se hizo reaccionar en una proporción molar de 1:15 con el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG a 4°C durante 20 horas, con la concentración total de proteína ajustada a 40 mg/ml. Para uso como medio en esta reacción de acoplamiento, el tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0 se suplementó con el agente reductor SCB 20 mM. La mezcla de la reacción de acoplamiento se purificó a través de dos columnas de purificación. 25 Primero, se usó una columna Blue HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare) para eliminar el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que permaneció sin acoplar con FSH. Posteriormente, se eliminaron los multipolímeros en los que dos o más conjugados Fc de inmunoglobulina-5K PEG se acoplaron con FSH a través de Resource Iso (1 ml, GE Healthcare) en base a su hidrofobicidad.

30

Columna: Blue HP (Hitrap 5 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 3,0 ml/min

Gradiente: A 0 → 100% 20 min B

A: Gly-NaOH 50 mM + KCl 0,2 M

35

B: Gly-NaOH 50 mM + KCl 2,5 M

Columna: Resource ISO (1 ml, GE Healthcare)

A 0 → 100% 90 min B (A: Tris 20 mM pH 7,5, B: A + A.S 1,3 M)

40 EJEMPLO 5: Preparación del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-insulina(N)

Para la pegilación de un Fc de inmunoglobulina en su extremo N, se hicieron reaccionar 10 mg/ml de Fc de inmunoglobulina en una proporción molar de 1:2 con 5K PropionALD(3) PEG (PEG con tres grupos propionaldehído, NOF, Japón) a 4°C durante 4,5 horas. La reacción se realizó en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, en presencia de SCB (NaCNBH₃) 20 mM como agente reductor. Usando SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare), se purificó Fc de inmunoglobulina monopegilado de la mezcla de reacción. A continuación, se hizo reaccionar insulina en una proporción molar de 1:4 con el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG a 4°C durante 19,5 horas. Para uso como medio en esta reacción de acoplamiento el tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, se suplementó con el agente reductor SCB 20 mM. La mezcla de la reacción de acoplamiento se purificó a través de dos columnas de purificación, Primero, se usó una columna SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare) para eliminar el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que permaneció sin acoplar con insulina. Un gradiente de sal de NaCl 1 M en Tris 20 mM (pH 7,5) permitió que el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG eluyera primero debido a la fuerza de unión relativamente débil, seguido inmediatamente por la elución de Fc de inmunoglobulina-PEG-insulina. Mediante esta

50

purificación primaria, se eliminó el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG, pero los multipolímeros de Fc-5K PEG e insulina no se separaron por completo. Por tanto, se realizó la purificación secundaria en base de la diferencia en peso molecular entre el complejo y el multipolímero usando una columna de Sephacryl S-300 (GE Healthcare). Al mismo tiempo, se formuló el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG-insulina. Los multipolímeros de alto peso molecular de Fc de inmunoglobulina-5K PEG e insulina eluyeron primero, seguido por el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG-insulina.

Columna: Source Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 8,0 ml/min

Gradiente: A 0 → 25% 100 min B (A: Tris 20 mM pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)

Columna: Sephacryl S-300 (HiPrep 120 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 0,6 ml/min.

EJEMPLO 6: Comparación del rendimiento de producción entre un complejo de PEG de 3 brazos (ejemplo 4 y 5) y un complejo PEG de 2 brazos

Se comparó el rendimiento de producción de un complejo PEG de 3 brazos y un complejo PEG de 2 brazos usando el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N) y el complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-insulina(N) preparados en el ejemplo 4 y 5, respectivamente (tabla 3).

Cuando se usa el proceso de preparación convencional usando PEG de 2 brazos, los polipéptidos fisiológicamente activos diméricos, tales como FSH (Mw Aprox. 40.000 Da) e insulina (Mw 5.807), ocuparon ambos extremos del polímero no peptídico de modo que el polímero no pudo formar un enlace covalente con el dominio Fc de inmunoglobulina que proporcionaba persistencia in vivo. Este fenómeno era más visible con un polipéptido fisiológicamente activo dimérico de pequeño peso molecular, tal como la insulina.

Según esto, los complejos proteicos persistentes con polipéptidos fisiológicamente activos diméricos se prepararon preferiblemente usando el PEG de 3 brazos.

Las diferencias en el rendimiento de producción de FSH e insulina según el proceso de preparación usando PEG de 2 brazos y PEG de 3 brazos se resumen en la tabla 3, a continuación.

Tabla 3

Principio farmacéutico activo (API)	Forma de PEG	Rendimiento de producción (basado en API)
FSH	2 brazos	10%
	3 brazos	32%
Insulina	2 brazos	3%
	3 brazos	27%

EJEMPLO 7: Preparación del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FcVIIa(N)

Para la pegilación de un Fc de inmunoglobulina en su extremo N, se hicieron reaccionar 6 mg/ml de Fc de inmunoglobulina en una proporción molar de 1:2 con 5K PropionALD(3) PEG (PEG con tres grupos propionaldehído, NOF, Japón) a 4°C durante 4,5 horas. La reacción se realizó en tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, en presencia de SCB (NaCNBH₃) 20 mM como agente reductor. Usando SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare), se purificó Fc de inmunoglobulina monopegilado de la mezcla de reacción. A continuación, se hizo reaccionar FVIIa en una proporción molar de 1:9 con el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG a 4°C durante 18 horas, con la concentración de proteína total ajustada a 20 mg/ml. Para uso como medio en esta reacción de acoplamiento un tampón fosfato de potasio 100 mM, pH 6,0, se suplementó con el agente reductor SCB 20 mM. La mezcla de la reacción de acoplamiento se purificó a través de dos columnas de purificación. Primero, se usó una columna SOURCE Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare) para eliminar el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG que permaneció sin acoplar con FVIIa. Un gradiente de sal de NaCl 1 M en Tris 20 mM (pH 7,5) permitió que el conjugado Fc de inmunoglobulina-5K PEG eluyera primero debido a la fuerza de unión relativamente débil, seguido inmediatamente por la elución de Fc de inmunoglobulina-PEG-FVIIa. Después de ello, se realizó la purificación secundaria para separar Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FVIIa de impurezas de multímeros de FVIIa usando una columna RESOURCE ISO (GE Healthcare). El Fc de inmunoglobulina-PEG-FVIIa eluyó primero, seguido por las impurezas de multímeros de FVIIa.

Columna: Source Q (LRC25 85 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 4 ml/min

Gradiente: A 0 → 7% 1 min B, 7%, 37% 80 min B (A: Tris 20 mM pH 7,5, B: A + NaCl 1 M)

Columna: RESOURCE ISO (preempaquetada 1 ml, GE Healthcare)

Velocidad de flujo: 2 ml/min

Gradiente: B 100 → 0% 60 min A (A: Tris 20 mM pH 7,5, B: A + (NH₄)₂SO₄ 1,6 M).

Tabla 4

Principio farmacéutico activo (API)	Forma de PEG	Rendimiento de producción (basado en API)
FacVIIa	2 brazos	No preparado
	3 brazos	Aproximadamente por encima del 3%

5

EJEMPLO 8: Ensayo in vivo del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N)

Se ensayó el Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) para determinar los efectos sobre el peso corporal y el nivel de IGF-1 en ratas SD a las que se les administró por vía subcutánea el mismo. Octreótido es un potente inhibidor de la hormona de crecimiento, y principalmente se aplica al tratamiento de acromegalia. Está comercialmente disponible de Novartis en dos formas: Sandostatin, una versión de acción corta; y Sandostatin-LAR, una versión de acción prolongada. Ahora bien, la acromegalia es un síndrome que resulta tras la sobreproducción de hormona del crecimiento humana (hGH). En pruebas in vivo de octreótido, se siguen el peso corporal y los niveles de IGF-1 de ratas a las que se administra por vía subcutánea con el mismo para examinar los efectos del mismo en la inhibición de la secreción de GH. Asimismo, se ensayó in vivo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) para cambios del peso corporal y niveles de IGF-1 en ratas. Se administró Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) en dosis únicas de 0,5, 1,0 y 2,0 mg/kg mientras que Sandostatin-LAR como control se administró en dosis únicas de 1,0 y 2,0 mg/kg, después de lo cual se siguieron el peso corporal y los niveles de IGF-1 de las ratas durante dos semanas. Ambos materiales de prueba se administraron por vía subcutánea.

20

Comparados con un grupo administrado con vehículo, se observó que los grupos de Sandostatin-LAR disminuían en peso corporal en aproximadamente el 3,7% cuando se administró una dosis de 1,0 mg/kg y en aproximadamente el 8,9% cuando se administró una dosis de 2,0 mg/kg. Por otra parte, los grupos de Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) disminuían en peso corporal en aproximadamente el 44,3% tras la administración de 0,5 mg/kg, en aproximadamente el 40,1 tras la administración de 1,0 mg/kg y en aproximadamente el 55,1% tras la administración de 2,0 mg/kg.

25

El análisis cuantitativo para cambios en IGF-1 en las ratas usó el kit de ELISA de IGF-1 de rata. Comparado con el vehículo, se observó que el nivel en sangre de IGF-1 disminuía en aproximadamente el 15% con Sandostatin 1,0 mg/kg y en aproximadamente el 11% con Sandostatin 2,0 mg/kg en base al AUC del nivel en sangre de IGF-1. Por otra parte, los grupos de Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) disminuían en el nivel de IGF-1 en sangre en aproximadamente el 23% con la dosis de 0,5 mg/kg, en aproximadamente el 18% con una dosis de 1,0 mg/kg, y en aproximadamente el 25% con una dosis de 2,0 mg/kg [figura 2].

30

Los datos de las pruebas in vivo demuestran que Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-octreótido(N) es más potente en actividad que Sandostatin-LAR, una formulación sostenida de octreótido.

35

EJEMPLO 9: Ensayo in vivo del complejo Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N)

El ensayo in vivo de Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N) se realizó según el método de Steelman-Pohley (Endocrinology 53, 504-616). Se emplearon ratas SD hembras inmaduras (21 días de edad) para el ensayo in vivo de Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N). Se administró Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N) en dosis únicas de 0,018, 0,075 y 0,3 µg/rata mientras que Follitrope, una forma nativa comercialmente disponible de FSH, se usó como un control a dosis de 4, 2 y 1 UI/rata una vez al día durante tres días. Se administraron un vehículo y los materiales de prueba en combinación con hCG (gonadotropina coriónica humana) a 13,3 U/rata. Cada material de prueba se administró por vía subcutánea en una cantidad de 0,25 ml/kg. 72 horas después de la primera administración de los materiales de prueba los animales se sometieron a eutanasia y tuvieron una ovariectomía. Los ovarios extirpados de esta manera se pesaron.

45

Como se representa en la figura 3, el Fc de inmunoglobulina-PEG de 3 brazos-FSH(N) mostró actividad in vivo de una manera dependiente de la dosis, con igualdad al Fc de inmunoglobulina-PEG de 2 brazos-FSH(N).

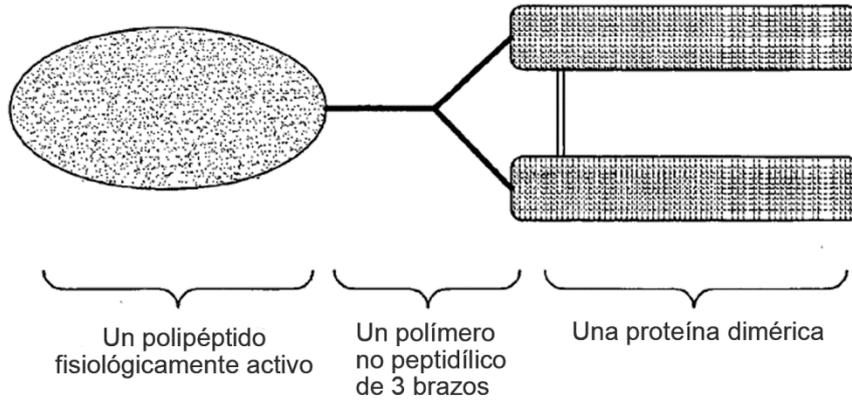
50

REIVINDICACIONES

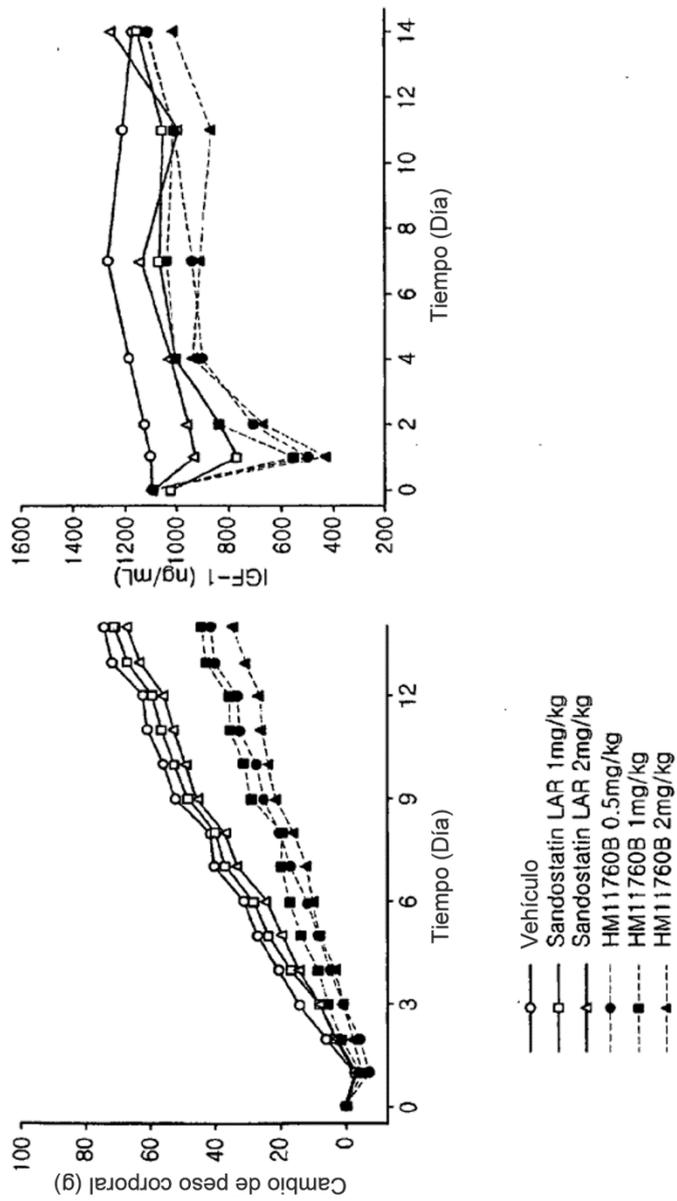
- 5 1. Un complejo proteico, que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, un dominio Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales, en donde los dos extremos funcionales del polímero no peptídico están covalentemente unidos a los dos grupos amino N-terminales del dominio Fc de inmunoglobulina y el tercero de los mismos está covalentemente unido al polipéptido fisiológicamente activo.
- 10 2. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina es aglucosilado.
- 15 3. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina está compuesto de uno a cuatro dominios diferentes seleccionados de entre C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4.
- 20 4. El complejo proteico como se define en la reivindicación 3, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina comprende además una región bisagra.
- 25 5. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina se selecciona de un grupo que consiste en dominios Fc de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM y combinaciones e híbridos de los mismos.
- 30 6. El complejo proteico como se define en la reivindicación 5, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina se selecciona de un grupo que consiste en dominios Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y combinaciones e híbridos de los mismos.
- 35 7. El complejo proteico como se define en la reivindicación 5, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina está en forma de dímeros o multímeros (combinaciones de Fc de inmunoglobulina) que cada uno comprende inmunoglobulinas glucosiladas compuestas de dominios del mismo origen.
- 40 8. El complejo proteico como se define en la reivindicación 5, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG4.
- 45 9. El complejo proteico como se define en la reivindicación 8, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina es un dominio Fc de IgG4 aglucosilado humano.
- 50 10. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde el polímero no peptídico se selecciona de un grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol y propilenglicol, polioli polioxietoxilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como PLA (ácido poliláctico) y PLGA (ácido poliláctico-glicólico), polímeros biodegradables, lipopolímeros, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de los mismos.
- 55 11. El complejo proteico como se define en la reivindicación 10, en donde el polímero no peptídico es un polietilenglicol.
- 60 12. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde el polímero no peptídico tiene un grupo funcional terminal seleccionado de entre grupos aldehído, grupos propionaldehído, grupos butiraldehído, grupos maleimida y derivados de succinimida.
- 65 13. El complejo proteico como se define en la reivindicación 12, en donde el polímero no peptídico tiene tres grupos funcionales aldehído en los extremos respectivos del mismo.
14. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde los tres extremos funcionales del polímero no peptídico se unen a grupos funcionales, N-terminales del dominio Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo, dichos grupos funcionales, N-terminales se seleccionan de un grupo que consiste en residuos de lisina, histidina, cisteína y combinaciones de los mismos.
15. El complejo proteico como se define en la reivindicación 1, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona de un grupo que consiste en hormonas, citoquinas, interleuquinas, proteínas que se unen a interleuquinas, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores de transcripción, factores sanguíneos, vacunas, proteínas estructurales, proteínas ligandos, receptores, antígenos de superficie celular, antagonistas de receptores y derivados o análogos de los mismos.
16. El complejo proteico como se define en la reivindicación 15, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona de un grupo que consiste en hormonas de crecimiento humanas, hormonas liberadoras de la hormona de crecimiento, péptidos liberadores de la hormona de crecimiento, interferones y receptores de interferones, factores estimulantes de colonias, péptidos similares a glucagón, péptidos de extendina-4, ANP,

- BNP, CNP, DNP, receptores acoplados a proteínas G, interleuquinas y receptores de interleuquinas, enzimas, proteínas que unen a interleuquina, proteínas que se unen a citoquinas, factores activadores de macrófagos, péptidos de macrófagos, factores de células B, factores de células T, proteína A, inhibidores de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxinas, linfoquinas, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento transformante, alfa-1 antitripsina, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína E, eritropoyetina, eritropoyetina muy glucosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptidos activadores de los receptores de trombina, trombomodulina, factor sanguíneo VII, VIIa, VIII, IX y XIII, activadores de plasminógeno, péptidos que se unen a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimuladora del hueso, calcitonina, insulina, somatostatina, octreótido (agonista de somatostatina), atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor activador de tejido conjuntivo, inhibidor de la ruta del factor tisular, hormona foliculoestimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nerviosos, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento de tipo insulínico, hormona corticoadrenal, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante del tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores, antagonistas de receptores, antígenos de superficie celular, antígenos de vacunas derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos.
- 5
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
17. El complejo proteico como se define en la reivindicación 16, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona de un grupo que consiste en hormonas de crecimiento humanas, interferón alfa, interferón beta, factor estimulante de colonias de granulocitos, eritropoyetina, exendina-4, péptido imidazol acetil exendina-4 (agonista de exendina-4), calcitonina, octreótido (agonista de somatostatina), BNP y fragmento Fab'.
 18. Un método para preparar un complejo proteico compuesto de un polipéptido fisiológicamente activo, un dominio Fc de inmunoglobulina y un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales, con los enlaces tanto del polipéptido fisiológicamente activo como del dominio Fc de inmunoglobulina al polímero no peptídico a través de respectivos enlaces covalentes, que comprende:
 - (1) unir covalentemente dos extremos funcionales del polímero no peptídico a grupos amino N-terminales opuestos del dominio Fc de inmunoglobulina para formar un conjugado;
 - (2) aislar de la mezcla de reacción del paso (1) el conjugado en que el dominio Fc de inmunoglobulina está covalentemente unido en los extremos N-terminales del mismo con el polímero no peptídico; y
 - (3) unir covalentemente el polipéptido fisiológicamente activo a un extremo funcional libre del polímero no peptídico del conjugado aislado.
 19. El método como se define en la reivindicación 18, en donde el polímero no peptídico tiene tres grupos funcionales aldehído en los respectivos extremos del mismo.
 20. El método como se define en la reivindicación 18, en donde el dominio Fc de inmunoglobulina se hace reaccionar en una proporción molar de 1:2 a 1:5 con el polímero no peptídico en el paso (1).
 21. El método como se define en la reivindicación 18, en donde el conjugado se hace reaccionar en una proporción molar de 1:0,5 a 1:0,05 con el polipéptido fisiológicamente activo en el paso (3).
 22. El método como se define en la reivindicación 18, en donde las reacciones tanto en el paso (1) como en el (3) se realizan en presencia de un agente reductor.
 23. El método como se define en la reivindicación 22, en donde el agente reductor se selecciona de un grupo que consiste en cianoborohidruro de sodio (NaCNBH_3), borohidruro de sodio, borato de dimetilamina y borato de piridina.
 24. Una composición farmacéutica, que comprende el complejo proteico de la reivindicación 1 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.
 25. Un complejo proteico preparado usando el método de la reivindicación 18.

[Fig. 1]



[Fig. 2]



[Fig. 3]

