

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 617**

51 Int. Cl.:

C07K 7/08 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

A61K 47/42 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.05.2014 PCT/KR2014/004799**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.12.2014 WO14193173**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2014 E 14804503 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 3006455**

54 Título: **Fragmento Fc de IgG4 que comprende una región bisagra modificada**

30 Prioridad:

31.05.2013 KR 20130063029

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

10.10.2018

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
214 Muha-ro Paltan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 445-958, KR**

72 Inventor/es:

**JUNG, SUNG YOUB;
HUH, YONG HO;
PARK, SUNG HEE;
LEE, JONG SOO y
CHOI, IN YOUNG**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 685 617 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 IgG4 que comprende una región bisagra modificada

5 **[Campo de la técnica]**

La presente divulgación se refiere a un fragmento Fc de IgG4 útil como vehículo de fármacos y, más específicamente, a un fragmento Fc de IgG4 que puede minimizar las funciones efectoras del Fc pero no induce un intercambio de cadenas con IgG *in vivo* y puede mejorar la semivida *in vivo* de un fármaco conjugado.

[Técnica Anterior]

10 El avance en la tecnología de la ingeniería genética ha dado lugar a la fabricación y la utilización de diversos tipos de fármacos de proteínas. Sin embargo, los fármacos de proteínas tienen problemas fatales en cuanto a que se desnaturalizan fácilmente o se descomponen fácilmente por acción de las proteasas *in vivo* y, por tanto, no pueden mantener sus concentraciones o títulos *in vivo* durante un largo periodo de tiempo. Por lo tanto, es muy importante mantener la sangre y las concentraciones *in vivo* de fármacos de proteínas a un nivel apropiado mediante el aumento de la estabilidad de las proteínas con el fin de proporcionar un tratamiento eficaz para los pacientes, mientras se reduce la carga de los pacientes para recibir suministros frecuentes de proteínas mediante inyecciones etc., y los gastos de los mismos.

En consecuencia, para la mejora de la estabilidad *in vivo* de fármacos de proteínas, se han realizado varios intentos durante un tiempo prolongado, cambiando el tipo de formulación de las proteínas, la fusión con otras proteínas, o uniendo un polímero apropiado en las superficies de proteínas por procedimientos químicos o biológicos.

Uno de los intentos para mejorar la estabilidad de las proteínas mediante fusión con otras proteínas es realizar una fusión entre el Fc de la inmunoglobulina y una proteína.

25 La región Fc es responsable de funciones efectoras, tales como la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) y la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA), además de la capacidad de unión al antígeno, que es la función principal de las inmunoglobulinas. Además, la secuencia de FcRn presente en la región Fc desempeña el papel de la regulación del nivel de IgG en el suero mediante el aumento de la semivida *in vivo* mediante conjugación a un receptor FcRn *in vivo*. En este sentido, se han realizado estudios activos para mejorar las proteínas terapéuticas a través de las fusiones entre la región Fc y proteínas terapéuticas.

30 Sin embargo, las proteínas de fusión de Fc producidas por recombinación genética tienen desventajas en cuanto que una proteína de fusión solo es posible en un área particular de la región Fc, es decir, un extremo o extremo carboxi, y solo entre proteínas glicosiladas o entre proteínas aglicosiladas, pero es imposible entre una proteína glicosilada y una proteína aglicosilada. Además, las proteínas de fusión de Fc producidas por recombinación genética tienen problemas en cuanto a que se puede producir una respuesta inmunitaria debido a la secuencia de aminoácidos recién producida por una fusión y también que la sensibilidad de una proteinasa en el área del enlazador se puede aumentar.

Además, las proteínas de fusión con el Fc tienen una semivida en suero de la proteína diana aumentada, pero al mismo tiempo, también tienen el problema de que exhiben las funciones efectoras poseídas por la región Fc (patente de EE.UU. N° 5.349.053). Por las funciones efectoras de la región Fc, las proteínas de fusión pueden fijar complementos o unirse a las células que expresan FcR para destruir células concretas e inducir la producción y secreción de diversas citocinas que inducen inflamación, induciendo de este modo la inflamación. Adicionalmente, las secuencias proteicas en las áreas fusionadas son secuencias proteicas nuevas que no están presentes en el cuerpo humano y, por tanto, tienen varios inconvenientes, incluyendo una posible inducción de respuestas inmunitarias en el caso de una administración a largo plazo.

45 De acuerdo con lo anterior, los estudios se han centrado en usar inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas en las que se han eliminado las funciones efectoras mientras que se mantenían las semividas en suero. Cole y col. han indicado anteriormente que la actividad de CCDA se inhibía sustituyendo los restos en las posiciones 234^a, 235^a y 237^a en el dominio CH2, que se sabe que desempeñan un papel importante en la unión a receptores de Fc, con alanina, para la producción de derivados de Fc con afinidades reducidas en los receptores de Fc (Cole y col., *J. Immunol.* 159: 3613-3621, 1997). No obstante, todos ellos tienen aminoácidos inadecuados que son diferentes de los de la región Fc humana nativa y, por tanto, pueden tener una inmunidad o antigeneicidad más alta y pueden haberse perdido las funciones preferibles de Fc.

55 Como procedimiento para eliminar o reducir funciones efectoras indeseadas al tiempo que se mantienen una concentración en sangre elevada de inmunoglobulinas se estudió y procedimiento de eliminar sacáridos en las inmunoglobulinas. En la patente de Estados Unidos n° 5.585.097, se prepararon derivados de anticuerpos aglicosilados sustituyendo el resto de asparagina en la posición 297 del dominio CH2, que es el resto glicosilado de los anticuerpos CD3, por otro aminoácido para preparar anticuerpos CD3, y, en particular, los derivados mostraron funciones efectoras reducidas al tiempo que mantienen la fuerza de unión con los receptores FcRn sin alterar sus semividas en suero. No obstante, este procedimiento también tiene un problema en cuanto a que pueden

reconocerse como materiales extraños y ser rechazados como tales por el sistema inmunológico debido a la producción de una construcción recombinante nueva.

5 En la preparación de fusiones de proteínas usando secuencias de Fc de IgG nativa, se puede seleccionar el Fc de IgG4 con el fin de minimizar las funciones efectoras por Fc. Se sabe que la IgG4 tiene una semivida *in vivo* similar a la de IgG1, pero tiene funciones efectoras relativamente pequeñas debido a la diferencia en la secuencia de aminoácidos. No obstante, a pesar de la ventaja de que la IgG4 tiene funciones efectoras reducidas, se puede producir un intercambio de cadenas *in vivo* entre IgG4 debido a su peculiar secuencia bisagra, y, por tanto, se notificó que hay mucha dificultad al usar fusiones proteicas para fines terapéuticos (van der Neut Kofschoten, y col., Science, 317:1554-1557, 2007). Es decir, existe un problema en cuanto a que cuando se usa el Fc de IgG4 como vehículo para una proteína de fusión se produce un intercambio de cadenas con IgG4 presente *in vivo*, de modo que se forma un híbrido con la IgG4 nativa, o puede estar presente en forma de monómeros, de forma que se altera la estructura original y tiene una estructura con una actividad terapéutica baja. Este es un problema frecuente se produzca el producto de fusión entre un fragmento Fc de IgG4 y un material fisiológicamente activo mediante ingeniería genética o *in vitro*.

15 El documento WO2005/047334 desvela un fragmento Fc de IgG utilizado como un vehículo de fármacos. Además se desvela un vector recombinante que expresa el fragmento Fc de IgG, un transformante transformado con el vector recombinante y un procedimiento de preparación de un fragmento Fc de IgG, que comprende cultivar el transformante.

20 El documento WO2012/083370 desvela anticuerpos, construcciones de inmunoglobulina o proteínas de fusión de inmunoglobulina IgG4 cuyas semividas *in vivo* se aumentan mediante la combinación de (i) una región Fc de IgG4 modificada o un dominio de unión a FcRn de la misma y (ii) una secuencia de la región bisagra de IgG4 modificada.

[Divulgación]

[Problema de la técnica]

25 En las circunstancias, los presentes autores, como resultado de los estudios para desarrollar un fragmento Fc de IgG capaz de actuar como vehículo de fármacos, que tiene un riesgo bajo de inducir una reacción de intercambio del brazo Fab con IgG *in vivo* y funciones efectoras, aún siendo capaces de superar las desventajas en la tecnología de fusión de recombinación genética, descubrieron que podía formarse un conjugado farmacológico con mejor durabilidad pero sin el riesgo de inducir la reacción de intercambio del brazo Fab con IgG *in vivo* y las funciones efectoras cuando la secuencia bisagra del fragmento Fc de IgG4, que estaba mutada para tener solo un resto de cisteína, se produjo en *E. coli* y se conjugó con un fármaco, completando de este modo la presente divulgación.

[Solución de la técnica]

35 Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un fragmento Fc de IgG4 que tiene un riesgo bajo de inducir una reacción de intercambio de cadenas con IgG *in vivo* o funciones efectoras y puede actuar como vehículo de fármaco. Más específicamente, un objeto de la presente divulgación es proporcionar un fragmento Fc de IgG4 modificado que incluye una región bisagra modificada, en el que parte de la secuencia bisagra se deletiona para que incluya solo un resto de cisteína.

Otro objeto de la presente divulgación es proporcionar un ácido nucleico que codifica un fragmento Fc de IgG4 modificado que incluye una región bisagra modificada, en el que parte de la secuencia bisagra se deletiona para que incluya solo un resto de cisteína.

40 Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un vector que incluye un ácido nucleico que codifica un fragmento Fc de IgG4 modificado que incluye una región bisagra modificada, en el que parte de la secuencia bisagra se deletiona para que incluya solo un resto de cisteína.

45 Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un vector que incluye un ácido nucleico que codifica un fragmento Fc de IgG4 modificado que incluye una región bisagra modificada, en el que parte de la secuencia bisagra se deletiona para que incluya solo un resto de cisteína.

Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento para preparar un fragmento Fc de IgG4 que incluye cultivar el microorganismo, que se introduce con un vector que incluye un ácido nucleico que codifica un fragmento Fc de IgG4 modificado.

50 Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar un conjugado farmacológico, en el que un fármaco y un fragmento Fc de IgG4 modificado están conjugados a través de un enlazador.

Otro objeto más de la presente divulgación es proporcionar una composición farmacéutica que incluye un conjugado farmacológico, en el que un fármaco y un fragmento Fc de IgG4 modificado están conjugados a través de un enlazador.

[Efectos ventajosos]

La presente divulgación puede proporcionar un fragmento Fc de IgG4 modificado que tiene una función efectora minimizada sin sustitución ni adición de aminoácidos o adición de glicano, y tampoco tiene reacción de intercambio de cadenas con la Ig4 *in vivo*. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la presente divulgación, con independencia del procedimiento de conjugarlo con un fármaco, tal como un procedimiento de ingeniería genética y un procedimiento covalente *in vitro*, puede inhibir una reacción de intercambio de cadenas *in vivo* de un fármaco conjugado cuando está conjugado a un fármaco, y, de este modo, puede proporcionar superioridad terapéutica significativa en comparación con el fragmento Fc de IgG4 nativo.

[Breve descripción de las figuras]

La Fig. 1 muestra la presencia/ausencia de intercambio de cadenas de IgG4 humana entre hIgG4 biotinilada y un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos humano-PEG-fragmento Fc de IgG4 en sangre de rata.
La FIG. 2 muestra la presencia/ausencia de intercambio de cadenas de IgG4 humana entre hIgG4 biotinilada y un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos humano-PEG-fragmento Fc de IgG4 en sangre humana.

[Mejor modo]

Las formas de realización preferidas de la presente divulgación se describirán a continuación con más detalle con referencia a los dibujos que la acompañan. No obstante, la presente divulgación puede ser realizada en diferentes formas y no debe interpretarse como limitada a las realizaciones expuestas en el presente documento. En su lugar, estas realizaciones se proporcionan para que esta divulgación sea minuciosa y completa, y transmita completamente el ámbito de la presente divulgación a los expertos en la técnica.

En un aspecto para conseguir los objetos anteriores, la presente divulgación proporciona un fragmento Fc de IgG4 modificado útil como vehículo de fármaco. Más específicamente, la presente divulgación proporciona un fragmento Fc de IgG4 modificado que incluye una región bisagra modificada, en el que parte de la secuencia bisagra se delecciona para que incluya solo un resto de cisteína.

El fragmento Fc de IgG4 modificado de la presente divulgación incluye una región bisagra modificada, en la que parte de la región bisagra representada por la siguiente secuencia de aminoácidos se elimina para incluir solo un resto de cisteína:
Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro (SEQ ID NO: 1).

Los presentes autores, al tiempo que tratan de resolver el problema del fragmento Fc de IgG4 que tiene una baja utilidad debido a la reacción de intercambio de cadenas con IgG4 *in vivo*, a pesar de su utilidad como vehículo para aumentar las semividas de los fármacos, descubrieron que la reacción de intercambio de cadenas *in vivo* y la formación de monómero no se produjeron cuando el fragmento Fc de IgG4 se modificó mediante la eliminación, a través de deleción, de un resto de cisteína de los dos restos de cisteína presentes en la región bisagra del fragmento Fc de IgG4, así como parte de la región bisagra, lo que confirma que el fragmento Fc de IgG4 modificado puede usarse eficazmente como vehículo de fármacos.

En una realización, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede incluir una región bisagra que se modificó mediante la deleción de 1 al 8 aminoácidos, incluyendo un residuo de Cys en la octava posición de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Además, en una realización, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede incluir una región bisagra que se modificó mediante la deleción de 1 al 8 aminoácidos, incluyendo un residuo de Cys en la posición 11 de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Como alternativa, en una realización, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede incluir una región bisagra que se modificó mediante la deleción de 1 al 5 aminoácidos, incluyendo un residuo de Cys en la posición 8 o de 1 a 5 aminoácidos que incluyen un resto de Cys en la posición 11 de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Como alternativa, en una realización, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede incluir una región bisagra que se modificó mediante la deleción de 1 al 3 aminoácidos, incluyendo un residuo de Cys en la posición 8 o de 1 a 3 aminoácidos que incluyen un resto de Cys en la posición 11 de una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1.

Los restos de aminoácidos deleccionados anteriormente pueden ser continuos o discontinuos.

La región bisagra del fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación está caracterizada porque se modifica para incluir solo un residuo de cisteína entre los dos restos de cisteína en las posiciones 8 y 11 de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y en que no se eliminan los dos residuos de cisteína.

La región de bisagra modificada para incluir solo un resto de cisteína fuera de los dos residuos de cisteína dentro de la región bisagra proporciona efectos sin intercambio de cadena *in vivo*, formación de monómero, etc., en el fragmento Fc de IgG4 modificado.

5 Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vehículo" se refiere a un material que está conjugado a un fármaco, y estando conjugado con fármaco, por lo general aumenta o elimina actividades fisiológicas del fármaco. Sin embargo, el vehículo de la presente divulgación aumenta la estabilidad *in vivo* de un fármaco mientras se minimiza simultáneamente la disminución de las actividades fisiológicas del fármaco, y el vehículo de la presente divulgación se caracteriza porque no tiene ningún efecto farmacológico de prevención de actividades terapéuticas del fármaco conjugado con el vehículo, tal como apoptosis o activación del complemento, y la unión con una proteína particular.

10 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "fragmento Fc de IgG4" se refiere a una región constante 2 de la cadena pesada (CH2) y una región constante 3 de la cadena pesada (CH3), excluyendo las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, una región constante 1 de la cadena pesada (CH1) y una región constante 1 de la cadena ligera (CL1) de IgG4, pero incluye una región bisagra modificada en la región constante de la cadena pesada. Además, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede referirse a una región Fc extendida que incluye una parte o la totalidad de la región constante 1 de la cadena pesada (CH1) y / o la región constante 1 de la cadena ligera (CL1), con exclusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, en la medida en que el fragmento Fc de IgG4 tiene sustancialmente el mismo efecto, o un efecto mejorado en comparación con el del tipo nativo.

20 Además, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación incluye no solo su secuencia de aminoácidos nativa, sino también un derivado de la secuencia de la misma (muteína). Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "una muteína del fragmento Fc de IgG4" se refiere a un fragmento Fc de IgG4 que tiene una secuencia de aminoácidos diferente de su tipo nativo por delección, inserción, sustitución conservadora, sustitución no conservadora o una combinación de las mismas, de al menos un residuo de aminoácido en la secuencia de aminoácidos nativa en la región que excluye su región bisagra. Además, pueden ser posibles varios tipos de derivados que tienen una eliminación de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una eliminación de unos pocos aminoácidos del extremo N del Fc nativo, o una adición de un residuo de metionina al extremo N del Fc nativo. Además, la región de unión al complemento, por ejemplo, la región de unión a C1q, o la región de CCDA, se puede retirar para eliminar las funciones efectoras. Los procedimientos para preparar las muteínas de la región Fc se divulgan en las Publicaciones de Patente Internacional WO 97/34631, WO 96/32478, etc.

25 El intercambio de aminoácidos en las proteínas o péptidos sin alteración completa de la actividad de las moléculas se ha desvelado previamente (H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979). Los intercambios que se producen habitualmente son el intercambio entre los residuos de aminoácidos de 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 ciertas circunstancias, la modificación puede realizarse mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación, etc.

Mientras tanto, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede ser uno derivado de seres humanos, ganado vacuno, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, cobayas, etc., y preferiblemente de seres humanos.

40 El fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede ser un tipo recombinante del fragmento Fc de IgG4 en el que la región Fc, derivada de seres humanos, ganado vacuno, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, cobayas, etc., se obtuvo a partir de un microorganismo.

45 Además, el fragmento Fc de IgG4 puede estar en forma de glicanos nativos, glicanos con un número aumentado en comparación con el glicano nativo, o uno sin glicanos. El aumento, disminución o eliminación de glicanos de Fc en las inmunoglobulinas pueden realizarse usando un procedimiento convencional tal como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático, un procedimiento de ingeniería genética utilizando microorganismos, etc. En particular, puesto que la región Fc de inmunoglobulina, en la que los glicanos se eliminan de Fc, muestra un deterioro significativo de la capacidad de unión del complemento (C1q) y una disminución o eliminación de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, no se inducen respuestas inmunitarias *in vivo* innecesarias. A este respecto, un tipo más apropiado de fragmento Fc de IgG4 que satisfaga mejor el fin original como un vehículo de fármaco puede ser un fragmento Fc de IgG4 aglicosilado.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "desglicosilación" se refiere a una región Fc en la que los sacáridos son eliminados por una enzima, y "aglicosilación" se refiere a un fragmento Fc aglicosilado producido en una célula procariota, y preferiblemente en *E. coli*.

55 Además, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede ser uno modificado por un polímero no peptídico. Preferentemente, el fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación puede ser uno modificado por polietilenglicol. El fragmento Fc de IgG4 modificado por polietilenglicol puede prepararse haciendo reaccionar con polietilenglicol a pH 7 o superior, preferiblemente a pH 7,5 a pH 9, y más preferiblemente a un pH de 8,0.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "una región bisagra modificada" se refiere a una región bisagra en el que cualquier residuo de una cisteína de los residuos de cisteína en las posiciones 8 y 11 de una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, que es la secuencia de la región bisagra de un fragmento Fc de IgG4 nativa, se ha delecionado, y, adicionalmente, parte del ácido amino se ha delecionado más.

- 5 En la presente divulgación, el número de residuos de aminoácidos eliminados en la región bisagra puede estar en el intervalo de 1 a 8 y, en particular, el o los restos de aminoácido pueden ser continuos o discontinuos. Específicamente, por ejemplo, la región bisagra modificada de la presente divulgación puede incluir una deleción en solo un residuo de cisteína en la posición 8 o en la posición 11; o una deleción de 2 a 8 aminoácidos continuos o discontinuos, incluyendo la cisteína residen en la posición 8; o una deleción de 2 a 8 aminoácidos continuos o discontinuos, incluyendo la cisteína residen en la posición 11.

La región de bisagra modificada de la presente divulgación puede tener, por ejemplo, al menos una secuencia de aminoácidos entre las secuencias de aminoácidos que se muestran a continuación:

Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys-Pro, Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys, Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro, Glu-Ser-Lys-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Ser-Pro-Ser-Cys-Pro, Glu-Pro-Ser-Cys.

- 15 En una realización de ejemplo la presente divulgación, con el fin de examinar el mecanismo de intercambio de cadenas entre la IgG4 presente en la sangre de rata y la sangre humana y el conjugado entre el fragmento Fc de IgG4 modificado y una proteína fisiológicamente activa de acuerdo con la presente divulgación, la sangre de rata y la sangre humana se mezclaron respectivamente con el conjugado entre el Fc de IgG4 Fc y la proteína fisiológicamente activa, y las muestras se recogieron de acuerdo con cada zona horaria y se sometieron a análisis de transferencia Western usando anticuerpos frente a la proteína fisiológicamente activa. Como resultado, se confirmó que las moléculas que pueden producirse mediante el intercambio de cadenas con IgG4 de rata o IgG4 humana. No se producían.

Por consiguiente, cuando el fragmento Fc de IgG4 modificado de acuerdo con la presente divulgación se usa como vehículo para fármacos, puede usarse con eficacia para aumentar la semivida en suero de los fármacos y mejorar las actividades fisiológicas de los fármacos sin un intercambio con las inmunoglobulinas nativas *in vivo*.

- 25 De acuerdo con otro aspecto, la presente divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica un fragmento Fc de IgG4 modificado que tiene una región bisagra, que se mutó para incluir solo un residuo de cisteína mediante la deleción de parte de los aminoácidos en la región bisagra, y un vector que incluye el mismo.

- El ácido nucleico que codifica el fragmento Fc de IgG4 modificado de la presente divulgación incluye ácidos nucleicos que codifican el fragmento Fc de IgG4 modificado que incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 (Pro-Ser-Cys-Pro-Ala- Pro-Glu-Phe-Leu-Gly- Gly-Pro-Ser-Val-Phe-Leu-Phe-Pro-Pro-Lys- Pro-Lys-Asp-Thr-Leu-Met-Ile-Ser-Arg-Thr- Pro-Glu- Val-Thr-Cys-Val-Val-Val-Asp-Val- Ser-Gln-Glu-Asp-Pro-Glu-Val-Gln-Phe-Asn- Trp-Tyr-Val-Asp-Gly-Val-Glu-Val-His- Asn- Ala-Lys-Thr-Lys-Pro-Arg-Glu-Glu-Gln-Phe- Asn-Ser-Thr-Tyr-Arg-Val-Val-Ser-Val-Leu- Thr-Val-Leu-His-Gln-Asp- Trp-Leu-Asn-Gly- Lys-Glu-Tyr-Lys-Cys-Lys-Val-Ser-Asn-Lys- Gly-Leu-Pro-Ser-Ser-Ile-Glu-Lys-Thr-Ile- Ser-Lys-Ala- Lys-Gly-Gln-Pro-Arg-Glu-Pro- Gln-Val-Tyr-Thr-Leu-Pro-Pro-Ser-Gln-Glu- Glu-Met-Thr-Lys-Asn-Gln-Val-Ser-Leu-Thr- Cys-Leu-Val-Lys-Gly-Phe-Tyr-Pro-Ser-Asp- Ile-Ala-Val-Glu-Trp-Glu-Ser-Asn-Gly-Gln- Pro-Glu-Asn-Asn-Tyr-Lys-Thr- Thr-Pro-Pro- Val-Leu-Asp-Ser-Asp-Gly-Ser-Phe-Phe-Leu- Tyr-Ser-Arg-Leu-Thr-Val-Asp-Lys-Ser-Arg- Trp-Gln-Glu- Gly-Asn-Val-Phe-Ser-Cys-Ser- Val-Met-His-Glu-Ala-Leu-His-Asn-His-Tyr- Thr-Gln-Lys-Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu-Gly-Lys). Por ejemplo, el ácido nucleico de la presente divulgación puede incluir la secuencia de nucleótidos de la SEQ ID NO: 3

(CCATCATGCCAGCACCTGAGTTCCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGTTCCCCC
 CAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGG
 TGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCTGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGACG
 GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGC
 ACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCCTACCGTCCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCA
 AGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCATCCTCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAGGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCC
 CATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG
 GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGA
 ACAACTACAAGACCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTA
 CAGCAGGCTAACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAACGTCTTCTCATG
 CTCCTGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCTGGGTA).

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "vector" se refiere a un vector recombinante capaz de expresar una proteína diana en una célula huésped apropiada, que es una construcción génica que incluye factores reguladores unidos operativamente para permitir la expresión de un inserto génico.

- 5 Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "unido operativamente" significa que la secuencia reguladora de un ácido nucleico está unida funcionalmente a la secuencia de un ácido nucleico que codifica una proteína diana de manera que las funciones generales se puedan realizar. La unión operativa con el vector se puede preparar mediante una tecnología de recombinación genética bien conocida en la técnica, y la escisión y unión de ADN específicas de sitio se pueden realizar fácilmente utilizando enzimas, etc., en general, bien conocidas en la técnica. Los vectores de expresión apropiados pueden incluir secuencias reguladoras de la expresión para elementos tales como un promotor, un codón de iniciación, un codón de terminación, una señal de poliadenilación y un potenciador. El codón de iniciación y el codón de terminación esencialmente deberán ejercer sus acciones en un individuo cuando se inserta una construcción génica en su interior y debe estar en marco con la secuencia codificante. Un promotor general puede ser constitutivo o inducible. El vector de expresión también puede incluir un marcador de selección para la selección de una célula huésped que incluye un vector, y para un vector de expresión replicable, puede incluir el origen de replicación.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un microorganismo, que se introduce con el vector anterior, capaz de producir fragmentos Fc de IgG4 modificados.

- 20 Para el fin de la presente divulgación, el microorganismo es preferiblemente una célula eucariota. La célula eucariota puede ser *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus*, etc., y, preferentemente, *Escherichia coli*. *Escherichia coli* puede ser *E. coli* XL-1 blue, *E. coli* BL21 (DE3), *E. coli* JM109, *E. coli* DH series, *E. coli* TOP10 y *E. coli* HB101, y, más preferentemente, *E. coli* BL21 (DE3), aunque sin limitaciones a estas. Cuando se usa *E. coli* como célula huésped, la región Fc de las inmunoglobulinas se puede producir en una forma en que originalmente están eliminados los sacáridos presentes en el dominio CH2 de las inmunoglobulinas nativas, ya que *E. coli* no posee un sistema para conjugar glicanos a las proteínas. Aunque los sacáridos presentes en el dominio CH2 de las inmunoglobulinas no afectan a la estabilidad estructural de las inmunoglobulinas, se ha sabido que las inmunoglobulinas pueden unirse a las células que expresan el receptor Fc y causar citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, inducir la secreción por las células inmunes de citocinas, provocando con ello respuestas inflamatorias, y se unen al elemento C1q de los complementos e inducen reacciones de fijación del complemento. Por consiguiente, si se producen las regiones Fc de las inmunoglobulinas aglicosiladas y se conjugan a proteínas terapéuticas, la concentración en suero de las proteínas terapéuticas se puede mantener durante un largo periodo de tiempo sin inducir las funciones efectoras de las inmunoglobulinas.

- 35 El procedimiento de transformación para el vector anterior en células procariotas puede incluir cualquier procedimiento que pueda introducir ácidos nucleicos en una célula, y la transformación se puede realizar mediante la selección de una tecnología estándar adecuado para una célula huésped dada conocida en la técnica. Los ejemplos del procedimiento pueden incluir electroporación, fusión de protoplastos, precipitación en fosfato de calcio (CaPO₄), precipitación en cloruro de calcio (CaCl₂), agitando usando fibras de carburo de silicio, PEG, sulfato de dextrano, lipofectamina, etc., pero no están limitados a los mismos

- 40 El microorganismo introducido con el vector de expresión recombinante puede cultivarse de acuerdo con un procedimiento convencional.

- 45 El procedimiento de cultivo se puede utilizar después de un ajuste fácil de acuerdo con el microorganismo seleccionado. En general, el medio utilizado para el cultivo debe contener todos los nutrientes esenciales para el crecimiento y la supervivencia de las células. El medio puede contener diversas fuentes de carbono, fuentes de nitrógeno, y componentes de oligoelementos. Los ejemplos de fuentes de carbono pueden incluir hidratos de carbono, tales como glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, maltosa, almidón y celulosa; grasas tales como aceite de soja, aceite de girasol, aceite de ricino, aceite de coco, ácidos grasos tales como ácido palmítico, ácido esteárico y ácido linoleico, alcoholes tales como glicerol y etanol, y ácidos orgánicos tales como ácido acético. Estas fuentes de

5 carbono se pueden usar solas o en combinación. Los ejemplos de fuentes de nitrógeno pueden incluir fuentes de nitrógeno orgánico tales como peptona, extracto de levadura, jugo de carne, extracto de malta, licor de maceración del maíz (LMM), HARINA de soja; y fuentes de nitrógeno inorgánico tales como urea, sulfato amónico, cloruro amónico, fosfato amónico, carbonato amónico y nitrato amónico. Estas fuentes de nitrógeno se pueden usar solas o
 10 en combinación. En el medio anterior, EL dihidrógeno fosfato, hidrógeno fosfato dipotásico, y las sales correspondientes que contienen sodio pueden estar contenidos como fuentes de fósforo. Adicionalmente, puede haber sales metálicas tales como sulfato de magnesio o sulfato de hierro. Además, también pueden estar contenidos aminoácidos, vitaminas y precursores apropiados. Durante el período de cultivo, el pH de un cultivo se puede ajustar mediante la adición de un compuesto tal como hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, amoniaco, ácido fosfórico, y ácido sulfúrico al cultivo de una manera apropiada. Adicionalmente, durante el período de cultivo se puede añadir un agente antiespumante, tal como éster de poliglicol de ácido graso, para evitar la generación de espuma. Además, con el fin de mantener el estado aeróbico del cultivo, se puede inyectar en el cultivo oxígeno o un gas que contenga oxígeno (por ejemplo, aire). La temperatura de cultivo puede ser, generalmente, de 20 °C a 45 °C, y preferiblemente, de 25 °C a 40 °C. Además, se puede usar un fermentador. Cuando las proteínas se producen utilizando un
 15 fermentador, deben considerarse varios factores, incluyendo la tasa de crecimiento y la cantidad de productos de expresión de una célula huésped. La expresión de proteínas puede inducirse mediante la adición de IPTG o similares en una condición de cultivo adecuada. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la presente divulgación puede sobreexpresarse en una célula huésped en forma de un agregado o se puede expresar en una forma acuosa. Con independencia de su tipo de expresión, las proteínas pueden purificarse por un procedimiento de purificación de
 20 proteínas convencional.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un fragmento Fc de IgG4 modificado, y este procedimiento incluye cultivar un microorganismo introducido con un ácido nucleico que codifica el fragmento Fc de IgG4 modificado.

25 De acuerdo con el procedimiento anterior, la aplicación industrial del fragmento Fc de IgG4 anterior, producido en una célula de un procarionta tal como E. coli, no está particularmente limitado. Una aplicación de ejemplo puede ser el uso como vehículo para la formación de un conjugado junto con un fármaco arbitrario.

Por consiguiente, en otro aspecto, la presente divulgación proporciona un fármaco y un conjugado de fármaco en el que el fragmento Fc de IgG4 modificado se conjuga al mismo mediante un enlazador.

30 Como se usa en el presente documento, un conjugado de fármaco o conjugado significa que al menos un fármaco está interconectado con al menos uno de los fragmentos Fc de IgG4 modificados.

Como se usa en el presente documento, un fármaco se refiere a un material que puede exhibir actividades terapéuticas cuando se administra a seres humanos o animales, y puede incluir un polipéptido, un compuesto, un extracto, un ácido nucleico, etc., pero no se limita a los mismos. Preferiblemente, el fármaco es un fármaco polipeptídico.

35 Tal como se usa en el presente documento, se entiende que un fármaco polipeptídico fisiológicamente activo, un fármaco polipeptídico y un fármaco de proteína tienen el mismo significado, y se caracterizan porque son tipos fisiológicamente activos que muestran antagonismo frente a diversos fenómenos fisiológicos *in vivo*.

El tipo del conjugado en el que el fragmento Fc de IgG4 está conjugado a un fármaco no está particularmente limitado, y el fragmento Fc de IgG4 y el fármaco se pueden conjugar en varias relaciones.

40 En la presente divulgación, el enlazador puede referirse tanto a un enlazador peptídico como a un enlazador no peptídico, preferiblemente un enlazador no peptídico, y más preferiblemente un polímero no peptídico.

45 El polímero no peptídico se refiere a un polímero biocompatible al que se conjugan al menos dos unidades de repetición, y las unidades de repetición están interconectadas mediante enlaces covalentes al azar que no sean enlaces peptídicos. El polímero no peptídico se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de entre etilenglicol y propilenglicol, polioli polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacáridos, dextrano, éter etílico de polivinilo, un polímero biodegradable tal como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímero LIPÍDICO, quitinas, ácido hialurónico, y una combinación de los mismos, y preferentemente, polietilenglicol. Los derivados conocidos en la técnica y los derivados que se pueden preparar fácilmente utilizando la tecnología en la materia también están incluidos en el ámbito de la presente divulgación.

50 En la presente divulgación, el polímero no peptídico puede tener dos o tres extremos reactivos, y el grupo reactivo terminal del polímero no peptídico se selecciona preferiblemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo aldehído propiónico, un grupo aldehído de butilo, un grupo maleimida, y un derivado de succinimida. Los ejemplos del derivado de succinimida pueden incluir propionato de succinimidilo, succinimidil hidroxilo, carboximetil succinimidilo, y carbonato de succinimidilo. En particular, cuando el polímero no peptídico incluye un grupo aldehído reactivo en su extremo como un grupo reactivo, puede minimizar las reacciones no
 55 específicas y es eficaz en su respectiva unión a un polipéptido fisiológico y un fragmento Fc de inmunoglobulina. El producto final producido a través de la alquilación reductora mediante la unión al aldehído es más estable que cuando se conectan mediante enlaces amida. El grupo aldehído reactivo reacciona selectivamente en un extremo N

terminal a pH bajo, y a un pH alto, por ejemplo, pH 9,0, se puede formar un enlace covalente con un residuo de lisina.

5 Los grupos reactivos terminales del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede tener un grupo maleimida en un extremo, mientras que tiene un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo aldehído de butilo en el otro extremo. Cuando se utiliza un polietilenglicol o un polímero no peptídico que tiene un grupo reactivo hidroxilo en ambos extremos, el conjugado de la presente divulgación se puede preparar mediante la activación del grupo hidroxilo con varios grupos reactivos de acuerdo con una reacción química conocida, o el uso de polietilenglicol que tiene un grupo reactivo modificado que está disponible comercialmente.

10 En cuanto a los polipéptidos fisiológicamente activos para su uso mediante unión al fragmento Fc de IgG4 modificado de la presente divulgación, se puede usar cualquier cosa que requiera el aumento de la semivida en suero sin limitaciones. Por ejemplo, se pueden usar diversos polipéptidos fisiológicamente activos, tales como citocinas, interleucinas, proteínas de unión a interleucinas, enzimas, anticuerpos, factores de crecimiento, factores reguladores de la transcripción, factores de coagulación de la sangre, vacunas, proteínas estructurales, proteínas o receptores de ligandos, antígenos de superficie celular, antagonistas de los receptores, derivados de los mismos, y análogos de los mismos.

20 Específicamente, los polipéptidos fisiológicamente activos pueden incluir hormona del crecimiento humana, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, péptido liberador de la hormona de crecimiento, interferones y receptores de interferón (por ejemplo, interferón- α , - β , y - γ , receptor soluble del interferón de tipo I, etc.), factores estimulantes de colonias, interleucinas (por ejemplo, interleucina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29, -30, etc.) y receptores de interleucina (por ejemplo, el receptor de IL-1, receptor de IL-4, etc.), enzimas (por ejemplo, glucocerebrosidasa, iduronato-2-sulfatasa, α -galactosidasa-A, agalsidasa α , β , α -L-iduronidasa, butirilcolinesterasa, quitinasa, glutamato descarboxilasa, imiglucerasa, lipasa, uricasa, acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas, endopeptidasa neutra, mieloperoxidasa, etc.), proteínas de unión a interleucina y citocinas (por ejemplo, IL-18bp, proteína de unión a TNF, etc.), factor de activación de macrófagos, péptido de macrófagos, factores de linfocitos B, factores de linfocitos T, proteína A, factores de inhibición de la alergia, glicoproteínas de necrosis, inmunotoxinas, linfoquinas, factores de necrosis tumoral, supresores tumorales, factores transformantes del crecimiento, α -1 antitripsina, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobinas, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factor de coagulación de la sangre, factor α de coagulación de la sangre, factor de coagulación de la sangre, factor de coagulación de la sangre, factor XIII de coagulación de la sangre, activadores de plasminógeno péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de la colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento morfogenético óseo, proteína morfogenética ósea, calcitonina, insulina y derivado de insulina, atriopeptina, factor de inducción de cartílago, elcatonina, factor activador del tejido conjuntivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del foliculo, 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 de células gliales, netrina, factor inhibidor de neutrófilos, factores neurotróficos, netrina, etc.), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocorticotropa, glucagón, péptidos insulino-trópicos, incluyendo péptido similar al glucagón 1 y exendina 4, incretinas secretadas en los intestinos, adipocitos incluyendo leptonas y neurocitocinas eficaces para el síndrome metabólico, colecistoquinina, polipéptidos pancreáticos, péptidos liberadores 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 del VEGF, receptor del factor activador de linfocitos B, etc.), antagonistas de los receptores (por ejemplo, IL1-Ra, etc.), antígenos de LA superficie celular (por ejemplo, CD 2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45, 69, etc.), anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂, y Fd), antígeno de la vacuna derivado de virus, etc., pero no se limitan a los mismos. El polipéptido fisiológicamente activo aplicable en la presente divulgación puede ser un tipo nativo; uno que se produjo mediante recombinación genética en una célula procariota tal como E. coli, o en una célula eucariota tal como una célula de levadura, una célula de insecto, o una célula animal; o un derivado que tiene una actividad equivalente al del tipo nativo y una mutación en al menos una posición de aminoácido.

55 El fragmento Fc de IgG4 modificado de la presente divulgación se puede producir en una célula después de conectarlo a un polipéptido fisiológicamente activo como una sola secuencia génica utilizando un procedimiento de recombinación genética directa, o el fragmento Fc de IgG4 puede producirse de forma independiente y conjugarse a un fármaco, tal como un polipéptido fisiológicamente activo, *in vitro*.

En todavía otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición farmacéutica que contiene el conjugado de fármaco anterior de la presente divulgación como principio activo.

60 La composición farmacéutica que contiene el conjugado de la presente divulgación puede incluir un vehículo farmacéuticamente aceptable. Entre los ejemplos de vehículo farmacéuticamente aceptable se pueden incluir un

aglutinante, un lubricante, un agente disgregante, un excipiente, un agente solubilizante, un agente dispersante, un agente estabilizante, un agente de suspensión, un agente colorante, un agente aromatizante, etc. ; para las formulaciones de inyección, un agente tampón, un agente conservante, un analgésico, un agente isotónico, un agente estabilizante, etc., se pueden mezclar para su uso; y para las formulaciones tópicas se puede usar una base, un excipiente, un lubricante, un agente conservante, etc.

El tipo de formulación de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente divulgación se puede preparar de diversas maneras mediante la combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica se puede formular en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, etc. Para las inyecciones, la composición farmacéutica se puede formular en ampollas de una sola dosis o recipientes multidosis. La composición farmacéutica puede también formularse en soluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas, y formulaciones de liberación sostenida.

Mientras tanto, los ejemplos de vehículos, excipientes y diluyentes adecuados pueden incluir lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, goma arábiga, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio, aceite mineral, etc. Adicionalmente, la composición de la presente divulgación puede contener además una carga, un anticoagulante, un lubricante, un humectante, un agente aromatizante, un emulsionante, un conservante, etc.

En la presente divulgación, la dosis real de los fármacos en los que se utiliza el fragmento Fc de IgG4 como vehículo se determinará en base a los tipos de los fármacos utilizados como ingredientes activos junto con varios factores tales como la enfermedad que se va a tratar, la vía de administración, la edad, el sexo, y el peso de un paciente, la gravedad de la enfermedad, etc. Puesto que la composición farmacéutica de la presente divulgación tiene una excelente duración *in vivo*, el número y la frecuencia de administración de la formulación farmacéutica de la presente divulgación puede reducirse significativamente.

La formulación farmacéutica de la presente divulgación se puede administrar a través de diversas rutas.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "administración" se refiere a una introducción de un material particular a un paciente de una manera apropiada, y el fármaco conjugado de la presente divulgación se puede administrar a través de cualquiera de las rutas habituales, siempre y cuando el fármaco puede llegar a un tejido diana. Por ejemplo, se puede realizar administración intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar, e intrarrectal, pero la vía de administración no está limitada a estas. 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. Preferentemente, se puede administrar la presente composición en forma inyectable. Además, la composición farmacéutica puede administrarse usando un cierto aparato capaz de transportar los ingredientes activos a una célula diana.

[Descripción detallada]

En lo sucesivo en el presente documento, la presente divulgación se describirá con mayor detalle con referencia a los ejemplos siguientes. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos, y no se pretende que la divulgación esté limitada por estos ejemplos.

Ejemplo 1. Preparación de un conjugado del factor estimulante de las colonias de granulocitos humano-PEG-inmunoglobulina

<1-1> Construcción de un vector que expresa un dominio de Fc de IgG4

Para la clonación de una región Fc de la cadena pesada que incluya la región bisagra de IgG4, se realizó RT-PCR usando como molde las células sanguíneas recogidas a partir de sangre humana, como se describe a continuación. En primer lugar, el ARN total se aisló de la sangre de aproximadamente pH 6, y el gen se amplificó en base al molde de ARN usando un kit Qiamp RNA blood (Qiagen). En particular, la SEQ ID NO: 4 (gggcatatgc catcatgccc agcacctgag ttctgggg) y la SEQ ID NO: 5 (gggggatccc tatttaccca gagacagga ga) se usaron como cebadores. Para facilitar el procedimiento posterior, un dominio capaz de reconocer los sitios de restricción NdeI y ATG, el codón de iniciación necesaria para la expresión de proteínas se insertó en los cebadores y un dominio capaz de reconocer los sitios de restricción BamHI se insertó en el 3-cebador de la SEQ ID NO: 5. El producto de la región Fc amplificado a partir de la misma se escindió con NdeI y BamHI, respectivamente, y se subclonó en pET22b (Novagen Co., Ltd.) para preparar un plásmido. El plásmido se diseñó de modo que el fragmento Fc de IgG4 puede incluir una secuencia bisagra, en la que los residuos de aminoácidos en las posiciones 1 a 8 de la secuencia de aminoácidos completa de Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro en la bisagra de Fc de IgG4 Fc están deletados.

El plásmido preparado en este Ejemplo se denominó "pmHMC001" y el resultado de su análisis de la secuencia mostró que el ácido nucleico que codifica el fragmento Fc de IgG4 tiene una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 3, y el fragmento Fc de IgG4 Fc tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 en el momento de la expresión.

El vector de expresión preparado de este modo se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) y, por lo tanto, se preparó un transformante de *E. coli*, *E. coli* BL21 / *pmHMC001* (HMC001).

<1-2> Expresión y purificación de una región Fc de IgG4

5 El transformante del microorganismo obtenido en el Ejemplo <1-1> se inoculó en un fermentador (Marubishi Co., Ltd.) para fermentar y se examinó la expresión del fragmento Fc de IgG4.

10 En primer lugar, los transformantes anteriores colocados en 100 ml de medio LB se cultivaron en un baño de agua en agitación durante la noche y luego se inocularon en un fermentador para proceder con el cultivo. El fermentador se mantuvo a 35 °C o 28 °C, y el cultivo se inició por agitación a 500 rpm mientras que el suministro de aire en el mismo a 20 vvm para evitar que la condición en el interior se convierta en anaerobiosis. Con el progreso de la fermentación, las fuentes de energía que eran deficientes para el crecimiento del microorganismo se repusieron usando glucosa y extracto de levadura de acuerdo con el estado de la fermentación del microorganismo, y la expresión se indujo mediante la adición de IPTG, un inductor, al mismo cuando la DO a 600 nm alcanzó 80. El cultivo se procesó durante de 40 horas a 45 horas hasta que la DO a 600 nm alcanzó el intervalo de 100 a 120 con el fin de obtener un cultivo de alta concentración.

15 La expresión de Fc de IgG4 en un transformante de *E. coli* se confirmó mediante un experimento descrito a continuación.

20 Con el fin de confirmar la expresión completa de Fc de IgG4 en el citoplasma, parte del líquido de fermentación se mezcló con una cantidad igual de un tampón de goteo proteína 2x y se sometió a electroforesis en 15 % de SDS-PAGE (Criterion Gel, Bio-Rad). Como resultado, se confirmó que el Fc de IgG se sobreexpresaba en el transformante preparado. La proteína sobreexpresada se demostró que formaba coagulantes y la proteína se purificó a través de replegamiento y el funcionamiento de una columna de los coagulantes de la misma manera. En primer lugar, se disolvieron 10 g de células en 100 ml de un tampón de lisis (Tris 10 mM, pH 9,0, EDTA 1 mM, 0,5 % de Triton X-100, y NaCl 0,2 M) y después se sometieron a ultrasonidos. El producto resultante se sometió a centrifugación a 10.000 rpm durante 20 minutos para separarlo en una fracción soluble y una fracción insoluble, y 2 g del coagulante insoluble se disolvieron en 20 ml de un tampón de solubilización (guanidina 6 M y Tris 50 mM) y luego se dejaron reaccionar durante 30 minutos a 4 °C con agitación suave. Al término de la reacción, el resultante se diluyó mediante la adición de 10 volúmenes de un tampón de replegamiento (urea 2 M, Tris 50 mM, arginina 0,25 y cisteína 3 mM, pH 9,0) y después se dejó reaccionar durante la noche con agitación suave. Al término de la reacción, la muestra se proporcionó con un tampón fresco de Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) usando Sephadex G25. La muestra con un tampón sustituido se eluyó en un gradiente de concentración de Tris-HCl (pH 8,0) y NaCl utilizando DEAE-FF (GE Healthcare), y fenilo-FF (GE Healthcare) se eluyó con un gradiente de concentración de sulfato amónico y Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) con el fin de eliminar una gran cantidad de multímeros y monómeros. Para el siguiente procedimiento de la columna, el producto resultante se desalinizó con Tris 10 mM (pH 7,5) utilizando Sephadex G25 (GE Healthcare) y, a continuación, con el fin de obtener un Fc de IgG4 de alta pureza, 15Q (GE Healthcare) se eluyó con un gradiente de concentración de Tris-HCl 10 mM (pH 7,5) y NaCl, y finalmente se obtuvo el Fc de IgG4.

<1-3> Preparación de un conjugado de fármaco

1) Preparación de un conjugado entre factores estimulantes de colonias de granulocitos y PEG

40 ALD-PEG-ALD (Shearwater Inc., USA), un poli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de 3,4 kDa con grupos reactivos de aldehído en ambos extremos, se añadió en un tampón fosfato 100 mM en el que se disolvieron factores estimulantes de colonias de granulocitos en una concentración de 5 mg / ml, de manera que la relación molar de los factores estimulantes de colonias de granulocitos: PEG se convirtió en 1: 5. Se añadió cianoborohidruro sódico (NaCNBH₃), un agente reductor, a una concentración final de 20 mM y se hizo reaccionar durante 3 horas a 4 mientras se agitó lentamente.. Con el fin de obtener un conjugado en el que PEG se conjuga selectivamente al extremo amino de los factores estimulantes de colonias de granulocitos y PEG y los factores estimulantes de colonias de granulocitos se conjugan en una proporción de 1:1, la mezcla de reacción se sometió a una cromatografía de exclusión por tamaño Superdex (Superdex R, Pharmacia, EE.UU.). Los factores estimulantes de colonias se purificaron usando tampón de potasio-fosfato 10 mM (pH 6,0) como solución de elución, mientras que LOS factores estimulantes de colonias de granulocitos que no estaban conjugadas a PEG, PEG sin reaccionar y los subproductos dímeros, en los que dos factores estimulantes de colonias de granulocitos se conjugaron con PEG. El conjugado factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG purificado se concentró hasta 5 mg / ml.

2) Formación de un conjugado entre un conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG y un fragmento Fc de IgG4

55 El fragmento Fc de IgG4 de la presente divulgación se disolvió en tampón de fosfato 100 mM. Con el fin de conjugar el fragmento Fc de IgG4 a los grupos reactivos de aldehído del conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG purificado anteriormente, se añadió el conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG a un tampón que contenía el fragmento Fc de IgG4 de manera que la relación molar del conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG: fragmento Fc de IgG4 se convirtió en 1:5. A ello se añadió

cianoborohidruro sódico (NaCNBH_3), un agente reductor, para una concentración final de 20 mM, y la mezcla de reacción se hizo reaccionar durante 20 horas a 4 mientras se agitaba lentamente. Una vez finalizada la reacción de conjugación, se eliminaron los materiales sin reaccionar y los subproductos, y el conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG-proteína inmunoglobulina se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico.

5 El conjugado del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG-fragmento Fc de IgG4 se purificó mediante la adición de la mezcla de reacción anterior a una columna de DEAE (Pharmacia, USA), que se equilibró con 20 mM de tampón Tris (pH 7,5), seguido del flujo del tampón que contiene NaCl 1M con un procedimiento de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0 M \rightarrow 0,5 M). Para extraer una pequeña cantidad de inmunoglobulinas que no han reaccionado y hormona de crecimiento humana mezclada como impurezas con la fracción del factor
10 estimulante de colonias de granulocitos-PEG-fragmento Fc de IgG4, se realizó además una cromatografía de intercambio catiónico. La fracción del factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG-fragmento Fc de IgG4, en una columna Polycat (PolyLC, EE.UU.), que se equilibró con acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), y adicionalmente se purificó mediante flujo de tampón de acetato de sodio 10 mM (pH 4,5) que contiene NaCl 1M con un procedimiento de gradiente de concentración lineal (concentración de NaCl: 0 M \rightarrow 0,5 M), y, de este modo, se obtuvo el conjugado
15 factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG-Fragmento Fc de IgG4 (HM10460A) con pureza.

Ejemplo 2. Confirmación de intercambio cadenas entre el conjugado de factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG-inmunoglobulina e IgG4 humana en sangre de rata

La IgG4 humana en la cantidad de 2 mg se marcó con biotina mediante mezclado con 20 mg / ml de solución de biotina-7-NHL en una proporción molecular de 1:10 y se purificó con un kit Biotin Protein Labeling Kit (Roche). La
20 sangre recogida de ratas normales se trató con heparina para los fines de anticoagulación y se añadió penicilina-estreptomicina (1 % v / v). 1,5 mg de IgG4 marcada con biotina y 1,32 mg de HM10460A se añadieron en 3 ml de la sangre, se mezclaron y la mezcla se dividió en alícuotas en 6 tubos (0,5 ml / tubo) y se incubaron en una incubadora a 37 °C. Un tubo se extrajo a tiempos de 0 horas, 4 horas, 10 horas, 24 horas, y 48 horas, respectivamente, y se separó el plasma de la misma y se almacenó a -20 °C. Cada una de las muestras de plasma y materiales estándar se mezclaron con un tampón de proteínas de proteína no reductor, y el resultante se sometió a una SDS-PAGE
25 usando un gel de poliacrilamida a un gradiente de concentración 4 % a 15 %. Se IgG4 marcada con biotina y HM10460A como materiales estándar. El gel, tras la finalización de la electroforesis, se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) y se analizó usando anticuerpos anti-GCSF humanos y estreptavidina-HRP. En cuanto a las condiciones de unión de anticuerpos se utilizaron anticuerpos de Fc de IgG anti-humanos (Sigma) en
30 5 % de leche descremada en condiciones de bloqueo después de diluir en una proporción de 1:150.000, los anticuerpos anti-GCSF humanos (kit de ensayo de G-CSF humano. IBL) en 1 % de leche desgrasada en condiciones de bloqueo después de diluir a una proporción de 1:2000, y estreptavidina-HRP en 5% de leche desgrasada en condiciones de bloqueo después de diluir a una proporción 1:5000, respectivamente. Se confirmó que HM10460A formaba dímeros (94 kDa), que tienen dos G-CSF por cada fragmento de Fc de IgG4, y los
35 fragmentos Fc de IgG4 (50 kDa), por el mecanismo de intercambio de cadenas entre los propios HM10460A.

En contraste, cuando HM10460A indujo una reacción de intercambio mutuo de cadenas entre HM10460A y moléculas de IgG4 humana, se esperaba que se formaran moléculas con un tamaño de 100 kDa y 122 kDa. Sin embargo, estas moléculas no se observaron mediante análisis de transferencia Western. Por el contrario, cuando se analizó mediante estreptavidina-HRP, apareció una banda de 75 kDa en la calle de la IgG4 y esto confirma la
40 formación de monómeros a partir de IgG4 humana, que es en sí mismo es un dímero de la IgG4 humana por naturaleza (FIG. 1).

Ejemplo 3. Confirmación de intercambio cadenas entre el conjugado de factor estimulante de colonias de granulocitos-PEG-inmunoglobulina e IgG4 humana en sangre humana

A sangre humana extraída de un donante se añadió penicilina-estreptomicina (1 % v / v). 1,32 mg de HM10460A
45 preparado en el ejemplo 1 se mezcló con 3 ml de la sangre, se mezclaron y la mezcla se dividió en alícuotas en 6 tubos (0,5 ml / tubo) y se incubaron en una incubadora a 37 °C. Un tubo se extrajo a tiempos de 0 horas, 4 horas, 10 horas, 24 horas, y 48 horas, respectivamente, y se separó el plasma de la misma y se almacenó a -20 °C antes del análisis. Cada una de las muestras de plasma y HM10460A y un fragmento Fc de IgG4 a varias concentraciones como materiales control se mezclaron con un tampón de muestras de proteína no reductor, y el resultante se
50 sometió a una SDS-PAGE usando un gel de poliacrilamida a un gradiente de concentración 4 % a 15 %. El gel, tras la finalización de la electroforesis, se transfirió a una membrana de PVDF (Immobilon-P, Millipore) y se analizó usando anticuerpos anti-GCSF humanos. Los anticuerpos de G-CSF anti-humanos (kit de ensayo de G-CSF humano. IBL) en 1 % de leche desgrasada en condiciones de bloqueo después de diluir a una proporción de 1:2000. Como en la sangre de rata, las moléculas con un tamaño de 100 kDa y 122 kD, que se pueden formar mediante
55 intercambio de cadenas con la IgG4 humana, no se formaron (FIG. 2).

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Fragmento Fc de IgG4 que comprende una región bisagra modificada

60 <130> OPA14085

ES 2 685 617 T3

<140> 10-2013-0063029
<141> 31-05-2013

<160> 21

5

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 12

10

<212> PRT

<213> *HOMO SAPIENS*

<400> 1

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

15

<210> 2

<211> 221

<212> PRT

20

<213> *HOMO SAPIENS*

<400> 2

Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
1 5 10 15

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
20 25 30

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
50 55 60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
65 70 75 80

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
85 90 95

Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
100 105 110

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
115 120 125

Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
130 135 140

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
145 150 155 160

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
165 170 175

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
180 185 190

Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
195 200 205

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
210 215 220

ES 2 685 617 T3

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

5 <210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Variante de la región bisagra
 <400> 7

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

15 <210> 8
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Variante de la región bisagra
 <400> 8

25 Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser
 1 5

30 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Variante de la región bisagra
 <400> 9

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 1 5

40 <210> 10
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Variante de la región bisagra
 <400> 10

Glu Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 1 5

50 <210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Variante de la región bisagra

ES 2 685 617 T3

<400> 11

Glu Ser Pro Ser Cys Pro
1 5

5 <210> 12
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Variante de la región bisagra

<400> 12

Glu Pro Ser Cys Pro
1 5

15 <210> 13
<211> 4
<212> PRT
20 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Variante de la región bisagra

25 <400> 13

Pro Ser Cys Pro
1

30 <210> 14
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Variante de la región bisagra

<400> 14

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

40 <210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Variante de la región bisagra

<400> 15

50 **Lys Tyr Gly Pro Pro Pro Ser Cys Pro**
1 5

55 <210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

ES 2 685 617 T3

<223> Variante de la región bisagra

<400> 16

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

<210> 17

<211> 8

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de la región bisagra

15 <400> 17

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys
 1 5

<210> 18

20 <211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Variante de la región bisagra

<400> 18

Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro
 1 5

30 <210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

35 <220>

<223> Variante de la región bisagra

<400> 19

40 <210> 20

Glu Ser Lys Pro Ser Cys Pro
 1 5

<211> 6

45 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de la región bisagra

50 <400> 20

Glu Ser Pro Ser Cys Pro
 1 5

55 <210> 21

<211> 4

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Variante de la región bisagra

<400> 21

Glu Pro Ser Cys

1

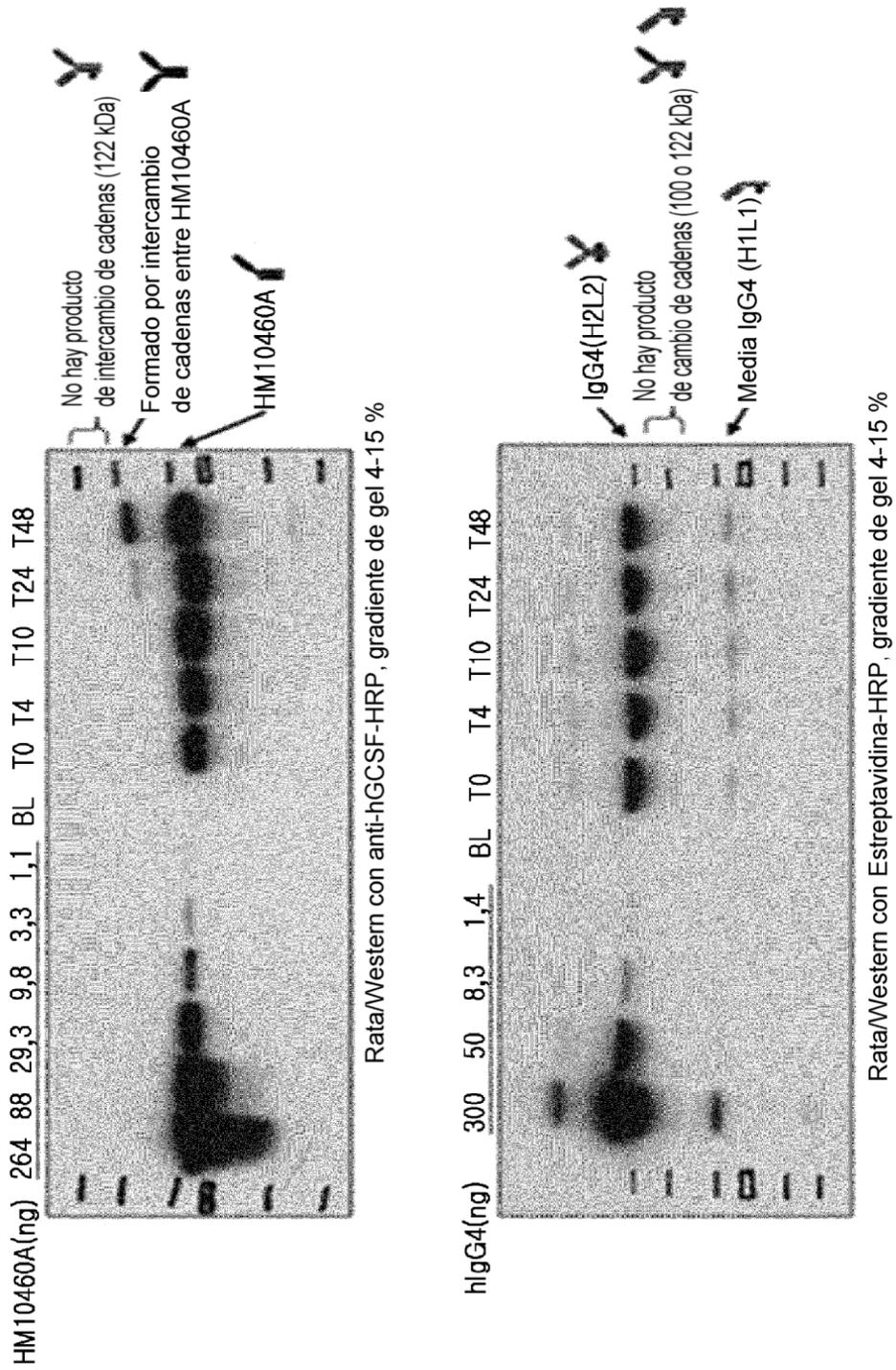
5

REIVINDICACIONES

1. Un fragmento Fc de IgG4 modificado que comprende una región bisagra modificada, en el que la región bisagra representada por la siguiente secuencia de aminoácidos se modificó delecionando parte de la secuencia de aminoácidos para incluir solo un resto de cisteína:
5 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro.
2. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que no se producen intercambio de cadena ni formación de monómeros *in vivo*.
3. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que la región bisagra se mutó mediante la deleción de 1 a 8 aminoácidos continuos o discontinuos que comprenden un resto de Cys en la 8ª posición.
- 10 4. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que la región bisagra se mutó mediante la deleción de 1 a 8 aminoácidos continuos o discontinuos que comprenden un resto de Cys en la 11ª posición.
5. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que la región bisagra se mutó mediante la deleción de 1 a 5 aminoácidos continuos o discontinuos que comprenden un resto de Cys en la 8ª posición.
- 15 6. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que la región bisagra se mutó mediante la deleción de 1 a 5 aminoácidos continuos o discontinuos que comprenden un resto de Cys en la 11ª posición.
7. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que la región bisagra se mutó mediante la deleción de 1 a 3 aminoácidos continuos o discontinuos que comprenden un resto de Cys en la 8ª posición.
8. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, en el que la región bisagra se modificó mediante la deleción de 1 a 3 aminoácidos continuos o discontinuos que comprenden un resto de Cys en la 11ª posición.
- 20 9. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, que está aglicosilado.
10. El fragmento Fc de IgG4 modificado de la reivindicación 1, que está modificado por un polímero no peptídico.
11. Un ácido nucleico que codifica el fragmento Fc de IgG4 de la reivindicación 1.
12. Un vector que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 11.
13. Un microorganismo introducido con el vector de la reivindicación 12.
- 25 14. Un procedimiento para preparar el fragmento Fc de IgG4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende cultivar el microorganismo de la reivindicación 13.
15. Un conjugado de fármaco, en el que el fragmento Fc de IgG4 de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 está conjugado al mismo mediante un enlazador.
- 30 16. El conjugado de fármaco de la reivindicación 15, en el que el fármaco se selecciona del grupo que consiste en hormona del crecimiento humana, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones y receptores de interferón, factor estimulante de colonias, interleucinas y receptores de interleucinas, enzimas, proteínas de unión a interleucina y a citocina, factor de activación de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de linfocitos B, factor de linfocitos T, proteína A, factor inhibidor de la alergia, glicoproteína de necrosis, inmunotoxina, linfotóxina, factor de necrosis tumoral, supresor tumoral, factor transformante del crecimiento, α -1 antitripsina, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetina, hemoglobina, trombina, péptido activador de receptor de trombina, trombomodulina, factor VII de coagulación sanguínea, factor VII α de coagulación sanguínea, factor VIII de coagulación sanguínea, factor IX de coagulación, factor XIII de coagulación sanguínea, activador del plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de la colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de las plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento morfogénico óseo, proteína morfogénica ósea, calcitonina, insulina y derivado de insulina, atriopeptina, factor de inducción de cartílago, elcatonina, factor activador del tejido conjuntivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso (incluyendo el factor de crecimiento nervioso, factor neurotrófico ciliar, el factor 1 de la axogénesis, péptido natriurético cerebral, factor neurotrófico derivado de células gliales, netrina, factor inhibidor de neutrófilos, factor neurotrófico y neutrina), hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocorticotropa, glucagón, péptidos insulínotropicos incluyendo el péptido 1 similar al glucagón y exendina 4, incretinas secretadas en el intestino, adipocitos incluyendo leptonas y neurocitocinas eficaces para el síndrome metabólico, colecistoquinina, polipéptidos pancreáticos, péptidos liberadores de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, receptores, antagonista de receptores, antígeno de superficie celular, anticuerpo monoclonal, anticuerpo policlonal, fragmentos de anticuerpos y antígeno de vacuna derivado de un virus.
- 50

17. El conjugado de fármaco de la reivindicación 15, en el que el fármaco es un factor estimulante de colonias de granulocitos.
18. El conjugado de fármaco de la reivindicación 15, en el que el enlazador es un polímero no peptídico.
- 5 19. El conjugado de fármaco de la reivindicación 18, en el que el polímero no peptídico tiene dos o tres extremos reactivos.
20. Una composición farmacéutica que comprende el conjugado de la reivindicación 15.
21. Un vehículo de fármacos que comprende un fragmento Fc de IgG4 modificado que comprende una región bisagra modificada, en el que la región bisagra representada por la siguiente secuencia de aminoácidos se modifica delecionando parte de la secuencia de aminoácidos para incluir solo un resto de cisteína:
- 10 Glu-Ser-Lys-Tyr-Gly-Pro-Pro-Cys-Pro-Ser-Cys-Pro, y
en la que no se produce intercambio de cadenas ni formación de monómeros *in vivo*.

[FIG. 1]



[FIG. 2]

