

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 612**

51 Int. Cl.:

A61K 47/68 (2007.01)

C07K 1/107 (2006.01)

C07K 14/62 (2006.01)

A61K 38/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.03.2014 PCT/KR2014/001818**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.09.2014 WO14137161**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014 E 14760968 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 2966083**

54 Título: **Procedimiento de preparación mejorado para producción de alto rendimiento de un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo**

30 Prioridad:

05.03.2013 KR 20130023602

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

20.02.2020

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JANG, MYUNG HYUN;
KIM, MIN YOUNG;
KIM, DAE JIN;
JUNG, SUNG YOUB y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

GARCÍA GONZÁLEZ, Sergio

ES 2 743 612 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

Procedimiento de preparación mejorado para producción de alto rendimiento de un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo

Antecedentes

5 1. Campo de la divulgación

La presente divulgación se refiere a un procedimiento para preparar un conjugado mediante la unión de un polipéptido fisiológicamente activo, un ligador de polímero no peptídico, y una región constante de inmunoglobulina por medio de un enlace covalente. Más particularmente, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para preparar eficientemente el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo, en el que una sal se usa en una reacción de acoplamiento para mejorar el problema del bajo rendimiento de producción durante la preparación del conjugado de polipéptido fisiológicamente activo.

2. Descripción de la técnica relacionada

En general, los polipéptidos fisiológicamente activos son fáciles de desnaturar debido a su baja estabilidad y se descomponen mediante la proteína hidrolasa en la sangre para eliminarse fácilmente a través del riñón o el hígado. Por lo tanto, para mantener la concentración sanguínea y la potencia de los medicamentos proteicos, que incluyen un polipéptido fisiológicamente activo como ingrediente farmacológico activo, es necesario administrar con frecuencia el fármaco a base de proteínas a los pacientes. Sin embargo, en el caso de los medicamentos proteicos administrados a pacientes principalmente en forma de formulación inyectable, las inyecciones frecuentes para mantener la concentración sanguínea de polipéptido fisiológicamente activo pueden causar un sufrimiento excesivo en los pacientes y un alto costo de tratamiento. Para resolver estos problemas, se ha realizado un esfuerzo constante para maximizar la eficacia farmacológica mediante el aumento de la estabilidad sanguínea de los fármacos proteicos y el mantenimiento de la concentración del fármaco en la sangre durante más tiempo. Estas formulaciones de fármacos proteicos de acción prolongada son necesarias para aumentar la estabilidad de los fármacos proteicos y al mismo tiempo para mantener la potencia de los fármacos en un nivel suficientemente alto, así como para no causar reacción inmune en los pacientes.

En la técnica anterior, para estabilizar proteínas e inhibir el contacto con la proteína hidrolasa y la pérdida a través del riñón, se ha usado un procedimiento para añadir químicamente polímeros que tienen una alta solubilidad tal como el polietilenglicol (de aquí en adelante denominado como "PEG") a la superficie de los fármacos proteicos. Se sabe que los PEG son efectivos para estabilizar proteínas y evitar la hidrólisis de proteínas mediante la unión no específica de PEG a un sitio específico o a varios sitios de la proteína diana para aumentar la solubilidad de la proteína, y no causar ningún efecto secundario adverso (Sada et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991).

Sin embargo, en el procedimiento que usa PEG, a pesar de su capacidad para mejorar el tiempo de circulación de fármacos peptídicos mediante el aumento del peso molecular del PEG, la potencia del fármaco peptídico se reduce significativamente y la reactividad del PEG con péptidos se reduce concurrentemente con un aumento en el peso molecular, de este modo se reduce el rendimiento.

Además, un procedimiento para preparar una proteína de fusión de un fragmento de inmunoglobulina y un polipéptido fisiológicamente activo puede superar los problemas de bajo rendimiento de pegilación y no especificidad, pero tiene problemas de que el aumento de la vida media de la sangre no es notablemente alto, contrario a lo esperado, y en algunos casos, posee un título bajo. Para maximizar el efecto de aumento de la vida media en sangre, también se pueden usar varios tipos de ligadores peptídicos, pero pueden tener la posibilidad de inducir una reacción inmunológica. Además, hay problemas en que, en los casos en que se usan péptidos que tienen enlaces disulfuro, tales como BNP, la aplicación es difícil debido a la alta probabilidad de plegamiento erróneo, y en los casos en que están presentes residuos de aminoácidos no nativos, la producción es imposible en la forma de un recombinante genético.

La insulina es un péptido secretado por las células beta del páncreas humano como un material que cumple un papel muy importante en el control del nivel de glucemia en el cuerpo. En los casos en que la insulina no se secreta adecuadamente o la insulina secretada no actúa adecuadamente en el cuerpo, la glucemia del cuerpo no se puede controlar y aumenta, lo que induce el estado denominado diabetes. El caso como se indicó anteriormente se conoce como diabetes mellitus tipo 2, y el caso en que la insulina no es secretada por el páncreas para aumentar la glucemia se conoce como diabetes mellitus tipo 1. La diabetes mellitus tipo 2 se trata con un agente hipoglucemiante oral que incluye un material químico como componente principal y, en ciertos pacientes, también se trata con insulina. Por otro lado, el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 1 requiere necesariamente la administración de insulina.

La terapia con insulina, ampliamente utilizada en la actualidad, es un procedimiento para administrar insulina mediante inyección antes y después de las comidas. Sin embargo, dicha terapia con insulina requiere que la insulina se administre constantemente tres veces por día y, por lo tanto, causa mucho sufrimiento e inconvenientes a los

pacientes. Para superar tales problemas, se han hecho varios intentos. Uno de ellos ha sido un intento de administrar fármacos peptídicos al cuerpo mediante la inhalación a través de las cavidades orales o nasales mediante el aumento de la permeabilidad de la membrana biológica de los fármacos peptídicos. Sin embargo, dicho procedimiento tiene una eficiencia de administración significativamente menor en el cuerpo en comparación con la inyección y, por lo tanto, todavía hay muchas dificultades para mantener la actividad in vivo de los fármacos peptídicos en las condiciones requeridas.

Además, se han intentado procedimientos para retrasar la absorción después de la administración subcutánea de fármacos excesivos. De acuerdo con esto, se han informado procedimientos para mantener la concentración de fármacos en la sangre a través de solo una administración única diaria. Algunos fármacos se han aprobado como medicamento (por ejemplo, Lantus, Sanofi-aventis) y se administran a pacientes en la actualidad. La investigación ha progresado para modificar la insulina con ácidos grasos para fortalecer la unión del polímero de insulina y extender la duración mediante la unión a la albúmina presente en el sitio de administración y en la sangre, y los fármacos producidos utilizando dicho procedimiento se han aprobado como medicamentos (Levemir, NovoNordisk). Sin embargo, dichos procedimientos tienen el efecto secundario de causar un dolor en el sitio de administración y, además, el intervalo de administración de una inyección diaria única todavía representa una carga significativa para los pacientes.

Para resolver estos problemas, los presentes inventores prepararon un complejo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo y una región constante de inmunoglobulina utilizando un polímero no peptídico como ligador, como una estrategia para maximizar simultáneamente un aumento de la vida media en sangre y el mantenimiento de la actividad in vivo de los polipéptidos fisiológicamente activos que incluyen insulina. Sin embargo, todavía se requiere un procedimiento para preparar el complejo con alto rendimiento y pureza, porque las materias primas que constituyen el conjugado son costosas. En este contexto, los autores hallaron que cuando se añade un tipo y concentración adecuados de una sal a una solución de reacción en una etapa de la reacción de acoplamiento durante la preparación del complejo, se puede preparar un complejo de un polipéptido fisiológicamente activo con alto rendimiento y pureza y se pueden reducir los costos de producción.

El documento WO 2005/047334 se refiere a "un fragmento Fc de IgG útil como portador de fármaco" y "un vector recombinante que expresa el fragmento Fc de IgG, un transformante transformado con el vector recombinante, y un procedimiento para preparar un fragmento Fc de IgG, que comprende cultivar el transformante".

El documento WO 2010/011096 se refiere a "un complejo proteico, que comprende un polipéptido fisiológicamente activo, una proteína dimérica y un polímero no peptídico que tiene tres extremos funcionales (3 brazos), con el enlace tanto del polipéptido fisiológicamente activo como del dimérico proteína al polímero de 3 brazos no peptídico a través de enlaces covalentes respectivos".

Sumario

La invención es como se define en las reivindicaciones.

Un objeto de la presente divulgación es proporcionar un procedimiento eficiente capaz de mejorar el bajo rendimiento de producción durante la preparación de un complejo mediante la unión de un polipéptido fisiológicamente activo, un ligador de polímero no peptídico, y una región constante de inmunoglobulina por medio de un enlace covalente.

En un aspecto para lograr el objeto anterior, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un complejo de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico - región constante de inmunoglobulina, que comprende las etapas de: (1) reacción de un polímero no peptídico con uno de un polipéptido fisiológicamente activo o una región constante de inmunoglobulina; y (2) reacción de la mezcla de reacción de la etapa (1) con el otro del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina en presencia de una sal.

Preferiblemente, el polímero no peptídico puede tener cada uno de modo independiente un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un derivado de aldehído, un derivado de maleimida y un derivado de succinimida en ambos extremos.

Más preferiblemente, el polímero no peptídico se puede ligar al polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina por medio de los grupos funcionales en ambos extremos para formar un enlace covalente.

Preferiblemente, el procedimiento también puede comprender la etapa de separar un conjugado del polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico o un conjugado de la región constante de inmunoglobulina - polímero no peptídico a partir de la mezcla de reacción después de la etapa (1).

Preferiblemente, la sal se puede seleccionar del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, carbonato de sodio, cianuro de sodio, citrato de sodio, nitrato de sodio, cloruro de potasio, acetato de potasio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, carbonato de potasio, cianuro de potasio, citrato de potasio, nitrato de potasio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de magnesio,

carbonato de magnesio, cianuro de magnesio, citrato de magnesio, nitrato de magnesio, cloruro de amonio, acetato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, cianuro de amonio, citrato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de calcio, acetato de calcio, sulfato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, cianuro de calcio, citrato de calcio y nitrato de calcio.

- 5 Más preferiblemente, la sal se puede seleccionar del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, y cloruro de potasio.

Preferiblemente, la sal se puede añadir a una concentración final de 0,1 a 3,0 M.

Más preferiblemente, la sal se puede añadir a una concentración final de 0,3 a 2,5 M.

- 10 Preferiblemente, si la sal es cloruro de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 3,0 M, si la sal es acetato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 2,5 M, si la sal es sulfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,7 M, si la sal es fosfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,8 M, o si la sal es cloruro de potasio, se puede añadir a una concentración final de 1,0 M o menos.

Preferiblemente, el tiempo de reacción de la etapa (2) puede ser 4 a 18 horas.

Preferiblemente, la temperatura de reacción de la etapa (2) puede ser 0 a 25 °C.

- 15 Preferiblemente, si el polímero no peptidilo tiene uno o más derivados de aldehído como grupos funcionales, la mezcla de reacción además comprende un agente reductor a una concentración final de 1 a 100 mM.

Preferiblemente, la etapa (1) se puede realizar a pH 5,0 a 6,5, y la etapa (2) se puede realizar a pH 6,0 a 8,5.

- 20 Preferiblemente, en la etapa (1), el polímero no peptidilo puede reaccionar con el polipéptido fisiológicamente activo, y en la etapa (2), la mezcla de reacción de la etapa (1) puede reaccionar con la región constante de inmunoglobulina.

Preferiblemente, en la etapa (1), el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptidilo puede reaccionar entre sí a una relación molar de 1:1 a 1:20, y en la etapa (2), el producto de la etapa (1) y la región constante de inmunoglobulina puede reaccionar entre sí a una relación molar de 1:0,5 a 1:10.

- 25 Más preferiblemente, la etapa (2) se puede llevar a cabo en presencia de cloruro de sodio añadido a una concentración final menor de 3,0 M, acetato de sodio añadido a una concentración final menor de 2,5 M, sulfato de sodio añadido a una concentración final menor de 0,7 M, fosfato de sodio añadido a una concentración final menor de 0,8 M, o cloruro de potasio añadido a una concentración final de 1,0 M o menos.

- 30 Preferiblemente, los grupos funcionales del polímero no peptidilo se puede unir a un grupo amino que está presente en un extremo N-terminal o en una cadena lateral del residuo de Lys del polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina.

Preferiblemente, el polímero no peptidilo se puede seleccionar del grupo que consiste en polietilenglicoles, polipropilén glicoles, copolímeros de etilén glicol y propilén glicol, polioles polioxietilados, alcoholes polivinílicos, polisacáridos, dextranos, polivinil étil éteres, ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico, y la combinación de estos.

- 35 Más preferiblemente, el polímero no peptidilo puede ser polietilenglicol.

Preferiblemente, el polímero no peptidilo puede tener un peso molecular que varía de 1 a 100 kDa.

Preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina puede estar aglicosilada.

Preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina puede consistir en uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en dominios de CH1, CH2, CH3 y CH4.

- 40 Preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina también puede incluir una región de bisagra.

Preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina se puede seleccionar del grupo que consiste en regiones constantes derivadas de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, sus combinaciones, y sus híbridos.

Preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina se puede seleccionar del grupo que consiste en regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sus combinaciones, y sus híbridos.

- 45 Más preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina puede ser una región Fc de IgG4.

Mucho más preferiblemente, la región constante de inmunoglobulina puede ser una región Fc de IgG4 humana aglicosilada.

Preferiblemente, el polipéptido fisiológicamente activo se puede seleccionar del grupo que consiste en hormona del crecimiento humana, hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento, péptidos liberadores de la hormona del crecimiento, interferón, receptores de interferón, factores estimulantes de colonias, péptidos tipo glucagón (GLP-1, etc.), oxintomodulina, receptores acoplados a proteínas G, interleuquinas, receptores de interleuquina, enzimas, proteínas de unión a interleuquina, proteínas de unión a citoquinas, factores de activación de macrófagos, péptidos de macrófagos, factores de células B, factores de células T, proteína A, inhibidores de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxinas, linfotoxinas, factor de necrosis tumoral, supresores de tumores, factor de crecimiento transformante, alfa-1 anti-tripsina, albúmina, α -lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptidos activadores del receptor de trombina, trombomodulina, factor sanguíneo VII, VIIa, VIII, VIII y XIII, activadores de plasminógeno, péptidos de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de collagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartilago, elcatonina, factor de activación del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona folículo estimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento tipo insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacuna derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos.

Más preferiblemente, el polipéptido fisiológicamente activo puede ser insulina.

Preferiblemente, en la etapa (1), el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico pueden reaccionar entre sí a una relación molar de 1:1 a 1:20 bajo la condición de pH de 5,0 a 6,5, y en la etapa (2), la mezcla de reacción de la etapa (1) y la región constante de inmunoglobulina pueden reaccionar entre sí a una relación molar de 1:0,5 a 1:10 bajo la condición de pH de 6,0 a 8,5 en presencia de la sal, en que si la sal es cloruro de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 3,0 M, si la sal es acetato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 2,5 M, si la sal es sulfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,7 M, si la sal es fosfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,8 M, o si la sal es cloruro de potasio, se puede añadir a una concentración final de 1,0 M o menos.

30 Efecto

Un complejo de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico - región constante de inmunoglobulina se puede producir con alta pureza y rendimiento mediante el procedimiento de preparación de la presente divulgación. Debido al procedimiento utilizado para preparar el complejo del polipéptido fisiológicamente activo, los costos de producción se pueden reducir, de este modo mejora la aplicabilidad industrial y el cumplimiento del fármaco. Por lo tanto, el procedimiento se puede usar para desarrollar formulaciones de acción prolongada de polipéptidos fisiológicamente activos.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 es un perfil que muestra el resultado de la purificación de las soluciones de la reacción de acoplamiento de los Ejemplos 2 y 3 por la columna Fuente 15Q, en el que se puede comparar el contenido de inmunoglobulina Fc sin reaccionar, un complejo de insulina de acción prolongada (complejo de fragmento de insulina-PEG-inmunoglobulina Fc) y las impurezas

Descripción detallada

En un aspecto para lograr los objetos anteriores, la presente divulgación proporciona un procedimiento para preparar un complejo de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico - región constante de inmunoglobulina, que comprende las etapas de: (1) reacción de un polímero no peptídico con uno de un polipéptido fisiológicamente activo o una región constante de inmunoglobulina; y (2) reacción de la mezcla de reacción de la etapa (1) con el otro del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina en presencia de una sal.

La etapa (1) es una etapa de unión del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina al polímero no peptídico, y se puede usar un procedimiento conocido para unir el polímero no peptídico con el polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina. Por ejemplo, se puede lograr mediante la reacción de ellos a 0 a 25 °C durante 1 a 16 horas. Preferiblemente, un polímero no peptídico se puede unir de modo covalente al polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina a través del grupo funcional mediante la reacción para formar un enlace covalente. En este momento, de acuerdo con el tipo del grupo funcional que participa en la reacción, un agente reductor también se puede incluir a una concentración de 1 a 20 mM para llevar a cabo la reacción.

El polímero no peptídico se puede unir al polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina por medio de los grupos funcionales incluidos en el mismo que forman enlaces covalentes. Preferiblemente, los

grupos funcionales del polímero no peptídico se puede unir a un grupo amino que está presente en un extremo N-terminal o en una cadena lateral del residuo de Lys del polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina. A este respecto, la posición del residuo de Lys en el polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina no está particularmente limitada al sitio específico. El residuo de Lys no se limita a Lys natural, y aminoácidos no naturales y derivados de Lys se incluyen sin limitación, siempre que contengan grupos amino unidos a los grupos funcionales del polímero no peptídico.

La mezcla de reacción puede incluir los productos de reacción, tales como un conjugado del polímero no peptídico y el polipéptido fisiológicamente activo o un conjugado del polímero no peptídico y la región constante de inmunoglobulina, y una mezcla de reacción sin reaccionar. En consecuencia, la etapa de separación del conjugado del polipéptido fisiológicamente activo-polímero no peptídico o el conjugado de la región constante de inmunoglobulina - polímero no peptídico a partir de la mezcla de reacción también se puede comprender después de la etapa (1).

El término "polímero no peptídico", como se usa en la presente, se refiere a un polímero biocompatible compuesto de dos o más unidades repetitivas que se mantienen juntas mediante un enlace covalente aleatorio distinto de un enlace peptídico. Los ejemplos del polímero no peptídico útil en la presente divulgación incluyen polietilenglicoles, polipropilenglicoles, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxiethylados, alcoholes polivinílicos, polisacáridos, dextranos, polivinil éteres, polímeros biodegradables tal como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y sus combinaciones, con preferencia por el polietilenglicol (PEG). Los derivados de los mismos que son bien conocidos en la técnica y los derivados que se pueden preparar fácilmente usando procedimientos conocidos en la técnica también están dentro del ámbito de la presente divulgación.

Los ligadores peptídicos utilizados en la proteína de fusión preparada de acuerdo con el procedimiento de fusión en marco anterior tienen la desventaja de que se escinden fácilmente in vivo mediante enzimas proteolíticas y, por lo tanto, cualquier aumento de la vida media en sangre de los fármacos activos debido al uso del portador correspondiente no cumple las expectativas. Sin embargo, en la presente divulgación, se encuentra que la vida media en sangre del péptido es similar a la del portador, debido al uso de polímeros que son resistentes a las enzimas proteolíticas. Por lo tanto, en la presente divulgación, cualquier polímero que tiene la función anterior, es decir, que tiene una resistencia a la enzima proteolítica in vivo, se puede usar como el polímero no peptídico sin ninguna limitación. Los polímeros no peptídicos tienen un peso molecular en el rango de 1 a 100 kDa, y preferiblemente en el rango de 1 a 20 kDa. Además, el polímero no peptídico de la presente divulgación que se conjuga con el polipéptido fisiológicamente activo, puede ser no solo una clase de polímero sino también la combinación de diferentes tipos de polímeros.

Los polímeros no peptídicos tal como se usan en la presente divulgación tienen los grupos funcionales que se pueden conjugar con la región Fc de inmunoglobulina y el fármaco proteico.

Preferiblemente, el polímero no peptídico se puede unir a un grupo amina o grupo tiol en una cadena lateral del residuo de aminoácido del polipéptido fisiológicamente activo para formar un enlace péptido, hemiacetal, imina o tiodioxipirrolidino.

El ejemplo no limitante de los grupos funcionales terminales de los polímeros no peptídicos puede incluir derivados de aldehído tales como un grupo propionaldehído y un grupo butiraldehído, derivados de maleimida y derivados de succinimida. Los derivados de succinimida pueden incluir succinimidil carboximetilo, valerato de succinimidilo, metilbutanoato de succinimidilo, metilpropionato de succinimidilo, butanoato de succinimidilo, propionato de succinimidilo, N-hidroxisuccinimida o carbonato de succinimidilo, pero sin limitación. Los grupos funcionales que se pueden unir selectivamente al grupo amina o al grupo tiol del residuo de aminoácido de la región Fc de inmunoglobulina y el polipéptido fisiológicamente activo para formar un enlace covalente se pueden usar sin limitación.

Los grupos funcionales en ambos extremos del polímero no peptídico pueden ser iguales o diferentes entre sí. Por ejemplo, el polímero no peptídico puede poseer un grupo succinimida en un extremo, y un derivado aldehído tal como un grupo propionaldehído o un grupo butiraldehído en el otro extremo. Cuando se usa polietilenglicol que tiene un grupo hidroxilo reactivo en ambos extremos del mismo como polímero no peptídico, el grupo hidroxilo se puede activar a varios grupos funcionales mediante reacciones químicas conocidas, o se puede usar polietilenglicol disponible comercialmente que tiene un grupo funcional modificado para preparar el complejo proteico de la presente divulgación.

Preferiblemente, el polímero no peptídico puede tener grupos propionaldehído como grupos funcionales en ambos extremos.

La conjugación con PEG, que generalmente se usa para preparar formulaciones de proteínas de acción prolongada, aumenta la estabilidad de las proteínas, mientras que los pesos moleculares más grandes de PEG exhiben una menor reactividad con las proteínas y, por lo tanto, disminuyen el rendimiento de producción. Debido a que el rendimiento de producción está estrechamente relacionado con el costo de producción y la aplicabilidad industrial

correspondiente, es muy importante aumentar el rendimiento de producción. El PEG con grupos funcionales aldehído se puede acoplar a un grupo amina, que está presente en un extremo N-terminal o en el grupo R del residuo de Lys del polipéptido. El rendimiento de la PEGilación puede variar de acuerdo con la relación molar de PEG a proteínas, la concentración de soluciones de reacción, el tiempo de reacción, pH, temperatura, etc.

5 Sin embargo, cuando se usa un polímero no peptídico que incluye PEG con dos o más grupos funcionales como un ligador entre dos polipéptidos diferentes, se requieren dos o más etapas en las reacciones, de este modo se reducen el rendimiento global. Particularmente, se observó que una etapa de la segunda reacción (en el que el polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina conjugada con un polímero no peptídico que tiene dos o más grupos funcionales reacciona con la región constante de inmunoglobulina o el polipéptido fisiológicamente activo, respectivamente, de aquí en adelante denominado como "reacción de acoplamiento") se realizaba con un rendimiento significativamente menor, en comparación con una etapa de la primera reacción en la que el polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina reacciona con un polímero no peptídico que tiene dos o más grupos funcionales.

15 Los presentes autores encontraron una correlación entre la adición de sal durante la reacción de acoplamiento y el rendimiento de la reacción, y confirmaron que el rendimiento de la reacción de acoplamiento se mejora mediante el uso de una sal.

La sal en la presente divulgación es un compuesto iónico que tiene una carga neta neutra, como resultado de la formación de enlaces eléctricos entre un número igual de aniones y cationes (considerando la valencia iónica), y se disocia en cationes y aniones en una solución acuosa. Con respecto a los objetos de la presente divulgación, la sal se puede añadir a la solución de reacción de modo que el conjugado del polímero no peptídico y el polipéptido fisiológicamente activo o el conjugado del polímero no peptídico y la región constante de inmunoglobulina se una a la región constante de inmunoglobulina o el polipéptido fisiológicamente activo para formar un enlace covalente. Los cationes formadores de sal comunes incluyen amonio (NH_4^+), calcio (Ca^{2+}), hierro (Fe^{2+} o Fe^{3+}), magnesio (Mg^{2+}), potasio (K^+), piridinio ($\text{C}_5\text{H}_5\text{NH}^+$), amonio cuaternario (NR_4^+) o sodio (Na^+), y los aniones pueden incluir acetato (CH_3COO^-), carbonato (CO_3^{2-}), cloruro (Cl^-), citrato ($\text{HOC}(\text{COO}^-)(\text{CH}_2\text{COO}^-)_2$), cianuro (CN^-), nitrato (NO_3^-), nitrito (NO_2^-), fosfato (PO_4^{3-}) o sulfato (SO_4^{2-}). La sal se puede formar en combinaciones de los cationes y aniones descritos anteriormente. La sal puede ser una sal típicamente usada en la técnica, pero sin limitación, preferiblemente cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, carbonato de sodio, cianuro de sodio, citrato de sodio, nitrato de sodio, cloruro de potasio, acetato de potasio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, carbonato de potasio, cianuro de potasio, citrato de potasio, nitrato de potasio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de magnesio, carbonato de magnesio, cianuro de magnesio, citrato de magnesio, nitrato de magnesio, cloruro de amonio, acetato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, cianuro de amonio, citrato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de calcio, acetato de calcio, sulfato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, cianuro de calcio, citrato de calcio o nitrato de calcio. Más preferiblemente, la sal puede ser cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio o cloruro de potasio. Como sal, se puede seleccionar libremente una sal apropiada de acuerdo con el tipo de polipéptido fisiológicamente activo y el disolvente de reacción.

La sal se puede incluir en la solución de reacción de modo que el polímero no peptídico unido al polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina a través de un grupo funcional se una efectivamente a la región constante de inmunoglobulina o al polipéptido fisiológicamente activo por medio de otro grupo funcional. Para aumentar el rendimiento de la reacción de acoplamiento del polímero no peptídico, la concentración final de la sal puede ser relativamente alta, por ejemplo, menor de 3,0 M. El límite de concentración inferior de la sal se puede determinar mediante la repetición de experimentos, y como un rango apropiado de la concentración de sal, por ejemplo, se puede sugerir que la sal se incluya a una concentración final de 0,1 a 3 M, y más específicamente, a una concentración final de 0,3 a 2,5 M durante la reacción de acoplamiento.

Preferiblemente, si la sal es cloruro de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 3,0 M, si la sal es acetato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 2,5 M, si la sal es sulfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,7 M, si la sal es fosfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,8 M, o si la sal es cloruro de potasio, se puede añadir a una concentración final de 1,0 M o menos. Si la concentración de sal excede el rango anterior de acuerdo con el tipo de sal, el rendimiento aumenta, pero se puede producir una aglomeración indeseable. Aunque se produzca la aglomeración, es posible preparar los complejos, pero se crean dificultades en el proceso. En términos de conveniencia del proceso, por lo tanto, es preferible que la sal se añada a una concentración para no causar una aglomeración excesiva, es decir, no generar aglomeración o una pequeña cantidad de aglomerados. Por ejemplo, cuando la adición de la sal durante la reacción de acoplamiento aumenta el rendimiento global en comparación con antes de la adición de la sal a pesar de la aglomeración, dicha aglomeración es aceptable siempre que no cause problemas graves de separación y/o purificación.

En una realización específica de la presente divulgación, cuando se preparó un complejo mediante la unión a insulina, un ligador de PEG que contiene dos grupos aldehído como grupos funcionales y la región constante de inmunoglobulina, se permitió que la reacción proceda usando una sal en diversas condiciones para aumentar el rendimiento. Se encontró que el uso de la sal durante la reacción de acoplamiento mejora el rendimiento (Tabla 1).

Además, los presentes autores encontraron que la mejora del rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la adición de la sal se puede lograr al evitar la generación de impurezas debido a una reacción secundaria, por ejemplo, al evitar la generación de multímeros que se pueden formar al unir dos conjugados diferentes de insulina - PEG a dos extremos N-terminales de una región constante de inmunoglobulina (FIG. 1).

- 5 En la presente divulgación, la reacción de acoplamiento, es decir, la reacción de la etapa (2) se puede llevar a cabo preferiblemente durante 4 a 18 horas. Además, la reacción de acoplamiento se puede llevar a cabo de 0 a 2,5 °C. Sin embargo, la condición de reacción no está limitada a esto.

10 En la presente divulgación si el polímero no peptidilo tiene uno o más derivados de aldehído como grupos funcionales, la mezcla de reacción también puede comprender un agente reductor a una concentración final de 1 a 100 mM.

15 En la presente divulgación, el agente reductor significa un compuesto que funciona para reducir el doble enlace imina reversible formado a partir de una reacción entre el grupo aldehído del polímero no peptidilo y el grupo amina de los polipéptidos (polipéptido fisiológicamente activo, región constante de inmunoglobulina), de este modo se forma un enlace covalente, y está destinado a abarcar todos los agentes reductores conocidos en la técnica. Con respecto a los objetos de la presente divulgación, el agente reductor se puede añadir a la solución de reacción en la que el polímero no peptidilo forma un enlace covalente con el polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina. Siempre que se use típicamente en la técnica, se puede emplear cualquier agente reductor en la presente divulgación. Preferiblemente, los ejemplos del agente reductor pueden incluir, pero sin limitación, cianoborohidruro de sodio, complejo de borano-piridina, borohidruro de sodio, complejo de borano-dimetilamina, complejo de borano-trimetilamina o triacetoxiborohidruro de sodio. Se puede seleccionar libremente un agente reductor adecuado de acuerdo con los tipos del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina y el disolvente de reacción.

20 El agente reductor se incluye en la solución de reacción para la conjugación del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina con el polímero no peptidilo. El agente reductor se puede incluir una concentración de 1-20 mM para la reacción entre el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptidilo o la región constante de inmunoglobulina y el polímero no peptidilo (reacción de la etapa (1)), y a una concentración de 1~100 mM para la reacción de acoplamiento (reacción de la etapa (2)).

25 Preferiblemente, etapa (1) se puede llevar a cabo a pH 5,0 a 6,5 y etapa (2) se puede llevar a cabo a pH 6,0 a 8,5. Además, la reacción se puede llevar a cabo en condiciones en las que la fuerza iónica se controla dentro de 20 a 500 mM usando citrato de sodio y fosfato de potasio o HEPES, pero no se limita a los mismos.

30 En una realización específica de la presente divulgación, se usó PEG que tiene propionaldehídos como grupos funcionales en ambos extremos del mismo como el polímero no peptidilo y reaccionó con insulina como el polipéptido fisiológicamente activo para preparar un conjugado de PEG-insulina, y posteriormente se llevó a cabo la reacción con la región constante de inmunoglobulina en presencia de la sal para preparar un complejo de región constante de insulina-PEG-inmunoglobulina.

35 Como se describió anteriormente, la unión con el polímero no peptidilo se produce entre los grupos funcionales del polímero no peptidilo y un grupo amina que está presente en un extremo N-terminal del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina o un grupo amina o un grupo tiol en una cadena lateral de residuos de aminoácidos que los constituye. Mientras tanto, debido a que la región constante de inmunoglobulina tiene dos extremos N-terminales, una región constante de inmunoglobulina está unida a través de dos grupos funcionales en la misma molécula de polímero no peptidilo, o a través de grupos funcionales en dos moléculas diferentes de polímero no peptidilo. Sin embargo, el complejo formado por el procedimiento de preparación de acuerdo con la presente divulgación está preferiblemente en la forma en que cada molécula del polipéptido fisiológicamente activo, el polímero no peptidilo y la región constante de inmunoglobulina está unida entre sí, es decir, una molécula del polipéptido fisiológicamente activo y una molécula de la región constante de inmunoglobulina se unen a ambos extremos de un polímero no peptidilo. En contraste, cuando una región constante de inmunoglobulina está unida a dos grupos funcionales de la misma molécula de polímero no peptidilo, todos los grupos funcionales en ambos extremos del polímero no peptidilo están unidos a las regiones constantes de inmunoglobulina, y por lo tanto no se pueden unir al polipéptido fisiológicamente activo mediante la reacción de acoplamiento. Cuando una región constante de inmunoglobulina se une a cada uno de los grupos funcionales de dos moléculas diferentes de polímeros no peptidilo, se pueden formar multímeros en forma de pseudo dímero.

40 En consecuencia, en una realización de la presente divulgación en la etapa (1), el polímero no peptidilo reacciona con el polipéptido fisiológicamente activo, y en la etapa (2), la mezcla de reacción de la etapa (1) reacciona con la región constante de inmunoglobulina. Si el polímero no peptidilo primero reacciona con el polipéptido fisiológicamente activo para formar un conjugado del polipéptido fisiológicamente activo- polímero no peptidilo, y posteriormente el conjugado reacciona con la región constante de inmunoglobulina mediante la reacción de acoplamiento, puede evitar la formación de conjugado mediante la unión de una región constante de inmunoglobulina a ambos extremos de un polímero no peptidilo, que se puede producir cuando primero reaccionan la región constante de inmunoglobulina y el polímero no peptidilo.

En un ejemplo específico de la realización anterior, es preferible que en la etapa (1), el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico reaccionan a una relación molar de 1:1 a 1:20, y en la etapa (2), el conjugado del polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico como un producto de la etapa (1) y la región constante de inmunoglobulina reaccionan a una relación molar de 1:0,5 a 1:10, pero sin limitación.

5 Más específicamente, la etapa (2) se puede llevar a cabo mediante la adición de cloruro de sodio a una concentración final menor de 3,0 M, acetato de sodio a una concentración final menor de 2,5 M, sulfato de sodio a una concentración final menor de 0,7 M, fosfato de sodio a una concentración final menor de 0,8 M, o cloruro de potasio a una concentración final de 1,0 M o menos, M o menos, pero no se limita al tipo y concentración de la sal. Mientras no se genere una aglomeración lo suficientemente excesiva como para interferir en el proceso en la mezcla de reacción, se pueden añadir varios tipos de sal a diferentes concentraciones. La sal se puede usar a una concentración que provoca la aglomeración correspondiente al nivel de aglomeración considerado como aceptable cuando no se añade sal.

10 Más específicamente, la etapa (1) es una etapa de reacción del polipéptido fisiológicamente activo con el polímero no peptídico a una relación molar de 1:1 a 1:20 bajo condición de pH de 5,0 a 6,5, y etapa (2) es una etapa de reacción de la mezcla de reacción de la etapa (1) con la región constante de inmunoglobulina a una relación molar de 1:0,5 a 1:10 bajo condición de pH de 6,0 a 8,5 en presencia de la sal, y si la sal es cloruro de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0 3,0 M, si la sal es acetato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 2,5 M, si la sal es sulfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,7 M, si la sal es fosfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,8 M, o si la sal es cloruro de potasio, se puede añadir a una concentración final de 1,0 M o menor.

15 La etapa (1) es una reacción para preparar el conjugado de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico, y posteriormente, se puede llevar a cabo una etapa de purificación del producto. La etapa (2) es una reacción para preparar el complejo de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico - región constante de inmunoglobulina mediante la reacción del conjugado de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptídico como producto de la etapa (1) con la región constante de inmunoglobulina. El complejo se puede preparar con un rendimiento mejorado mediante el control de las condiciones de reacción y la relación molar de los reactivos como se describió anteriormente.

20 Como se usa en la presente, el término "polipéptido fisiológicamente activo" se refiere a un polipéptido que tiene una determinada función fisiológica in vivo como concepto general. Tiene una estructura polipeptídica en común y muestra diversas actividades biológicas. Cuando el cuerpo se vuelve biológicamente anormal como resultado de una falta o una secreción excesiva de un material involucrado en una determinada función, el polipéptido fisiológicamente activo puede regular la expresión genética o la función fisiológica, de este modo se corrige la anomalía. Se pueden incluir fármacos proteicos típicos.

25 El polipéptido fisiológicamente activo se puede seleccionar del grupo que consiste en hormona del crecimiento humana, hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento, péptidos liberadores de la hormona del crecimiento, interferón, receptores de interferón, factores estimulantes de colonias, péptidos tipo glucagón (GLP-1, etc.), oxintomodulina, receptores acoplados a proteínas G, interleuquinas, receptores de interleuquina, enzimas, proteínas de unión a interleuquina, proteínas de unión a citoquinas, factores de activación de macrófagos, péptidos de macrófagos, factores de células B, factores de células T, proteína A, inhibidores de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxinas, linfotoxinas, factor de necrosis tumoral, supresores de tumores, factor de crecimiento transformante, alfa-1 anti-tripsina, albúmina, α -lactalbumina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptidos activadores del receptor de trombina, trombomodulina, factor sanguíneo VII, VIIa, VIII, VIII y XIII, activadores de plasminógeno, péptidos de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor de activación del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona folículo estimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento tipo insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacuna derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos. Preferiblemente, el polipéptido fisiológicamente activo puede ser insulina, pero no se limita a esta.

30 35 40 45 50 55 60 La insulina utilizada en la realización de la presente divulgación es un tipo de péptidos fisiológicamente activos secretados por el páncreas cuando el nivel de glucemia se eleva, lo que funciona para controlar los niveles de glucemia al hacer que el hígado, músculos esqueléticos y tejido adiposo absorban glucosa de la sangre y la almacenen como glucógeno, y mediante la supresión de la lipólisis, un metabolismo para usar la grasa como fuente de energía. En términos de estructura, la insulina comprende la cadena alfa y la cadena beta. Los términos de cadena alfa de insulina y cadena beta de insulina se pueden usar indistintamente con la cadena de insulina A y la cadena de insulina B, respectivamente. Estos péptidos incluyen agonistas, precursores, derivados, fragmentos y

variantes de insulina. Se prefieren la insulina nativa, la insulina de acción rápida y la insulina de acción prolongada.

La insulina nativa es una hormona secretada por el páncreas y desempeña un papel fundamental en el control de los niveles de glucemia al promover la captación celular de glucosa e inhibir la lipólisis. La insulina que tiene la función de regular los niveles de glucemia se produce a partir de un precursor de proinsulina sin una función de regulación de los niveles de glucosa en sangre, a través de una serie de procesos. La secuencia de aminoácidos de la insulina es la siguiente:

- Cadena alfa:

Gly-Ile-Val-Glu-Gln-Cys-Cys-Thr-Ser-Ile-Cys-Ser-Leu-Tyr-Gln-Leu-Glu-Asn-Tyr-Cys-Asn (SEQ ID NO. 1) -

10 - Cadena beta:

Phe-Val-Asn-Gln-His-Leu-Cys-Gly-Ser-His-Leu-Val-Glu-Ala-Leu-Tyr-Leu-Val-Cys-Gly-Glu-Arg-Gly-Phe-Phe-Tyr-Thr-Pro-Lys-Thr (SEQ ID NO. 2)

Los agonistas de insulina significan la sustancia que se une al receptor de insulina in vivo y exhibe las mismas actividades biológicas que la insulina, independientemente de la estructura de la insulina.

15 Los derivados de insulina indican un péptido que muestra una homología de secuencia de al menos 80% en una secuencia de aminoácidos en comparación con la insulina nativa, tiene algunos grupos de residuos de aminoácidos alterados en forma de sustitución química (por ejemplo, alfa-metilación, alfa -hidroxilación), eliminación (por ejemplo, desaminación) o modificación (por ejemplo, N-metilación, glicosilación, ácido graso), y tiene la función de controlar el nivel de glucemia en el cuerpo.

20 Los fragmentos de insulina denotan el tipo de insulina en la que se añaden o eliminan uno o más aminoácidos de los terminales amino o carboxi de la insulina, y los aminoácidos que se añaden también pueden ser aminoácidos no nativos (por ejemplo, aminoácidos tipo D). Dichos fragmentos de insulina conservan la función de controlar el nivel de glucemia en el cuerpo.

25 Las variantes de insulina denotan un péptido que difiere de la insulina en uno o más en la secuencia de aminoácidos, y conserva la función de controlar el nivel de glucemia en el cuerpo.

Los procedimientos respectivos utilizados para la preparación de agonistas, derivados, fragmentos y variantes de insulina se pueden emplear independientemente o en combinación. Por ejemplo, el péptido de insulina puede incluir péptidos de los cuales uno o más en la secuencia de aminoácidos difieren de los de la insulina nativa y que tienen desaminación en el residuo de aminoácido N-terminal, que tienen la función de controlar el nivel de glucemia en el cuerpo.

30 Como se usa en la presente, el término "región constante de inmunoglobulina" se refiere a un fragmento de inmunoglobulina que está desprovisto de las regiones variables de las cadenas liviana y pesada, la región constante 1 de la cadena pesada (CH1), y la región constante de la cadena liviana (CL), es decir, una región Fc compuesta de las regiones constantes 2 y 3 de la cadena pesada (CH2 y CH3) (o inclusive de la región constante de la cadena pesada (CH4)). Opcionalmente, la región Fc de inmunoglobulina también puede comprender una región de bisagra. Asimismo, la región constante de inmunoglobulina de la presente divulgación puede ser una región Fc de inmunoglobulina extendida que comprende una parte o la totalidad de la región constante 1 de la cadena pesada (CH1) y/o la región constante de la cadena liviana (CL) excepto solo para las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de la inmunoglobulina, siempre que muestre efectos sustancialmente idénticos o superiores a los de la región constante de inmunoglobulina nativa. Además, la región constante de inmunoglobulina de la presente divulgación puede carecer de una parte significativa de la secuencia de aminoácidos que corresponde a CH2 y/o CH3. En consecuencia, la región constante de inmunoglobulina de la presente divulgación puede comprender (1) dominio CH1, dominio CH2, dominio CH3 y dominio CH4, (2) dominio CH1 y dominio CH2, (3) dominio CH1 y dominio CH3, (4) dominio CH2 y dominio CH3, (5) una combinación de uno o más dominios constantes y una región bisagra de inmunoglobulina (o una región bisagra parcial), o (6) un dímero de cada dominio constante de la cadena pesada y la región constante de la cadena livianas.

Una región constante de inmunoglobulina que incluye la región Fc es un polipéptido biodegradable que se puede metabolizar in vivo, de modo que se puede usar de manera segura como un portador de fármacos. Además, una región Fc de inmunoglobulina es más ventajosa en términos de producción, purificación y rendimiento de producción de un complejo que una molécula de inmunoglobulina completa debido a su peso molecular relativamente más bajo. Además, debido a que carece de Fab, exhibe una alta no homogeneidad debido a la diferencia en la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo a otro, la Fc de inmunoglobulina sola proporciona al complejo una homogeneidad significativamente mejorada y reduce la posibilidad de inducir antigenicidad sanguínea.

55 Por otro lado, la región constante de inmunoglobulina se puede originar de los seres humanos o animales, tales como vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas, cobayos, etc., y puede ser preferiblemente de

origen humano. Además, la región constante de inmunoglobulina se puede seleccionar de fragmentos Fc derivados de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, o combinaciones o híbridos de los mismos. Preferiblemente, la región constante se deriva de IgG o IgM, que son las más abundantes en la sangre, y lo más preferiblemente de IgG, que se sabe que mejora la vida media en suero de las proteínas de unión a ligando.

- 5 Como se usa en la presente, el término "combinación" significa que los polipéptidos que codifican regiones constantes de inmunoglobulina de cadena simple (preferiblemente regiones Fc) del mismo origen se unen a un polipéptido de cadena simple de un origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, se puede preparar un dímero o un multímero mediante la combinación de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos de IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc e IgE.
- 10 Como se usa en la presente, el término "híbrido" significa que las secuencias que codifican dos o más regiones constantes de inmunoglobulina de diferentes orígenes están presentes en una región constante de inmunoglobulina de cadena única (preferiblemente, una región Fc). En la presente divulgación, son posibles diversas formas híbridas. Por ejemplo, el dominio híbrido puede estar compuesto de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 y CH4 de Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE y Fc IgD y puede incluir una región bisagra.
- 15 La IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente divulgación puede incluir combinaciones o híbridos de las mismas. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4, y la más preferida es la región Fc de IgG4 que rara vez tiene funciones efectoras tales como citotoxicidad dependiente del complemento (CDC).

La región constante de inmunoglobulina puede estar en forma de cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas o cadenas de azúcar disminuidas en comparación con la forma nativa, o puede estar en una forma desglucosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar de la región constante de inmunoglobulina se puede lograr mediante procedimientos típicos en la técnica, tales como un procedimiento químico, un procedimiento enzimático y un procedimiento de ingeniería genética que utiliza un microorganismo. Aquí, la región constante de inmunoglobulina desglucosilada muestra una fuerte disminución en la afinidad de unión al complemento (C1q) y una disminución o pérdida en la citotoxicidad dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, por lo que no induce respuestas inmunes innecesarias in vivo. A este respecto, una región constante de inmunoglobulina en una forma desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuada para el objeto de la presente divulgación como un portador de fármaco. Por consiguiente, una región Fc aglicosilada derivada de IgG4 humana se puede usar mucho más preferiblemente. La región Fc derivada de ser humano es más preferible que una región Fc no derivada de ser humano, que puede actuar como un antígeno en el cuerpo humano y causar respuestas inmunes indeseables, como la producción de un nuevo anticuerpo contra el antígeno.

Además, no solo la región constante de inmunoglobulina con la secuencia de aminoácidos nativa sino también su mutante de secuencia de aminoácidos se pueden incluir dentro del alcance de la región constante de inmunoglobulina de la presente divulgación. Un derivado de la secuencia de aminoácidos tiene una secuencia que difiere en uno o más residuos de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una supresión, una inserción, una sustitución no conservativa o conservadora 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 en Fc de IgG, que se sabe que son importantes para la unión, se pueden usar como los sitios adecuados para la modificación. En la presente divulgación, se pueden usar diversos derivados, tales como los preparados mediante la eliminación de los sitios capaces de formar enlaces disulfuro, eliminación de varios aminoácidos N-terminales de la Fc nativa, o adición de metionina al extremo N-terminal de la Fc nativa. Además, los sitios de fijación del complemento, por ejemplo, los sitios de fijación C1q, o los sitios ADCC se pueden eliminar de la región Fc nativa para eliminar la función efectora. Las técnicas de preparación de mutantes de secuencia de aminoácidos de la región constante de inmunoglobulina se divulgan en las publicaciones de patentes internacionales Nros WO 97/34631 y WO 96/32478.

Las sustituciones de aminoácidos en proteínas y péptidos, que generalmente no alteran la actividad de las moléculas, son bien conocidas en la técnica (H.Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Las sustituciones más comunes se producen entre los residuos de aminoácidos Ala/Ser, Val/Ile, Asp/Glu, Thr/Ser, Ala/Gly, Ala/Thr, Ser/Asn, Ala/Val, Ser/Gly, Thr/Phe, Ala/Pro, Lys/Arg, Asp/Asn, Leu/Ile, Leu/Val, Ala/Glu, Asp/Gly. Opcionalmente, los aminoácidos se pueden modificar por fosforilación, sulfatación, acilación, glucosilación, metilación, farnesilación, acetilación y amidación.

Los derivados de la región constante de inmunoglobulina mencionados anteriormente pueden ser derivados que exhiben la misma actividad biológica que la de la región constante de inmunoglobulina de la presente divulgación, mientras que tienen una estabilidad estructural mejorada contra el calor, pH o similares. Además, estas regiones Fc se pueden obtener de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales, que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsters, ratas y cobayos, o pueden ser recombinantes o derivados de los mismos, obtenidos de células animales o microorganismos transformados. Aquí, se pueden obtener de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de inmunoglobulinas completas de organismos humanos o animales y su tratamiento con una enzima proteolítica. Las inmunoglobulinas se escinden en regiones Fab y Fc por tratamiento con papaína, y en pF'c y F (ab)₂ por tratamiento con pepsina. Estos fragmentos se pueden someter a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c.

Preferiblemente, una región constante de inmunoglobulina derivada del ser humano puede ser una región constante de inmunoglobulina recombinante que se obtiene de un microorganismo.

De aquí en adelante, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a los siguientes Ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos son solo para fines ilustrativos.

5 **Ejemplo 1: Reacción de PEGilación de insulina y purificación de insulina mono-pegilada**

La insulina en polvo se disolvió en HCl 10 mM, y posteriormente se hizo reaccionar con 3,4K de propion-ALD2 PEG (PEG que tiene dos grupos propionaldehído en ambos extremos, IDB, Corea) a 4 °C durante aproximadamente 2 horas a una relación molar de 1:4 de insulina: PEG y una concentración de insulina de 5 mg/ml para pegilar el extremo N-terminal de la cadena beta de insulina. Esta reacción se realizó bajo citrato de sodio 50 mM, pH 6,0, en isopropanol 45% con la adición de cianoborohidruro de sodio 3,0 mM, un agente reductor. La solución de reacción se purificó con columna SP-HP (GE Healthcare) usando un tampón que contiene citrato de sodio (pH 3,0) y EtOH 45%, y un gradiente de concentración de KCl.

15 **Ejemplo 2: Preparación del complejo mediante reacción de acoplamiento sin adición de sal**

Para preparar un complejo de insulina-PEG- fragmento Fc de inmunoglobulina, la insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y un fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar a una relación molar de 1: 1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ ml a 25 °C durante 13 horas. En este momento, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM, fosfato de potasio 22 mM y etanol 10% a pH 8,2, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

Después de completar la reacción, la solución de reacción se pasó a través de la columna Source 15Q (GE Healthcare) para separar y purificar la insulina sin reaccionar, el fragmento Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, el complejo de insulina-PEG- fragmento Fc de inmunoglobulina y el complejo del fragmento Fc de inmunoglobulina acoplado con dos o más insulina mono-PEGilada (insulina-PEG) usando tampón Tris-HCl (pH 7,5) y un gradiente de concentración de NaCl. En este sentido, el contenido de impurezas se identificó en un perfil (FIG. 1).

Posteriormente, se usó Source 15ISO (GE Healthcare) como una segunda columna para eliminar cualquier Fc de inmunoglobulina residual y complejo de insulina multiacoplada, de este modo se obtiene el complejo de insulina-PEG-Fc de inmunoglobulina. En este caso, la elución se realizó usando un gradiente de concentración de sulfato de amonio que contiene Tris-HCl (pH 7,5). El complejo eluido de insulina-PEG- Fc de inmunoglobulina se analizó con RP-HPLC e IE-HPLC.

25 **Ejemplo 3: Mejora del rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la adición de cloruro de sodio**

Para examinar el efecto del cloruro de sodio sobre el rendimiento de la reacción de acoplamiento, la insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y el fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar a una relación molar de 1:1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ml a 25 °C durante 13 horas. En este momento, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM, fosfato de potasio 22 mM y etanol 10% a pH 8,2 con la adición de cloruro de sodio a una concentración final de 0,5 a 3,0 M, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

La solución de reacción se purificó y analizó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La adición de cloruro de sodio a la solución de acoplamiento mejoró el rendimiento de la reacción de acoplamiento, en comparación con la no adición. Este efecto se maximizó mediante la adición de cloruro de sodio con una concentración final de 2,0 M (Tabla 1). Los resultados del perfil de Source 15Q mostraron que las impurezas debidas a una reacción secundaria disminuyeron a medida que se mejoró el rendimiento (FIG. 1). También se confirmó que cuando la reacción de acoplamiento se realizó mediante la adición de cloruro de sodio 2,0 M, se puede preparar un complejo altamente puro de insulina - PEG – Fc de inmunoglobulina Fc con una pureza del 95% o más (Tabla 2). En contraste, cuando se añadió cloruro de sodio a una concentración final de 3,0 M, se comenzó a observar aglomeración.

40 **Ejemplo 4: Mejora del rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la adición de acetato de sodio**

Para examinar el efecto del acetato de sodio sobre el rendimiento de la reacción de acoplamiento, la insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y el fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar en una relación molar de 1: 1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ml a 25 °C durante 13 horas. En este momento, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM, fosfato de potasio 22 mM y etanol 10% a pH 8,2 con la adición de acetato de sodio a una concentración final de 1,5 a 3,0 M, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

La solución de reacción se purificó y analizó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La adición de acetato de sodio a la solución de acoplamiento mejoró el rendimiento de la reacción de acoplamiento, en comparación con la no adición. Este efecto se maximizó mediante la adición de acetato de sodio con una concentración final de 1,5 M (Tabla 1). También se confirmó que cuando la reacción de acoplamiento se realizó mediante la adición de acetato de sodio 1,5 M, se puede preparar un complejo altamente puro de insulina - PEG – Fc de inmunoglobulina con una

pureza del 95% o más (Tabla 2). En contraste, cuando se añadió acetato de sodio a una concentración final de 2,5 M o más, es difícil calcular el rendimiento debido a la aglomeración.

Ejemplo 5: Mejora del rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la adición de sulfato de sodio

5 Para examinar el efecto del sulfato de sodio en el rendimiento de la reacción de acoplamiento, la insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y el fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar a una relación molar de 1: 1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ ml a 25 °C durante 13 horas. En este momento, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM, fosfato de potasio 22 mM y etanol 10% a pH 8,2 con la adición de sulfato de sodio a una concentración final de 0,4 a 0,7 M, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

10 La solución de reacción se purificó y analizó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La adición de sulfato de sodio a la solución de acoplamiento mejoró el rendimiento de la reacción de acoplamiento, en comparación con la no adición. Este efecto se maximizó mediante la adición de sulfato de sodio con una concentración final de 0,4 M (Tabla 1). Cuando se añadió sulfato de sodio a una concentración final de 0,5 M, se comenzó a observar aglomeración. Cuando se añadió sulfato de sodio a una concentración final de 0,7 M o más, es difícil calcular el rendimiento debido a la aglomeración.

Ejemplo 6: Mejora del rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la adición de fosfato de sodio

20 Para examinar el efecto del fosfato de sodio en el rendimiento de la reacción de acoplamiento, la insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y el fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar a una relación molar de 1: 1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ml a 25 °C durante 13 horas. En este momento, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM, fosfato de potasio 22 mM y etanol 10% a pH 8,2 con la adición de sulfato de sodio a una concentración final de 0,4 a 0,8 M, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

25 La solución de reacción se purificó y analizó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La adición de fosfato de sodio a la solución de acoplamiento mejoró el rendimiento de la reacción de acoplamiento, en comparación con la no adición. Este efecto se maximizó mediante la adición de fosfato de sodio con una concentración final de 0,4 M (Tabla 1). En contraste, cuando se añadió fosfato de sodio a una concentración final de 0,6 M, se comenzó a observar aglomeración. Cuando se añadió sulfato de sodio a una concentración final de 0,8 M o más, es difícil calcular el rendimiento debido a la aglomeración.

Ejemplo 7: Mejora del rendimiento de la reacción de acoplamiento mediante la adición de cloruro de potasio

30 Para examinar el efecto del cloruro de potasio en el rendimiento de la reacción de acoplamiento, la insulina mono-PEGilada preparada por el procedimiento del Ejemplo 1 y el fragmento Fc de inmunoglobulina se hicieron reaccionar a una relación molar de 1: 1,2 con un nivel de proteína total de 20 mg/ml a 25 °C durante 13 horas. En este momento, la solución de reacción contenía HEPES 100 mM, fosfato de potasio 22 mM y etanol 10% a pH 8,2 con la adición de cloruro de potasio a una concentración final de 0,5 a 1,0 M, y además contenía cianoborohidruro de sodio 20 mM como agente reductor.

La solución de reacción se purificó y analizó de la misma manera que en el Ejemplo 2. La adición de cloruro de potasio a la solución de acoplamiento mejoró el rendimiento de la reacción de acoplamiento, en comparación con la no adición. Este efecto se maximizó mediante la adición de fosfato de sodio con una concentración final de 1,0 M (Tabla 1).

40 La siguiente Tabla 1 muestra el rendimiento de la reacción de acoplamiento y el rendimiento total de acuerdo con el tipo y la concentración de sal en la reacción de acoplamiento durante la preparación del complejo, que incluye la insulina y el fragmento Fc de inmunoglobulina.

[Tabla 1]

Tipo de sal	Concentración (M)	Grado de aglomeración por examen visual	Rendimiento de la reacción de acoplamiento (%)	Rendimiento total (%)
Sin adición (grupo control)	-		32,3	16,2
Cloruro de sodio	0,5	-	35,7	17,9
	1,0	-	39,2	19,7

ES 2 743 612 T3

	1,5	-	41,2	20,6
	2,0	-	42,2	21,2
	2,5	-	39,8	20,0
	3,0	+	37,0	18,9
Acetato de sodio	1,5	-	43,4	21,7
	2,0	-	39,2	19,7
	2,5	+++	-	-
	3,0	++++	-	-
Sulfato de sodio	0,4	-	36,3	18,2
	0,5	+	43,5	21,8
	0,6	+	42,1	21,1
	0,7	+++	-	-
Fosfato de sodio	0,4	-	40,7	20,4
	0,6	++	39,2	19,7
	0,8	+++	-	-
Cloruro de potasio	0,5	-	35,2	17,6
	1,0	-	35,8	17,9
-: sin aglomeración, +: cantidad traza, ++; cantidad pequeña, +++; cantidad excesiva, ++++; aglomeración completa				

5 Como se muestra en la Tabla 1, los grupos con sal añadida mostraron rendimientos de reacción de acoplamiento aumentados de 35,2% a 43,5% desde 32,3% y rendimientos totales aumentados de 17,6% a 21,8% desde 16,2%, en comparación con el grupo de control sin adición, aunque difieren de acuerdo con el tipo y la concentración de la sal. Se convirtieron sus tasas de cambio con respecto al rendimiento del grupo de control sin adición, y las tasas de cambio del rendimiento de la reacción de acoplamiento y el rendimiento total fueron tan altas como 9 a 35%.

10 La siguiente Tabla 2 muestra la pureza del complejo final que se preparó mediante la adición de cloruro de sodio 2,0 M o acetato de sodio 1,5 M a la solución de reacción de acoplamiento durante la preparación del complejo que incluye insulina y fragmento Fc de inmunoglobulina. La pureza se verificó dos veces mediante análisis de HPLC usando cromatografía de exclusión por tamaño (de aquí en adelante, denominada SE) y cromatografía de intercambio iónico (de aquí en adelante, denominada IE).

[Tabla 2]

Sal	Resultado del análisis HPLC para la pureza del complejo
cloruro de sodio 2,0 M	SE 98,1%, IE 98,5%
acetato de sodio 1,5 M	SE 96,2%, IE 96,9%

15 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> HANMI PHARM. CO., LTD.

<120> Un procedimiento mejorado para la preparación del complejo polipéptido fisiológicamente activo

<130> OPA14034-TW

ES 2 743 612 T3

<150> KR 10-2013-0023602

<151> 2013-03-05

<160> 2

<170> KopatentIn 1,71

5 <210> 1

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

10

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu
1 5 10 15

Glu Asn Tyr Cys Asn
20

<210> 2

<211> 30

<212> PRT

15 10 <213> Homo sapiens

<400> 2

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr
1 5 10 15

Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr
20 25 30

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptidilo - región constante de inmunoglobulina, que comprende las etapas de:
 - 5 (1) reacción de un polímero no peptidilo con uno de un polipéptido fisiológicamente activo o una región constante de inmunoglobulina para preparar un complejo de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptidilo o un complejo de la región constante de inmunoglobulina - polímero no peptidilo; y
 - 10 (2) reacción del complejo del polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptidilo o el complejo de la región constante de inmunoglobulina - polímero no peptidilo preparado en la etapa (1) con el otro del polipéptido fisiológicamente activo o la región constante de inmunoglobulina en presencia de una sal para preparar un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptidilo - región constante de inmunoglobulina;

en el que

el polímero no peptidilo se selecciona del grupo que consiste en polietilen glicoles, polipropilen glicoles, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, alcoholes polivinílicos, polisacáridos, dextranos, polivinil etil éteres, ácido poliláctico (PLA), ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y la combinación de los mismos;

la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio, carbonato de sodio, cianuro de sodio, citrato de sodio, nitrato de sodio, cloruro de potasio, acetato de potasio, sulfato de potasio, fosfato de potasio, carbonato de potasio, cianuro de potasio, citrato de potasio, nitrato de potasio, cloruro de magnesio, acetato de magnesio, sulfato de magnesio, fosfato de magnesio, carbonato de magnesio, cianuro de magnesio, citrato de magnesio, nitrato de magnesio, cloruro de amonio, acetato de amonio, sulfato de amonio, fosfato de amonio, carbonato de amonio, cianuro de amonio, citrato de amonio, nitrato de amonio, cloruro de calcio, acetato de calcio, sulfato de calcio, fosfato de calcio, carbonato de calcio, cianuro de calcio, citrato de calcio y nitrato de calcio; y

25 la sal se añade a una concentración final de 0,3 M a 3,0 M.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero no peptidilo tiene cada uno de modo independiente un grupo funcional seleccionado del grupo que consiste en un derivado de aldehído, un derivado de maleimida y un derivado de succinimida en ambos extremos, opcionalmente en el que el polímero no peptidilo se une al polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina por medio de grupos funcionales en ambos extremos para formar un enlace covalente.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, que además comprende la etapa de separar un complejo de polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptidilo o un complejo de región constante de inmunoglobulina - polímero no peptidilo a partir de la mezcla de reacción después de la etapa (1).
- 35 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, acetato de sodio, sulfato de sodio, fosfato de sodio y cloruro de potasio, opcionalmente en el que si la sal es cloruro de sodio, se añade a una concentración final menor de 3,0 M, si la sal es acetato de sodio, se añade a una concentración final menor de 2,5 M, si la sal es sulfato de sodio, se añade a una concentración final menor de 0,7 M, si la sal es fosfato de sodio, se añade a una concentración final menor de 0,8 M, o si la sal es cloruro de potasio, se añade a una concentración final de 1,0 M o menor de.
- 40 5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la sal se añade a una concentración final de 0,3 a 2,5 M.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el tiempo de reacción de la etapa (2) es 4 a 18 horas, opcionalmente en el que la temperatura de reacción de la etapa (2) es 0 a 25 °C.
- 45 7. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en el que si el polímero no peptidilo tiene uno o más derivados de aldehído como grupos funcionales, la mezcla de reacción además comprende un agente reductor a una concentración final de 1 a 100 mM.
8. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la etapa (1) se lleva a cabo a pH 5,0 a 6,5 y la etapa (2) se lleva a cabo a pH 6,0 a 8,5.
- 50 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero no peptidilo reacciona con el polipéptido fisiológicamente activo en la etapa (1), y el complejo del polipéptido fisiológicamente activo - polímero no peptidilo de la etapa (1) reacciona con la región constante de inmunoglobulina en la etapa (2).
10. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, en el que el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptidilo reaccionan entre sí a una relación molar de 1:1 a 1:20 en la etapa (1), y el producto de la

- etapa (1) y la región constante de inmunoglobulina reaccionan entre sí a una relación molar de 1:0,5 a 1:10 en la etapa (2),
 opcionalmente en el que la etapa (2) se lleva a cabo en presencia de cloruro de sodio añadido a una concentración final menor de 3,0 M, acetato de sodio añadido a una concentración final menor de 2,5 M, sulfato de sodio añadido a una concentración final menor de 0,7 M, fosfato de sodio añadido a una concentración final menor de 0,8 M, o cloruro de potasio añadido a una concentración final de 1,0 M o menos.
- 5
11. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que los grupos funcionales del polímero no peptídico se unen a un grupo amina que está presente en un extremo N-terminal o en una cadena lateral del residuo de Lys del polipéptido fisiológicamente activo y la región constante de inmunoglobulina.
- 10
12. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polímero no peptídico es polietilenglicol, opcionalmente en el que el polímero no peptídico tiene un peso molecular que varía de 1 a 100 kDa.
13. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de inmunoglobulina está aglicosilada.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de inmunoglobulina comprende uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en los dominios CH1, CH2, CH3 y CH4,
 opcionalmente en el que la región constante de inmunoglobulina además comprende una región de bisagra.
- 15
15. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en regiones constantes derivadas de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, sus combinaciones, y sus híbridos.
- 20
16. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la región constante de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en las regiones constantes de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, sus combinaciones, y sus híbridos,
 opcionalmente en el que la región constante de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4, y
 opcionalmente en el que la región constante de inmunoglobulina es una región Fc de IgG4 humana aglicosilada.
- 25
17. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en hormona del crecimiento humana, hormonas liberadoras de la hormona del crecimiento, péptidos liberadores de la hormona del crecimiento, interferón, receptores de interferón, factores estimulantes de colonias, péptidos tipo glucagón (GLP-1, etc.), oxintomodulina, receptores acoplados a proteínas G, interleuquinas, receptores de interleuquina, enzimas, proteínas de unión a interleuquina, proteínas de unión a citoquinas, factores de activación de macrófagos, péptidos de macrófagos, factores de células B, factores de células T, proteína A, inhibidores de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxinas, linfotoxinas, factor de necrosis tumoral, supresores de tumores, factor de crecimiento transformante, alfa-1 anti-tripsina, albúmina, α -lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina, eritropoyetina glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptidos activadores del receptor de trombina, trombomodulina, factor sanguíneo VII, VIIa, VIII, VIII y XIII, activadores de plasminógeno, péptidos de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante ósea, calcitonina, insulina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor de activación del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona folículo estimulante, hormona luteinizante, hormona liberadora de hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento tipo insulina, hormona adrenocortical, glucagón, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacuna derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos, opcionalmente en el que el polipéptido fisiológicamente activo es insulina.
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
18. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que en la etapa (1), el polipéptido fisiológicamente activo y el polímero no peptídico reaccionan entre sí a una relación molar de 1:1 a 1:20 bajo la condición de pH de 5,0 a 6,5, y en la etapa (2), la mezcla de reacción de la etapa (1) y la región constante de inmunoglobulina reaccionan entre sí a una relación molar de 1:0,5 a 1:10 bajo la condición de pH de 6,0 a 8,5 en presencia de la sal, y si la sal es cloruro de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 3,0 M, si la sal es acetato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 2,5 M, si la sal es sulfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,7 M, si la sal es fosfato de sodio, se puede añadir a una concentración final menor de 0,8 M, o si la sal es cloruro de potasio, se puede añadir a una concentración final de 1,0 M o menor.
19. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido fisiológicamente activo es insulina,

y el polímero no peptídico es polietilenglicol.

