

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 799 326**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.07.2014 PCT/KR2014/006328**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.01.2015 WO15005747**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.07.2014 E 14822721 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.03.2020 EP 3020732**

54 Título: **Un conjugado de Fc de inmunoglobulina que mantiene la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina a FcRn**

30 Prioridad:

12.07.2013 KR 20130082509

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

16.12.2020

73 Titular/es:

**HANMI PHARM. CO., LTD. (100.0%)
214, Muha-ro, Paltan-myeon
Hwaseong-si, Gyeonggi-do 18536, KR**

72 Inventor/es:

**HWANG, SANG YOUNG;
LEE, JONG SOO;
HONG, SUNG HEE;
CHOI, IN YOUNG;
JUNG, SUNG YOUB y
KWON, SE CHANG**

74 Agente/Representante:

VIDAL GONZÁLEZ, Maria Ester

ES 2 799 326 T3

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

DESCRIPCIÓN

Un conjugado de Fc de inmunoglobulina que mantiene la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina a FcRn

5 [Campo técnico]

La presente divulgación se refiere a un conjugado de un fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido mediante un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina con una región de unión a FcRn capaz de mantener la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina, un método para preparar el conjugado, un método para mantener la afinidad de unión intrínseca del conjugado por FcRn, y una composición que comprende el conjugado capaz de mantener la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn.

15 [Antecedentes de la técnica]

Se han realizado varios estudios sobre conjugados o complejos de proteínas que comprenden un portador, como un polímero de polietilenglicol, albúmina, ácido graso o anticuerpo Fc (región constante), unido a una proteína para aumentar la vida media en suero de la proteína. Los estudios conocidos hasta la fecha sobre tales conjugados o complejos de proteínas apuntan principalmente a aumentar la vida media en suero de un fármaco para acortar el intervalo de administración del fármaco y mejorar así la conveniencia del paciente. Sin embargo, muchas tecnologías convencionales tienen problemas tales como una disminución en la actividad de una proteína terapéutica debido a, por ejemplo, un obstáculo espacial causado por una unión no específica entre una proteína terapéutica y una proteína portadora. Además, en el caso de los conjugados de ácidos grasos que se unen de manera reversible a la albúmina sérica para aumentar su vida media en suero, existe un límite para aumentar significativamente la vida media en suero de un fármaco proteico, ya que el aclaramiento renal, que representa la mayor pérdida de un fármaco proteico, no puede evitarse debido a la unión reversible entre la proteína y el ácido graso.

Además, se han realizado esfuerzos para usar fragmentos de inmunoglobulina que aumenten la vida media de las sustancias fisiológicamente activas, que incluyen las proteínas. La región CH2-CH3 del Fc de la inmunoglobulina incluye un sitio de unión a FcRn (receptor de protección) que prolonga la vida media de un anticuerpo. FcRn es una proteína relacionada con MHC de clase I expresada en células endoteliales vasculares y se une a IgG y albúmina. Característicamente, IgG y FcRn se unen fuertemente entre sí a un pH ácido débil y se disocian entre sí a un pH neutro. Por lo tanto, cuando la IgG entra a las células endoteliales vasculares desde los vasos sanguíneos por pinocitosis o endocitosis y entra a los lisosomas (pH 6,0), está protegida por FcRn sin que se degrade. Cuando la IgG se fusiona con la membrana celular mediante reciclaje, se disocia del FcRn a pH 7,4 y se libera en los vasos sanguíneos. Debido a este procedimiento, las vidas medias *in vivo* de IgG1, IgG2 e IgG4, que incluyen el sitio de unión a FcRn, son 3 semanas en promedio, que son más largas que las de otras proteínas.

Por lo tanto, cuando un fragmento Fc de inmunoglobulina se une a una sustancia fisiológicamente activa, la vida media de la sustancia fisiológicamente activa puede incrementarse mediante el reciclaje mediado por FcRn. A este respecto, existe la necesidad de desarrollar un método capaz de mantener la afinidad de unión de un fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn sin reducir la actividad de una sustancia fisiológicamente activa cuando la sustancia fisiológicamente activa y el fragmento Fc de inmunoglobulina están unidos entre sí.

45 [Divulgación]

[Problema técnico]

Los presentes autores han realizado grandes esfuerzos para desarrollar un conjugado que puede mantener la afinidad de unión intrínseca del propio fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn sin reducir la actividad de un polipéptido fisiológicamente activo y puede disociarse fácilmente a partir de FcRn a un pH neutro. Como resultado, los presentes autores han encontrado que un conjugado que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido mediante un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tiene una región de unión para FcRn puede mantener la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn y, al mismo tiempo, puede disociarse fácilmente de FcRn a un pH neutro de 7,4, lo que completa por consiguiente la presente divulgación.

[Solución técnica]

Es un objetivo de la presente divulgación proporcionar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn, en donde la relación de unión de la cantidad del conjugado unido a FcRn a pH 6,0 y la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 7,4 está dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de una relación determinada mediante la medición de las cantidades de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina a FcRn en las mismas condiciones como las usadas para el conjugado.

65

Otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn, en donde una relación de unión determinada mediante la sustitución de la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 6,0 y la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 7,4 en la siguiente ecuación 1 está dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de una relación de unión determinada mediante la medición de las cantidades del fragmento Fc de inmunoglobulina unidas a FcRn en las mismas condiciones que las usadas para el conjugado:

Ecuación 1

$$\text{Relación de unión (\%)} = (\text{cantidad unida a pH 7,4} / \text{cantidad unida a pH 6,0}) \times 100.$$

Aún otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método para preparar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que mantenga la afinidad de unión intrínseca de un fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn, el método comprende: (a) unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tiene una región de unión a FcRn para preparar una mezcla de conjugados de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo; y (b) separar de la mezcla un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que muestra una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, como se determina mediante la sustitución de la cantidad unida a FcRn a pH 6,0 y la cantidad unida a FcRn a pH 7,4 en la ecuación 1.

Aún otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar un método para mantener la afinidad de unión intrínseca de un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo por FcRn, el método comprende unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn.

Aún otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar una composición que comprenda el conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que mantenga la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn.

[Efectos ventajosos]

Como se describió anteriormente, el conjugado de la presente divulgación mantiene la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn y, al mismo tiempo, se disocia fácilmente de FcRn a un pH neutro tal como un pH de 7,4. Por lo tanto, puede usarse ventajosamente para aumentar la vida media en suero de un polipéptido fisiológicamente activo.

[Descripción de los dibujos]

La Figura 1 es una vista esquemática que muestra el proceso de reciclar una proteína unida a FcRn. La Figura 2 muestra sensogramas de la unión de conjugados de inmunoglobulina-proteína a FcRn a un pH ácido. La Figura 3 muestra sensogramas de la unión de conjugados de inmunoglobulina-proteína a FcRn a un pH neutro. La Figura 4 muestra los resultados de una prueba para comparar la farmacocinética *in vivo* del conjugado de fragmento de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R.

[Mejor modo]

Para lograr los objetos anteriores, en un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn, en donde la relación de unión de la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 6,0 y la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 7,4 está dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de una relación determinada mediante la medición de las cantidades del fragmento Fc de inmunoglobulina unido a FcRn en las mismas condiciones que las usadas para el conjugado.

En una modalidad, el conjugado de acuerdo con la presente divulgación muestra una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, como se determina mediante el uso de la siguiente ecuación:

Ecuación 1

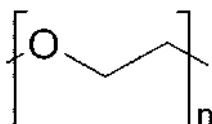
$$\text{Relación de unión (\%)} = (\text{cantidad unida a pH 7,4} / \text{cantidad unida a pH 6,0}) \times 100.$$

En otra modalidad, el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede obtenerse tras hacer reaccionar el polipéptido fisiológicamente activo que tiene el enlazador no peptídico unido al mismo con el fragmento Fc de inmunoglobulina a un pH de 4,0-9,0, que une por consiguiente el polipéptido fisiológicamente activo a través del enlazador no peptídico a una porción que excluye la región de unión a FcRn del fragmento Fc de inmunoglobulina.

En aún otra modalidad, el enlazador no peptídico que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y combinaciones de estos

En aún otra modalidad, el enlazador no peptídico que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede ser un polímero de polietilenglicol representado por la siguiente fórmula 1:

Fórmula 1



en donde n varía de 10 a 2400.

En aún otra modalidad, el enlazador no peptídico que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede tener un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y derivados de succinimida.

En aún otra modalidad, el polipéptido fisiológicamente activo que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en péptido similar a glucagón-1 (GLP-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, péptido liberador de la hormona de crecimiento, interferones, receptores de interferón, receptor acoplado a proteína G, interleucinas, receptores de interleucina, enzimas, proteínas de unión a interleucina, proteínas de unión a citocinas, factor de activación de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfotóxica, factor de necrosis tumoral, supresores de tumores, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, α -lactoalbúmina, apolipoproteína E, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factores sanguíneos VII, VIIa, VIII, IX y XIII, factor activador de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiotensina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante ósea, calcitonina, 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 la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocortical, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacunales derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos.

En aún otra modalidad, el fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende la región de unión a FcRn, que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación, puede comprender un dominio CH2, un dominio CH3 o ambos.

En aún otra modalidad, el fragmento Fc de inmunoglobulina que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede estar en una forma no glicosilada.

En aún otra modalidad, el fragmento Fc de inmunoglobulina que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede comprender una región bisagra.

En aún otra modalidad, el fragmento Fc de inmunoglobulina que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, combinaciones de estos e híbridos de estos.

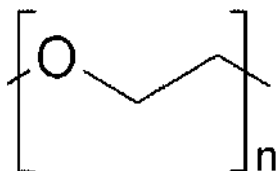
En aún otra modalidad, el fragmento Fc de inmunoglobulina que se incluye en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede ser un fragmento Fc de IgG4.

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que mantiene la afinidad de unión intrínseca de un fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn, el método comprende: (a) unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn a un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico para preparar una mezcla de conjugados de fragmentos Fc de inmunoglobulina-polipéptidos fisiológicamente activos; y (b) separar de la mezcla un conjugado de fragmento Fc de

inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que muestra una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, como se determina mediante la sustitución de la cantidad de unión a FcRn a pH 6,0 y la cantidad de unión a FcRn a pH 7,4 en la ecuación 1.

5 En una modalidad, el enlazador no peptídico que se usa en el método de preparación de acuerdo con la presente divulgación puede ser un polímero de polietilenglicol representado por la siguiente fórmula 1:

Fórmula 1



en donde n varía de 10 a 2400.

20 En aún otra modalidad, el conjugado separado en la etapa (b) del método de preparación de acuerdo con la presente divulgación puede tener una estructura en la que el enlazador no peptídico está unido al extremo N-terminal del fragmento Fc de inmunoglobulina.

25 En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para mantener la afinidad de unión intrínseca de un conjugado de fragmento Fc de polipéptido-inmunoglobulina fisiológicamente activo para FcRn, el método comprende unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn.

30 En una modalidad, el mantenimiento de la afinidad de unión intrínseca puede realizarse *in vivo*.

En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo, que mantiene la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn.

35 [Modo de divulgación]

40 En un aspecto, la presente divulgación proporciona un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn, en donde la relación de la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 6,0 y la cantidad de conjugado unido a FcRn a pH 7,4 está dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de una relación determinada mediante la medición de las cantidades del fragmento Fc de inmunoglobulina unido a FcRn en las mismas condiciones que las usadas para el conjugado.

45 Como se usa en la presente descripción, la expresión "cantidad de unión del conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo" se refiere a la relación de la concentración de la proteína conjugada unida a FcRn con respecto a la concentración total de la proteína conjugada unida o no unida a FcRn al pH de interés. En la presente divulgación, debido a que esta cantidad de unión se usa para calcular la relación entre las cantidades de unión a dos pH, la relación entre las cantidades de unión puede calcularse a partir de la cantidad absoluta de unión medida a un pH y también puede determinarse mediante la medición de otras cantidades físicas, que son proporcionales a la cantidad del conjugado unido y fáciles de medir. Por ejemplo, la relación entre las cantidades de unión puede determinarse mediante la medición de las señales de resonancia de plasmón superficial (SPR) y mediante el cálculo de la relación entre las señales a pH 6,0 y pH 7,4. Además, también pueden usarse otros métodos para determinar la relación entre las cantidades de unión.

55 Específicamente, la presente divulgación proporciona un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn, en donde una relación de unión determinada mediante la sustitución de la cantidad del conjugado unido a FcRn a pH 6,0 y la cantidad del conjugado unido a FcRn a pH 7,4 en la siguiente ecuación 1 es menor que el intervalo de $\pm 6\%$ de una relación de unión determinada mediante la medición de las cantidades del fragmento Fc de inmunoglobulina unido a FcRn en las mismas condiciones que las usadas para el conjugado:

Ecuación 1

65
$$\text{Relación de unión (\%)} = (\text{cantidad unida a pH 7,4} / \text{cantidad unida a pH 6,0}) \times 100$$

La relación de unión puede obtenerse como un valor de porcentaje (%) mediante la división de la cantidad de unión del conjugado (o fragmento Fc de inmunoglobulina) a FcRn a pH 7,4 por la cantidad de unión del conjugado (o fragmento Fc de inmunoglobulina) a FcRn a pH 6,0 y mediante la multiplicación del valor dividido por 100.

5 La relación de unión puede calcularse mediante el uso del método propuesto por Weirong Wang y otros (DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 39:1469-1477, 2011) para predecir la vida media de un anticuerpo monoclonal, pero no se limita específicamente al mismo. En el método descrito en la literatura anterior, un anticuerpo monoclonal que tiene una alta relación de unión mostró una vida media corta *in vivo*.

10 El método para medir la relación de unión puede realizarse, particularmente mediante el uso de un método de resonancia de plasmón superficial, pero no se limita específicamente al mismo.

15 Por ejemplo, el método para medir la relación de unión puede realizarse mediante la inmovilización de FcRn en un chip biosensor (por ejemplo, un chip biosensor Biacore CM5) mediante el uso de un kit de acoplamiento de amina o similar, la inyección del chip biosensor inmovilizado con FcRn con un tampón ácido (por ejemplo, tampón de pH 6,0) que contiene un material (por ejemplo, el conjugado o el fragmento Fc de inmunoglobulina) para medir el grado de unión al FcRn, y después inyectar un tampón neutro (por ejemplo, tampón de pH 7,4) en el chip biosensor. En este caso, la relación de unión puede determinarse mediante la medición de la unidad de resonancia (RU) en un estado de equilibrio antes de completar la inyección de la muestra en el tampón de pH 6,0 en el chip para determinar la cantidad unida a pH 6,0, mediante la medición de la unidad de resonancia después de la inyección del tampón de pH 7,4 para determinar la cantidad unida a pH 7,4, y después dividir la cantidad unida a pH 7,4 por la cantidad unida a pH 6,0. Cuando la relación de unión se expresa en porcentaje, el valor dividido puede multiplicarse por 100.

25 En el método descrito anteriormente, la composición del tampón de pH 6,0 no se limita específicamente, siempre que pueda inducir una unión entre el material a medir para determinar el grado de unión a FcRn y FcRn. Por ejemplo, el tampón de pH 6,0 puede ser un tampón que contiene una sal como fosfato. La concentración de la sal en el tampón puede ser 50-200 mM, pero no se limita a la misma. Además, el tampón puede inyectarse en el chip biosensor inmovilizado con FcRn a una temperatura de aproximadamente 25 °C, pero la temperatura de medición puede cambiarse dentro del intervalo de temperatura en el que el pH del tampón no cambia.

30 Además, el tampón de pH 6,0 puede contener el material a medir para el grado de unión a FcRn. La concentración del material a medir para el grado de unión a FcRn en el tampón de pH 6,0 no se limita específicamente, siempre que pueda medirse el grado de unión a FcRn. Por ejemplo, la concentración del material a medir para el grado de unión a FcRn en el tampón de pH 6,0 puede estar entre 100 nM y 12,5 nM.

35 En el método descrito anteriormente, la composición del tampón de pH 7,4 no se limita específicamente, siempre que pueda inducir la disociación entre el material a medir para el grado de unión a FcRn y FcRn. Por ejemplo, el tampón de pH 7,4 puede ser un tampón que contiene fosfato. La concentración de una sal en el tampón puede ser 50-200 mM, pero no se limita a la misma. Además, el tampón de pH 7,4 puede inyectarse en el chip biosensor inmovilizado con FcRn a una temperatura de 25 ~ 37 °C, pero no se limita a la misma. En una modalidad específica, la relación entre las cantidades de unión se mide a una temperatura de 25 °C.

40 Además, la cantidad de unión entre FcRn y el material a medir para el grado de unión a FcRn a pH 6,0 puede ser un valor de unidad de resonancia medido a 2-60 segundos antes de completar la inyección de la muestra de pH 6,0. La unión entre FcRn y el material a medir para el grado de unión a FcRn está preferentemente en un estado de equilibrio en el punto de tiempo de medición.

45 Además, la cantidad de unión entre FcRn y el material a medir para el grado de unión a FcRn a pH 7,4 puede ser un valor de unidad de resonancia medido a 10-20 segundos después de la inyección del tampón de pH 7,4. El punto de tiempo de medición está preferentemente entre el punto de tiempo en el que el valor de RU cambia rápidamente y antes de que el valor de RU alcance 0.

50 En una comparación de la relación de unión entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el conjugado de acuerdo con la presente divulgación, las relaciones de unión son preferentemente valores determinados por el mismo método experimental en las mismas condiciones experimentales, pero las composiciones y temperaturas de los tampones pueden variar en dependencia del tipo de conjugado.

55 El método de resonancia de plasmón superficial como se describió anteriormente es uno de los métodos para determinar la relación de unión. Además del método de resonancia de plasmón superficial, puede usarse cualquier método en la presente divulgación, siempre que sea un método tal como una prueba de inmunoabsorción enzimática (ELISA), que puede medir la cantidad del conjugado unido a FcRn. Además, la unidad de la cantidad de unión puede variar en dependencia del método usado.

60 Cuando la relación de unión de un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido mediante un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tiene una región de unión a FcRn está dentro del intervalo de $\pm 6,0$ % de la relación de unión del

propio fragmento Fc de inmunoglobulina, medido por el método descrito anteriormente, el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo tiene una vida media larga *in vivo*.

5 En la presente divulgación, se encontró que, incluso cuando un polipéptido fisiológicamente activo se unía covalentemente a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tenía una región de unión a FcRn para formar un conjugado, la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina para FcRn podría mantenerse, lo que sugiere que el reciclaje intracelular del fragmento Fc de inmunoglobulina puede ocurrir fácilmente para aumentar la vida media *in vivo*. Particularmente, cuando el enlazador no peptídico se une a la porción que excluye la región de unión a FcRn del fragmento Fc de inmunoglobulina, no reduce la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn. Cuando el enlazador no peptídico es polietilenglicol $(-[O-CH_2-CH_2]_n-)$, n en $- [O-CH_2-CH_2]_n-$ es 10 o mayor, particularmente 10-2400, más particularmente 10-480, e incluso más particularmente 50-250, pero no se limita a los mismos.

15 Se encontró que cuando n en $-[O-CH_2-CH_2]_n-$ es particularmente 10-2400, y más particularmente 50-2400, el polietilenglicol no influye en la actividad fisiológica y la actividad de unión a FcRn de cada uno de los polipéptidos fisiológicamente activos y el fragmento Fc de inmunoglobulina. La presente divulgación se basa en esta característica.

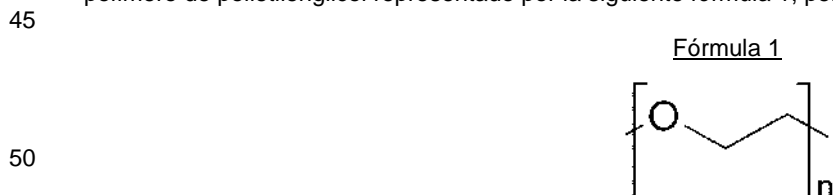
20 Como se usa en la presente descripción, el término "conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo" se refiere a un conjugado que comprende un polipéptido fisiológicamente activo unido covalentemente a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tiene una región de unión a FcRn y muestra una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6,0\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, como se determina mediante la sustitución de la cantidad de unión a FcRn a pH 6,0 y la cantidad de unión a FcRn a pH 7,4 en la ecuación 1.

25 El enlazador no peptídico en el conjugado puede unirse a residuos de aminoácidos alejados de la región de unión a FcRn del fragmento Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, una región correspondiente a las posiciones 252-257 y 307-311 de CH2 y las posiciones 433-436 de CH2, numerados de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. El enlazador no peptídico puede estar unido preferentemente al extremo N-terminal o C terminal del fragmento Fc de inmunoglobulina, y más preferentemente unido al extremo N-terminal, pero no se limita al mismo.

30 Cuando el enlazador no peptídico está unido al extremo N-terminal o C terminal del fragmento Fc de inmunoglobulina, no reduce sustancialmente la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn y, por lo tanto, la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina del conjugado para FcRn puede mantenerse.

35 Como se usa en la presente descripción, el término "enlazador no peptídico" se refiere a un polímero biocompatible compuesto de dos o más unidades repetidas unidas entre sí, en el que las unidades repetidas están unidas entre sí por cualquier enlace covalente no peptídico. Este enlazador no peptídico puede tener dos o tres extremos.

40 El enlazador no peptídico usado en la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en polímeros biodegradables tales como polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol con propilenglicol, poliol polioxiethylado, polivinil alcohol, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, polímeros biodegradables tales como ácido poliláctico (PLA) y ácido poliláctico-glicólico (PLGA), polímeros lipídicos, quitinas, ácido hialurónico y combinaciones de estos, pero no se limitan a los mismos. Preferentemente, el enlazador no peptídico es polietilenglicol, por ejemplo, un polímero de polietilenglicol representado por la siguiente fórmula 1, pero no se limita:



55 en donde n varía de 10 a 2400, preferentemente de 10 a 480, y más preferentemente de 50 a 250, pero no se limita a los mismos.

Mientras tanto, otros enlaces no peptídicos que tienen un peso molecular correspondiente al del polietilenglicol de fórmula 1 también caen dentro del alcance de la presente divulgación.

60 Además, sus derivados conocidos en la técnica y los derivados de enlaces no peptídicos que pueden prepararse fácilmente en el estado de la técnica también caen dentro del alcance de la presente divulgación.

65 El polietilenglicol que se usa como el enlazador no peptídico en la presente divulgación tiene la ventaja de que no da como resultado un obstáculo espacial entre el polipéptido fisiológicamente activo y el fragmento Fc de inmunoglobulina unido a ambos extremos del mismo, de modo que tanto la actividad fisiológica del polipéptido fisiológicamente activo y la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn pueden mantenerse.

Un enlace de peptidilo que se usa en una proteína de fusión preparada por un método de fusión convencional en marco tiene la desventaja de que se escinde fácilmente por proteasa *in vivo*, y por lo tanto, el efecto esperado de aumentar la vida media en suero del fármaco activo mediante un portador no puede obtenerse. Sin embargo, el conjugado que comprende el enlazador no peptidilo de acuerdo con la presente divulgación supera drásticamente esta desventaja. El enlazador no peptidilo puede ser un polímero que tiene resistencia a proteasa para mantener la vida media en suero del péptido, similar a la de un portador. Por lo tanto, cualquier enlazador no peptidilo puede usarse en la presente divulgación sin ninguna limitación, siempre que sea un polímero que tenga la función descrita anteriormente, es decir, un polímero que tenga resistencia a proteasa *in vivo*.

Además, el enlazador no peptidilo que está unido al fragmento Fc de inmunoglobulina en la presente divulgación puede estar hecho no solo de un tipo de polímero, sino también de una combinación de diferentes tipos de polímeros.

El enlazador no peptidilo que se usa en la presente divulgación tiene grupos reactivos capaces de unirse al fragmento Fc de inmunoglobulina y al polipéptido fisiológicamente activo.

Los grupos reactivos en ambos extremos del polímero no peptidilo se seleccionan preferentemente del grupo que consiste en un grupo aldehído reactivo, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y un derivado de succinimida. En la presente descripción, el derivado de succinimida puede ser succinimidil propionato, hidroxisuccinimidilo, succinimidil carboximetilo, o succinimidil carbonato. En particular, cuando el polímero no peptidilo tiene un grupo aldehído reactivo en ambos extremos del mismo, un polipéptido fisiológicamente activo y una inmunoglobulina se unen efectivamente a ambos extremos del enlazador no peptidilo, respectivamente, mientras se minimizan las reacciones no específicas. Un producto final generado por alquilación reductora a través de un enlace aldehído es mucho más estable que el unido a través de un enlace amida. El grupo reactivo aldehído puede unirse selectivamente al extremo N-terminal a un pH bajo y puede formar un enlace covalente con un residuo de lisina a un pH alto, por ejemplo, a pH 9,0. En la presente descripción, el enlazador no peptidilo puede contener dos o más grupos aldehídos o tener dos o más grupos alcoholes sustituidos con grupos funcionales que incluyen aldehído.

Los grupos reactivos en ambos extremos del enlazador no peptidilo pueden ser iguales o diferentes. Por ejemplo, un extremo del enlazador no peptidilo puede tener un grupo maleimida, y el otro extremo puede tener un grupo aldehído, un grupo propionaldehído o un grupo alquil aldehído tal como butil aldehído. Cuando se usa un polietilenglicol que tiene grupos reactivos con hidroxilo en ambos extremos como el enlazador no peptidilo, los grupos hidroxilo pueden activarse en diversos grupos reactivos mediante una reacción química conocida. Alternativamente, puede usarse un polietilenglicol comercialmente disponible que tenga un grupo reactivo modificado para preparar el conjugado de la presente divulgación.

Como se usa en la presente descripción, el término "polipéptido fisiológicamente activo" se refiere colectivamente a polipéptidos que tienen cualquier actividad fisiológica *in vivo*, que comúnmente tienen una estructura de polipéptido y tienen diversas actividades fisiológicas. Los polipéptidos fisiológicamente activos incluyen aquellos que funcionan para regular la expresión genética y la función fisiológica y para corregir una condición anormal causada por la falta o secreción excesiva de una sustancia que está involucrada en la regulación de las funciones *in vivo*. Los polipéptidos fisiológicamente activos también pueden incluir agentes terapéuticos proteicos generales. Además, el término "polipéptido fisiológicamente activo" pretende incluir no solo polipéptidos nativos, sino también derivados de estos.

El tipo y tamaño del polipéptido fisiológicamente activo en el conjugado de la presente divulgación no se limita específicamente, siempre que sea un polipéptido fisiológicamente activo que pueda mostrar un aumento en la vida media en suero por la estructura conjugada de la presente divulgación. En una modalidad de la presente divulgación, los conjugados se preparan mediante el uso de diversos polipéptidos fisiológicamente activos, que incluyen insulina, interferón, hormona de crecimiento humana y un agonista de GLP-1, que son ejemplos representativos de polipéptidos fisiológicamente activos, y se encontró que la afinidad de unión intrínseca del propio fragmento Fc de inmunoglobulina para FcRn puede mantenerse independientemente del tipo y tamaño del polipéptido fisiológicamente activo.

El polipéptido fisiológicamente activo incluido en el conjugado de acuerdo con la presente divulgación puede seleccionarse del grupo que consiste en péptido-1 similar al glucagón (GLP-1), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, hormona liberadora de la hormona de crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones, receptores de interferón, receptor acoplado a la proteína G, interleucinas, receptores de interleucina, enzimas, proteínas de unión a interleucina, proteínas de unión a citocinas, factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glucoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfoxina, factor de necrosis tumoral, supresores tumorales, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, α -lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factores sanguíneos VII, VIIa, VIII, IX y XIII, factor activador de plasminógeno, péptido 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, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor de activación del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del folículo, hormona luteinizante, hormona liberadora de hormona

5 luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocortical, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacunales derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales y fragmentos de anticuerpos, pero no se limita a los mismos. Además, el término "polipéptido fisiológicamente activo", como se usa en la presente descripción, pretende incluir no solo polipéptidos fisiológicamente activos naturales, sino también agonistas, precursores, derivados, fragmentos o variantes de cada polipéptido. En la presente descripción, los ejemplos de derivados de oxintomodulina incluyen todos los divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente Coreana núm. 10-2012-0137271, y los ejemplos de derivados de péptidos liberadores de insulina incluyen los divulgados en la Publicación de Solicitud de Patente Coreana núm. 10-2009-0008151, pero no se limitan a los mismos.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "fragmento Fc de inmunoglobulina" se refiere a una proteína que contiene la región constante de la cadena pesada de una inmunoglobulina, que excluye la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y la región constante de la cadena ligera 1 (CL1) de la inmunoglobulina. El fragmento Fc puede incluir una región bisagra en la región constante de la cadena pesada. En la presente divulgación, el fragmento Fc de inmunoglobulina comprende preferentemente un dominio CH2, un dominio CH3, o ambos, porque se debe mantener la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn.

20 Además, la región Fc de inmunoglobulina en la presente divulgación puede ser un fragmento Fc extendido que incluye una porción o la totalidad de la región constante de la cadena pesada 1 (CH1) y/o la región constante de la cadena ligera 1 (CL1), a excepción de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de la inmunoglobulina, siempre que mantenga su afinidad de unión intrínseca por FcRn, incluso cuando está unida al polipéptido fisiológicamente activo y al enlazador no peptídico.

25 Debido a que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un polipéptido biodegradable metabolizado *in vivo*, es seguro para su uso como portador de fármaco. Además, debido a que el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular más bajo que la molécula de inmunoglobulina completa, es beneficioso en términos de preparación, purificación y rendimiento del conjugado. Además, debido a que la región Fab, que muestra una no homogeneidad alta debido a la diferencia en la secuencia de aminoácidos entre los anticuerpos, se elimina, el fragmento Fc tiene una homogeneidad considerablemente mayor y un potencial bajo para inducir la antigenicidad sérica.

35 En la presente divulgación, el fragmento Fc de inmunoglobulina incluye no solo una secuencia de aminoácidos nativa, sino también una secuencia mutante de este. Como se usa en la presente descripción, el término "mutante de secuencia de aminoácidos" se refiere a una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una delección, inserción, sustitución no conservadora o conservadora o combinaciones de estas de uno o más residuos de aminoácidos. Por ejemplo, en el caso de IgG Fc, los residuos de aminoácidos en las posiciones 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 o 327 a 331, que se conoce que son importantes en la unión, pueden usarse como un objetivo adecuado para la modificación.

40 Además, también son posibles varios mutantes, que incluyen los mutantes que tienen una delección de una región capaz de formar un enlace disulfuro, una delección de varios residuos de aminoácidos en el extremo N-terminal de un Fc nativo, o una adición de residuo de metionina al extremo N-terminal de un Fc nativo. Además, para eliminar las funciones efectoras, puede eliminarse un sitio de unión al complemento, por ejemplo, un sitio de unión a C1q, y también puede eliminarse un sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Las técnicas de preparación de tales derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina se divulgan en las publicaciones de patentes internacionales números WO 97/34631 y WO 96/32478.

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

En algunos casos, el fragmento Fc de inmunoglobulina también puede modificarse mediante, por ejemplo, fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación o amidación.

55 Los mutantes Fc descritos anteriormente son mutantes que muestran la misma actividad biológica que la del fragmento Fc de la presente divulgación, pero tienen una estabilidad estructural mejorada contra el calor, el pH, o similares.

60 Además, estos fragmentos Fc pueden obtenerse de formas nativas aisladas de humanos y animales, que incluyen vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser formas recombinantes o derivados de los estas, obtenidos de células animales transformadas o microorganismos. En la presente descripción, pueden obtenerse de una inmunoglobulina nativa mediante el aislamiento de una inmunoglobulina completa del cuerpo vivo de humanos o animales y tratamiento con proteasa. Cuando la inmunoglobulina completa se trata con papaína, se escinde en Fab y Fc. Mientras tanto, cuando se trata con pepsina, se escinde en pF'c y F(ab)₂. Estos fragmentos pueden someterse, por ejemplo, a cromatografía de exclusión por tamaño para aislar Fc o pF'c.

65

Preferentemente, es un fragmento Fc de inmunoglobulina recombinante obtenido de un microorganismo que usa un fragmento Fc humano.

5 Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede estar en forma de cadenas de azúcar nativas, cadenas de azúcar aumentadas en comparación con una forma nativa o cadenas de azúcar disminuidas en comparación con la forma nativa, o puede estar en una forma desglicosilada. El aumento, disminución o eliminación de las cadenas de azúcar Fc de inmunoglobulina puede realizarse mediante el uso de métodos convencionales, tales como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética que usa un microorganismo. El fragmento Fc de inmunoglobulina obtenido tras eliminar las cadenas de azúcar de un Fc muestra una fuerte disminución en la afinidad de unión por el complemento (c1q) y una disminución o pérdida en la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos o la citotoxicidad dependiente del complemento, y por lo tanto no induce respuestas inmunes innecesarias *in vivo*. A este respecto, un fragmento Fc de inmunoglobulina en una forma desglicosilada o aglicosilada puede ser más adecuado para su uso como portador de fármaco.

15 Como se usa en la presente descripción, el término "desglicosilación" se refiere a una eliminación enzimática de porciones de azúcar de un fragmento Fc, y el término "aglicosilación" significa un fragmento Fc no glicosilado producido en procariontes, preferentemente en *E. coli*.

20 Mientras tanto, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede originarse de humanos o animales como ganado, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas o cobayas. Preferentemente, es de origen humano. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc derivado de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, combinaciones de estos, o híbridos de estos. Preferentemente, se deriva de IgG o IgM, que se encuentra entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y lo más preferentemente se deriva de IgG que se conoce que mejora la vida media de las proteínas de unión a ligando.

25 El término "combinación", como se usa en la presente descripción, se refiere a una formación de enlace entre un polipéptido que codifica fragmentos Fc de inmunoglobulina de cadena única del mismo origen y un polipéptido de cadena única de origen diferente para formar un dímero o multímero. En otras palabras, puede formarse un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos IgG Fc, IgA Fc, IgM Fc, IgD Fc, e IgE Fc.

30 Como se usa en la presente descripción, el término "híbrido" se refiere a la presencia de dos o más secuencias correspondientes a fragmentos Fc de inmunoglobulina de diferentes orígenes en un fragmento Fc de inmunoglobulina de cadena sencilla. En la presente divulgación, son posibles varios tipos de híbridos. En otras palabras, los híbridos de dominio pueden estar compuestos de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en CH1, CH2, CH3 and CH4 of IgG Fc, IgM Fc, IgA Fc, IgE Fc e IgD Fc, y pueden incluir una región bisagra.

35 Por otro lado, la IgG puede dividirse en subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y pueden usarse combinaciones o híbridos de estas en la presente divulgación, preferentemente las subclases IgG2 e IgG4, y lo más preferentemente el fragmento Fc de IgG4 rara vez tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente del complemento). En otras palabras, el fragmento Fc de inmunoglobulina más preferible para su uso como portador de fármaco en la presente divulgación es un fragmento Fc no glicosilado derivado de IgG4 humano. El fragmento Fc humano es más preferible que un fragmento Fc no 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.

40 En una modalidad de la presente divulgación, cada uno de insulina, interferón, hormona de crecimiento humana y un agonista de GLP-1 se une a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tiene la capacidad de unirse a FcRn, que prepara por consiguiente conjugados que aumentan la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn y puede disociarse fácilmente de FcRn a un pH neutro y también puede mostrar un grado de disociación similar al del fragmento Fc de inmunoglobulina (Ejemplos y Figuras 2 y 3). Además, se encontró que el conjugado de la presente divulgación tiene una duración de acción *in vivo* larga en comparación con un conjugado en marco (Figura 4).

45 En un otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para preparar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que mantiene la afinidad de unión intrínseca de un fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn, el método comprende las etapas de: (a) unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que tiene una región de unión a FcRn para preparar una mezcla de conjugados de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activos; y (b) separar de la mezcla un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que muestra una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, como se determina mediante la sustitución de la cantidad unida a FcRn a pH 6,0 y la cantidad unida a FcRn a pH 7,4 en la siguiente ecuación 1.

Ecuación 1

65 Relación de unión (%) = (cantidad unida a pH 7,4/cantidad unida a pH 6,0) X 100

En la presente descripción, el polipéptido fisiológicamente activo, el fragmento Fc de inmunoglobulina, el enlazador no peptidilo, el conjugado y la determinación de la relación de unión son como se describieron anteriormente.

La etapa (a) en el método de la presente divulgación es una etapa de unir covalentemente un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptidilo a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La etapa (a) puede comprender las etapas de: (i) unir cualquiera de los polipéptidos fisiológicamente activos y el fragmento Fc de inmunoglobulina a un grupo reactivo en un extremo del enlazador no peptidilo; y (ii) unir el restante a un grupo reactivo en el otro extremo del enlazador no peptidilo. La etapa (a) puede comprender, además, entre las etapas (i) y (ii), una etapa de separación del polipéptido fisiológicamente activo o fragmento Fc de inmunoglobulina unido a un extremo del enlazador no peptidilo.

Para unir el polipéptido fisiológicamente activo a través del enlazador no peptidilo a una porción que excluye la región de unión a FcRn del fragmento Fc de inmunoglobulina, el polipéptido fisiológicamente activo que tiene el enlazador no peptidilo unido al mismo puede reaccionar con el fragmento Fc de inmunoglobulina a un pH de 4,0-9,0.

Cuando el conjugado se prepara mediante este proceso, pueden generarse subproductos como un conjugado que muestra una disminución en la afinidad de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn además de un conjugado que mantiene la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn. Por esta razón, después de la reacción que une el polipéptido fisiológicamente activo a través del péptido no peptidilo al fragmento Fc de inmunoglobulina, se requiere adicionalmente un proceso para separar de la mezcla de conjugado un fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que mantiene la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina para FcRn.

Por lo tanto, el método de la presente divulgación comprende la etapa (b) de separar de la mezcla de conjugado un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que muestra una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, tal como se determina mediante la sustitución de la cantidad unida a FcRn a pH 6,0 y la cantidad unida a FcRn a pH 7,4 en la ecuación 1.

La etapa (b) es preferentemente un proceso para separar un conjugado en el que el enlazador no peptidilo está unido a residuos de aminoácidos alejados de la región de unión a FcRn del fragmento Fc de inmunoglobulina, por ejemplo, una región correspondiente a las posiciones 252-257 y 307-311 de CH2 y las posiciones 433-436 de CH2, numeradas de acuerdo con el sistema de numeración Kabat. Específicamente, la etapa (b) es un proceso para separar selectivamente solo un conjugado en el que el enlazador no peptidilo está conectado al extremo N-terminal del fragmento Fc de inmunoglobulina para que se mantenga la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc por FcRn.

Las condiciones de separación y purificación en la etapa (b) pueden variar en dependencia de los tipos de enlazador no peptidilo, polipéptido fisiológicamente activo y similares usados.

En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona un método para mantener la afinidad de unión intrínseca de un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo para FcRn, el método comprende unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptidilo a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn.

En la presente descripción, el polipéptido fisiológicamente activo, el fragmento Fc de inmunoglobulina, el enlazador no peptidilo y el conjugado son como se describieron anteriormente.

La presente divulgación tiene ventajas en que, dado que el polipéptido fisiológicamente activo se une a través del enlazador no peptidilo al fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende la región de unión a FcRn, la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn se mantiene mientras que el fragmento Fc de inmunoglobulina puede disociarse fácilmente de FcRn a un pH neutro y puede reciclarse fácilmente, lo que sugiere que la vida media *in vivo* del fragmento Fc de inmunoglobulina puede aumentarse efectivamente.

En la presente descripción, el mantenimiento de la afinidad de unión intrínseca puede realizarse *in vivo*.

En aún otro aspecto, la presente divulgación proporciona una composición que comprende el conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo, que mantiene la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn.

En la presente descripción, el polipéptido fisiológicamente activo, el fragmento Fc de inmunoglobulina y el conjugado son como se describieron anteriormente.

En lo sucesivo, la presente divulgación se describirá con más detalle con referencia a ejemplos. Sin embargo, debe entenderse que estos ejemplos son solo para fines ilustrativos y no pretenden limitar el alcance de la presente divulgación.

Ejemplos: Preparación de conjugados de proteína fisiológicamente activa y fragmento Fc que comprende el sitio de unión a FcRn

(1) Preparación del fragmento Fc de inmunoglobulina

Se preparó un fragmento Fc de inmunoglobulina de acuerdo con el método divulgado en la Solicitud de Patente Coreana núm. 10-2006-0077377 (titulada "método para la producción en masa de la región Fc de inmunoglobulina libre de residuos de metionina") presentada a nombre de los presentes autores.

(2) Preparación del conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina-insulina

Se realizó una reacción para PEGilar un propion-PEG ALD2 de 3,4 kDa (IDB, Corea) específicamente en el extremo N-terminal de la cadena beta de insulina. La solución de reacción se purificó mediante el uso de una columna de intercambio catiónico. Para preparar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-insulina, la insulina mono-PEGilada purificada se hizo reaccionar con el Fc de inmunoglobulina. En este momento, la reacción se realizó a pH 6,0-8,2 para dirigir la insulina específicamente al extremo N-terminal del Fc de inmunoglobulina. Una vez completada la reacción, la solución de reacción se purificó primero mediante el uso de una columna de intercambio aniónico, y después se purificó mediante el uso de una columna hidrofóbica, por consiguiente, se obtuvo un conjugado de insulina que comprende insulina unida específicamente en el sitio a la inmunoglobulina.

(3) Preparación del conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-interferón

Se añadió un propion-PEG ALD2 de 3,4 kDa (IDB, Corea) y se hizo reaccionar con un tampón que contenía interferón humano alfa-2b (hIFNa-2b; peso molecular: 19 kDa) disuelto en el mismo. Para obtener un conjugado en el que el PEG se une específicamente al extremo amino terminal del interferón alfa y el PEG y el interferón alfa se unen entre sí en una relación de 1:1, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía en columna de intercambio aniónico para purificar un IFNa-2b mono-PEGilado. Para dirigir el interferón mono-PEGilado purificado específicamente al extremo N-terminal del Fc de inmunoglobulina, se realizó una reacción a un pH de 5,5-6,5. Después de la reacción de unión, para purificar el conjugado producido con el fragmento Fc de inmunoglobulina-interferón, la mezcla de reacción se pasó a través de una columna de intercambio aniónico para obtener una fracción de conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-interferón. La fracción de conjugado se purificó adicionalmente mediante el uso de una columna hidrofóbica, por consiguiente, se obtuvo un conjugado de interferón que comprende interferón unido específicamente en el sitio al Fc de inmunoglobulina.

(4) Preparación del conjugado del fragmento Fc de inmunoglobulina-hormona de crecimiento humana

Se añadió un propion-PEG ALD2 de 3,4 kDa (IDB, Corea) y se hizo reaccionar con un tampón que contenía hormona de crecimiento humana (hGH; peso molecular: 22 kDa) disuelto en el mismo. Para obtener un conjugado en el que el PEG se une específicamente al extremo amino terminal de la hormona del crecimiento humana y el PEG y la hormona del crecimiento humana se unen entre sí en una relación de 1:1, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía en columna de intercambio aniónico para purificar una hormona de crecimiento humana mono-PEGilada (hGH). Para dirigir y unir la hormona de crecimiento humana mono-PEGilada purificada específicamente al extremo N-terminal del Fc de inmunoglobulina, se realizó una reacción a un pH de 5,5-6,5. Después de la reacción de unión, la mezcla de reacción se purificó mediante el uso de una columna de intercambio aniónico, por consiguiente se obtuvo una fracción de conjugado de hormona de crecimiento humana que comprende la hormona de crecimiento humana unida específicamente en el sitio al Fc de inmunoglobulina.

(5) Preparación del conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R

Se hizo reaccionar un propion-PEG ALD2 de 3,4 kDa (IDB, Corea) específicamente en el sitio con el residuo de lisina de imidazo-acetil-exendina-4 (CA exendina-4, Bachem, Suiza). Para obtener un conjugado en el que PEG y el agonista de GLP-1R están unidos entre sí en una relación de 1:1, la mezcla de reacción se sometió a cromatografía en columna de intercambio catiónico para purificar exendina-4 mono-PEGilada. Para preparar un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R que comprende la exendina-4 mono-PEGilada unida específicamente al extremo N-terminal del Fc de inmunoglobulina, se realizó una reacción a un pH de 5,0-8,2. Después de la reacción de acoplamiento, se realizó un proceso de purificación en dos etapas mediante el uso de una columna hidrofóbica y una columna de intercambio aniónico, por consiguiente se obtuvo un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R que comprende el agonista de GLP-1R unido específicamente en el sitio al Fc de inmunoglobulina.

Ejemplo comparativo: Preparación del conjugado que comprende el agonista de GLP-1R unido en marco al fragmento de inmunoglobulina

Para comparar con el conjugado de la presente divulgación, se preparó una proteína de fusión de un agonista de GLP-1R con un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende un sitio FcRn de aproximadamente 50 kDa mediante un método de recombinación génica sin usar un enlazador. El conjugado que comprende el agonista de GLP-1R unido en marco al fragmento Fc de inmunoglobulina (en lo sucesivo también se refiere como "conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco") se purificó del cultivo mediante el uso de una columna de afinidad.

Ejemplo experimental 1: Evaluación de la afinidad de unión para FcRn

Entre las proteínas introducidas en las células por endocitosis, una proteína que tiene un sitio de unión a FcRn se une a FcRn a un pH ácido, mientras que una proteína que no se une a FcRn se elimina por degradación lisosómica. Cuando la proteína unida a FcRn se disocia de FcRn a un pH neutro, se libera a la superficie celular, mientras que la proteína unida a FcRn que no se disocia de FcRn sufre degradación lisosómica. Este mecanismo se muestra en la Figura 1.

Por lo tanto, para examinar si el conjugado del Ejemplo, obtenido mediante la unión de la proteína fisiológicamente activa a través del enlazador no peptídico al Fc de inmunoglobulina que comprende el sitio de unión a FcRn, puede mantener la afinidad de unión del Fc de inmunoglobulina solo para FcRn o si puede disociarse fácilmente de FcRn a un pH neutro y puede liberarse en la sangre, se realizó el siguiente experimento.

Específicamente, para examinar si la afinidad de unión del fragmento de inmunoglobulina por FcRn no cambia incluso cuando se forma el conjugado de la presente divulgación, se midió la afinidad de unión entre FcRn y el conjugado del Ejemplo o el Ejemplo Comparativo mediante el uso de SPR (resonancia de plasmón superficial, BIACORE 3000). Como FcRn, se usó el receptor de dímero FCGRT y B2M (Sino Biological Inc.). FcRn se inmovilizó en un chip CM5 mediante el uso de un método de acoplamiento de amina, y después se añadió el conjugado al mismo a una concentración entre 100 nM y 12,5 nM para medir la afinidad de unión entre ellos. Sin embargo, debido a que el mecanismo del aumento de la vida media mediado por FcRn depende del pH, el experimento se llevó a cabo en un pH ácido y en un pH neutro.

(1) Medición de la afinidad de unión del conjugado de inmunoglobulina-proteína para FcRn a pH ácido

Debido a que la unión de una proteína endocitada a FcRn ocurre a un pH ácido, se usó un tampón de fosfato (pH 6,0) como tampón-1 para reproducir esta unión. Todos los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína se diluyeron en el tampón de corrida-1 para inducir la unión, y la disociación de los conjugados también se realizó mediante el uso del tampón de corrida-1. Cada uno de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína se puso en contacto con el chip inmovilizado con FcRn durante 4 minutos para inducir la unión de este, y después se sometió a un proceso de disociación durante 6 minutos. A continuación, para medir los valores de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína a diferentes concentraciones, es decir, unir al chip los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína a diferentes concentraciones, el tampón Hepes a pH 7,4 se puso en contacto con los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína unidos a FcRn durante aproximadamente 30 segundos. La afinidad de unión de cada uno de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína para FcRn a un pH ácido se analizó mediante el uso de la unión Langmuir 1:1 con el modelo de referencia de deriva en el programa de evaluación BIA, y los resultados del análisis se muestran en la Figura 2.

(2) Medición de la afinidad de unión del conjugado de inmunoglobulina-proteína para FcRn a pH neutro

Debido a que la liberación del conjugado de las células después de la unión a FcRn ocurre cuando el pH cambia de un pH ácido a un pH neutro, se usó el tampón Hepes (pH 7,4) como tampón de corrida-2. Sin embargo, la unión entre FcRn y cada uno de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína se indujo durante 4 minutos mediante el uso de la muestra que comprende cada uno de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína, que se diluyeron en el tampón de corrida-1, y después se indujo la disociación de cada uno de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína a partir de FcRn durante 1 minuto mediante el uso del tampón de corrida-2. Los sensores de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína se muestran en la Figura 3. El grado de disociación del fragmento de inmunoglobulina-proteína conjugada a partir de FcRn se expresó como una relación de unión (%) de acuerdo con la siguiente ecuación 2. En la presente descripción, la unidad de resonancia medida a los 2 segundos antes de completar la inyección de la muestra de pH 6,0 se seleccionó como una cantidad física que es proporcional a la cantidad unida a pH 6,0, y la unidad de resonancia medida a los 10 segundos después del inicio de la disociación a pH 7,4 se seleccionó como una cantidad física que es proporcional a la cantidad unida a pH 7,4. Mediante el uso de las unidades de resonancia seleccionadas, la relación de unión se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación 2:

Ecuación 2

$$\text{Relación de unión (\%)} = (\text{cantidad unida a pH 7,4} / \text{cantidad unida a pH 6,0}) \times 100$$

Como se usa en la presente descripción, el término "relación de unión" se refiere a la medida en que el conjugado de fragmento de inmunoglobulina-proteína se disocia fácilmente a partir de FcRn. Puede observarse que, a medida que el valor de la relación de unión se reduce, la disociación del conjugado a un pH neutro es mejor y el reciclaje del conjugado mediado por FcRn ocurre más fácilmente, mientras que, a medida que el valor de la relación de unión se hace mayor, la disociación del conjugado a un pH neutro es insuficiente, por lo que es más probable que el conjugado se elimine por degradación lisosómica incluso cuando es endocitado mediante la unión a FcRn.

Como resultado, como se muestra en las Figuras 2 y 3, los diversos conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína del Ejemplo se unieron a FcRn de una manera dependiente de la concentración. Los resultados también se muestran en la Tabla 1 a continuación, y los grados de disociación de los conjugados, calculados mediante el uso de la ecuación 2, se muestran en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 1: Comparación de las afinidades de unión de los conjugados de fragmento de inmunoglobulina-proteína para FcRn a pH 6,0

5	Materiales de prueba	pH 6,0		
		ka (1/Ms, X10 ⁵)	kd (1/s, X10 ⁻³)	K _D (nM)
	Fragmento de inmunoglobulina	4,8	10,5	22,0 ± 3,0
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-insulina	3,1	7,1	22,6 ± 3,9
10	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-interferón	3,0	9,3	30,0 ± 4,8
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-hormona de crecimiento humana	1,2	3,6	26,8 ± 9,0
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R	3,8	9,5	24,7 ± 5,5
15	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco	3,2	5,3	17,0 ± 3,7
20	*ka: constante de velocidad de asociación, kd: constante de velocidad de disociación, KD: constante de afinidad, relación de unión: un valor obtenido mediante la división de la cantidad de unión a pH 7,4 por la cantidad de unión a pH 6,0 y mediante la multiplicación el valor dividido por 100.			

Tabla 2: Comparación de grados de disociación de fragmentos de inmunoglobulina-proteína conjugada de FcRn

25	Materiales de prueba	Concentración (nM)	Cantidad de unión (RU) a pH 6,0	Cantidad de unión (RU) a pH 7,4	Relación de unión (%)	Relación de unión promedio (%)
	Fragmento de inmunoglobulina	100	163,7	4,8	2,9	5,4 ± 2,0
		50	137,4	6,5	4,7	
30		25	110,9	7,4	6,6	
		12,5	88,0	6,5	7,3	
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-insulina	100	214,1	4,8	2,2	5,0 ± 2,2
		50	174,3	8,0	4,6	
35		25	143,9	8,4	5,9	
		12,5	106,6	7,9	7,4	
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-interferón	100	196,9	6,4	3,2	5,0 ± 1,6
		50	157,2	6,7	4,3	
40		25	120,3	6,7	5,6	
		12,5	91,3	6,4	7,0	
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-hormona de crecimiento humana	100	205,7	8,2	4,0	6,6 ± 2,6
		50	153,0	7,7	5,1	
45		25	111,9	8,3	7,4	
		12,5	82,9	8,1	9,8	
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R	100	163,5	6,2	3,8	6,6 ± 2,6
		50	135,5	8,1	5,9	
50		25	107,7	7,2	6,7	
		12,5	86,2	8,6	10,0	
	Conjugado de fragmento de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco	100	301,7	38,2	12,7	12,7 ± 0,3
		50	249,5	31,2	12,5	
		25	197,6	25,9	13,1	
		12,5	148,7	18,6	12,5	

55 Como puede observarse en las Tablas 1 y 2 anteriores, la afinidad de unión a un pH ácido o un pH neutro no difirió significativamente entre el fragmento de inmunoglobulina sola (un Fc independiente que no tiene proteína terapéutica unida al mismo) y los conjugados de la presente divulgación. En otras palabras, se encontró que, en el caso de los conjugados de inmunoglobulina-proteína producidos de acuerdo con la presente divulgación, la afinidad de unión del fragmento de inmunoglobulina por FcRn no cambió incluso cuando la inmunoglobulina se unió a la proteína fisiológicamente activa, y particularmente, los conjugados que comprenden diversas proteínas fisiológicamente activas que tienen diferentes tamaños mostraron resultados similares. Sin embargo, el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco del Ejemplo comparativo mostró una alta relación de unión, y por lo tanto no pudo disociarse adecuadamente a partir de FcRn a un pH neutro, lo que sugiere que tiene un efecto menor en la prolongación de la vida media de la proteína fisiológicamente activa, en comparación con el conjugado de la presente divulgación.

65

Ejemplo experimental 2: Prueba para comparar la farmacocinética *in vivo* entre el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R

5 Para comparar la farmacocinética *in vivo* entre el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R del Ejemplo (5) y el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco, se analizaron los cambios en las concentraciones séricas de los conjugados mediante el uso de ratas SD normales.

10 Específicamente, cada uno de los conjugados de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R (400 mcg/kg) y el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco (400 mcg/kg) se diluyeron en solución salina fisiológica y se administraron por vía subcutánea a los animales a una dosis de 2 ml/kg. A las 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312 y 336 horas después de la administración de los materiales de prueba, se recogió sangre de la vena yugular de las ratas, y el suero se separó de la sangre. A continuación, se cuantificó la concentración del fármaco en cada una de las muestras de suero mediante una prueba de inmunoabsorción ligada a enzimas, y los resultados de la cuantificación se muestran en la Figura 4.

15 Como resultado, las vidas medias en suero del conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R y el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco fueron 40,9 horas y 28 horas, respectivamente, y las concentraciones séricas máximas de los conjugados fueron 1758,6 ng/ml y 742,7 ng/ml, respectivamente. En otras palabras, cuando los fármacos se administraron por vía subcutánea a las ratas normales a la misma dosis, se demostró que el conjugado de fragmento de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R de la presente divulgación era excelente en términos de absorción *in vivo* y vida media en comparación con el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-agonista de GLP-1R en marco (Figura 4).

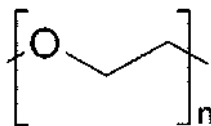
REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende un conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo que mantiene la afinidad de unión intrínseca del fragmento Fc de inmunoglobulina por FcRn, el conjugado que comprende solo una molécula de un polipéptido fisiológicamente activo unido mediante un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn, en donde una relación de unión del conjugado está dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina determinada en las mismas condiciones que las usadas para el conjugado, en donde la relación de unión del conjugado y la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina se determinan mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Relación de unión (\%)} = (\text{cantidad unida a FcRn a pH 7,4/cantidad unida a FcRn a pH 6,0}) \times 100;$$

- en donde la composición comprende solo formas monoméricas de dicho conjugado; y en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en péptido similar al glucagón-1 (GLP-1), agonista del receptor de GLP-1, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), hormona de crecimiento humana (hGH), eritropoyetina (EPO), glucagón, oxintomodulina, insulina, hormona liberadora de la hormona del crecimiento, péptido liberador de la hormona del crecimiento, interferones, receptores de interferón, receptor acoplado a la proteína G, interleucinas, receptores de interleucina, enzimas, proteínas de unión a interleucina, proteínas de unión a citocinas, factor activador de macrófagos, péptido de macrófagos, factor de células B, factor de células T, proteína A, inhibidor de alergia, glicoproteínas de necrosis celular, inmunotoxina, linfotóxina, factor de necrosis tumoral, supresores de tumores, factor de crecimiento de metástasis, antitripsina alfa-1, albúmina, α -lactalbúmina, apolipoproteína-E, eritropoyetina altamente glicosilada, angiopoyetinas, hemoglobina, trombina, péptido activador del receptor de trombina, trombomodulina, factores sanguíneos VII, VIIa, VIII, IX y XIII, factor activador de plasminógeno, péptido de unión a fibrina, uroquinasa, estreptoquinasa, hirudina, proteína C, proteína C reactiva, inhibidor de renina, inhibidor de colagenasa, superóxido dismutasa, leptina, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento epitelial, factor de crecimiento epidérmico, angiostatina, angiotensina, factor de crecimiento óseo, proteína estimulante ósea, calcitonina, atriopeptina, factor inductor de cartílago, elcatonina, factor de activación del tejido conectivo, inhibidor de la vía del factor tisular, hormona estimulante del foliculo, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, factores de crecimiento nervioso, hormona paratiroidea, relaxina, secretina, somatomedina, factor de crecimiento similar a la insulina, hormona adrenocortical, colecistoquinina, polipéptido pancreático, péptido liberador de gastrina, factor liberador de corticotropina, hormona estimulante de la tiroides, autotaxina, lactoferrina, miostatina, antígenos de superficie celular, antígenos vacunales derivados de virus, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, y fragmentos de anticuerpos.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el enlazador no peptídico se selecciona del grupo que consiste en polietilenglicol, polipropilenglicol, un copolímero de etilenglicol-propilenglicol, poliol polioxietilado, alcohol polivinílico, polisacárido, dextrano, polivinil etil éter, un polímero biodegradable, un polímero lipídico, quitina, ácido hialurónico y combinaciones de estos.
3. La composición de la reivindicación 1, en donde el enlazador no peptídico es un polímero de polietilenglicol representado por la siguiente fórmula:



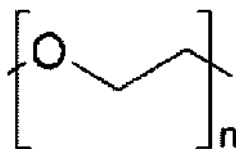
en donde n varía de 10 a 2400.

4. La composición de la reivindicación 1, en donde el enlazador no peptídico tiene un grupo reactivo seleccionado del grupo que consiste en un grupo aldehído, un grupo propionaldehído, un grupo butiraldehído, un grupo maleimida y derivados de succinimida.
5. La composición de la reivindicación 1, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en insulina, interferones, hormona de crecimiento humana (hGH) y agonista del receptor GLP-1.
6. La composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende la región de unión a FcRn comprende un dominio CH2, un dominio CH3, o ambos.
7. La composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina está en una forma no glicosilada.

8. La composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina comprende además una región bisagra.
- 5 9. La composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc derivado del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, combinaciones de estos e híbridos de estos.
10. La composición de la reivindicación 1, en donde el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.
- 10 11. Un método para preparar una composición de acuerdo con la reivindicación 1, el método comprende:
 (a) unir un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn para preparar una mezcla de conjugados de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo; y
 (b) separar de la mezcla conjugados de fragmentos Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activos que comprenden solo una molécula de un polipéptido fisiológicamente activo unido a través de un enlazador no peptídico a un fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende una región de unión a FcRn y que muestran una relación de unión dentro del intervalo de $\pm 6\%$ de la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina, determinada en las mismas condiciones que las usadas para el conjugado, en donde la relación de unión del conjugado y la relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina se determinan mediante el uso de la siguiente ecuación:

$$\text{Relación de unión (\%)} = (\text{cantidad unida a FcRn a pH 7,4/cantidad unida a FcRn a pH 6,0}) \times 100.$$

12. El método de la reivindicación 11, en donde el enlazador no peptídico es un polímero de polietilenglicol representado por la siguiente fórmula:



en donde n varía de 10 a 2400.

- 35 13. El método de la reivindicación 11, en donde el conjugado separado en la etapa (b) tiene una estructura en la cual el enlazador no peptídico está unido al extremo N-terminal del fragmento Fc de inmunoglobulina.
- 40 14. El método de la reivindicación 11, en donde la etapa (b) comprende determinar una relación de unión del conjugado y una relación de unión del fragmento Fc de inmunoglobulina mediante el uso de la ecuación antes de separar el conjugado de fragmento Fc de inmunoglobulina-polipéptido fisiológicamente activo.
15. El método de la reivindicación 11, en donde el polipéptido fisiológicamente activo se selecciona del grupo que consiste en insulina, interferones, hormona de crecimiento humana (hGH) y agonista del receptor de GLP-1
- 45 16. El método de la reivindicación 11, en donde
 (a) el fragmento Fc de inmunoglobulina que comprende la región de unión a FcRn comprende un dominio CH2, un dominio CH3 o ambos;
 (b) el fragmento Fc de inmunoglobulina está en una forma no glicosilada;
 (c) el fragmento Fc de inmunoglobulina comprende además una región bisagra;
 50 (d) el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc derivado del grupo que consiste en IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, combinaciones de estos e híbridos de estos; o
 (e) el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.

Figura 1

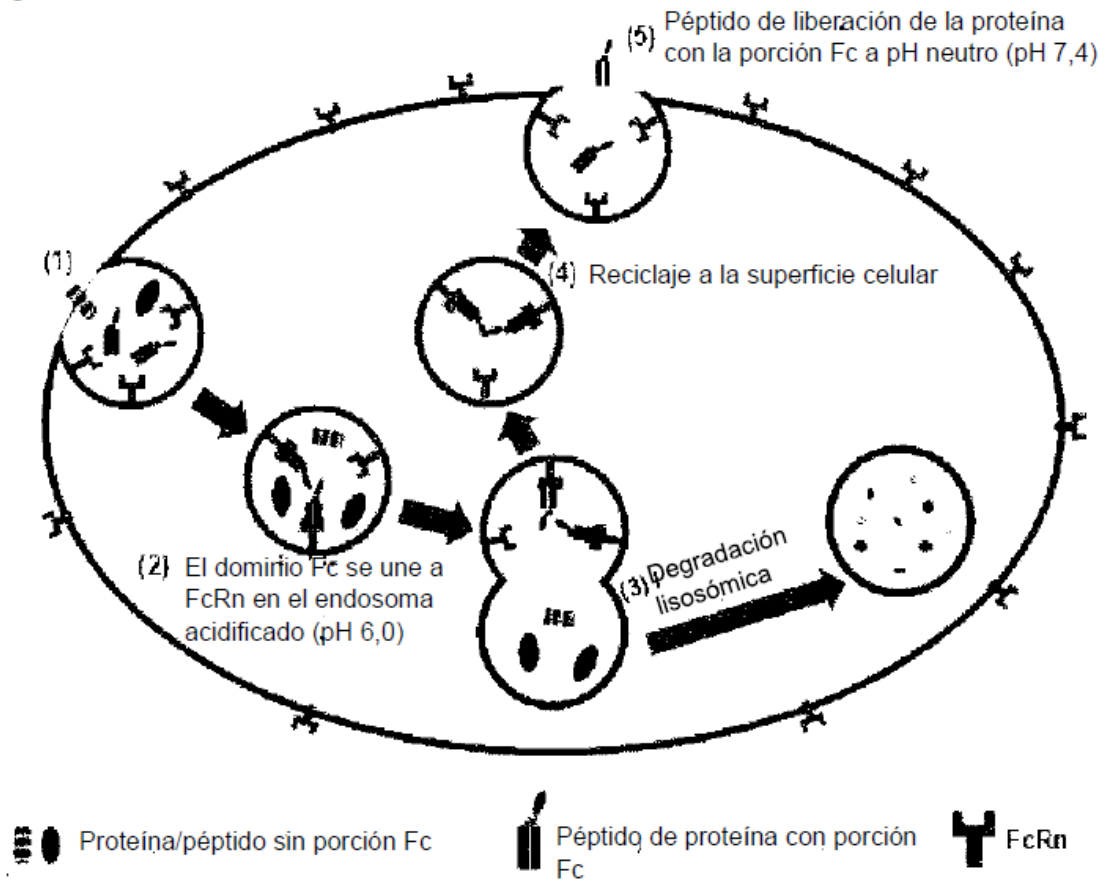


Figura 2

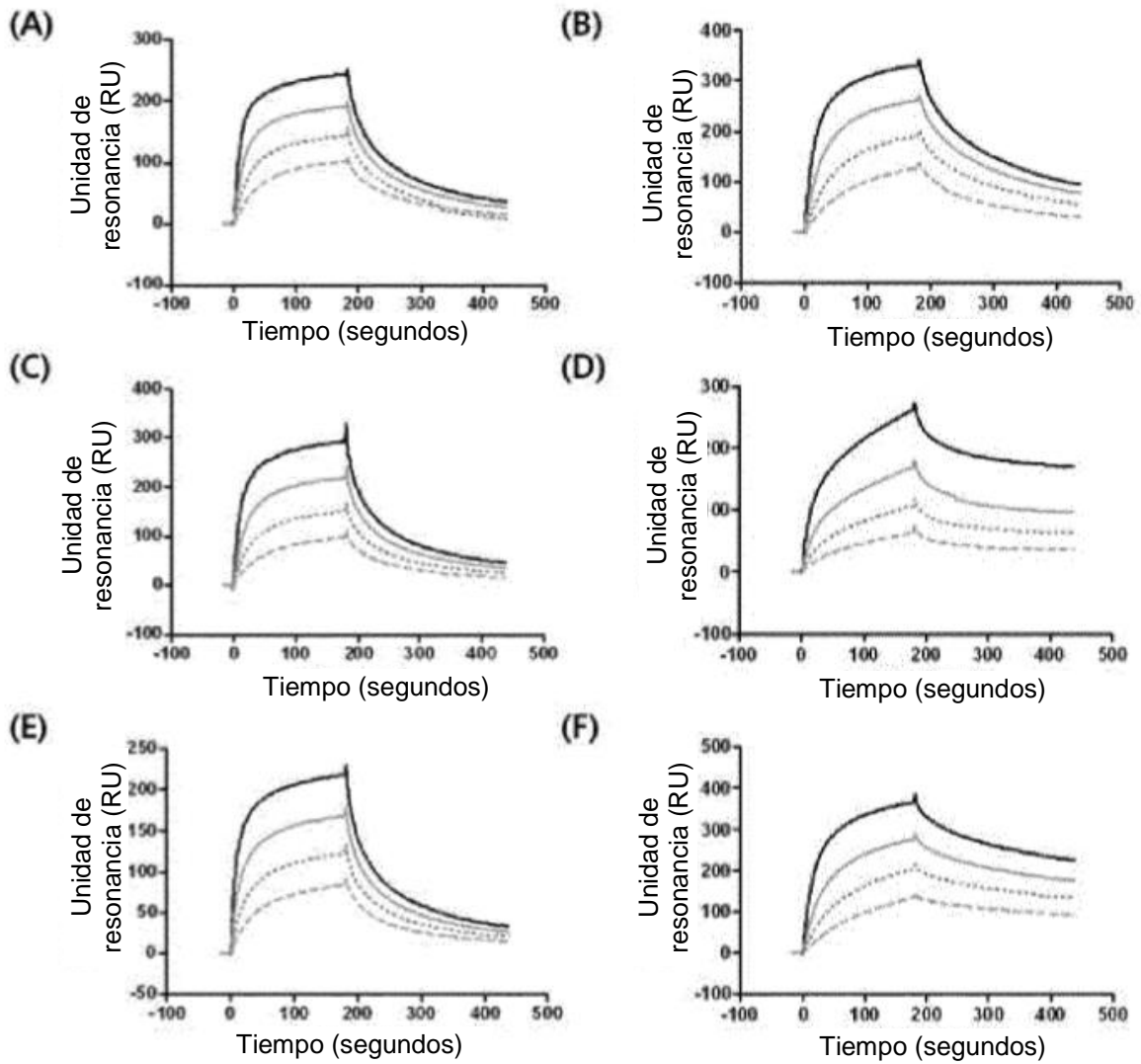


Figura 3

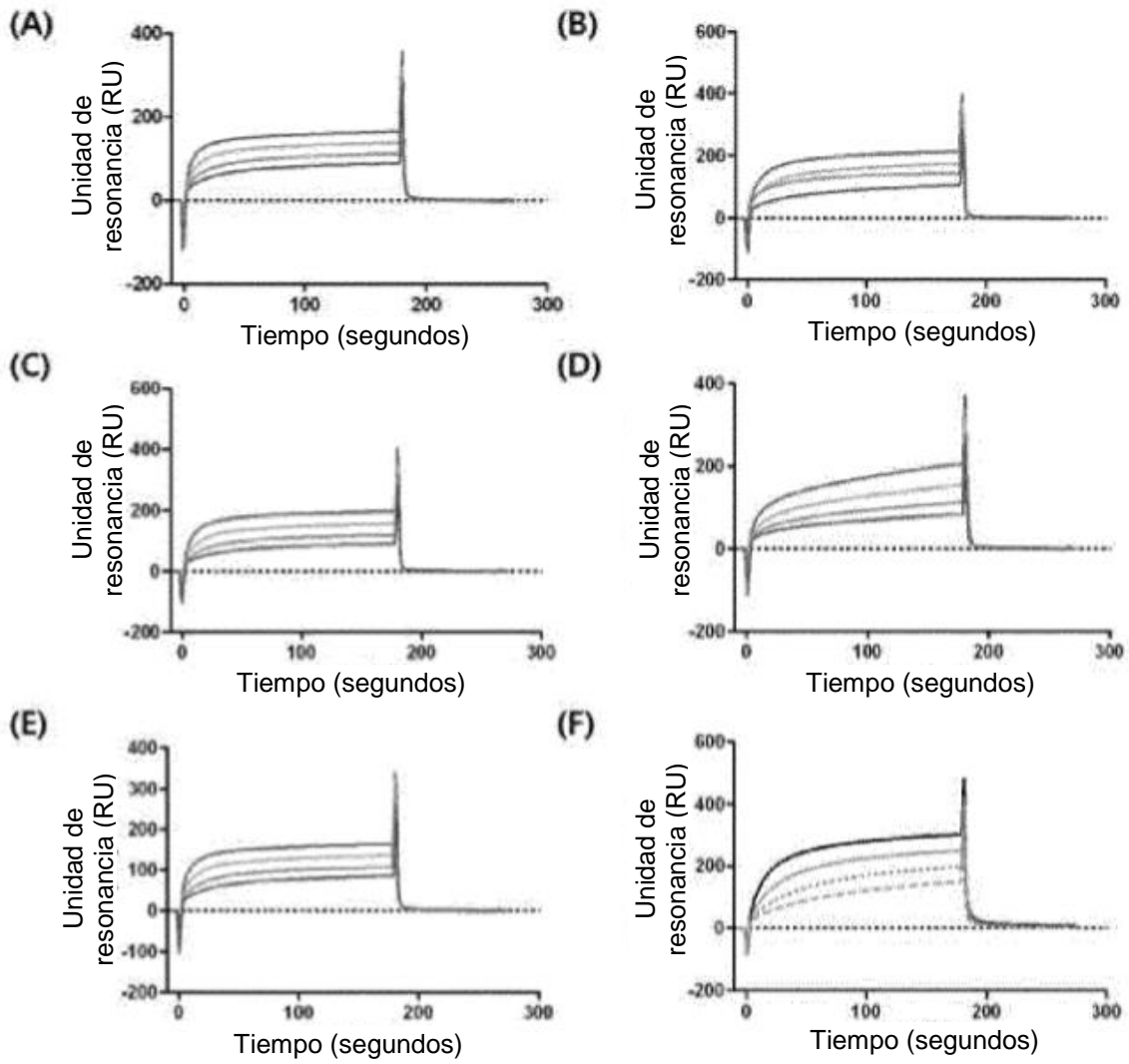


Figura 4

