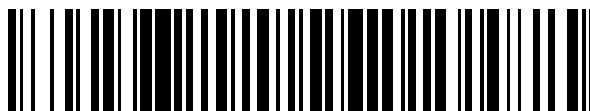


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 169**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.11.2004 E 04800092 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2013 EP 1682584**

54 Título: **Composición farmacéutica que comprende una región Fc de inmunoglobulina como portador**

30 Prioridad:

13.11.2003 KR 2003080299

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

21.10.2013

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**KIM, YOUNG MIN;
SONG, DAE HAE;
JUNG, SUNG YOUB;
KIM, CHANG HWAN;
CHOI, IN YOUNG;
KWON, SE CHANG y
LEE, GWAN SUN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 426 169 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

Composición farmacéutica que comprende una región Fc de inmunoglobulina como portador

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un uso novedoso de un fragmento Fc de inmunoglobulina. Más particularmente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador, y a un método para mejorar la duración *in vivo* de la acción de un fármaco unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina.

Técnica anterior

10 En el pasado, un gran número de farmacólogos y químicos se han esforzado por alterar y/o modificar químicamente la actividad *in vivo* de moléculas fisiológicamente activas que existen de manera natural. Estos esfuerzos se centraron principalmente en aumentar o prolongar cierta actividad *in vivo*, reducir la toxicidad, eliminar o reducir los efectos secundarios o modificar actividades fisiológicas específicas de las sustancias fisiológicamente activas. Cuando se modifica químicamente una sustancia fisiológicamente activa, en muchos casos pierde parte o la mayoría de sus actividades fisiológicas. Sin embargo, en algunos casos, la modificación puede dar como resultado un

15 aumento o cambio de la actividad fisiológica. Con respecto a esto, muchos estudios se han centrado en la modificación química que puede lograr una actividad fisiológica deseada, y la mayoría de tales estudios han implicado unir covalentemente una sustancia fisiológicamente activa (fármaco) a un portador fisiológicamente aceptable.

20 Por ejemplo, la publicación de patente internacional n.º WO 01/93911 emplea un polímero que tiene una pluralidad de restos ácidos como portador de fármaco. La publicación de patente internacional n.º WO 03/00778 da a conocer copolímeros de bloque anfífilos que contienen grupos aniónicos que, cuando se usan como portador de fármaco para un fármaco catiónico, mejoran la estabilidad del fármaco. La patente europea n.º 0 681 481 describe un método para mejorar las propiedades de fármacos básicos usando ciclodextrina y ácidos como portadores. Por otro lado, los fármacos hidrófobos tienen baja estabilidad *in vivo* principalmente debido a su baja solubilidad acuosa. Para mejorar

25 la baja solubilidad acuosa de los fármacos hidrófobos, la publicación de patente internacional n.º WO 04/064731 emplea un lípido como portador. Sin embargo, hasta la fecha, no hay ningún informe sobre el uso de un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador de fármaco.

30 Normalmente, dado que los polipéptidos se desnaturalizan de manera relativamente fácil debido a su baja estabilidad, se degradan mediante enzimas proteolíticas en la sangre y se eliminan fácilmente a través del riñón o del hígado, los medicamentos proteicos, que incluyen polipéptidos como componentes farmacéuticamente eficaces, necesitan administrarse con frecuencia a pacientes para mantener títulos y concentraciones de nivel en sangre deseados. Sin embargo, esta administración frecuente de medicamentos proteicos, especialmente mediante inyección, provoca dolor a los pacientes. Para solucionar estos problemas, se han hecho muchos esfuerzos para mejorar la estabilidad en suero de fármacos proteicos y mantener los fármacos en la sangre a altos niveles durante

35 un periodo de tiempo prolongado, y por tanto maximizar la eficacia farmacéutica de los fármacos. Por tanto, las composiciones farmacéuticas con actividad sostenida necesitan aumentar la estabilidad de fármacos proteicos y mantener los títulos a niveles suficientemente altos sin provocar respuestas inmunitarias en pacientes.

40 Para estabilizar proteínas y prevenir la degradación enzimática y el aclaramiento por los riñones, convencionalmente se usó un polímero que tenía una alta solubilidad, tal como polietilenglicol (denominado simplemente "PEG" a continuación en el presente documento), para modificar químicamente la superficie de un fármaco proteico. Mediante unión a regiones específicas o diversas de una proteína diana, PEG estabiliza la proteína y previene la hidrólisis, sin provocar efectos secundarios graves (Sada *et al.*, J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Sin embargo, a pesar de esta capacidad para potenciar la estabilidad de proteína, este acoplamiento de PEG tiene problemas tales como reducir enormemente el número de títulos de proteínas fisiológicamente "activas". Además el

45 rendimiento disminuye con el aumento del peso molecular de PEG debido a la reactividad reducida con las proteínas.

Recientemente, se han sugerido conjugados de polímero-fármaco proteico. Por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.738.846, puede prepararse un conjugado uniendo un fármaco proteico idéntico a ambos extremos de PEG para mejorar la actividad del fármaco proteico. Además, tal como se describe en la

50 publicación de patente internacional n.º WO 92/16221, pueden unirse dos fármacos proteicos diferentes a ambos extremos de PEG para proporcionar un conjugado que tiene dos actividades diferentes. Sin embargo, métodos anteriores no fueron muy satisfactorios en mantener la actividad de fármacos proteicos.

Por otro lado, Kinstler *et al.* notificaron que una proteína de fusión preparada acoplado factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) a albúmina humana mostró una estabilidad mejorada (Kinstler *et al.*, Pharmaceutical Research 12(12): 1883-1888, 1995). En esta publicación, sin embargo, dado que el fármaco modificado, que tiene una estructura de G-CSF-PEG-albúmina, sólo mostró un aumento de aproximadamente cuatro veces en el tiempo de residencia en el organismo y un aumento ligero en la semivida sérica en comparación con la

55 administración individual de G-CSF nativo, no se ha industrializado como formulación de acción prolongada eficaz

para fármacos proteicos.

Un método alternativo para mejorar la estabilidad *in vivo* de proteínas fisiológicamente activas es uniendo un gen de proteína fisiológicamente activa a un gen que codifica para una proteína que tiene una alta estabilidad en suero mediante tecnología de recombinación genética y cultivando las células transfectadas con el gen recombinante para producir una proteína de fusión. Por ejemplo, puede prepararse una proteína de fusión conjugando albúmina, una proteína que se sabe que es la más eficaz en potenciar la estabilidad de proteína, o su fragmento a una proteína fisiológicamente activa de interés mediante recombinación genética (publicaciones de patente internacional n.ºs WO 93/15199 y WO 93/15200, publicación de patente europea n.º 413.622). Una proteína de fusión de interferón-alfa y albúmina, desarrollada por Human Genome Science Company y comercializada con el nombre comercial "AlbuferonTM", aumentó la semivida desde 5 horas hasta 93 horas en monos, pero se sabía que era problemática porque redujo la actividad *in vivo* hasta menos del 5% de interferón-alfa no modificado (Osborn *et al.*, J. Phar. Exp. Ther. 303(2): 540-548, 2002).

Se aplicaron tecnologías de ADN recombinante para fusionar un fármaco proteico a un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, se expresaron previamente interferón (publicación de patente coreana abierta a consulta por el público n.º 2003-9464) y receptor de interleucina 4, receptor de interleucina 7 o receptor de eritropoyetina (EPO) (registro de patente coreana n.º 249572) en mamíferos en una forma fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina. La publicación de patente internacional n.º WO 01/03737 describe una proteína de fusión que comprende una citocina o factor de crecimiento unido a un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante enlace peptídico. Además, la patente estadounidense n.º 5.116.964 da a conocer proteínas fusionadas al extremo amino o carboxilo terminal de un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante recombinación genética. La patente estadounidense n.º 5.349.053 da a conocer una proteína de fusión que comprende IL-2 fusionada a un fragmento Fc de inmunoglobulina mediante enlace peptídico. Otros ejemplos de proteínas de fusión de Fc preparadas mediante recombinación genética incluyen una proteína de fusión de interferón beta o su derivado y un fragmento Fc de inmunoglobulina (publicación de patente internacional n.º WO 00/23472), y una proteína de fusión de receptor de IL-5 y un fragmento Fc de inmunoglobulina (patente estadounidense n.º 5.712.121), una proteína de fusión de interferón alfa y el fragmento Fc de inmunoglobulina G4 (patente estadounidense n.º 5.723.125), y una proteína de fusión de proteína CD4 y el fragmento Fc de inmunoglobulina G2 (patente estadounidense n.º 6.451.313).

También se conocen técnicas que implican la modificación de residuos de aminoácido de un fragmento Fc de inmunoglobulina. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.605.690 da a conocer una proteína de fusión de Fc de TNFR-IgG1, que se prepara mediante recombinación genética usando un fragmento Fc de IgG1 que tiene alteraciones de aminoácidos en la región de unión a complemento o la región de unión a receptor. Además, se dan a conocer otros métodos de preparación de una proteína de fusión usando un fragmento Fc de inmunoglobulina modificado mediante recombinación genética en las patentes estadounidenses n.ºs 6.277.375, 6.410.008 y 6.444.792.

Tales proteínas de fusión de Fc producidas mediante recombinación genética tienen las siguientes desventajas: la fusión de la proteína sólo se produce en una región específica de un fragmento Fc de inmunoglobulina, que está en un extremo amino o carboxilo terminal; sólo se producen formas homodiméricas y no formas monoméricas; y una fusión sólo puede tener lugar entre las proteínas glicosiladas o entre las proteínas aglicosiladas, y es imposible preparar una proteína de fusión compuesta por una proteína glicosilada y una proteína aglicosilada. Además, una nueva secuencia de aminoácidos creada por la fusión puede desencadenar respuestas inmunitarias, y una región de unión puede volverse sensible a la degradación proteolítica.

El documento WO 02/066514 A simplemente da a conocer proteínas de fusión de polipéptidos farmacéuticamente activos y fragmentos de Fc, en las que la unión entre ellos está formada mediante fusión recombinante. El documento WO 02/066514 A no menciona nada sobre un conjugado de fragmento Fc de IgG-polipéptido distinto de fusión.

El documento US-A-5 045 312 se refiere a un uso terapéutico de una GH fisiológicamente activa conjugada a un ligando, particularmente un ligando de IgG, en el que dicha GH está unida a dicho ligando mediante un agente de reticulación que tiene dos grupos reactivos. El documento US-A-5 045 312 simplemente usa IgG como anticuerpo completo, no como fragmento Fc para un ligando para mejorar la actividad de GH, el documento US-A-5 045 312 sólo da a conocer un conjugado de una IgG y GH unidas mediante un enlazador químico.

El documento WO 01/81415 A2 se refiere a un agente terapéutico que modula las actividades de PTH (paratiroides) y THrP (proteína relacionada con el paratiroides), y da a conocer un dominio de Fc como portador deseable y que puede usarse un enlazador no peptídico. Sin embargo, el documento WO 01/81415 A2 sólo da a conocer conjugados de PTH-Fc y PTHrP-Fc producidos como proteína de fusión mediante un método recombinante, pero no enseña ni sugiere un conjugado de PTH-enlazador-Fc en el que se usa un enlazador no peptídico.

Para solucionar estos problemas, los inventores de la presente solicitud realizaron una investigación, y descubrieron que, cuando se administra un fármaco en forma unida a un fragmento Fc de IgG, el fármaco tiene estabilidad *in vivo* mejorada al tiempo que muestra una reducción mínima en la actividad *in vivo*.

Descripción de la invención

Por tanto, un objeto de la presente invención es proporcionar una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador, en la que dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está unido covalentemente a un fármaco que es un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico, en la que el polipéptido fisiológicamente activo es la hormona del crecimiento humana (hGH), en la que la unión entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco no es una fusión mediante recombinación genética, y en la que el enlazador no peptídico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxiethylados, polialcoholes vinílicos, polisacáridos, dextranos, polivinil éteres, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas y ácidos hialurónicos.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para mejorar la duración *in vivo* de la acción de un fármaco mediante el uso *in vitro* de un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador.

Breve descripción de los dibujos

Los objetos anteriores y otros, las características y otras ventajas de la presente invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada tomada junto con los dibujos adjuntos, en los que:

la figura 1 muestra los resultados de cromatografía de un fragmento Fc de inmunoglobulina obtenido mediante escisión de una inmunoglobulina con papaína;

la figura 2 muestra los resultados de SDS-PAGE de un fragmento Fc de inmunoglobulina purificado (M: marcador de tamaño molecular, carril 1: IgG, carril 2: Fc);

la figura 3 muestra los resultados de SDS-PAGE de conjugados de IFN α -PEG-Fc (A), ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y EPO-PEG-Fc (C), que se generan mediante una reacción de acoplamiento (M: marcador de tamaño molecular, carril 1: Fc, carril 2: proteína fisiológicamente activa, carril 3: conjugado de proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc);

la figura 4 muestra los resultados de cromatografía de exclusión molecular de un conjugado de IFN α -PEG-Fc que se purifica tras una reacción de acoplamiento;

la figura 5 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado de EPO-PEG-Fc;

las figuras 6a y 6b muestran los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF y análisis de SDS-PAGE, respectivamente, de un Fc de inmunoglobulina nativo y de un Fc de inmunoglobulina desglucosilado (DG Fc);

la figura 7 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de un conjugado de IFN α -PEG-Fc y un conjugado de IFN α -PEG-DG Fc;

las figuras 8a a 8c muestran los resultados de HPLC de fase inversa de conjugados de IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc e IFN α -PEG-derivado de AG Fc recombinante;

la figura 9 es un gráfico que muestra los resultados de análisis farmacocinético de una IFN α nativa, un complejo de IFN α -PEG 40 K, un conjugado de IFN α -PEG-albúmina y un conjugado de IFN α -PEG-Fc;

la figura 10 es un gráfico que muestra los resultados de análisis farmacocinético de una EPO nativa, una EPO altamente glicosilada, un conjugado de EPO-PEG-Fc y un conjugado de EPO-PEG-AG Fc;

la figura 11 es un gráfico que muestra los resultados de análisis farmacocinético de conjugados de IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc e IFN α -PEG-AG Fc recombinante;

la figura 12 es un gráfico que muestra la farmacocinética de un Fab', un complejo de Fab'-S-PEG 40 K, un conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc;

la figura 13 es un gráfico que muestra las actividades *in vivo* de Fab', un complejo de Fab'-S-PEG 40 K, un conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc y un conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc;

la figura 14 es un gráfico que muestra los resultados de comparación de subclases de IgG humana para la afinidad de unión al complemento C1q; y

la figura 15 es un gráfico que muestra los resultados de comparación de un Fc glicosilado, un DG Fc enzimáticamente desglucosilado y un conjugado de interferón-PEG-portador en el que el portador es AG Fc producido por *E. coli* para determinar la afinidad de unión al complemento C1q.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador.

El término "portador", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia unida a un fármaco, que normalmente aumenta, reduce o elimina la actividad fisiológica del fármaco uniéndose al fármaco. Sin embargo, con respecto a los objetos de la presente invención, en la presente invención se emplea un portador para minimizar una reducción en la actividad fisiológica de un fármaco de interés, unido al portador, mientras que se potencia la estabilidad *in vivo* del fármaco.

Para lograr los objetos de la presente invención, la presente invención se caracteriza por emplear un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador.

Resulta seguro usar el fragmento Fc de inmunoglobulina como un portador de fármaco porque es un polipéptido biodegradable que se metaboliza en el organismo. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina tiene un peso molecular relativamente bajo en comparación con la molécula de inmunoglobulina completa, siendo por tanto ventajoso en la preparación, purificación y rendimiento de conjugados debido a. Además, dado que el fragmento Fc de inmunoglobulina no contiene el fragmento Fab, cuya secuencia de aminoácidos se diferencia entre subclases de anticuerpos y que por tanto es altamente no homogénea, puede aumentarse enormemente la homogeneidad de sustancias y ser menos antigénicas.

El término "fragmento Fc de inmunoglobulina", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína que contiene la región constante de cadena pesada 2 (C_{H2}) y la región constante de cadena pesada 3 (C_{H3}) de una inmunoglobulina, y no las regiones variables de las cadenas pesada y ligera, la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}) de la inmunoglobulina. Puede incluir además la región de bisagra en la región constante de cadena pesada. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede contener una parte o la totalidad de la región constante de cadena pesada 1 (C_{H1}) y/o la región constante de cadena ligera 1 (C_{L1}), excepto por las regiones variables de las cadenas pesada y ligera. Además, siempre que tenga una función fisiológica sustancialmente similar o superior a la proteína nativa el fragmento Fc de IgG puede ser un fragmento que tiene una delección en una parte relativamente larga de la secuencia de aminoácidos de C_{H2} y/o C_{H3}. Es decir, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede comprender 1) un dominio C_{H1}, un dominio C_{H2}, un dominio C_{H3} y un dominio C_{H4}, 2) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H2}, 3) un dominio C_{H1} y un dominio C_{H3}, 4) un dominio C_{H2} y un dominio C_{H3}, 5) una combinación de uno o más dominios y una región de bisagra de inmunoglobulina (o una parte de la región de bisagra), y 6) un dímero de cada dominio de las regiones constantes de cadena pesada y la región constante de cadena ligera.

El fragmento Fc de la presente invención incluye una secuencia de aminoácidos nativa y derivados de secuencia (mutantes) de la misma. Un derivado de secuencia de aminoácidos es una secuencia que es diferente de la secuencia de aminoácidos nativa debido a una delección, una inserción, una sustitución no conservativa o conservativa o combinaciones de las mismas de uno o más residuos de aminoácido. Por ejemplo, en un Fc de IgG, pueden usarse residuos de aminoácido que se sabe que son importantes en la unión, en las posiciones de 214 a 238, de 297 a 299, de 318 a 322 o de 327 a 331, como diana adecuada para la modificación. Además, son posibles otros diversos derivados, incluyendo uno en el que se deleciona una región que puede formar un enlace disulfuro, o se eliminan determinados residuos de aminoácido en el extremo N-terminal de una forma de Fc nativa o se añade un residuo de metionina al mismo. Además, para eliminar funciones efectoras, puede producirse una delección en un sitio de unión a complemento, tal como un sitio de unión a C1q y un sitio de ADCC. Se dan a conocer técnicas de preparación de tales derivados de secuencia del fragmento Fc de inmunoglobulina en las publicaciones de patente internacional n.^{os} WO 97/34631 y WO 96/32478.

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

Además, si se desea, puede modificarse el fragmento Fc mediante fosforilación, sulfatación, acrilación, glicosilación, metilación, farnesilación, acetilación, amidación y similares.

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

Además, estos fragmentos Fc pueden obtenerse a partir de formas nativas aisladas de seres humanos y otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, o pueden ser recombinantes o derivados de las mismas, obtenidos a partir de microorganismos o células de animales transformadas. En el presente documento, pueden obtenerse a partir de una inmunoglobulina nativa aislando las inmunoglobulinas completas a partir de organismos humanos o animales y tratándolas con una enzima proteolítica. La papaína digiere la inmunoglobulina nativa para dar fragmentos Fab y Fc, y el tratamiento con pepsina da como resultado la producción de fragmentos pF_c y F(ab')₂. Estos fragmentos pueden someterse, por ejemplo, a cromatografía de exclusión molecular para aislar Fc o pF_c.

Preferiblemente, un fragmento Fc derivado de ser humano es un fragmento Fc de inmunoglobulina recombinante que se obtiene a partir de un microorganismo.

5 Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede estar en la forma que tiene cadenas de azúcar nativas, aumento de las cadenas de azúcar en comparación con una forma nativa o reducción de las cadenas de azúcar en comparación con la forma nativa, o pueden estar en una forma desglucosilada. El aumento, la reducción o la eliminación de las cadenas de azúcar de Fc de inmunoglobulina puede lograrse mediante métodos comunes en la técnica, tales como un método químico, un método enzimático y un método de ingeniería genética usando un microorganismo. La eliminación de cadenas de azúcar de un fragmento Fc da como resultado una brusca reducción de la afinidad de unión a la parte de C1q del primer componente de complemento C1 y una reducción o pérdida de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC), no induciendo por tanto respuestas inmunitarias innecesarias *in vivo*. Con respecto a esto, un fragmento Fc de inmunoglobulina en una forma desglucosilada o aglicosilada puede ser más adecuado para el objeto de la presente invención como portador de fármaco.

15 Tal como se usa en el presente documento, el término “desglucosilación” se refiere a que los restos de azúcar se eliminan enzimáticamente de un fragmento Fc, y el término “aglicosilación” significa que un fragmento Fc se produce en una forma no glicosilada por una procarionota, preferiblemente *E. coli*.

20 Por otro lado, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede derivarse de seres humanos o de otros animales incluyendo vacas, cabras, cerdos, ratones, conejos, hámsteres, ratas y cobayas, y preferiblemente seres humanos. Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina puede ser un fragmento Fc que se deriva de IgG, IgA, IgD, IgE e IgM, o que se prepara mediante combinaciones de las mismas o híbridos de las mismas. Preferiblemente, se deriva de IgG o IgM, que están entre las proteínas más abundantes en la sangre humana, y lo más preferiblemente de IgG, que se sabe que potencia las semividas de proteínas de unión a ligando.

25 Por otro lado, el término “combinación”, tal como se usa en el presente documento, significa que polipéptidos que codifican para fragmentos Fc de inmunoglobulina monocatenarios del mismo origen están unidos a un polipéptido monocatenario de origen diferente para formar un dímero o multímero. Es decir, puede formarse un dímero o multímero a partir de dos o más fragmentos seleccionados del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4.

30 El término “híbrido”, tal como se usa en el presente documento, significa que están presentes secuencias que codifican para dos o más fragmentos Fc de inmunoglobulina de origen diferente en un fragmento Fc de inmunoglobulina monocatenario. En la presente invención, son posibles diversos tipos de híbridos. Es decir, los híbridos de dominios pueden estar compuestos por de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4 de Fc de IgG1, Fc de IgG2, Fc de IgG3 y Fc de IgG4, y pueden incluir la región de bisagra.

35 Por otro lado, IgG se divide en las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y la presente invención incluye combinaciones e híbridos de las mismas. Se prefieren las subclases IgG2 e IgG4, y lo más preferido es el fragmento Fc de IgG4 que con poca frecuencia tiene funciones efectoras tales como CDC (citotoxicidad dependiente de complemento) (véanse las figuras 14 y 15).

40 Es decir, como portador de fármaco de la presente invención, el fragmento Fc de inmunoglobulina más preferible es un fragmento Fc no glicosilado derivado de IgG4 humana. El fragmento Fc derivado de ser humano es más preferible que un fragmento Fc no derivado de ser humano, que puede actuar como antígeno en el cuerpo humano y provocar respuestas inmunitarias indeseables tales como la producción de un nuevo anticuerpo frente al antígeno.

El fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, preparado tal como se describió anteriormente, actúa como portador de fármaco y forma un conjugado con un fármaco.

El término “conjugado de fármaco” o “conjugado”, tal como se usa en el presente documento, significa que uno o más fármacos están unidos a uno o más fragmentos Fc de inmunoglobulina.

45 El término “fármaco”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a una sustancia que presenta actividad terapéutica cuando se administra a seres humanos o animales, y el fármaco es un fármaco polipeptídico.

50 Los términos “polipéptido fisiológicamente activo”, “proteína fisiológicamente activa”, “polipéptido activo” “fármaco polipeptídico” y “fármaco proteico”, tal como se usan en el presente documento, son intercambiables en cuanto a sus significados y se caracterizan porque están en una forma fisiológicamente activa que muestra diversas funciones fisiológicas *in vivo*.

55 El fármaco polipeptídico tiene la desventaja de no poder mantener una acción fisiológica durante un largo periodo de tiempo debido a su propiedad de desnaturalizarse o degradarse fácilmente por enzimas proteolíticas presentes en el organismo. Sin embargo, cuando el fármaco polipeptídico se conjuga con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención para formar un conjugado, el fármaco tiene un aumento de la estabilidad estructural y semivida de degradación. Además, el polipéptido conjugado con el fragmento Fc tiene una disminución de la actividad fisiológica mucho menor que otras formulaciones de fármacos polipeptídicos conocidas. Por tanto, en comparación

con la biodisponibilidad *in vivo* de fármacos polipeptídicos convencionales, el conjugado del polipéptido y el fragmento Fc de inmunoglobulina según la presente invención se caracteriza por tener una biodisponibilidad *in vivo* notablemente mejorada. Esto también se describe claramente mediante realizaciones de la presente invención. Es decir, cuando se unieron al fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, IFN α , G-CSF, hGH y otros fármacos proteicos presentaron un aumento de aproximadamente dos a seis veces de la biodisponibilidad *in vivo* en comparación con sus formas convencionales conjugadas a PEG solo o tanto a PEG como a albúmina (tablas 8, 9 y 10).

Por otro lado, la unión de una proteína y el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención se caracteriza porque no es una fusión mediante un método de recombinación convencional. Una forma de fusión del fragmento Fc de inmunoglobulina y un polipéptido activo usado como fármaco mediante un método de recombinación se obtiene de tal manera que el polipéptido está unido al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del fragmento Fc, y por tanto se expresa y se pliega como un único polipéptido a partir de una secuencia de nucleótidos que codifica para la forma de fusión.

Esto provoca una brusca disminución en la actividad de la proteína de fusión resultante porque la actividad de una proteína como sustancia fisiológicamente funcional está determinada por la conformación de la proteína. Por tanto, cuando se fusiona un fármaco polipeptídico con Fc mediante un método de recombinación, no hay ningún efecto con respecto a la biodisponibilidad *in vivo* incluso cuando la proteína de fusión tiene una estabilidad estructural aumentada. Además, dado que con frecuencia una proteína de fusión de este tipo se pliega de manera errónea y por tanto se expresa como cuerpos de inclusión, el método de fusión no es económico en cuanto al rendimiento de producción y aislamiento de proteínas. Además, cuando la forma activa de un polipéptido está en una forma glicosilada, el polipéptido debe expresarse en células eucariotas. En este caso, Fc también está glicosilado, y esta glicosilación puede provocar respuestas inmunitarias no adecuadas *in vivo*.

Es decir, sólo la presente invención hace posible producir un conjugado de un polipéptido activo glicosilado y fragmento Fc de inmunoglobulina aglicosilado, y supera todos los problemas anteriores, incluyendo mejorar el rendimiento de producción de proteínas, porque los dos componentes del complejo se preparan y se aíslan de manera individual mediante los mejores sistemas.

El fármaco proteico que está conjugado con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención es la hormona del crecimiento humana.

El polipéptido fisiológicamente activo, hormona del crecimiento humana, requiere una dosificación frecuente tras la administración al organismo para la terapia o prevención de enfermedades. Además, determinados derivados se incluyen en el alcance de los polipéptidos fisiológicamente activos de la presente invención siempre que tengan función, estructura, actividad o estabilidad sustancialmente idénticas o mejoradas en comparación con formas nativas de los polipéptidos fisiológicamente activos.

Por otro lado, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención puede formar un conjugado unido a un fármaco mediante un enlazador.

Este enlazador es un enlazador no peptídico y se prefiere más un polímero no peptídico.

El término "enlazador peptídico", tal como se usa en el presente documento, significa aminoácidos, y preferiblemente de 1 a 20 aminoácidos, que están linealmente unidos entre sí mediante enlace peptídico, y puede estar en una forma glicosilada. Con respecto a los objetos de la presente invención, se prefiere una forma aglicosilada. Este enlazador peptídico es preferiblemente un péptido que tiene una unidad de repetición de Gly y Ser, que es inmunológicamente inactiva para células T.

El término "polímero no peptídico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un polímero biocompatible que incluye dos o más unidades de repetición unidas entre sí mediante un enlace covalente excluyendo el enlace peptídico. El polímero no peptídico incluye polietilenglicol, polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, poli(alcohol vinílico), polisacáridos, dextrano, poli(vinil éter), polímeros biodegradables tales como PLA (poli(ácido láctico) y PLGA (poli(ácido láctico-glicólico), polímeros lipídicos, quitinas y ácido hialurónico. El más preferido es polietilenglicol (PEG).

El conjugado de la presente invención, fragmento Fc de inmunoglobulina-fármaco o fragmento Fc de inmunoglobulina-enlazador-fármaco, se prepara a diversas razones molares. Es decir, el número del fragmento Fc de inmunoglobulina y/o enlazador unido a un único fármaco polipeptídico no está limitado. Sin embargo, preferiblemente, en el fármaco conjugado de la presente invención, el fármaco y el fragmento Fc de inmunoglobulina están conjugados entre sí a una razón molar de 1:1 a 10:1, y preferiblemente de 1:1 a 2:1.

Además, la unión del fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, un determinado enlazador y un determinado fármaco incluye todos los enlaces covalentes excepto un enlace peptídico formado cuando el fragmento Fc y un fármaco polipeptídico se expresan como una proteína de fusión mediante recombinación genética. Con respecto a la actividad fisiológica del fármaco, la unión se realiza mediante enlaces covalentes.

Además, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, un determinado enlazador y un determinado fármaco pueden unirse entre sí en un determinado sitio del fármaco. Por otro lado, el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención y un fármaco polipeptídico pueden unirse entre sí en un extremo N-terminal o extremo C-terminal, y preferiblemente en un grupo libre, y se forma fácilmente un enlace covalente entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco especialmente en un extremo amino-terminal, un grupo amino de un residuo de lisina, un grupo amino de un residuo de histidina, o un residuo de cisteína libre.

Por otro lado, la unión del fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención, un determinado enlazador y un determinado fármaco puede realizarse en una determinada dirección. Es decir, el enlazador puede unirse al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un grupo libre del fragmento Fc de inmunoglobulina, y también puede unirse al extremo N-terminal, al extremo C-terminal o a un grupo libre del fármaco proteico. Cuando el enlazador es un enlazador peptídico, la unión puede tener lugar en un determinado sitio de unión.

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

Por otro lado, la composición farmacéutica de la presente invención, que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador puede administrarse mediante una variedad de vías.

El término "administración", tal como se usa en el presente documento, significa introducción de una cantidad predeterminada de una sustancia en un paciente mediante un determinado método adecuado. El conjugado de la presente invención puede administrarse mediante cualquiera de las vías comunes, siempre que pueda alcanzar un tejido deseado. Se contempla una variedad de modos de administración, incluyendo por vía intraperitoneal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, oral, tópica, intranasal, intrapulmonar e intrarrectal, pero la presente invención no se limita a estos modos de administración mostrados a modo de ejemplo. Sin embargo, dado que los péptidos se digieren tras la administración oral, los principios activos de una composición para administración oral deben recubrirse o formularse para su protección frente a la degradación en el estómago. Preferiblemente, la presente composición puede administrarse en una forma inyectable. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede administrarse usando un determinado aparato que puede transportar los principios activos al interior de una célula diana.

La composición farmacéutica que comprende el conjugado según la presente invención puede incluir un portador farmacéuticamente aceptable. Para la administración oral, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir aglutinantes, lubricantes, disgregantes, excipientes, solubilizantes, agentes dispersantes, estabilizantes, agentes de suspensión, agentes colorantes y perfumes. Para preparaciones inyectables, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir agentes de tamponamiento, agentes conservantes, analgésicos, solubilizantes, agentes isotónicos y estabilizantes. Para preparaciones para administración tópica, el portador farmacéuticamente aceptable puede incluir bases, excipientes, lubricantes y agentes conservantes. La composición farmacéutica de la presente invención puede formularse en una variedad de formas farmacéuticas en combinación con los portadores farmacéuticamente aceptables mencionados anteriormente. Por ejemplo, para la administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en comprimidos, trociscos, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes u obleas. Para preparaciones inyectables, la composición farmacéutica puede formularse en una forma farmacéutica unitaria, tal como un recipiente de múltiples dosis o una ampolla como forma farmacéutica de una única dosis. La composición farmacéutica también puede formularse en disoluciones, suspensiones, comprimidos, cápsulas y preparaciones de acción prolongada.

Por otro lado, los ejemplos de portadores, excipientes y diluyentes adecuados para las formulaciones farmacéuticas incluyen lactosa, dextrosa, sacarosa, sorbitol, manitol, xilitol, eritritol, maltitol, almidón, caucho de goma arábica, alginato, gelatina, fosfato de calcio, silicato de calcio, celulosa, metilcelulosa, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, agua, hidroxibenzoato de metilo, hidroxibenzoato de propilo, talco, estearato de magnesio y aceites minerales. Además, las formulaciones farmacéuticas pueden incluir adicionalmente cargas, agentes anticoagulantes, lubricantes, humectantes, perfumes, emulsionantes y antisépticos.

Una dosificación sustancial de un fármaco en combinación con el fragmento Fc de inmunoglobulina de la presente invención como portador puede determinarse mediante diversos factores relacionados incluyendo los tipos de enfermedades que van a tratarse, las vías de administración, la edad, el sexo, el peso y la gravedad de la enfermedad del paciente, así como por los tipos de fármaco como componente activo. Dado que la composición farmacéutica de la presente invención tiene una duración muy larga de la de acción *in vivo*, tiene la ventaja de reducir enormemente la frecuencia de administración de fármacos farmacéuticos.

En otro aspecto, otro objeto de la presente invención es proporcionar un método para mejorar la duración *in vivo* de un fármaco mediante el uso *in vitro* de un fragmento Fc de inmunoglobulina.

En una realización de la presente invención, un conjugado de polipéptido fisiológicamente activo-PEG-fragmento Fc

de inmunoglobulina ejerce una estabilidad mucho mayor que un complejo de polipéptido-PEG o un conjugado de polipéptido-PEG-albúmina. Análisis farmacocinéticos revelaron que IFN α tiene una semivida en suero aumentada en aproximadamente 20 veces cuando se une a PEG de 40 kDa (complejo de IFN α -PEG 40 K) y en aproximadamente 10 veces en un conjugado de IFN α -PEG-albúmina, en comparación con la IFN α nativa. En cambio, un conjugado de IFN α -PEG-Fc mostró una semivida notablemente aumentada en aproximadamente 50 veces (véase la tabla 3). Además, se observó el mismo resultado para la proteína diana, hormona del crecimiento humana (hGH). Los conjugados de proteína según la presente invención, cada uno de los cuales comprende la proteína diana hGH unida a PEG-Fc, presentaron aumentos de aproximadamente 10 veces en el tiempo de residencia medio (MRT) y la semivida en suero en comparación con las formas nativas de las proteínas y las formas conjugadas con PEG o PEG-albúmina (véanse las tablas 4 a 7).

Además, cuando se unió un complejo de PEG-Fc a un grupo -SH cerca del extremo C-terminal de un Fab' o del extremo N-terminal del Fab', el conjugado de Fab'-PEG-Fc resultante presentó una semivida en suero de 2 a 3 veces más larga que un complejo de PEG 40 K-Fab' (véase la figura 12).

Además, cuando se preparan conjugados de proteína usando Fc de inmunoglobulina desglucosilado (DG Fc), en el que se eliminan restos de azúcar, y derivados de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante (AG Fc), sus semividas en plasma y su actividad *in vitro* se mantienen similares a los conjugados de proteína preparados usando el Fc nativo (véanse la tabla 3 y las figuras 8 y 11).

Por tanto, dado que los conjugados de proteína de la presente invención tienen semividas en suero y tiempo de residencia medio (MRT) prolongados cuando se aplican al polipéptido fisiológicamente activo, hormona del crecimiento humana, son útiles para desarrollar formulaciones de acción prolongada de los polipéptidos fisiológicamente activos.

Puede obtenerse una mejor comprensión de la presente invención mediante los siguientes ejemplos que se exponen para ilustrar, pero que no debe interpretarse como los límites de la presente invención.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1: Preparación I de conjugado de IFN α -PEG-fragmento Fc de inmunoglobulina

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

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

<Etapa 2> Preparación de complejo de IFN α -PEG

Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa que tenía un grupo reactivo de aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), con interferón alfa 2b humano (hIFN α -2b, PM: 20 kDa) disuelto en tampón fosfato 100 mM en una cantidad de 5 mg/ml a una razón molar IFN α :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. A esta mezcla se le añadió un agente reductor, cianoborohidruro de sodio (NaCNBH₃, Sigma), a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 3 h con agitación suave para permitir que PEG se uniera al extremo amino-terminal de interferón alfa. Para obtener un complejo 1:1 de PEG e interferón alfa, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex^R (Pharmacia). Se eluyó el complejo de IFN α -PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, se retiraron interferón alfa no unido a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dimericos en los que PEG se unió a dos moléculas de interferón alfa. Se concentró el complejo de IFN α -PEG purificado hasta 5 mg/ml. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima de IFN α con respecto a PEG, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

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

Para unir el complejo de IFN α -PEG purificado en la etapa 2 anterior al extremo N-terminal de un fragmento Fc de inmunoglobulina, se disolvió el fragmento Fc de inmunoglobulina (de aproximadamente 53 kDa) preparado en la etapa 1 anterior en tampón fosfato 10 mM y se mezcló con el complejo de IFN α -PEG a una razón molar complejo de IFN α -PEG:Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Tras ajustar la concentración de tampón fosfato de la disolución de reacción hasta 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la disolución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 20 h con agitación suave. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima para el complejo de IFN α -PEG con respecto a Fc, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2.

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

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

EJEMPLO DE REFERENCIA 2: Preparación II de conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc

<Etapa 1> Preparación de complejo de Fc-PEG

Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa que tenía un grupo reactivo de aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater), con el fragmento Fc de inmunoglobulina preparado en la etapa 1 del ejemplo 1 a razones molares Fc:PEG de 1:1, 1: 2,5, 1:5, 1:10 y 1:20, en las que el fragmento Fc de Ig se había disuelto en tampón fosfato 100 mM en una cantidad de 15 mg/ml. A esta mezcla se le añadió un agente reductor, NaCNBH₃ (Sigma), a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 3 h con agitación suave. Para obtener un complejo 1:1 de PEG y Fc, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex^R (Pharmacia). Se eluyó el complejo de Fc-PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se retiraron fragmento Fc de inmunoglobulina no unido a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dimericos en los que PEG se unió a dos moléculas de fragmento Fc de inmunoglobulina. Se concentró complejo de Fc-PEG purificado hasta aproximadamente 15 mg/ml. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima de Fc con respecto a PEG, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:3 a 1:10.

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

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

EJEMPLO 3: Preparación de conjugado de hGH-PEG-Fc

Se preparó y se purificó un conjugado de hGH-PEG-Fc según el mismo método que en el ejemplo 1, excepto porque se usó un fármaco distinto de interferón alfa, hormona del crecimiento humana (hGH, PM: 22 kDa) y la razón molar hGH:PEG fue de 1:5.

EJEMPLO DE REFERENCIA 6: Preparación de conjugado de proteína usando PEG que tiene un grupo reactivo diferente

Se preparó un conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc usando PEG que tenía un grupo reactivo de propionato de succinimidilo (SPA) en ambos extremos, de la siguiente manera. Se mezcló polietilenglicol de 3,4 kDa, SPA-PEG-

55

SPA (Shearwater), con 10 mg de interferón alfa disuelto en tampón fosfato 100 mM a razones molares IFN α :PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 y 1:20. Entonces se dejó reaccionar la mezcla a temperatura ambiente con agitación suave durante 2 h. Para obtener un complejo 1:1 de PEG e interferón alfa (complejo de IFN α -PEG), en el que PEG se unió selectivamente al grupo amino de un residuo de lisina de interferón alfa, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión molecular en Superdex. Se eluyó el complejo de IFN α -PEG de la columna usando tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, y se retiraron interferón alfa no unido a PEG, PEG sin reaccionar y subproductos dimericos en los que dos moléculas de interferón alfa se unieron a ambos extremos de PEG. Para unir el complejo de IFN α -PEG al grupo amino de un residuo de lisina de Fc de inmunoglobulina, se concentró el complejo de IFN α -PEG purificado hasta aproximadamente 5 mg/ml, y se preparó y se purificó un conjugado de IFN α -PEG-Fc según los mismos métodos que en las etapas 3 y 4 del ejemplo 1. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima de IFN α con respecto a PEG, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5.

Por otro lado, se preparó otro conjugado de IFN α -PEG-Fc según los mismos métodos que los descritos anteriormente usando PEG, que tenía un grupo reactivo de N-hidroxisuccinimidilo (NHS) en ambos extremos, NHS-PEG-NHS (Shearwater) o PEG que tenía un grupo reactivo de butilaldehído en ambos extremos, BUA-PEG-BUA (Shearwater).

EJEMPLO DE REFERENCIA 7: Preparación de conjugado de proteína usando PEG que tiene diferente peso molecular

Se preparó un complejo de IFN α -PEG 10 K usando polietilenglicol de 10 kDa que tenía un grupo reactivo de aldehído en ambos extremos, ALD-PEG-ALD (Shearwater). Se preparó y se purificó este complejo según el mismo método que en la etapa 2 del ejemplo 1. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima de IFN α con respecto a PEG de 10 kDa, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2,5 a 1:5. Se concentró el complejo de IFN α -PEG 10 K purificado hasta aproximadamente 5 mg/ml, y, usando este concentrado, se preparó y se purificó un conjugado de IFN α -PEG 10 K-Fc según los mismos métodos que en las etapas 3 y 4 del ejemplo 1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 8: Preparación de conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc (grupo -SH)

<Etapa 1> Expresión y purificación de Fab'

Se hizo crecer un transformante de *E. coli*, BL21/poDLHF (número de registro: KCCM-10511), que expresaba Fab' anti-factor de necrosis tumoral alfa, en 100 ml de medio LB durante la noche con agitación, y se inoculó en un fermentador de 5 l (Marubishi) y se cultivó a 30°C y 500 rpm y a una velocidad de flujo de aire de 20 vvm. Para compensar los nutrientes insuficientes para el crecimiento bacteriano durante la fermentación, se complementario los cultivos con glucosa y extractos de levadura según los estados fermentados de las bacterias. Cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO₆₀₀ de 80-100, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteínas. Se cultivaron adicionalmente los cultivos durante de 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm aumentó hasta de 120 a 140. Se centrifugó el fluido de fermentación así obtenido a 20.000Xg durante 30 min. Se recogió el sobrenadante y se descartó el sedimento.

Se sometió el sobrenadante a la siguiente cromatografía en columna en tres etapas para purificar Fab' anti-factor de necrosis tumoral alfa. Se cargó el sobrenadante sobre una columna de proteína G HiTrap (5 ml, Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato 20 mM (pH 7,0), y se eluyó la columna con glicina 100 mM (pH 3,0). Entonces se cargaron las fracciones de Fab' recogidas sobre una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (PBS, pH 7,3), y se eluyó esta columna con el mismo tampón. Finalmente, se cargaron las segundas fracciones de Fab' en una columna PolyCAT 213250 (PolyLC), y se eluyó esta columna con un gradiente de NaCl lineal de 0,15-0,4 M en tampón acetato 10 mM (pH 4,5), proporcionando así fracciones de Fab' anti-factor de necrosis tumoral alfa altamente puras.

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

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

Tras completarse la reacción, se cambió el tampón de reacción por tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0) para retirar NHS-PEG-MAL no unido. Entonces se cargó la mezcla de reacción en una columna PolyCAT (PolyLC). Se eluyó la columna con un gradiente de NaCl lineal de 0,15-0,5 M en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). Durante esta elución, el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG eluyó antes que Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, y el Fc de Ig sin reaccionar eluyó después, eliminando así las moléculas de Fc de Ig sin reaccionar.

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

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

Tras completarse la reacción, se cargó la mezcla de reacción en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3), y se eluyó la columna con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc acoplado eluyó relativamente antes debido a su alto peso molecular, y complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG y Fab' sin reaccionar eluyeron después, eliminando así las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente Fc de inmunoglobulina-PEG sin reaccionar, se cargaron de nuevo las fracciones de conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc recogidas en una columna PolyCAT 213250 (PolyLC), y se eluyó esta columna con un gradiente de NaCl lineal de 0,15-0,5 M en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0), proporcionando así un conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc puro que comprendía el complejo de Fc-PEG unido a un grupo -SH cerca del extremo C-terminal del Fab'.

EJEMPLO DE REFERENCIA 9: Preparación de conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc (extremo N-terminal)

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

Se disolvieron 40 mg del Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 8 en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 5 mg/ml, y se mezclaron con butil-ALD-PEG-butil-ALD (3,4 kDa, Nektar) a una razón molar Fab':PEG de 1:5. Se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la mezcla de reacción a una concentración final de 20 mM, y entonces se dejó reaccionar la mezcla de reacción a 4°C durante 2 h con agitación suave.

Tras completarse la reacción, se cambió el tampón de reacción por tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0). Entonces se cargó la mezcla de reacción en una columna PolyCAT (PolyLC). Se eluyó la columna con un gradiente de NaCl lineal de 0,15-0,4 M en tampón acetato 20 mM (pH 4,5). Durante esta elución en columna, el complejo de Fab'-PEG que comprendía el enlazador PEG unido al extremo N-terminal del Fab' eluyó antes que Fab' sin reaccionar, y el Fab' sin reaccionar eluyó después, eliminando así las moléculas de Fab' sin reaccionar.

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

Para unir el complejo de Fab'-PEG purificado en la etapa 1 anterior al extremo N-terminal de un Fc de inmunoglobulina, se disolvió el complejo de Fab'-PEG en tampón fosfato de sodio 100 mM (pH 6,0) a una concentración de 10 mg/ml, y se mezcló con el Fc de inmunoglobulina disuelto en el mismo tampón a una razón molar complejo de Fab'-PEG:Fc de 1:5. Tras concentrar la mezcla de reacción hasta una concentración de proteína final de 50 mg/ml, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la mezcla de reacción a una concentración final de 20 mM, y entonces se hizo reaccionar la mezcla de reacción a 4°C durante 24 h con agitación suave.

Tras completarse la reacción, se cargó la mezcla de reacción en una columna Superdex 200 (Pharmacia) equilibrada con tampón fosfato de sodio 10 mM (pH 7,3), y se eluyó la columna con el mismo tampón a una velocidad de flujo de 1 ml/min. El conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc acoplado eluyó relativamente antes debido a su alto peso molecular, y Fc de inmunoglobulina y complejo de Fab'-PEG sin reaccionar eluyeron después, eliminando así las moléculas sin reaccionar. Para eliminar completamente las moléculas de Fc de inmunoglobulina sin reaccionar, se cargaron de nuevo las fracciones de conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc recogidas en una columna PolyCAT 213250 (PolyLC), y se eluyó esta columna con un gradiente de NaCl lineal de 0,15-0,5 M en tampón fosfato de sodio 20 mM (pH 6,0), proporcionando así un conjugado de Fab'-N-PEG-N-Fc puro que comprendía el complejo de Fc de inmunoglobulina-PEG unido al extremo N-terminal del Fab'.

EJEMPLO 10: Preparación y purificación de Fc de inmunoglobulina desglucosilado

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

EJEMPLO DE REFERENCIA 11: Preparación de conjugado de IFN α -PEG-DG Fc

Para unir el Fc de inmunoglobulina desglucosilado preparado en el ejemplo 10 al complejo de IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del ejemplo 1, se mezcló el complejo de IFN α -PEG con el DG Fc disuelto en tampón fosfato 10 mM a razones molares complejo de IFN α -PEG:DG Fc de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Tras ajustar la concentración de tampón fosfato de la disolución de reacción hasta 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la disolución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 20 h con agitación suave. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima de complejo de IFN α -PEG con respecto a DG

Fc, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2.

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

EJEMPLO 12: Preparación y purificación de derivado de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante

<Preparación de vector de expresión 1 de derivado de Fc de IgG4>

20 Para preparar regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina IgG4 humana, se prepararon un primer derivado (delta-Cys de IgG4), que tenía una delección de nueve aminoácidos en el extremo amino-terminal de la región de bisagra nativa, y un segundo derivado (monómero de IgG4), que carecía de la región de bisagra mediante una delección de los doce aminoácidos de la región de bisagra. Como vector de expresión que contenía una secuencia secretora de *E. coli*, se usó pT14S1SH-4T20V22Q (patente coreana n.º 38061), desarrollado antes de la presente invención por la presente invención.

25 Para obtener regiones constantes de cadena pesada de inmunoglobulina IgG4 humana, se llevó a cabo RT-PCR usando ARN aislado a partir de células sanguíneas humanas como molde, de la siguiente manera. En primer lugar, se aisló ARN total de aproximadamente 6 ml de sangre usando un kit de sangre para ARN Qiasm (Qiagen), y se realizó la amplificación génica usando el ARN total como molde y un kit de RT-PCR en una etapa (Qiagen). En esta PCR, se usaron un par de cebadores sintetizados representados por SEQ ID NO. 1 y 2 y otro par de cebadores sintetizados representados por SEQ ID NO. 2 y 3. SEQ ID NO. 1 es una secuencia de nucleótidos que comienza desde el 10º residuo, serina, de 12 residuos de aminoácido, a continuación, de la región de bisagra de IgG4. SEQ ID NO. 3 se diseñó para tener una secuencia de nucleótidos que codificaba para un dominio C_H2 que tenía alanina como primer residuo de aminoácido. SEQ ID NO. 2 se diseñó para tener un sitio de reconocimiento de BamHI que contenía un codón de terminación.

30

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
gag	tcc	aaa	tat	ggt	ccc	cca	tgc	cca	tca	tgc	cca
ctc	agg	ttt	ata	cca	ggg	ggt	acg	ggt	agt	acg	ggt
Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro

35 Para clonar cada uno de los fragmentos de región constante de IgG4 amplificados en un vector de expresión que contenía un derivado de secuencia secretora de *E. coli*, se usó el pT14S1SH-4T20V22Q (patente coreana n.º 38061) desarrollada antes de la presente invención por los presentes inventores. Este vector de expresión contiene un derivado de secuencia secretora de enterotoxina estable al calor que tiene una secuencia de nucleótidos representada por SEQ ID NO. 4. Para facilitar la clonación, se insertó un sitio de reconocimiento de Stul en un extremo del derivado de secuencia secretora de enterotoxina estable al calor de *E. coli* del plásmido pT14S1SH-4T20V22Q mediante mutagénesis dirigida al sitio usando un par de cebadores representados por SEQ ID NO. 5 y 6 para inducir la mutagénesis para introducir el sitio de Stul en una secuencia de nucleótidos que codifica para el último residuo de aminoácido de la secuencia secretora. Se encontró que esta inserción del sitio de Stul era satisfactoria mediante secuenciación de ADN. El plásmido pT14S1SH-4T20V22Q resultante que contenía un sitio de Stul se denominó pmSTII. Se trató el plásmido pmSTII con Stul y BamHI y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, y se purificó un fragmento grande (4,7 kb), que contenía el derivado de secuencia secretora de enterotoxina estable al calor de *E. coli*. Entonces, se digirieron los fragmentos génicos amplificados con BamHI y se ligaron con el vector de expresión linealizado, proporcionando así pSTIIIdCG4Fc y pSTIIIG4Mo.

50 Se transformaron individualmente los vectores de expresión finales en *E. coli* BL21(DE3), y los transformantes resultantes se denominaron BL21/pSTIIIdCG4Fc (HM10932) y BL21/pSTIIIdCG4Mo (HM10933), que se depositaron en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y se les asignaron los

números de registro KCCM-10597 y KCCM-10598, respectivamente. Posteriormente, cuando los cultivos alcanzaron un valor de DO_{600} de 80, se añadió un inductor, IPTG, a los cultivos para inducir la expresión de proteína. Se cultivaron adicionalmente los cultivos durante de 40 a 45 h hasta que el valor de DO a 600 nm aumentó hasta de 100 a 120. Se rompieron las células *E. coli* recogidas de los fluidos de fermentación, y se sometieron los lisados celulares resultantes a cromatografía en columna en dos etapas para purificar los derivados de región constante de inmunoglobulina recombinantes presentes en el citosol de *E. coli*.

Se equilibraron 5 ml de una columna de afinidad de proteína A (Pharmacia) con PBS, y se cargaron los lisados celulares en la columna a una velocidad de flujo de 5 ml/min. Se eliminaron mediante lavado las proteínas no unidas con PBS, y se eluyeron las proteínas unidas con citrato 100 mM (pH 3,0). Se desalaron las fracciones recogidas usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). Entonces, se llevó a cabo una cromatografía en columna de intercambio aniónico secundaria usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia). Se cargaron las fracciones de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante purificado primarias en la columna Q-Sepharose HP 26/10, y se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0,2 M en tampón Tris 10 mM (pH 8,0), proporcionando así un derivado de Fc de inmunoglobulina aglicosilado recombinante altamente puro (AG Fc), delta-Cys de IgG4 y una fracción de monómero de IgG4 altamente puro.

EJEMPLO DE REFERENCIA 13: Preparación de conjugado de complejo de $IFN\alpha$ -PEG y derivado de AG Fc recombinante

Según los mismos métodos que en los ejemplos 1 y 11, se unió el complejo de $IFN\alpha$ -PEG al extremo N-terminal de delta-Cys de IgG4 como derivado de AG Fc preparado en el ejemplo 12. Tras la reacción de acoplamiento, se retiraron las sustancias sin reaccionar y subproductos de la mezcla de reacción, y en primer lugar se purificó el conjugado de proteína de $IFN\alpha$ -PEG-AG Fc (I) así producido usando 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) y se purificó adicionalmente mediante un ensayo de cromatografía de líquidos a alta presión usando una columna PolyCAT 21,5X250 (poliLC), purificando así el conjugado hasta un alto grado. Se desaló la disolución de reacción de acoplamiento usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (Pharmacia) con tampón Tris 10 mM (pH 8,0). Después, se cargó entonces la disolución de reacción en 50 ml de una columna Q HP 26/10 (Pharmacia) a una velocidad de flujo de 8 ml/min., y se eluyó esta columna con un gradiente de NaCl lineal de 0-0,2 M para obtener fracciones deseadas. Se cargaron de nuevo las fracciones recogidas en una columna PolyCAT 21,5x250 equilibrada con tampón acetato 10 mM (pH 5,2) a una velocidad de flujo de 15 ml/min., y se eluyó esta columna con un gradiente de NaCl lineal de 0,1-0,3 M, proporcionando así fracciones altamente puras. Según el mismo método que el descrito anteriormente, se preparó otro conjugado de proteína de $IFN\alpha$ -PEG-AG Fc (II) usando otro derivado de AG Fc preparado en el ejemplo 12, monómero de IgG4.

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Preparación de complejo de $IFN\alpha$ -PEG 40 K

Se disolvieron 5 mg de interferón alfa en tampón fosfato 100 mM para obtener un volumen final de 5 ml, y se mezclaron con metoxi-PEG-aldehído activado de 40 kDa (Shearwater), a una razón molar $IFN\alpha$:PEG 40 kDa de 1:4. A esta mezcla se le añadió un agente reductor, $NaCNBH_3$, a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 18 h con agitación suave. Para inactivar el PEG, que no reaccionó con $IFN\alpha$, se añadió etanolamina a la mezcla de reacción a una concentración final de 50 mM.

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

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

Según el mismo método que el descrito anteriormente, se conjugó PEG de 40 kDa al extremo N-terminal de hormona del crecimiento humana, factor estimulante de colonia de granulocitos (G-CSF) y un derivado de G-CSF, proporcionando así los complejos derivados hGH-PEG 40 K, G-CSF-PEG 40 K y PEG 40 K-¹⁷S-G-CSF.

EJEMPLO COMPARATIVO 2: Preparación de conjugado de IFN α -PEG-albúmina

Para unir el complejo de IFN α -PEG purificado en la etapa 2 del ejemplo 1 al extremo N-terminal de albúmina, se mezcló el complejo de IFN α -PEG con albúmina sérica humana (HSA, de aproximadamente 67 kDa, Green Cross) disuelta en tampón fosfato 10 mM a una razón molar complejo de IFN α -PEG:albúmina de 1:1, 1:2, 1:4 y 1:8. Tras

- 5 ajustar la concentración de tampón fosfato de la disolución de reacción hasta 100 mM, se añadió un agente reductor, NaCNBH₃, a la disolución de reacción a una concentración final de 20 mM y se dejó reaccionar a 4°C durante 20 h con agitación suave. Mediante este experimento, se encontró que la razón molar de reacción óptima de complejo de IFN α -PEG con respecto a albúmina, que proporcionó la mayor reactividad y generó la menor cantidad de subproductos tales como dímeros, era de 1:2.
- 10 Tras la reacción de acoplamiento, se sometió la mezcla de reacción a cromatografía de exclusión molecular usando una columna Superdex^R (Pharmacia) para eliminar sustancias sin reaccionar y subproductos y purificar el conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina producido. Tras concentrar la mezcla de reacción y cargarla en la columna, se hizo pasar tampón acetato de sodio 10 mM a través de la columna a una velocidad de flujo de 2,5 ml/min. para retirar albúmina no unida y sustancias sin reaccionar, seguido por elución en columna para purificar sólo el
- 15 conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina. Dado que las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina recogidas contenían una pequeña cantidad de impurezas, albúmina sin reaccionar y dímeros de interferón alfa, se llevó a cabo cromatografía de intercambio catiónico para retirar las impurezas. Se cargaron las fracciones de conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina fracciones en una columna SP5PW (Waters) equilibrada con acetato de sodio 10 mM (pH 4,5), y se eluyó la columna con un gradiente lineal de NaCl 0-0,5 M en tampón acetato de sodio
- 20 10 mM (pH 4,5) usando NaCl 1 M, aislando así el conjugado de proteína de IFN α -PEG-albúmina en una forma altamente pura.

Según el mismo método que el descrito anteriormente, se conjugó albúmina a hormona del crecimiento humana, G-CSF, y un derivado de G-CSF, proporcionando así conjugados de hGH-PEG-albúmina, G-CSF-PEG-albúmina y ¹⁷S-G-CSF-PEG-albúmina.

25 EJEMPLO COMPARATIVO 3: Preparación de complejo de Fab'-S-PEG 40 K

Se activó el residuo de cisteína libre del Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 8 mediante incubación en un tampón de activación (acetato de sodio 20 mM (pH 4,0), DTT 0,2 mM) durante 1 h. Tras cambiar el tampón por un tampón de modificación de PEG, fosfato de potasio 50 mM (pH 6,5), se añadió maleimida-PEG (PM: 40 kDa, Shearwater) al mismo a una razón molar Fab':PEG 40 kDa de 1:10 y se hizo reaccionar a 4°C durante 24 h con

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

EJEMPLO EXPERIMENTAL 1: Identificación y análisis cuantitativo de los conjugados de proteína

40 <1-1> Identificación de los conjugados de proteína

Se analizaron los conjugados de proteína preparados en los ejemplos anteriores mediante SDS-PAGE no reducida usando un gel en gradiente del 4-20% y un gel al 12% y ELISA (R&D System).

- 45 Como resultado del análisis de SDS-PAGE, tal como se muestra en la figura 3, una reacción de acoplamiento de un polipéptido fisiológico, un polímero no peptídico, PEG y un fragmento Fc de inmunoglobulina dio como resultado la producción satisfactoria de un conjugado de IFN α -PEG-Fc (A), un conjugado de ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-Fc (B) y un conjugado de EPO-PEG-Fc (C).

Además, se analizó el DG Fc preparado en el ejemplo 10 mediante el 12% de SDS-PAGE no reducido. Tal como se muestra en la figura 6b, se detectó una banda de DG Fc en una posición que corresponde con el peso molecular del Fc nativo que carece de restos de azúcar.

50 <1-2> Análisis cuantitativo de los conjugados de proteína

- Se cuantificaron los conjugados de proteína preparados en los ejemplos anteriores mediante cromatografía de exclusión molecular usando una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 (Pharmacia) y tampón fosfato de potasio 10 mM (pH 6,0) como tampón de elución, en la que se comparó un área de pico de cada conjugado de proteína con la de un grupo control. Se sometieron individualmente patrones analizados cuantitativamente con anterioridad, IFN α , hGH, G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, EPO y Fc, a cromatografía de exclusión molecular, y se determinó un factor de conversión
- 55

entre una concentración y un pico. Se sometió una cantidad predeterminada de cada conjugado de proteína a la misma cromatografía de exclusión molecular. Restando un área de pico correspondiente a un fragmento Fc de inmunoglobulina del área de pico así obtenida, se determinó un valor cuantitativo para una proteína fisiológicamente activa presente en cada conjugado de proteína. La figura 4 muestra el resultado de la cromatografía de exclusión molecular del conjugado de IFN α -PEG-Fc purificado, en la que se observó un único pico. Este resultado indica que el conjugado de proteína purificado no contiene impurezas multiméricas tales como un dímero, un trímero o un número superior de monómeros.

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

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

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

Por otro lado, se llevó a cabo HPLC de fase inversa para determinar las purezas de los conjugados de proteína preparados en los ejemplos 1, 11 y 13, IFN α -PEG-Fc, IFN α -PEG-DG Fc e IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc. Se usó una columna de fase inversa (columna 259 VHP54, Vydac). Se eluyó la columna con un gradiente de acetonitrilo del 40-100% con el 0,5% de TFA, y se analizaron las purezas midiendo la absorbancia a 280 nm. Como resultado, tal como se muestra en la figura 8, las muestras no contenían interferón o Fc de inmunoglobulina no unidos, y se encontró que todos los conjugados de proteína, IFN α -PEG-Fc (A), IFN α -PEG-DG Fc (B) e IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (C), tenían una pureza superior al 96%.

Para determinar pesos moleculares precisos de los conjugados de proteína purificados, se analizó la masa para cada conjugado usando un espectrómetro de masas MALDI-TOF de alto rendimiento (Voyager DE-STR, Applied Biosystems). Se usó ácido sinapínico como matriz. Se recubrieron 0,5 ml de cada muestra de prueba sobre un portaobjetos y se secaron con aire, se mezclaron de nuevo con un volumen igual de una disolución de matriz y se secaron con aire, y se introdujeron en una fuente de iones. Se llevó a cabo la detección de una manera positiva usando un analizador TOF en modo lineal. Se aceleraron los iones con una fuente de extracción dividida que se hizo funcionar con extracción retardada (DE) usando un tiempo de extracción retardada de 750 ns a 1500 ns a una tensión de aceleración total de aproximadamente 2,5 kV.

En la tabla 1 a continuación se facilitan los pesos moleculares observados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para los conjugados de proteína de Fc preparados en los ejemplos. La figura 5 muestra el resultado de espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado de EPO-PEG-Fc, y la figura 7 muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF de los conjugados de IFN α -PEG-Fc y de IFN α -PEG-DG Fc. Como resultado, se encontró que el conjugado de proteína de EPO-PEG-Fc tenía una pureza de más del 95% y un peso molecular muy próximo a un PM teórico. Además se encontró que EPO se acopló al fragmento Fc de inmunoglobulina a una razón de 1:1.

TABLA 1

	PM teórico (kDa)	PM medido (kDa)
IFN α -PEG-Fc (E.1)	75,4	75,9
hGH-PEG-Fc (E.3)	78,4	78,6
G-CSF-PEG-Fc (E.4)	75,3	75,9
¹⁷ S-G- derivado de CSF-PEG-Fc (E.4)	75,0	75,9
EPO-PEG-Fc (E.5)	91,4	91,0

Además, se examinaron cuando el Fc y el DG Fc preparados en el ejemplo 10 para determinar sus pesos moleculares mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, se encontró que el DG Fc tenía 50 kDa, lo que es aproximadamente 3 kDa menos que el Fc nativo (figura 6a). Dado que el PM de 3 kDa corresponde al tamaño teórico de restos de azúcar, los resultados demuestran que se han retirado completamente los restos de azúcar.

La tabla 2 a continuación muestra los resultados de espectrometría de masas MALDI-TOF del conjugado de IFN α -PEG-DG Fc preparado en el ejemplo 11 y de los conjugados de IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (I e II) preparados en el ejemplo 13. Se encontró que el conjugado de IFN α -PEG-DG Fc era 3 kDa más ligero, y el conjugado de IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (I) era aproximadamente 3-4 kDa más ligero, que el conjugado de IFN α -PEG-Fc de 75,9 kDa. El conjugado de IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (II) acoplado a un monómero de Fc mostró un peso molecular reducido en 24,5 kDa correspondiente al peso molecular del monómero de Fc.

TABLA 2

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

EJEMPLO EXPERIMENTAL 2: Análisis farmacocinético I

- 5 Se evaluaron formas nativas de proteínas fisiológicamente activas (controles) y los conjugados de proteína preparados en los ejemplos y en los ejemplos comparativos, complejos de -PEG 40 K, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-DG Fc y conjugados de -PEG-derivado recombinante de AG Fc, para determinar su estabilidad en suero y parámetros farmacocinéticos en ratas SD (cinco ratas por grupo). Se inyectaron individualmente los controles y los complejos de -PEG 40 K, conjugados de -PEG-albúmina, conjugados de -PEG-Fc, conjugados de -PEG-DG Fc y conjugados de -PEG-derivado recombinante de AG Fc (grupos de prueba) por vía subcutánea a una dosis de 100 μ g/kg. Tras la inyección subcutánea, se extrajeron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 y 96 h en los grupos control, y, en los grupos de prueba, a las 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 y 288 h. Se recogieron las muestras de sangre en tubos con un anticoagulante, heparina, y se centrifugaron durante 5 min. usando una microcentrifugadora de alta velocidad Eppendorf para eliminar células de la sangre. Se midieron los niveles de proteína en suero mediante ELISA usando anticuerpos específicos para las proteínas fisiológicamente activas.
- 10
- 15 Los resultados de análisis farmacocinéticos de las formas nativas de IFN α , hGH, G-CSF y EPO, y complejos de -PEG 40 K de las mismas, conjugados de -PEG-albúmina de las mismas, conjugados de -PEG-Fc de las mismas y conjugados de -PEG-DG Fc de las mismas, se facilitan en las tablas 3 a 7 a continuación. En las siguientes tablas, T $_{m\acute{a}x}$ indica el tiempo que se tardó en alcanzar la máxima concentración en suero de fármaco, T $_{1/2}$ indica la semivida en suero de un fármaco, y MRT (tiempo de residencia medio) indica el tiempo medio que reside una molécula de fármaco en el cuerpo.
- 20

TABLA 3

Farmacocinética de interferón alfa

	IFN α nativo	IFN α -PEG 40 K (E.C.1)	IFN α -PEG-albúmina (E.C.2)	IFN α -PEG-Fc (E.1)	IFN α -PEG-DG Fc (E.11)	IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (I) (E.13)	IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (II) (E.13)
T $_{m\acute{a}x}$ (h)	1,0	30	12	30	48	24	24
T $_{1/2}$ (h)	1,7	35,8	17,1	90,4	71,0	61,2	31,2
MRT (h)	2,1	71,5	32,5	150,1	120,6	111,0	58,8

TABLA 4

Farmacocinética del factor de crecimiento humano

	hGH nativa	hGH-PEG 40 K (E.C.1)	hGH-PEG-albúmina (E.C.2)	hGH-PEG-Fc (E.3)
T $_{m\acute{a}x}$ (h)	1,0	12	12	12
T $_{1/2}$ (h)	1,1	7,7	5,9	11,8
MRT (h)	2,1	18,2	13,0	18,8

25

TABLA 5

Farmacocinética de G-CSF

	G-CSF nativo	G-CSF-PEG 40 K (E.C.1)	G-CSF-PEG-albúmina (E.C.2)	G-CSF-PEG-Fc (E.4)
T $_{m\acute{a}x}$ (h)	2,0	12	12	12
T $_{1/2}$ (h)	2,8	4,8	5,2	6,9
MRT (h)	5,2	24,5	25,0	32,6

TABLA 6

Farmacocinética de derivado de 17 S-G-CSF

	Derivado de 17 S-G-CSF nativo	17 S-G-CSF-PEG 40 K (E.C.1)	17 S-G-CSF-PEG-albúmina (E.C.2)	17 S-G-CSF-PEG-Fc (E.4)
T $_{m\acute{a}x}$ (h)	2,0	24	24	24

T _{1/2} (h)	2,9	4,3	6,4	7,0
MRT (h)	5,8	24,4	25,1	33,2

TABLA 7

Farmacocinética de EPO

	EPO nativa	EPO altamente glicosilada	EPO-PEG-Fc (E.5)	EPO-PEG-derivado recombinante de AG Fc (E.13)
T _{máx} (h)	6,0	12	30	48
T _{1/2} (h)	9,4	18,4	61,5	87,9
MRT (h)	21,7	26,8	117,6	141,6

5 Tal como se muestra a partir de los datos de la tabla 3 y del gráfico farmacocinético de la figura 9, el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc tenía una semivida en suero de 90,4 h, que era aproximadamente 50 veces superior a la de IFN α nativo y aproximadamente 2,5 veces superior a la de IFN α -PEG 40 K que tenía una semivida de 35,8 h, preparado en el ejemplo comparativo 1. Además, se encontró que el conjugado de proteína de IFN α -PEG-Fc de la presente invención era superior en cuanto a la semivida en suero a IFN α -PEG-albúmina, que tiene una semivida de 17,1 h.

10 Por otro lado, tal como se muestra en la tabla 3 y la figura 11, el conjugado de IFN α -PEG-DG Fc tenía una semivida en suero de 71,0 h, lo que era casi igual al conjugado de IFN α -PEG-Fc, lo que indica que la desglicosilación de Fc no afecta enormemente a la estabilidad *in vivo* del conjugado de IFN α -PEG-DG Fc. Además, se encontró que el conjugado preparado usando el derivado recombinante de AG Fc producido mediante un método recombinante tenía un efecto idéntico al de DG Fc derivado de la forma nativa. Sin embargo, la semivida en suero de un complejo acoplado a un monómero de Fc fue de aproximadamente la mitad de la de un complejo acoplado a un dímero de Fc normal.

15 Tal como se muestra en la tabla 4, la hormona del crecimiento humana también mostró una semivida en suero prolongada cuando se conjugó con el fragmento Fc de IgG según la presente invención. Es decir, en comparación con la forma nativa (1,1 h), el complejo de hGH-PEG 40 K y el conjugado de hGH-PEG-albúmina tenían semividas ligeramente aumentadas de 7,7 h y 5,9 h, respectivamente, mientras que el conjugado de hGH-PEG-Fc de proteína de la presente invención presentó una semivida en suero enormemente prolongada de 11,8 h.

20 Tal como resulta evidente a partir de los datos farmacocinéticos de G-CSF y su derivado en las tablas 5 y 6, los conjugados de G-CSF-PEG-Fc y ¹⁷S-G-CSF-PEG-Fc presentaron una semivida en suero mucho más larga que el complejo de -PEG 40 K y el conjugado de -PEG-albúmina. Se encontró que el fragmento Fc de inmunoglobulina en el suero prolongaba la duración de la acción de proteínas fisiológicamente activas en formas nativas, así como en sus derivados que tenían alteraciones de determinados residuos de aminoácido en niveles similares a las formas nativas. A partir de estos resultados, puede predecirse fácilmente que el método de la presente invención tendrá un efecto similar sobre otras proteínas y sus derivados.

25 Tal como se muestra en la tabla 7 y la figura 10, la conjugación de la EPO glicosilada nativa al fragmento Fc también dio como resultado un aumento en la semivida en suero. Es decir, la EPO tenía una semivida en suero de 9,4 h en la forma nativa, y una semivida en suero prolongada de 18,4 h cuando se glicosiló altamente para mejorar la estabilidad en suero. El conjugado de EPO-PEG-Fc, que comprende EPO acoplada al fragmento Fc de inmunoglobulina según la presente invención, presentó una semivida en suero notablemente prolongada de 61,5 h. Además, cuando se conjugó con el derivado de Fc aglicosilado (AG) recombinante derivado de *E. coli*, la semivida de EPO aumentó hasta 87,9 h, indicando que la aglicosilación del fragmento Fc permite la preparación de un conjugado de proteína que no afecta a la estabilidad en suero de la proteína sin funciones de anticuerpo.

30 Tal como resulta evidente a partir de los resultados anteriores, los conjugados de proteína covalentemente unida al fragmento Fc de inmunoglobulina a través de un polímero no peptídico según la presente invención presentaron semividas en suero aumentadas de varias veces a varias decenas de veces con respecto a la de la forma nativa. Además, cuando el Fc de inmunoglobulina era aglicosilado mediante producción en *E. coli* o se desglicosiló mediante tratamiento enzimático, su efecto de aumento de la semivida en suero de su conjugado de proteína se mantuvo a un nivel similar.

35 En particular, en comparación con proteínas modificadas con PEG de 40 kDa que tenían la duración de la acción más larga entre las moléculas de PEG para aumentar la duración de la acción de proteínas en el suero, los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina tenían una estabilidad en suero muy superior. Además, en comparación con conjugados de proteína acoplados a albúmina en lugar del Fc de inmunoglobulina, los conjugados de proteína de la presente invención presentaron una excelente estabilidad en suero, lo que indica que los conjugados de proteína de la presente invención son eficaces en el desarrollo de formas de acción prolongada de fármacos proteicos. Estos resultados, que los presentes conjugados de proteína tengan excelentes efectos sobre la estabilidad en suero y el MRT en una amplia gama de proteínas incluyendo derivados de factor estimulante de colonias mediante mutación puntual en comparación con proteínas conjugadas con PEG o con albúmina

convencionales, indican que la estabilidad y los efectos de prolongación de la duración de los presentes conjugados de proteína son aplicables a otros polipéptidos fisiológicamente activos.

Por otro lado, cuando se evaluó el conjugado de proteína de IFN α -PEG 10 K-Fc (ejemplo 7) preparado usando un polímero no peptídico, PEG de 10 kDa, para determinar su semivida en suero según el mismo método que el descrito anteriormente, mostró una semivida en suero de 48,8 h, que era algo más corta que la semivida en suero (79,7 h) de un conjugado de proteína preparado usando PEG de 3,4 kDa.

Además, las semividas en suero de los conjugados de proteína disminuyen al aumentar el peso molecular del polímero no peptídico PEG. Estos resultados indican que el factor principal que aumenta la estabilidad en suero y la duración de los conjugados de proteína es el fragmento Fc de inmunoglobulina conjugado en vez del polímero no peptídico.

Incluso cuando se cambió el grupo reactivo de PEG por un grupo reactivo distinto de un grupo aldehído, los conjugados de proteína con el PEG mostraron patrones similares en cuanto al peso molecular aparente y la semivida en suero a los acoplados a PEG que tenía un grupo reactivo de aldehído.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 3: Análisis farmacocinético II

Para determinar las semividas en suero de los conjugados de Fab'-S-PEG-N-Fc y de Fab'-N-PEG-N-Fc preparados en el ejemplo 8 y 9 y del complejo de Fab'-S-PEG 40 K preparado en el ejemplo comparativo 3, se llevó a cabo un análisis farmacocinético de fármaco según el mismo método que en el ejemplo experimental 2 usando Fab' como control, los conjugados y el complejo. Los resultados se facilitan en la figura 12.

Tal como se muestra en la figura 12, los conjugados de Fab'-S-PEG-N-Fc y de Fab'-N-PEG-N-Fc presentaron una semivida en suero prolongada dos o tres veces en comparación con el Fab' o el complejo de Fab'-S-PEG 40 K.

EJEMPLO EXPERIMENTAL 4: Evaluación de la actividad intracelular de los conjugados de proteína

<4-1> Comparación de los conjugados de proteína de IFN α para la actividad intracelular

Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína de IFN α , se evaluaron IFN α -PEG-Fc (ejemplo 1), IFN α -PEG-DG Fc (ejemplo 11), IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc (ejemplo 13), IFN α -PEG 40 K (ejemplo comparativo 1) e IFN α -PEG-albúmina (ejemplo comparativo 2) para determinar la actividad antiviral mediante un bioensayo de cultivo celular usando células de riñón bovino Madin Darby (MDBK) (ATCC CCL-22) infectadas por el virus de la estomatitis vesicular. Se usó interferón alfa 2b no pegilado, disponible del National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC), como material de patrón.

Se cultivaron células MDBK en MEM (medio esencial mínimo, JBI) complementado con el 10% de FBS y el 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C en condiciones del 5% de CO₂. Se diluyeron las muestras que iban a analizarse y el material de patrón con el medio de cultivo hasta concentraciones predeterminadas y se colocaron alícuotas de 100 μ l sobre cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se desprendieron las células cultivadas, se añadieron a la placa que contenía las muestras en un volumen de 100 μ l, y se cultivaron durante aproximadamente 1 h a 37°C en condiciones del 5% de CO₂. Después, se añadieron 50 μ l de virus de la estomatitis vesicular (VEV) de 5-7X10³ UFP a cada pocillo de la placa, y se cultivaron adicionalmente las células durante aproximadamente de 16 a 20 h a 37°C en condiciones del 5% de CO₂. Un pocillo que no contenía la muestra ni el material de patrón sino que sólo contenía el virus se usó como control negativo, y un pocillo que sólo contenía células se usó como control positivo.

Tras retirar el medio de cultivo, se añadieron 100 μ l de una disolución roja neutra a la placa para teñir las células viables, seguido por incubación durante 2 h a 37°C en condiciones del 5% de CO₂. Tras retirar los sobrenadantes, se añadieron 100 μ l de una mezcla 1:1 de etanol al 100% y ácido acético al 1% a cada pocillo de la placa. Tras mezclar exhaustivamente para disolver todos los cristales rojos neutros eluidos de las células teñidas, se midió la absorbancia a 540 nm. Se usó el control negativo como blanco, y se calcularon valores de DE₅₀ (dosis que provocaban una inhibición del crecimiento celular del 50%), en los que se fijó el crecimiento celular del control positivo al 100%.

TABLA 8

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica (UI/mg)	Actividad relativa (%) para IFN α nativo
IFN α nativo	100	4,24E+08	100
IFN α -PEG 40 K	100	2,04E+07	4,8
IFN α -PEG-albúmina	100	2,21E+07	5,2
IFN α -PEG-Fc	100	1,19E+08	28,1
IFN α -PEG-DG Fc	100	1,09E+08	25,7
IFN α -PEG-derivado recombinante de AG Fc	100	9,58E+07	22,6

Tal como se muestra en la tabla 8, el IFN α -PEG 40 K disminuyó la actividad hasta el 4,8% del IFN α nativo. Especialmente, a medida que aumentó el tamaño de los restos de PEG, un conjugado de proteína tenía estabilidad en suero mejorada pero disminuyó gradualmente la actividad. Se notificó que interferón alfa tenía actividades *in vitro* del 25% cuando se modificó con PEG de 12 kDa y de aproximadamente el 7% cuando se modificó con PEG de 40 kDa (P. Bailon *et al.*, Bioconjugate Chem. 12: 195-202, 2001). Es decir, dado que un conjugado de proteína tiene una semivida más larga pero disminuye bruscamente en cuanto a la actividad biológica a medida que aumenta el peso molecular de los restos de PEG, existe la necesidad de desarrollar un conjugado de proteína que tenga una semivida en suero más larga y una actividad más fuerte. Además, el conjugado de IFN α -PEG-albúmina presentó una actividad débil de aproximadamente el 5,2% en comparación con el IFN α nativo. En cambio, los conjugados de IFN α -PEG-Fc y de IFN α -PEG-DG Fc de la presente invención mostraron una actividad relativa notablemente mejorada del 28,1% y del 25,7% en comparación con el IFN α nativo. Además, la conjugación de IFN α al derivado recombinante de AG Fc dio como resultado un aumento similar en la actividad. A partir de estos resultados, se espera que el interferón alfa conjugado con el fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en suero notablemente aumentada y una eficacia farmacéutica *in vivo* enormemente mejorada.

<4-2> Comparación de los conjugados de proteína de hormona del crecimiento humana para la actividad intracelular

Para comparar la actividad intracelular de los conjugados de proteína de hormona del crecimiento humana, se compararon hGH-PEG-Fc, hGH-PEG 40 K y hGH-PEG-albúmina para la actividad intracelular.

Se midieron las actividad intracelulares de los conjugados de hGH mediante un ensayo *in vitro* usando una línea celular de linfoma de ganglios de rata, Nb2 (Colección europea de cultivos celulares (ECACC) n.º 97041101), que desarrolla mitogénesis dependiente de la hormona del crecimiento humana.

Se cultivaron células Nb2 en medio de Fisher complementado con el 10% de FBS (suero bovino fetal), el 0,075% de NaCO₃, 2-mercaptoetanol 0,05 mM y glutamina 2 mM, y se cultivaron adicionalmente en un medio similar que no contenía el 10% de FBS durante 24 h. Después, se contaron las células cultivadas, y se transfirieron en alícuotas aproximadamente 2X10⁴ células a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se diluyeron hGH-PEG-Fc, hGH-PEG 40 K, hGH-PEG-albúmina, un patrón disponible del National Institute for Biological Standards and Controls (NIBSC) como control, y hormona del crecimiento humana nativa (HM-hGH) y se añadieron a cada pocillo a diversas concentraciones, seguido por incubación durante 48 h a 37°C en condiciones del 5% de CO₂. Posteriormente, para medir la actividad de proliferación celular determinando el número de células en cada pocillo, se añadieron 25 μ l del reactivo Cell Titer 96 Aqueous One Solution (Promega) a cada pocillo, y se cultivaron adicionalmente las células durante 4 h. Se midió la absorbancia a 490 nm, y se calculó un título para cada muestra. Los resultados se facilitan en la tabla 9 a continuación.

TABLA 9

	Conc. (ng/ml)	Actividad específica* (U/mg)	Actividad relativa (%) para HM-hGH nativa
hGH nativa	100	2,71E+06	100
hGH (patrón disponible de NIBSC)	100	2,58E+06	95,2
hGH-PEG 40 K	100	0,206E+06	7,6
hGH-PEG-albúmina	100	0,141E+06	5,2
hGH-PEG-Fc	100	0,76E+06	28,1
Actividad específica*=1/DE ₅₀ X10 ⁶ (DE ₅₀ : cantidad de proteína requerida para el 50% del crecimiento celular máximo)			

Tal como se muestra en la tabla 9, también en el caso de la hormona del crecimiento humana, la conjugación con PEG de 40 kDa (hGH-PEG 40 K) dio como resultado una disminución en la actividad hasta aproximadamente el 7,6% de la forma nativa, y el conjugado de hGH-PEG-albúmina presentó una baja actividad *in vitro* que fue de aproximadamente el 5,2% de la hGH nativa. Sin embargo, el conjugado de hGH-PEG-Fc de la presente invención aumentó notablemente la actividad relativa hasta más del 28% en comparación con la hGH nativa. A partir de estos resultados, se espera que la hormona del crecimiento humana unida al fragmento Fc de inmunoglobulina tenga una semivida en suero notablemente aumentada y una eficacia farmacéutica *in vivo* enormemente mejorada. Además, se cree que la actividad aumentada de los conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina de la presente invención se debe a la estabilidad en suero aumentada y la afinidad de unión conservada a receptores debida al Fc de inmunoglobulina o debida al espacio formado por el polímero no peptídico. Se prevé que estos efectos serán aplicables a conjugados de proteína de Fc de inmunoglobulina acoplados a otras proteínas fisiológicamente activas.

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

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

Se diluyeron dos veces en serie el conjugado de Fab'-S-PEG-N-Fc y de Fab'-N-PEG-N-Fc y el complejo de Fab'-S-PEG 40 K, y se colocaron alícuotas de 100 μ l en pocillos de una placa de 96 pocillos. Se añadieron rhTNF- α (R&D Systems) y actinomicina D (Sigma) usados como inhibidor de la síntesis de ARN a cada pocillo a concentraciones finales de 10 ng/ml y 1 μ g/ml, respectivamente, se incubaron durante 30 min. en una incubadora a 37°C con el 5% de CO₂, y se transfirieron a una microplaca para el ensayo. Se añadieron células L929 a cada pocillo a una densidad de 5X10⁴ células/50 ml de medio y se cultivaron durante 24 h en una incubadora a 37°C con el 5% de CO₂. Tras retirar el medio de cultivo, se añadieron 50 μ l de MTT (Sigma) disuelto en PBS a una concentración de 5 μ g/ml a cada pocillo, y se cultivaron adicionalmente las células durante aproximadamente 4 h en una incubadora a 37°C con el 5% de CO₂. Se añadieron 150 μ l de DMSO a cada pocillo, y se determinó el grado de neutralización de la citotoxicidad midiendo la absorbancia a 540 nm. Como control, se usó el Fab' purificado en la etapa 1 del ejemplo 8.

Tal como se muestra en la figura 13, todos los conjugados de proteína usados en esta prueba tenían un título similar al de Fab'. Estos resultados indican que cuando se prepara un conjugado de proteína uniendo un Fc de inmunoglobulina a un residuo de cisteína libre cerca del extremo N-terminal o del extremo C-terminal de un Fab' a través de PEG, el Fab' muestra una semivida en suero notablemente aumentada y una alta actividad *in vivo*.

<4-5> Ensayo de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC)

Para determinar si los derivados preparados en los ejemplos y las proteínas correspondientes a las regiones constantes de inmunoglobulinas, expresadas en los transformantes de *E. coli* y purificadas, se unen a C1q humano, se llevó a cabo un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) de la siguiente manera. Como grupos de prueba se usaron regiones constantes de inmunoglobulina producidas por los transformantes HM10932 y HM10927, depositados en el Centro de Cultivo Coreano de Microorganismos (KCCM) el 15 de septiembre de 2004 y a los que se les asignaron los números de registro KCCM-10597, KCCM-10588, y los derivados preparados en los ejemplos anteriores. Como patrones, se usaron una inmunoglobulina glicosilada (IVIG-globulin S, Green Cross PBM) y varios anticuerpos comercialmente disponibles usados como anticuerpos terapéuticos. Se prepararon las muestras de prueba y de patrón en tampón carbonato 10 mM (pH 9,6) a una concentración de 1 μ g/ml. Se transfirieron las muestras en alícuotas a una placa de 96 pocillos (Nunc) en una cantidad de 200 ng por pocillo, y se recubrió la placa durante la noche a 4°C. Después, se lavó cada pocillo con PBS-T (NaCl 137 mM, KCl 2 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂PO₄ 2 mM, el 0,05% de Tween 20) tres veces, se bloquearon con 250 μ l de un tampón de bloqueo (el 1% de albúmina sérica bovina en PBS-T) a temperatura ambiente durante 1 h, y se lavaron de nuevo con el mismo PBS-T tres veces. Se diluyeron las muestras de prueba y de patrón en PBS-T hasta una concentración predeterminada y se añadieron a pocillos recubiertos con anticuerpo, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 1 h y se lavó con PBST tres veces. Posteriormente, se añadió C1q 2 μ g/ml (R&D Systems) a la placa y se hizo reaccionar a temperatura ambiente durante 2 h, y se lavó la placa con PBS-T seis veces. Se añadieron 200 μ l de una dilución 1:1000 de un conjugado de peroxidasa con anticuerpo humano anti-C1q humano (Biogenesis, EE.UU.) en el tampón de bloqueo a cada pocillo y se hicieron reaccionar a temperatura ambiente durante 1 h. Tras lavar cada pocillo con PBS-T tres veces, se mezclaron volúmenes iguales de reactivos de color A y B (color A: peróxido estabilizado y color B: cromógeno estabilizado; DY 999, R&D Systems), y se añadieron 200 μ l de la mezcla a cada pocillo, seguido por incubación durante 30 min. Después, se añadieron 50 μ l de una disolución de terminación de la reacción, ácido sulfúrico 2 M, a cada pocillo. Se leyó la placa usando un lector de microplacas (Molecular Device). Se midió la absorbancia de muestra de patrón y de prueba a 450 nm, y los resultados se facilitan en las figuras 14 y 15, respectivamente.

Cuando se compararon subclases de inmunoglobulina entre sí para la actividad de complemento en su fragmento Fc de inmunoglobulina, la mayor afinidad de unión a C1q se encontró en la inmunoglobulina humana IgG1 (Fitzgerald), la siguiente en IgG2 (Fitzgerald) y después IgG4 (Fitzgerald), indicando que hay una diferencia entre subclases en cuanto a la actividad de complemento. La IVIG usada en esta prueba, que es una combinación de subclases de IgG, mostró una afinidad de unión a C1q casi igual a la IgG1 purificada porque IgG1 representa la mayor parte de IVIG. En comparación con estos patrones, con respecto a cambios en la afinidad de unión a C1q mediante la aglicosilación, Fc de IgG1 que tenía la actividad de complemento más fuerte disminuyó notablemente cuando estaba aglicosilado. Fc de IgG4, que se sabe que no induce activación de complemento, en pocas ocasiones tenía afinidad de unión a C1q, lo que indica que el Fc de IgG4 se usa como un excelente portador recombinante sin actividad de complemento (figura 14).

Para determinar si el portador mantiene su propiedad de no tener afinidad de unión a C1q incluso después de haberse conjugado a un péptido fisiológicamente activo, se prepararon conjugados de IFN alfa-Fc usando Fc glicosilado, Fc enzimáticamente desglucosilado y Fc recombinante aglicosilado como portadores para IFN alfa y se evaluaron para su afinidad de unión a C1q. Un conjugado de IFN alfa acoplado a Fc glicosilado (IFN α -PEG-Fc:Fc de IgG1 glicosilado) mantuvo una alta afinidad de unión a C1q. En cambio, cuando se acopló interferón alfa a un Fc desglucosilado usando PNGasa F y otras enzimas, el conjugado resultante (IFN α -PEG-DG Fc:Fc de IgG1 desglucosilado) presentó una afinidad de unión a C1q notablemente reducida, que fue similar a la del conjugado de Fc aglicosilado derivado de *E. coli*. Además, cuando se cambió el resto de IgG1 del conjugado de interferón alfa acoplado a Fc de IgG1 aglicosilado (IFN α -PEG-AGFCG1:Fc de IgG1 aglicosilado) por el resto de IgG4, se encontró que el conjugado de interferón resultante (IFN α -PEG-FcG4 derivado 1:Fc de IgG1 aglicosilado) perdió completamente su afinidad de unión a C1q. Cuando se cambió el resto de Fc de IgG1 por el monómero de Fc de

IgG4, el conjugado resultante (IFN α -PEG-FcG4 derivado 2:Fc de IgG4 aglicosilado). Estos resultados indican que tales formas del fragmento Fc de IgG4 sin útiles como excelentes portadores que no tienen las funciones efectoras de fragmentos de anticuerpo (figura 15).

Aplicabilidad industrial

- 5 Tal como se describió anteriormente en el presente documento, la composición farmacéutica de la presente invención aumenta enormemente las semividas en plasma de fármacos. Por otro lado, los conjugados de proteína superan la desventaja más significativa de las formulaciones de acción prolongada convencionales, reducción de los títulos de fármaco, teniendo por tanto un tiempo de circulación en sangre y una actividad *in vivo* superiores a la albúmina, que anteriormente se sabía que era la más eficaz. Además, los conjugados de proteína no tienen riesgo de inducir respuestas inmunitarias. Debido a estas ventajas, los conjugados de proteína son útiles para desarrollar formulaciones de acción prolongada de fármacos proteicos. Las formulaciones de acción prolongada de fármacos proteicos según la presente invención pueden reducir el dolor del paciente provocado por inyecciones frecuentes, y mantener concentraciones en suero de polipéptido activas durante un periodo de tiempo prolongado, proporcionando por tanto de manera estable eficacia farmacéutica.
- 10
- 15 Además, el presente método de preparación de un conjugado de proteína supera desventajas de la producción de proteínas de fusión mediante manipulación genética, incluyendo la dificultad para establecer sistemas de expresión, glicosilación diferente de una forma nativa, inducción de respuesta inmunitaria y orientación limitada de la de proteína fusión, bajos rendimientos debido a reacciones no específicas y problemas de acoplamiento químico tales como toxicidad de compuestos químicos usados como aglutinantes, proporcionando por tanto de manera fácil y económica fármacos proteicos con semivida en suero prolongada y alta actividad.
- 20

<110> Hanmi Pharm. Co., Ltd.

<120> COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE UNA REGIÓN Fc DE INMUNOGLOBULINA COMO PORTADOR

<150> Documento KR10-2003-0080299

25 <151> 13-11-2003

<160> 6

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 35

30 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cebador

<400> 1

35 cgatcatgccc agcacctgag ttctggggg gacca 35

<210> 2

<211> 42

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

40 <220>

<223> cebador

<400> 2

gggggatcct cattacca gagacagga gaggctctt tg 42

<210> 3

	<211> 29	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
5	<223> cebador	
	<400> 3	
	cggcacctga gttcctgggg ggaccatca	29
	<210> 4	
	<211> 69	
10	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 4	
	atgaaaaaga caatcgcaatt tcttcttgca tctatgttcg tttttctat tgctacaaat	60
	gcccaggcg	69
	<210> 5	
15	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> <i>Homo sapiens</i>	
	<400> 5	
	tctattgcta caaatgccca ggccttcca accattccct tatcc	45
20	<210> 6	
	<211> 45	
	<212> ADN	
	<213> Secuencia artificial	
	<220>	
25	<223> cebador	
	<400> 6	
	agataacgat gtttacgggt ccggaagggt tgtaaggga atagg	45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Composición farmacéutica que comprende un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador, en la que dicho fragmento Fc de inmunoglobulina está unido covalentemente a un fármaco que es un polipéptido fisiológicamente activo a través de un enlazador no peptídico, en la que el polipéptido fisiológicamente activo es la hormona del crecimiento humana (hGH), en la que la unión entre el fragmento Fc de inmunoglobulina y el fármaco no es una fusión mediante recombinación genética, y en la que el enlazador no peptídico se selecciona del grupo que consiste en poli(etilenglicol), poli(propilenglicol), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol, polioles polioxietilados, polialcoholes vinílicos, polisacáridos, dextranos, polivinil éteres, polímeros biodegradables, polímeros lipídicos, quitinas y ácidos hialurónicos.
- 10 2. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está aglicosilado.
3. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina está compuesto por de uno a cuatro dominios seleccionados del grupo que consiste en dominios C_{H1}, C_{H2}, C_{H3} y C_{H4}.
- 15 4. Composición farmacéutica según la reivindicación 3, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina incluye además una región de bisagra.
5. Composición farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, y combinaciones e híbridos de los mismos.
- 20 6. Composición farmacéutica según la reivindicación 5, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina se selecciona del grupo que consiste en fragmentos Fc de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, y combinaciones e híbridos de los mismos.
7. Composición farmacéutica según la reivindicación 6, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4.
- 25 8. Composición farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el fragmento Fc de inmunoglobulina es un fragmento Fc de IgG4 aglicosilado humano.
9. Método para mejorar la duración *in vivo* de la acción de un fármaco, que se caracteriza por el uso *in vitro* de un fragmento Fc de inmunoglobulina como portador en una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.

30

FIG. 1

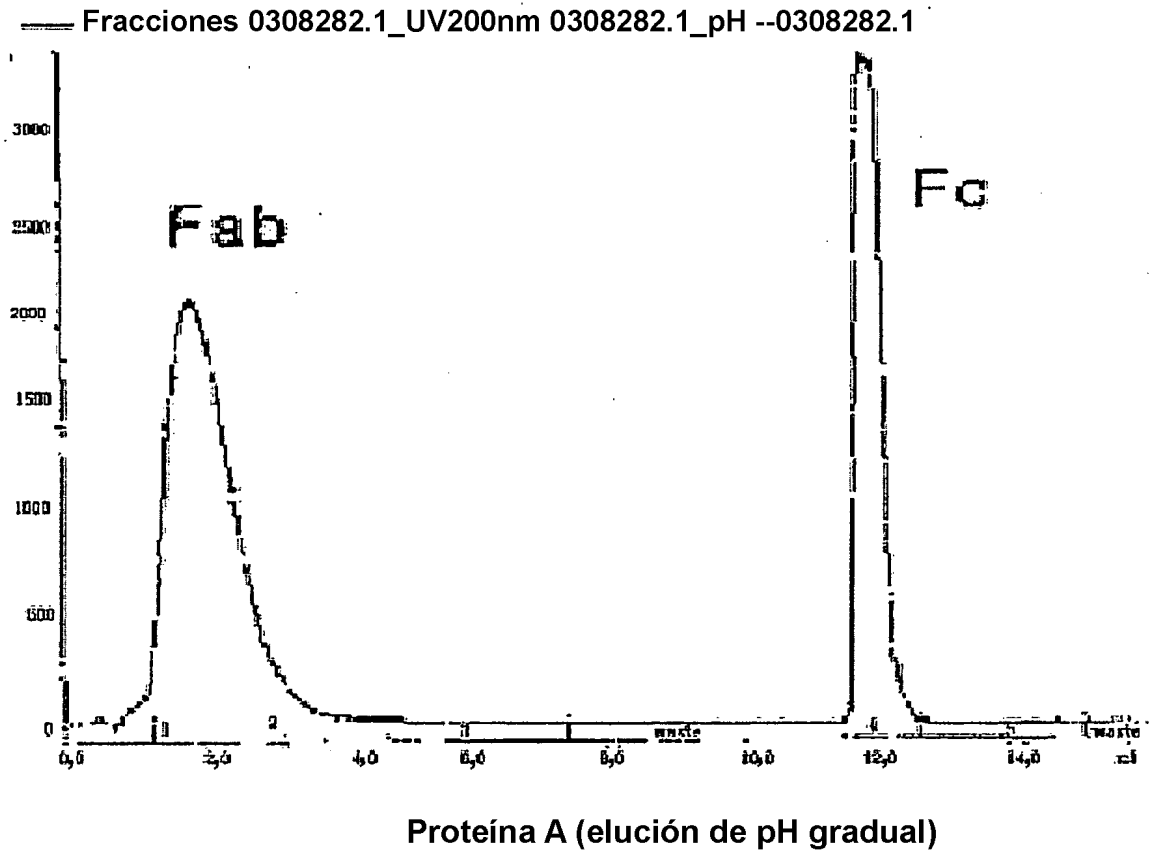


FIG. 2

M IgG Fc

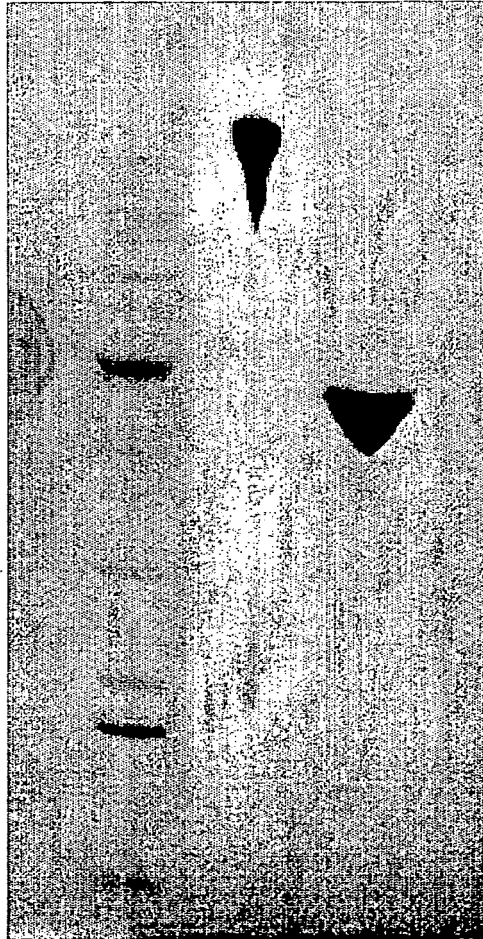
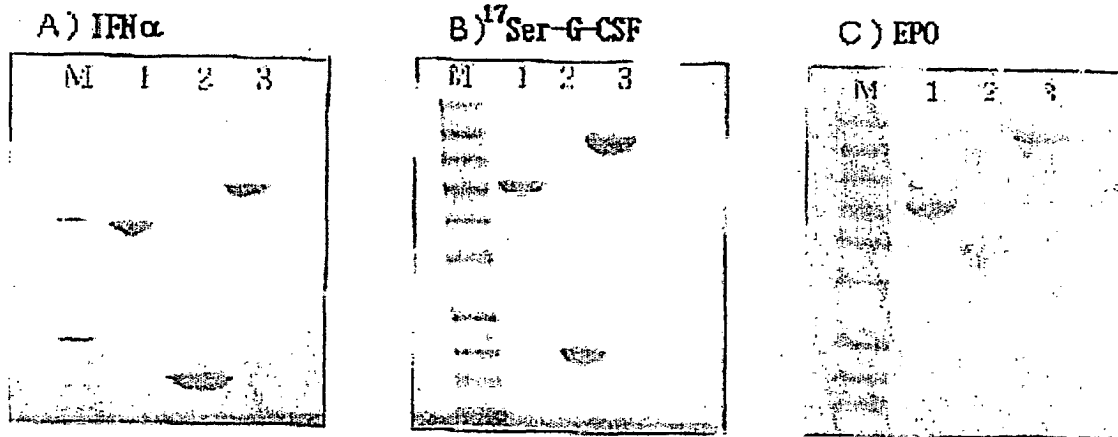


FIG. 3



M: marcador de tamaño molecular
 carril 1: Fc
 carril 2: proteína fisiológicamente activa
 carril 3: conjugado de proteína fisiológicamente activa-PEG-Fc

FIG. 4

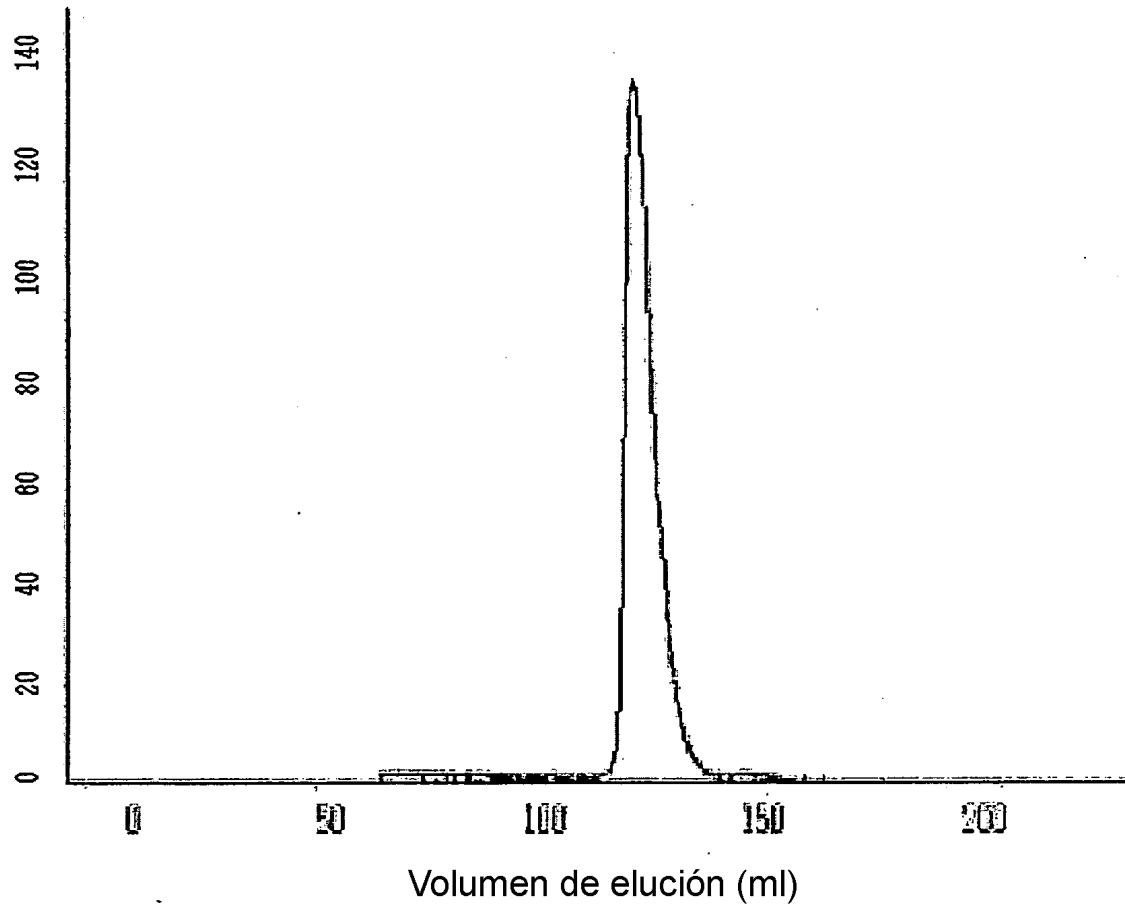


FIG. 5

Voyager Spec#1⇒BC⇒SM25[BP=5012.2.2008]

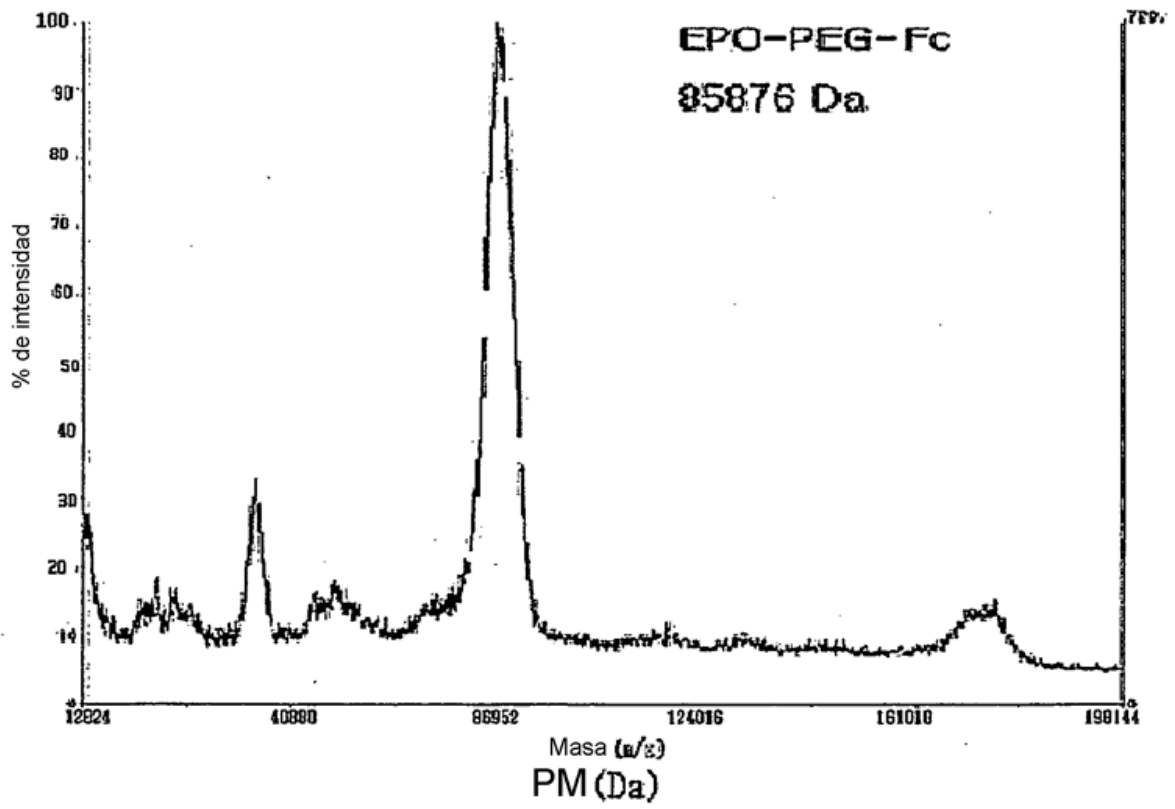


FIG. 6a

Voyager Spec#1⇒BC⇒NR(2.00)⇒SM25 [BP=5367.4.4.1478]

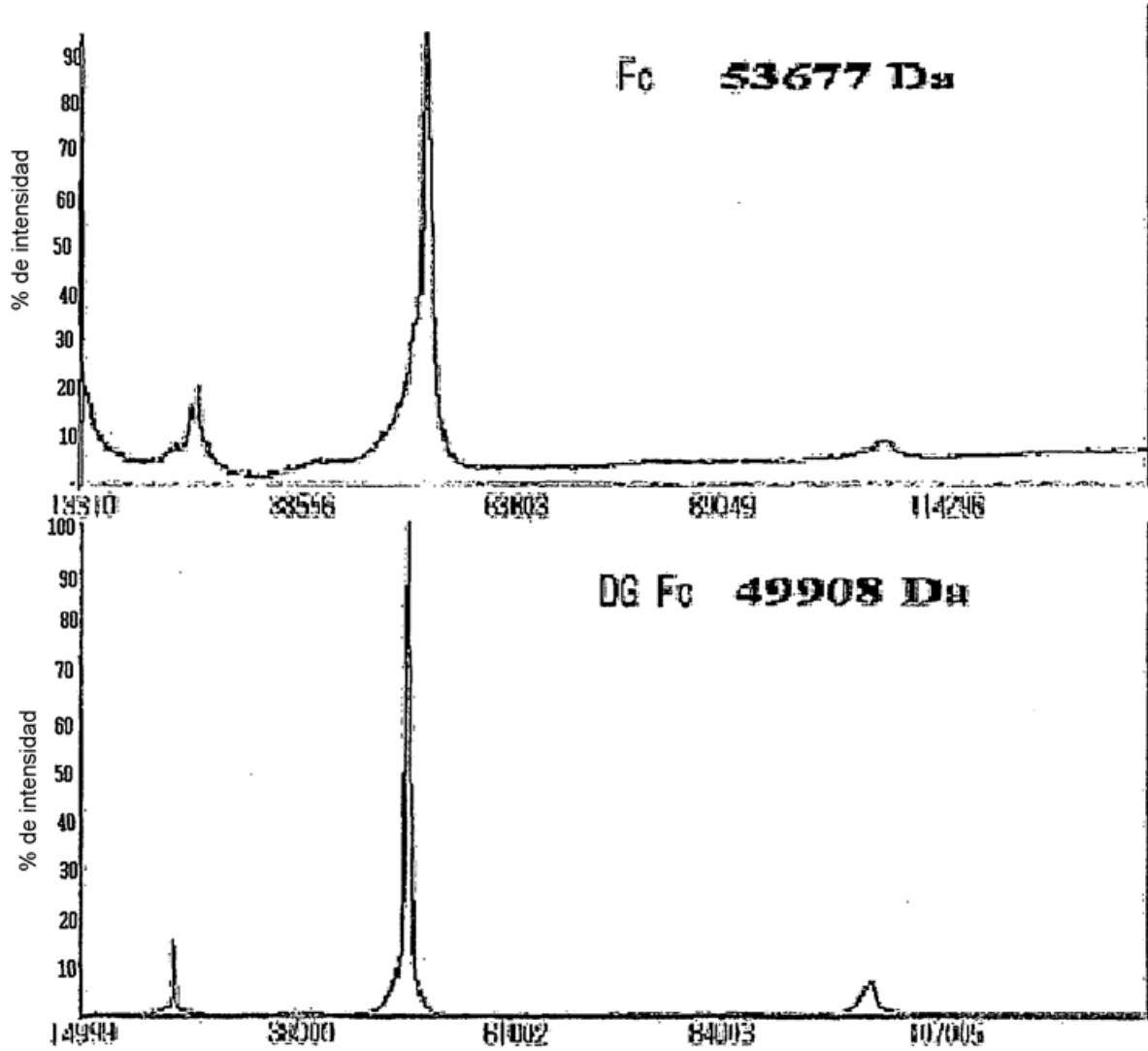


FIG. 6b

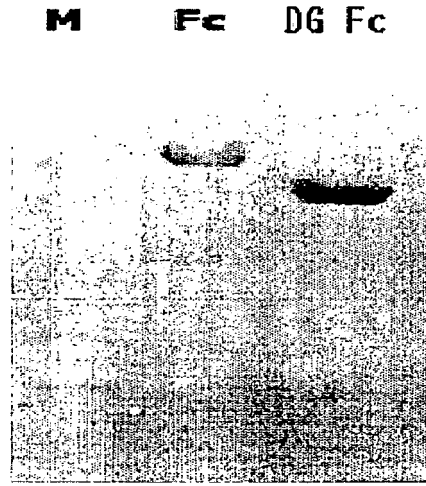


FIG. 7

Spec#1→BC→NR(2,00)→SM25→SM25 [BP=75945,7.3551]

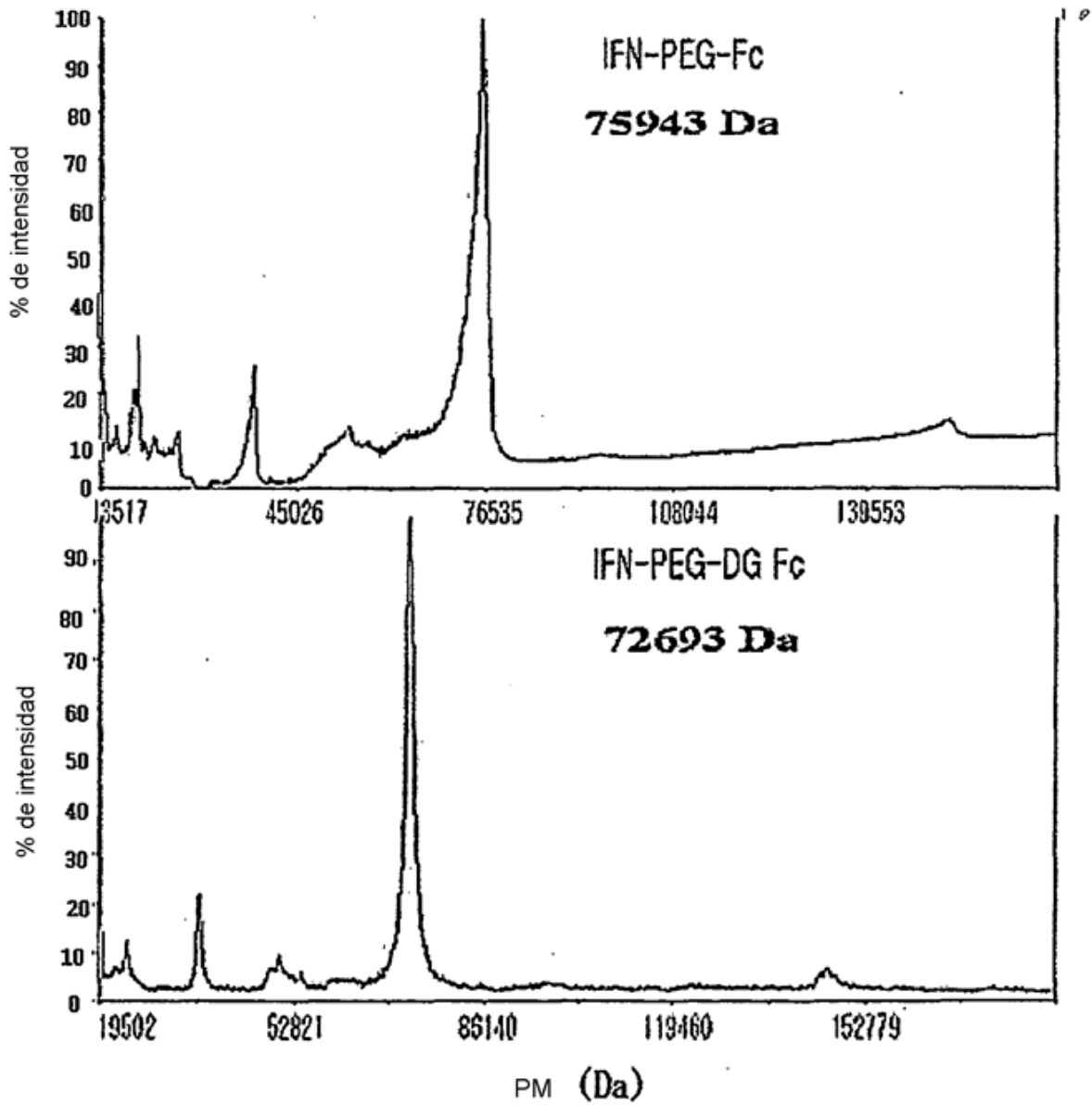


FIG. 8a

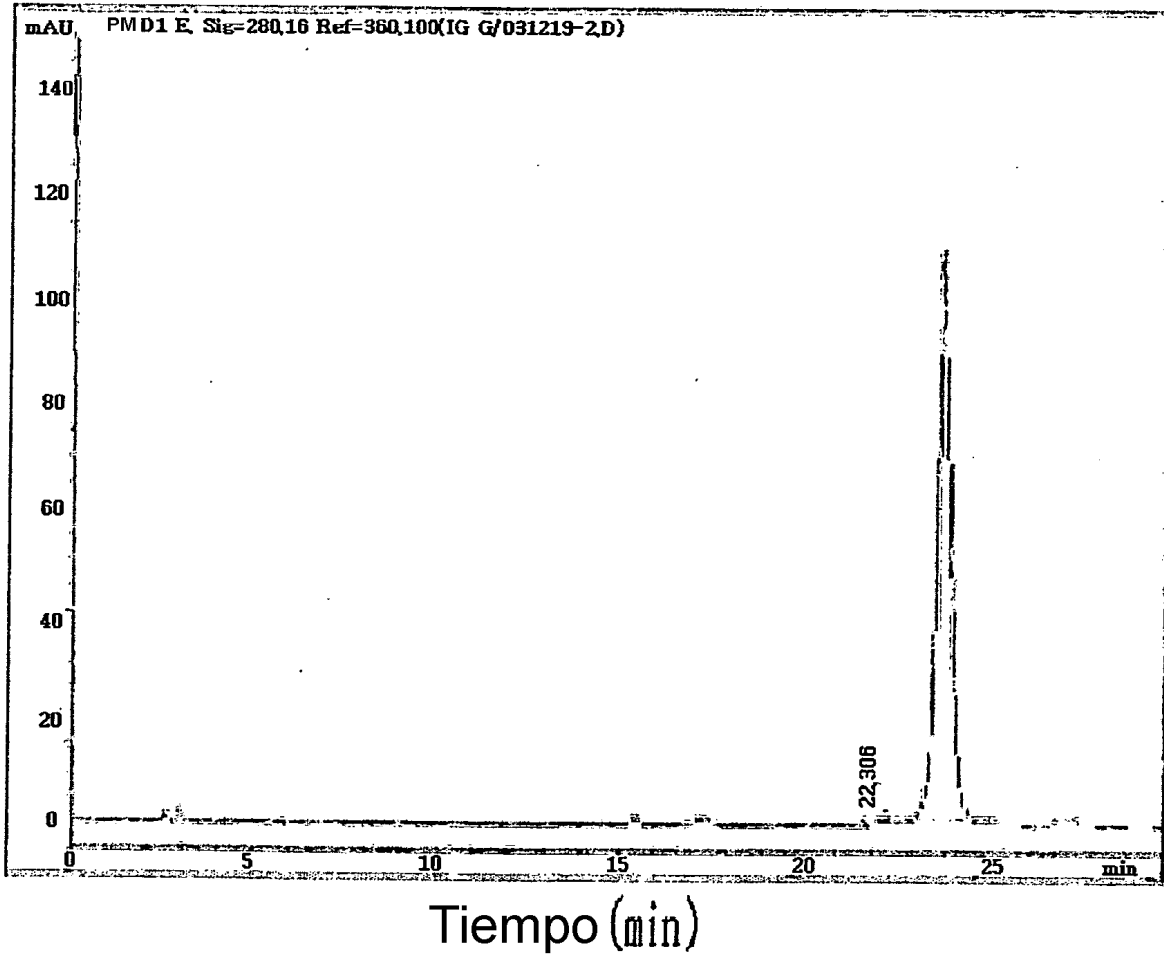


FIG. 8b

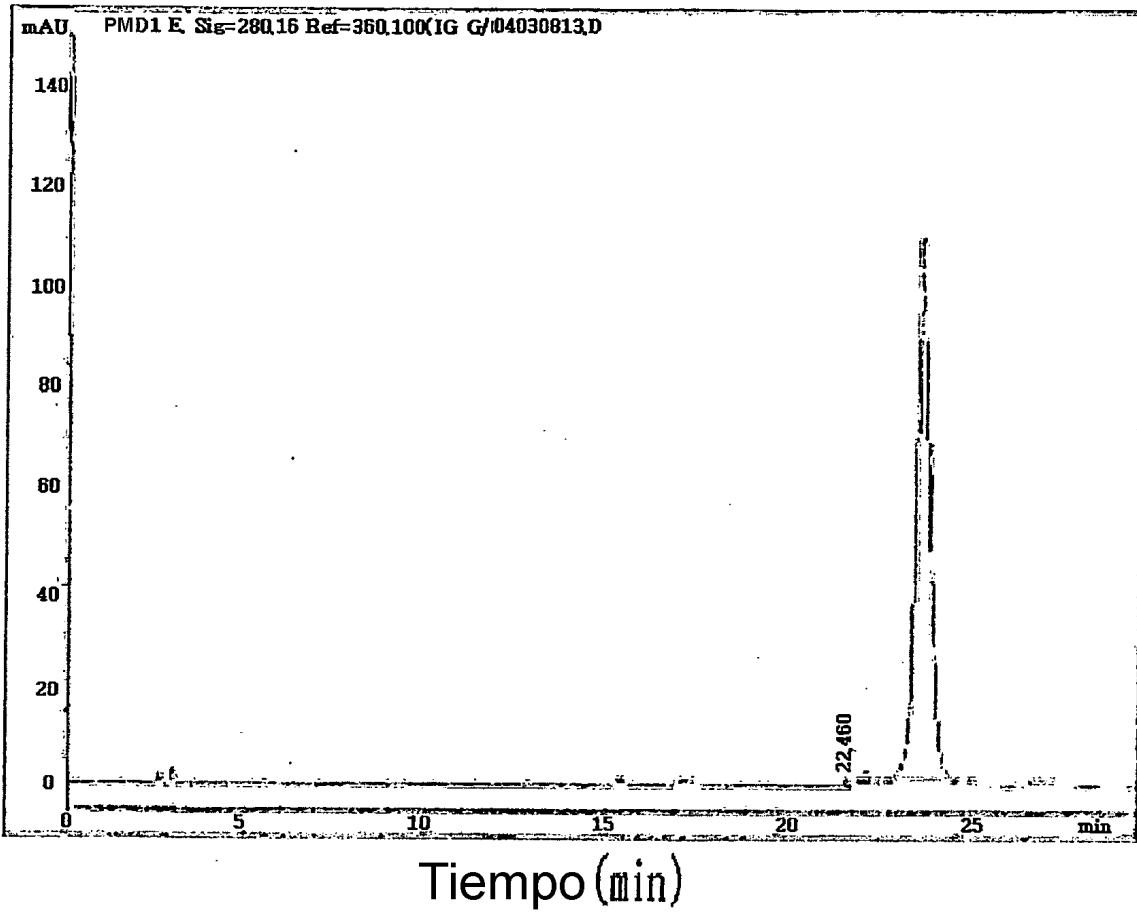


FIG. 8c

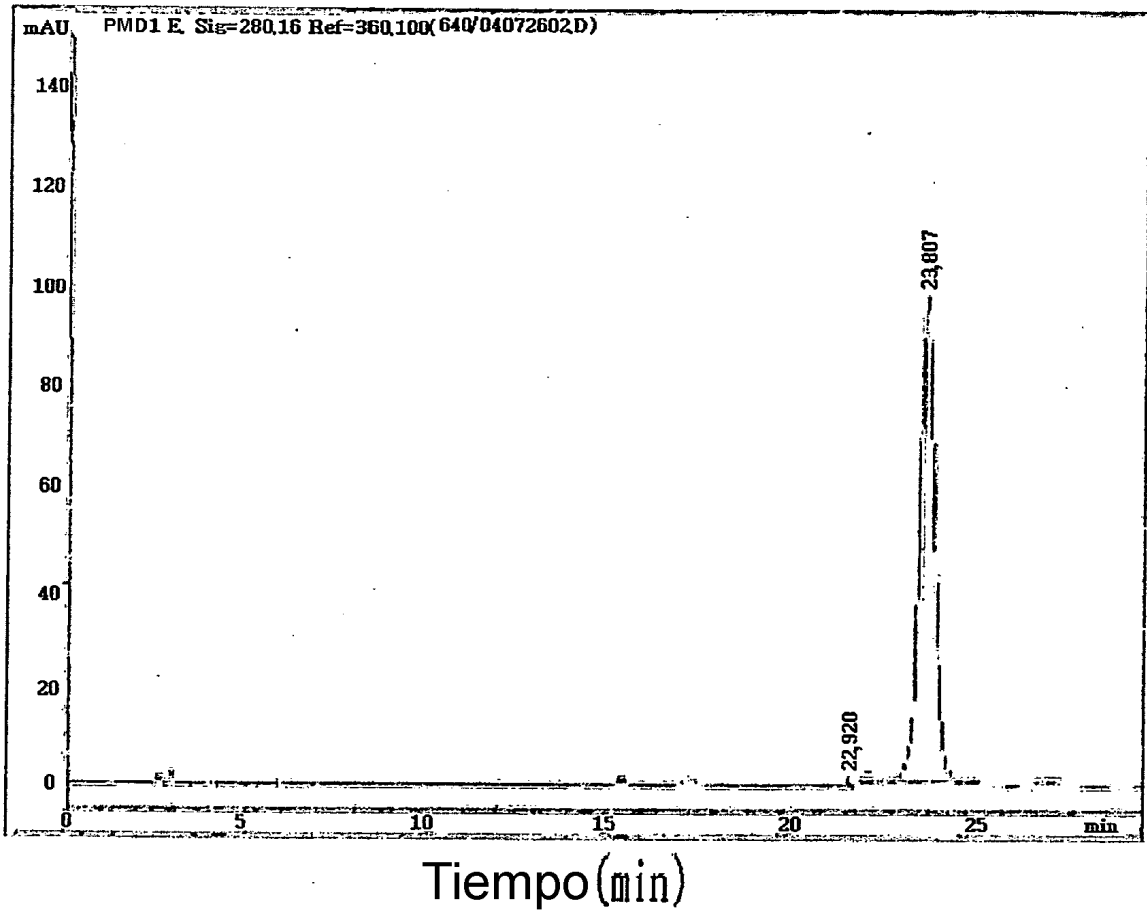


Fig. 9

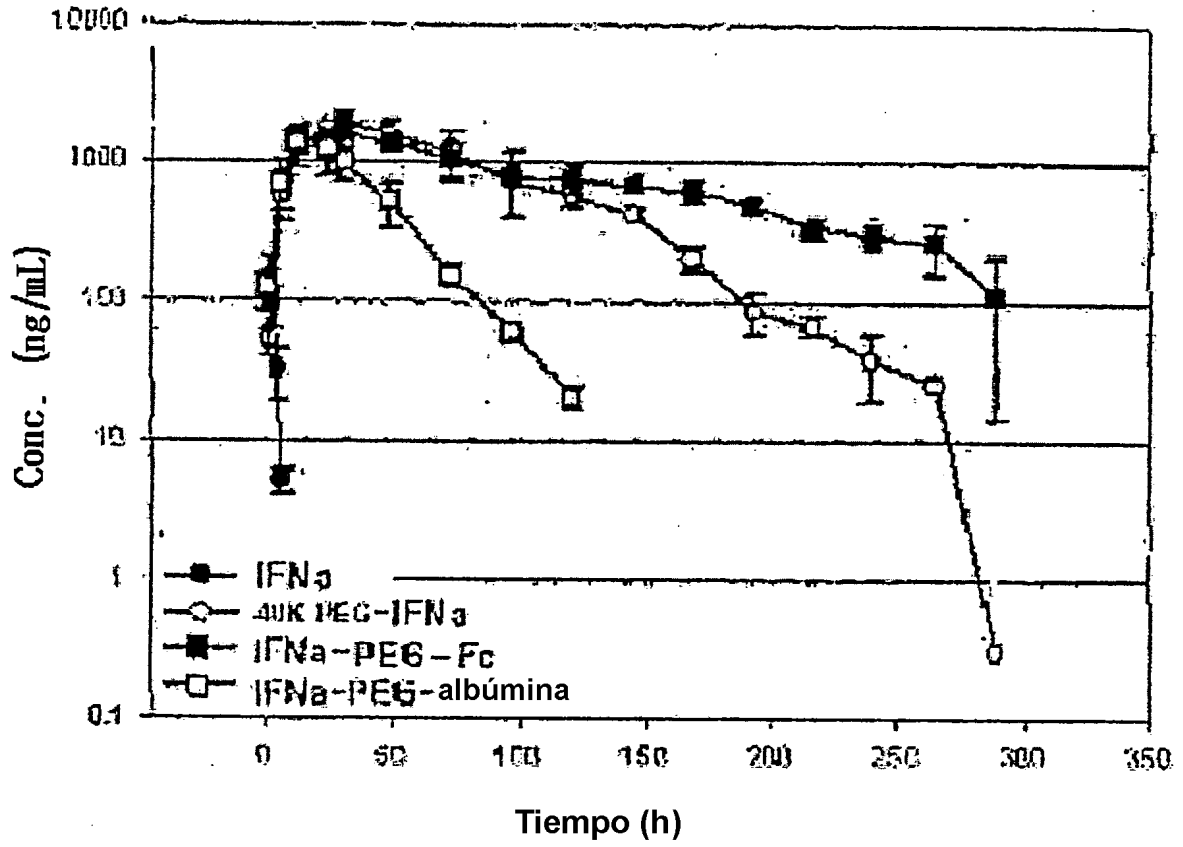


FIG. 10

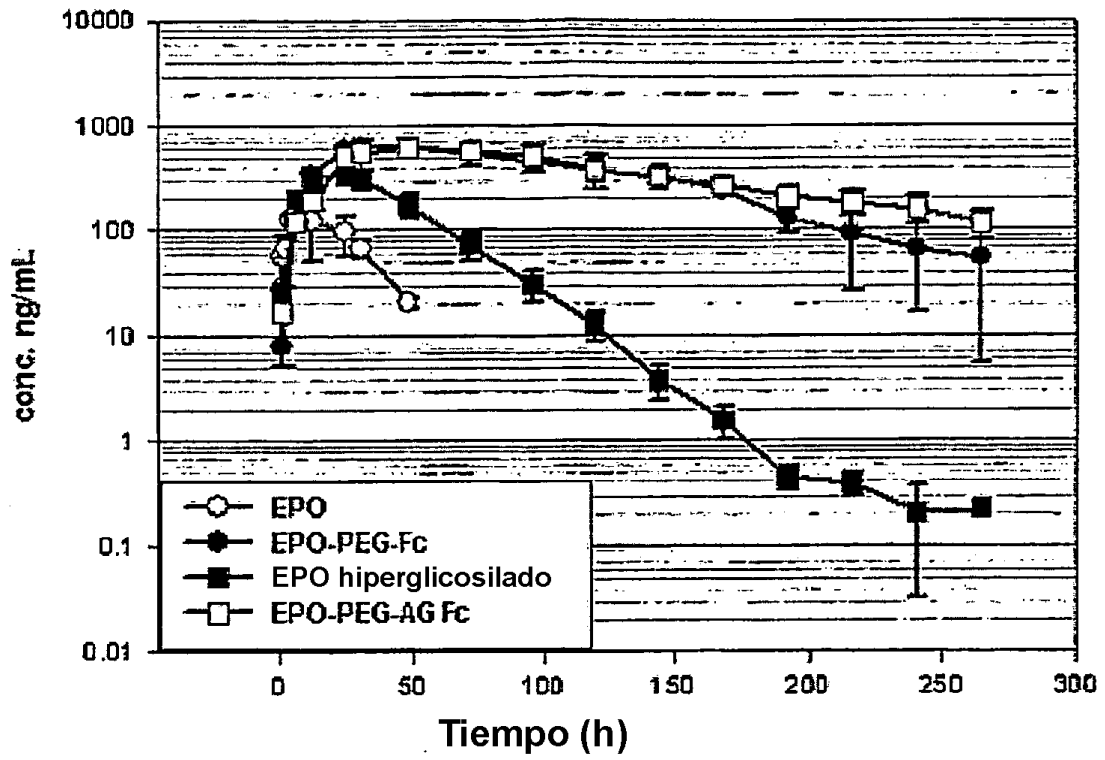


FIG. 11

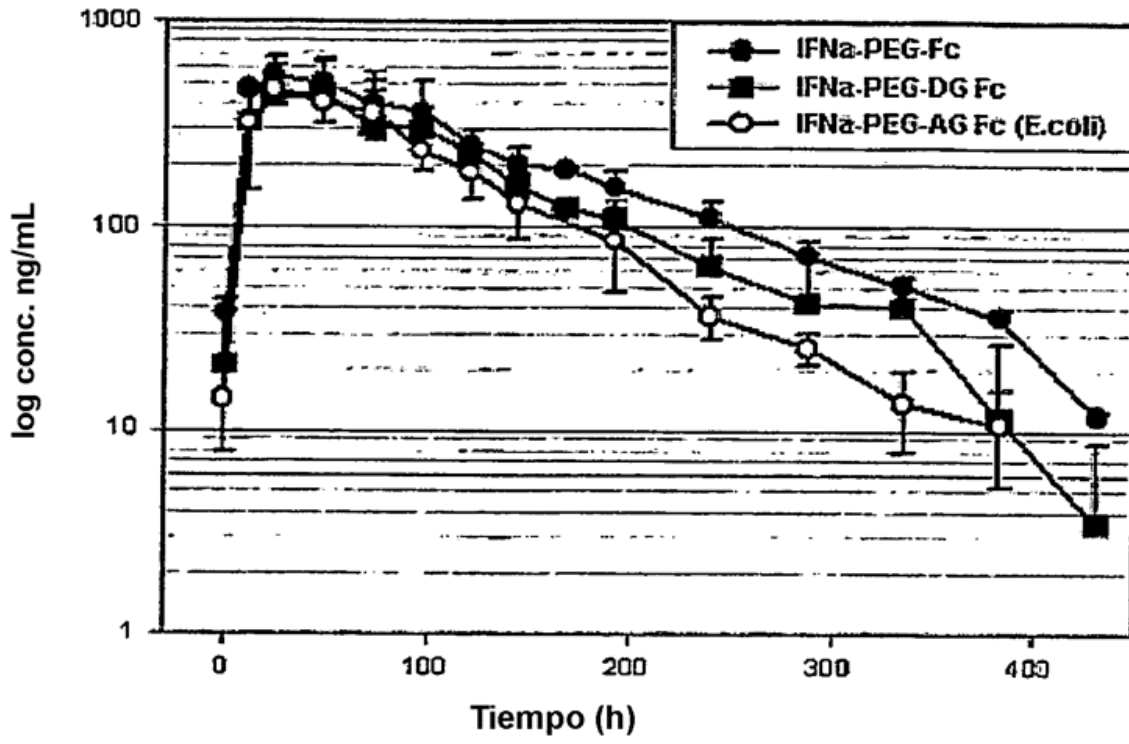


FIG. 12

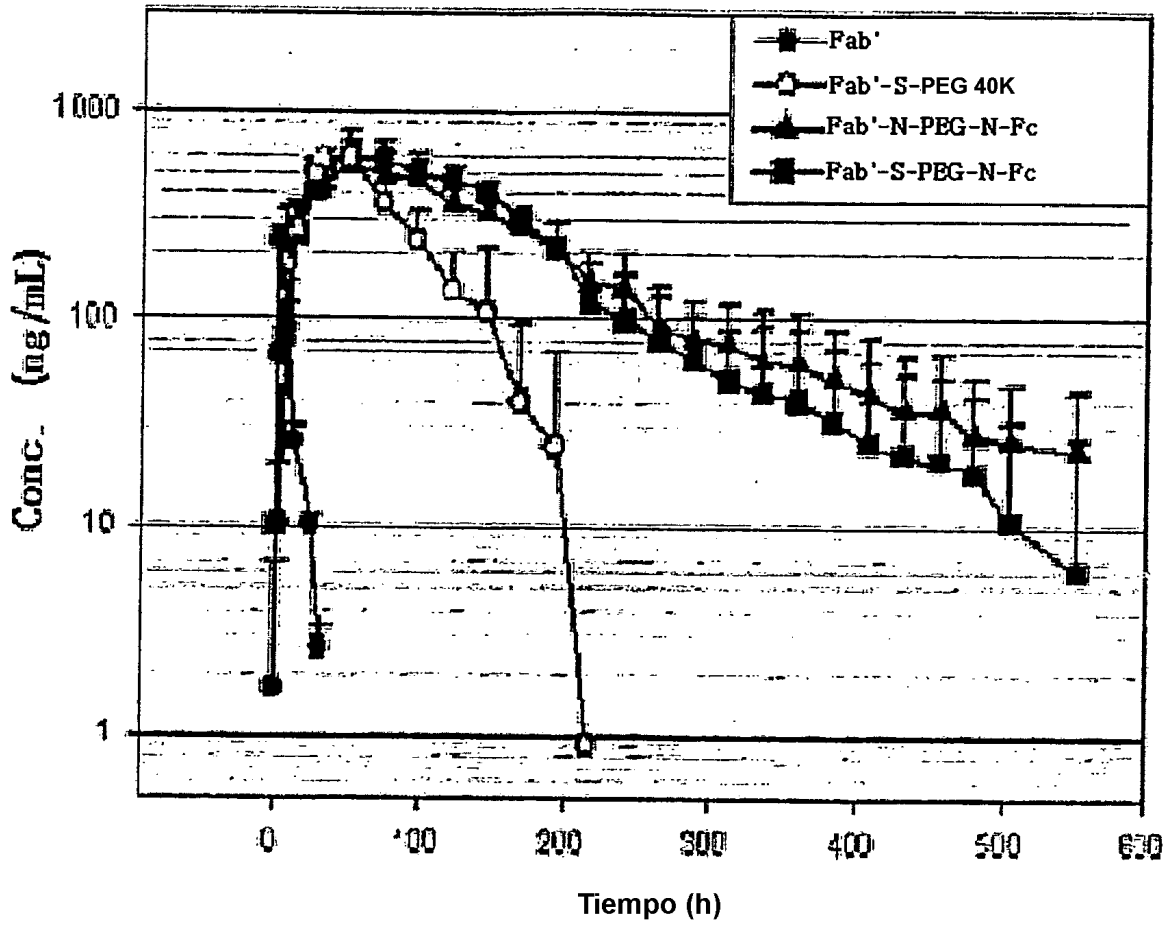


FIG. 13

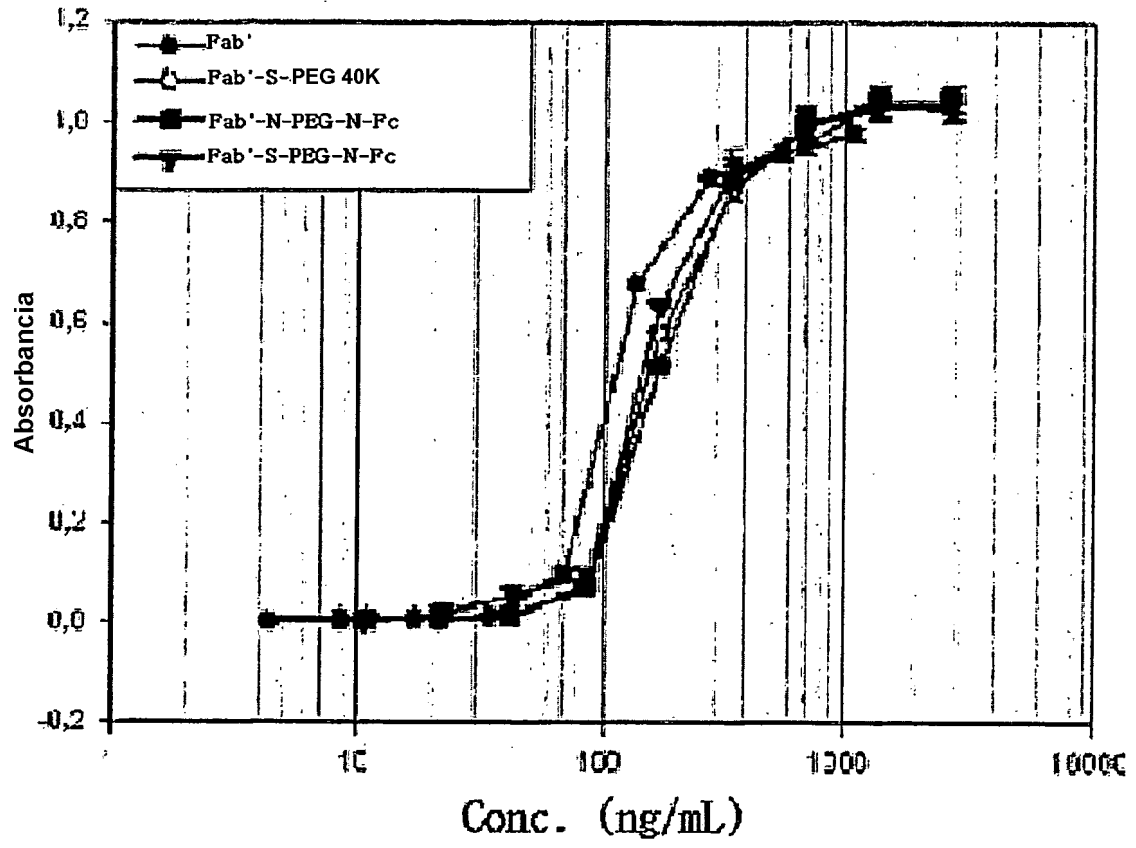


FIG. 14

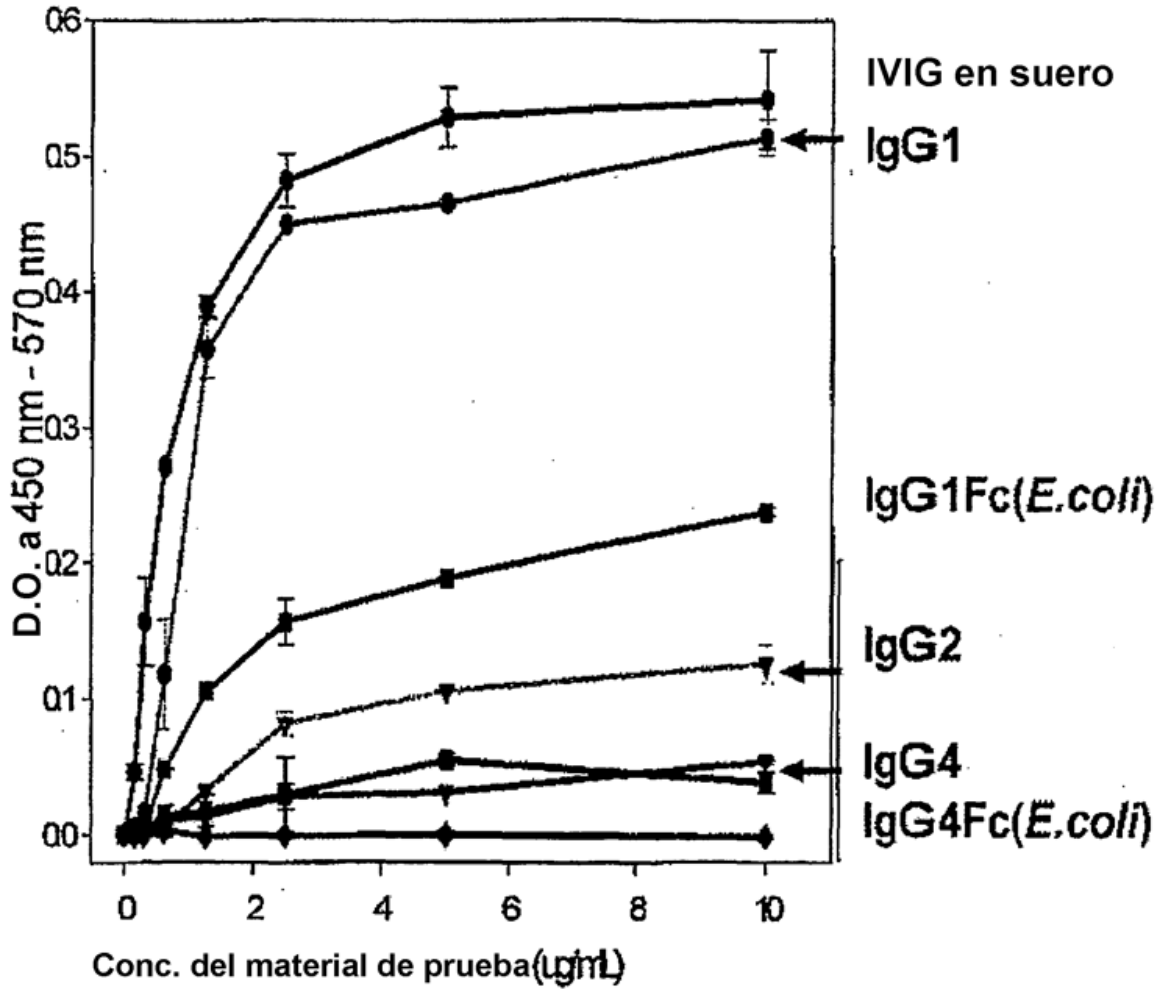


FIG. 15

