



República Federativa do Brasil
Ministério da Economia
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(11) PI 0408331-8 B1



(22) Data do Depósito: 13/03/2004

(45) Data de Concessão: 17/09/2019

(54) Título: CONJUGADO DE PROTEÍNA, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO DITO CONJUGADO DE PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA PROLONGAR A MEIA VIDA ÚTIL IN VIVO DE UM POLIPEPTÍDEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO

(51) Int.Cl.: C07K 19/00; C07K 16/00; C07K 14/00.

(30) Prioridade Unionista: 05/06/2003 KR 10-2003-0036408; 13/03/2003 KR 10-2003-0015744.

(73) Titular(es): HANMI SCIENCE CO., LTD..

(72) Inventor(es): YOUNG-MIN KIM; DAE-JIN KIM; SUNG-MIN BAE; CHANG-KI LIM; SE-CHANG KWON; GWAN-SUN LEE.

(86) Pedido PCT: PCT KR2004000535 de 13/03/2004

(87) Publicação PCT: WO 2004/081053 de 23/09/2004

(85) Data do Início da Fase Nacional: 13/09/2005

(57) Resumo: "CONJUGADO DE POLIPEPTÍDEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO POSSUINDO MEIA VIDA ÚTIL IN VIVO PROLONGADA". Conjugado de proteína possuindo uma meia vida útil in vivo prolongada de uma atividade fisiológica, compreendendo i) um polipeptídeo fisiologicamente ativo, ii) um polímero não peptídico e iii) uma imunoglobulina, sendo útil para o desenvolvimento de um medicamento de polipeptídeo devido à estabilidade in vivo melhorada e meia vida útil prolongada no sangue, enquanto reduz a possibilidade de induzir uma resposta imune.

“CONJUGADO DE PROTEÍNA, PROCESSO PARA PREPARAÇÃO DO DITO CONJUGADO DE PROTEÍNA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E PROCESSO PARA PROLONGAR A MEIA VIDA ÚTIL *IN VIVO* DE UM POLIPEPTÍDEO FISIOLÓGICAMENTE ATIVO”

Campo da Invenção

[001] A presente invenção se refere a uma proteína de longa duração, possuindo meia vida útil *in vivo* prolongada e a um processo de preparação da mesma.

Antecedentes da Invenção

[002] Polipeptídeos são suscetíveis à desnaturação ou degradação enzimática no sangue, fígado e rins. Em razão da baixa estabilidade dos polipeptídeos, é necessário administrar os medicamentos de polipeptídeos em uma frequência controlada, a um indivíduo, a fim de manter uma concentração de plasma eficaz da substância ativa. Além disso, uma vez que os medicamentos de polipeptídeo são geralmente administrados por infusão, a frequente injeção de medicamentos de polipeptídeo causa desconforto considerável a um indivíduo. Assim, têm sido realizados muitos estudos de modo a desenvolver um medicamento de polipeptídeo que possua uma meia vida útil circulante aumentada no sangue, enquanto mantendo uma eficácia farmacológica alta do mesmo. Tais medicamentos de polipeptídeo desejados também satisfariam os requisitos de estabilidade melhorada no soro, atividade alta, aplicabilidade aos vários polipeptídeos e uma probabilidade baixa de indução de resposta imune indesejada, quando injetados em um indivíduo.

[003] Um dos processos mais amplamente empregados para aperfeiçoar a estabilidade das proteínas é a modificação química de um polipeptídeo com macromoléculas altamente solúveis, tais como, polietileno glicol ("PEG) que impede os polipeptídeos de contatar as proteases. É também sabido que, quando ligado a um medicamento de polipeptídeo, específica e não especificamente, PEG aumenta a solubilidade do medicamento de polipeptídeo e impede a hidrólise do mesmo, dessa

forma aumentando a estabilidade do soro do medicamento de polipeptídeo, sem incorrer em qualquer resposta imune devido a sua antigenicidade baixa (Sada e outros, *J.Fermentation Bioengineering*, 1991, 71:137-139). Contudo, tais polipeptídeos pegilados possuem as desvantagens de abaixar ambos a atividade e o rendimento de produção de uma substância ativa conforme o peso molecular de PEG aumenta. Um interferon conjugado com dois PEGs ativados, bem como um espaçador PEG que é ligado aos dois polipeptídeos possuindo atividades diferentes são revelados na Patente US número 5.738.846 e Publicação de Patente Internacional Número WO92/16221, respectivamente; contudo, elas não mostram qualquer efeito distinto em termos de atividade prolongada dos polipeptídeos fisiologicamente ativos *in vivo*.

[004] É também reportado que a meia vida útil circulante de um fator de estimulação de colônia de granulócito humano recombinante ("G-CSF") pode ser prolongado por ligação covalente do mesmo à albumina, através de um PEG heterobifuncional (Kinstler e outros, *Pharmaceutical Research*, 1995, 12(12): 1883-1888). Contudo, a estabilidade da albumina modificada com G-CSF-PEG é meramente 4 vezes maior que a da G-CSF autêntica e, assim, isto ainda não foi colocado em prática.

[005] Como outra abordagem para melhorar a estabilidade *in vivo* dos polipeptídeos fisiologicamente ativos, é produzido um polipeptídeo ativo fundido com uma proteína estável em um transformante por uso de tecnologias recombinantes. Por exemplo, a albumina é conhecida como uma das proteínas mais eficazes para melhorar a estabilidade dos polipeptídeos fundidos à mesma e existem muitas de tais proteínas de fusão reportadas (Publicação de Patente Internacional, números WO93/15199 e 93/15200 e Publicação de Patente Europeia número 413.622). Contudo, uma proteína de fusão acoplada a albumina ainda possui o problema de atividade reduzida.

[006] A Patente US número 5.045.312 revela um processo para conjugar

hormônio do crescimento à albumina de soro bovino ou imunoglobulina de camundongo, usando um agente de reticulação, tal como, carbodiimida, glutaraldeído, ácido clorídrico, etc., a fim de melhorar a atividade do hormônio do crescimento. Contudo, esse processo é unicamente objetivado na melhora da atividade de um hormônio do crescimento alvo. Além disso, o uso de compostos químicos, tais como, carbodiimida, glutaraldeído, ácido clorídrico, etc. como um agente de reticulação é desvantajoso, devido a toxicidade potente e não especificidade de reação dos mesmos.

[007] Foi reportado que as imunoglobulinas são capazes de atuar como anticorpos para exibir citotoxicidade mediada por célula e dependente de anticorpo (ADCC) e citotoxicidade dependente de complemento (CDC), e as cadeias de açúcar desempenham um papel importante na ADCC e CDC (Burton D., *Molec. Immun.* 22, 161-206, 1985). Não obstante a ausência das cadeias de açúcar, uma imunoglobulina aglicosilada possui uma meia vida útil no sangue semelhante àquela de uma glicosilada, contudo, sua afinidade em relação a um complemento ou receptor diminui em 10 a 1.000 vezes devido à desglicosilação (Waldmann H., *Eur. J. Immunol.* 23, 403-411, 1993; Morrisson S., *J. Immunol.* 143, 2595-1601, 1989).

[008] Embora tenham sido feitas muitas tentativas de combinar um polipeptídeo fisiologicamente ativo com várias macromoléculas, todas falharam em aumentar simultaneamente a estabilidade e a atividade.

[009] Como um processo aperfeiçoado para melhorar a estabilidade de um polipeptídeo ativo e manter simultaneamente a atividade *in vivo* do mesmo, a presente invenção provê um conjugado de proteína compreendendo um polipeptídeo fisiologicamente ativo, polímero não peptídico e imunoglobulina, que são covalentemente interligados propriamente.

Sumário da Invenção

[010] Consequentemente, um objetivo primário da presente invenção é pro-

ver um conjugado de proteína possuindo uma meia vida útil *in vivo* prolongada de um polipeptídeo fisiologicamente ativo, sem induzir uma resposta imune em um indivíduo, embora minimizando a redução na atividade do polipeptídeo.

[011] Outro objetivo da presente invenção é prover um processo para preparação de um conjugado de proteína compreendendo um polipeptídeo fisiologicamente ativo, um polímero não peptídico biocompatível e uma imunoglobulina, os quais são interligados covalentemente.

[012] Um objetivo adicional da presente invenção é prover uma composição farmacêutica compreendendo os polipeptídeos fisiologicamente ativos possuindo uma meia vida útil *in vivo* prolongada.

[013] Ainda um objetivo adicional da presente invenção é prover um processo para melhorar a estabilidade *in vivo* e prolongar a meia vida útil circulante de um polipeptídeo fisiologicamente ativo, sem sacrificar a atividade do mesmo.

Breve Descrição dos Desenhos

[014] Os objetivos acima e outros além das características da presente invenção ficarão claros a partir da descrição da invenção que se segue, quanto tomada em conjunto com os desenhos anexos, que mostram respectivamente:

[015] A Figura 1 é um cromatograma dos conjugados hGH-PEG-IgG;

[016] A Figura 2 mostra resultados de SDS-PAGE de conjugados hGH-PEG-IgG;

[017] A Figura 3 mostra resultados de SDS-PAGE de conjugados de Interferon-PEG-IgG;

[018] A Figura 4 mostra resultados de SDS-PAGE de conjugados hGH-PEG-IgG antes e após tratamento de DDT;

[019] A Figura 5 mostra cromatograma de HPLC de fase reversa de um conjugado IFN α -PEG-IgG;

[020] A Figura 6 mostra um espectro de massa de conjugados hGH-PEG-

IgG;

[021] A Figura 7 mostra um gráfico farmacocinético mostrando que os conjugados hGH-PEG-IgG possuem estabilidade de soro superior ao complexo PEG-hGH;

[022] A Figura 8 mostra um gráfico farmacocinético ilustrando que os conjugados de eritropoietina-PEG-IgG possuem uma meia vida útil circulante melhorada, quando comparados a eritropoietina livre ou eritropoietina estabilizada por hiperglicosilação;

[023] A Figura 9 mostra um espectro de massa de IgG(AG IgG) aglicosilado;

[024] A Figura 10 ilustra um gráfico farmacocinético mostrando que o conjugado IFN α -PEG-AG IgG possui estabilidade em sangue melhorada quando comparado ao IFN α do tipo selvagem e mantém sua atividade a despeito da ausência da cadeia de açúcar;

[025] A Figura 11 ilustra um gráfico farmacocinético mostrando que o conjugado de EPO-PEG-AG IgG possui uma estabilidade em sangue melhorada, quando comparado ao IFN α do tipo selvagem e mantém sua atividade a despeito da ausência da cadeia de açúcar;

[026] A Figura 12 ilustra um gráfico farmacocinético mostrando que os conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG e Fab'-N-PEG-N-IgG possuem meia vida útil circulante melhorada, quando comparados ao complexo do tipo selvagem Fab' e Fab'-S-40K PEG;

[027] A Figura 13 ilustra um gráfico mostrando atividades *in vivo* de Fab' e Fab'-S-40K PEG complexo, conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG e conjugado de Fab'-N-PEG-N-IgG;

[028] A Figura 14 mostra atividade *in vivo* de conjugados de hGH-PEG-IgG com base na alteração do peso dependente de tempo em ratos após injeção apenas de veículo (30 μ g/diários; grupo 1), hGH do tipo selvagem (30 μ g/diários; grupo 2),

hGH-PEG (30 µg/diários; grupo 3), conjugado hGH-PEG-IgG (30 µg/dia; grupo 4) e conjugado hGH-PEG-IgG (10 µg/dia; grupo 5);

[029] A Figura 15 ilustra atividade *in vivo* de conjugados G-CSF-PEG-IgG com base na alteração no número de neutrófilos dependente do tempo: nenhum tratamento (grupo 1), apenas injeção de veículo (grupo 2), G-CSF tipo selvagem (grupo 3), 20 kDa PEG-G-CSF (grupo 4) e tratamento com conjugado ¹⁷S-G-CSF-PEG-IgG; e

[030] A Figura 16 ilustra atividade *in vivo* de conjugados EPO-PEG-IgG com base na alteração no número de hematócritos dependente de tempo: apenas injeção de solvente (grupo 1), EPO do tipo selvagem (grupo 2), EPO altamente glicosilado (grupo 3) e tratamento com conjugado EPO-PEG-IgG (grupo 4).

Descrição Detalhada da Invenção

[031] O termo "polipeptídeo fisiologicamente ativo" conforme usado aqui, se refere a qualquer polipeptídeo ou proteína possuindo uma atividade biológica útil, quando administrado a um mamífero incluindo seres humanos, que é intercambiável com o termo "proteína fisiologicamente ativa", "proteína ativa", "polipeptídeo ativo" ou "medicamento de peptídeo".

[032] O termo "conjugado de proteína" ou "conjugado" se refere a um composto compreendendo um polipeptídeo fisiologicamente ativo, um polímero não peptídico e uma imunoglobulina que são covalentemente interligados um ao outro de acordo com a presente invenção.

[033] O termo "complexo", conforme distinto do termo "conjugado" é usado aqui para significar aqueles compostos compreendendo apenas dois componentes selecionados de um polipeptídeo fisiologicamente ativo, uma imunoglobulina e um polímero não peptídico.

[034] O termo "polímero não peptídico" se refere a um polímero biocompatível compreendendo pelo menos dois monômeros, onde os monômeros são ligados

em conjunto através de uma ligação covalente que não uma ligação de peptídeo.

[035] De acordo com um aspecto da presente invenção, é provido um conjugado de proteína compreendendo i) polipeptídeo fisiologicamente ativo, ii) um polímero não peptídico e iii) uma imunoglobulina, que são covalentemente ligados um ao outro e possuindo uma meia vida útil prolongada *in vivo* do polipeptídeo fisiologicamente ativo.

[036] Por exemplo, o conjugado de proteína da invenção pode compreender, pelo menos, uma estrutura unitária de [polipeptídeo ativo/polímero não peptídico/imunoglobulina], onde todos os componentes são covalentemente interligados em uma forma linear. O polímero não peptídico pode ter dois grupos reativos em ambas extremidades, através dos quais o polímero é covalentemente ligado ao polipeptídeo fisiologicamente ativo e a imunoglobulina, respectivamente. Em uma concretização preferida, dois complexos de polipeptídeo fisiologicamente ativo e polímero não peptídico podem ser covalentemente ligados a uma imunoglobulina.

[037] A razão molar de polipeptídeo fisiologicamente ativo para imunoglobulina pode variar de cerca de 1:1 a 10:1, preferivelmente 1:1 a cerca de 4:1.

[038] Um tipo de polímero bem conhecido como uma combinação de tipos diferentes de polímeros pode ser usado como polímero não peptídico.

[039] No conjugado de proteína da presente invenção, os sítios de ligação apropriados da imunoglobulina podem incluir um grupo funcional livre de um resíduo de aminoácido na região variável ou região constante da imunoglobulina. Sítios apropriados da imunoglobulina para ligação covalente com polímero não peptídico ou polímero ativo podem incluir um grupo terminal amino dentro da região variável, grupo amina de resíduo de lisina ou resíduo de histidina e grupo -SH livre de cisteína e o sítio apropriado do polímero não peptídico é um grupo terminal reativo.

[040] A imunoglobulina pode ser selecionada do grupo consistindo em IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, uma combinação dos mesmos e todos os subtipos de IgG, tais

como, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. A fim de não induzir uma resposta imune em um paciente, a imunoglobulina é preferivelmente uma imunoglobulina humana.

[041] Como um componente constituindo o conjugado de proteína da invenção, a imunoglobulina pode ser tanto natural quanto isolada do sangue ou um recombinante preparado por engenharia genética. Qualquer imunoglobulina modificada com substituição, deleção ou adição de resíduos de aminoácido nos vários sítios aqui, bem como qualquer derivado da mesma hiperglicosilado, hipoglicosilado ou aglicosilado pode também ser usada para a presente invenção, à medida que, tal imunoglobulina ou derivado seja substancialmente equivalente a um tipo selvagem, em termos de função, estrutura e estabilidade da mesma. Aumento ou diminuição do grau de glicosilação ou deglicosilação pode ser realizado por qualquer um dos processos convencionais, tais como, processos químicos, enzimáticos e biotecnológicos. Os resíduos de aminoácido números 214 a 238, 297 a 299, 318 a 322 e 327 a 331 da imunoglobulina G, que são conhecidos como sítios importantes para ligação, podem ser usados como sítio apropriado para a modificação.

[042] Um polímero não peptídico apropriado possui um grupo reativo selecionado do grupo consistindo em aldeído, aldeído propiônico, aldeído butila, maleimida e derivado succinimida. O derivado de succinimida pode ser selecionado do grupo consistindo em propionato de succinimidila, carboximetil succinimidila, succinimidila hidróxi e carbonato de succinimidila. Um polímero não peptídico possuindo grupos aldeído em ambas as extremidades é eficaz na minimização do acoplamento não específico, dessa forma ligando o polímero não peptídico ao polímero fisiologicamente ativo e uma imunoglobulina em cada extremidade do polímero, respectivamente. Um conjugado de proteína produzido por alquilação redutiva de um grupo aldeído é mais estável que aquele acoplado através de uma ligação de amida.

[043] Os grupos reativos em ambas as extremidades do polímero não peptídico podem ser idênticos ou diferentes entre si. Por exemplo, um polímero não pep-

tídico pode ter um grupo maleimida em uma extremidade, e um grupo maleimida, um grupo aldeído ou um grupo aldeído propiônico na outra extremidade. Quando polietileno glicol é usado como o polímero não peptídico, um produto comercialmente disponível pode ser empregado para preparar o conjugado de proteína da invenção, ou os grupos hidróxi terminais do PEG comercial podem ser adicionalmente convertidos em outros grupos reativos antes da reação de acoplamento.

[044] O polímero não peptídico pode servir como um espaçador que liga-se covalentemente ao terminal amino, resíduo de lisina, resíduo de histidina ou resíduo de cisteína da imunoglobulina e um dos grupos reativos do polipeptídeo fisiologicamente ativo, respectivamente.

[045] O polímero não peptídico é preferivelmente selecionado do grupo consistindo em polietileno glicol, poli(propileno glicol), polímero etileno glicol-propileno glicol, poliol polioxietilado, álcool polivinílico, polissacarídeo, dextrana, éter polivinila etílico, poli(ácido láctico-glicólico), polímero biodegradável, polímero lipídico, quitina, ácidos hialurônicos e uma combinação dos mesmos. Derivados dos acima conhecidos na técnica podem ser usados para a mesma finalidade. Polímero não peptídico mais preferível é o polietileno glicol. O peso molecular do polímero não peptídico pode variar de 500 a 100.000, preferivelmente de 500 a 20.000.

[046] Agentes de reticulação previamente reportados para combinação de dois polipeptídeos por clonagem genética, tais como, oligopeptídeos, aumentam a possibilidade de resposta imune e limitam o sítio de ligação ao terminal N ou terminal C dos polipeptídeos. Consequentemente, uma vantagem do uso de um polímero não peptídico em relação aos oligopeptídeos repousa na redução de toxicidade e imunogenicidade. Outra vantagem é sua ampla aplicabilidade devido à diversidade dos sítios a serem ligados.

[047] Quando usados como um agente de reticulação, os compostos químicos menores tais como, carbodiimida e glutaraldeído podem resultar em desnatura-

ção dos polipeptídeos a serem ligados através dos mesmos ou podem obstruir uma ligação controlada e purificação do resultante. Contrário a tais substâncias químicas, o conjugado de proteína da invenção, que compreende um polímero não peptídico é vantajoso em termos de facilidade de controle da ligação, purificação dos conjugados resultantes e minimização da reação de acoplamento não específica.

[048] O conjugado de proteína da presente invenção mostra uma meia vida útil prolongada *in vivo* e atividade muito superior ao complexo de polipeptídeo-PEG ou um conjugado de polipeptídeo-PEG-albumina. De acordo com análises farmacocinéticas, a meia vida útil de um conjugado de hGH-PEG-IgG da presente invenção foi cerca e treze vezes mais longa que aquela do hGH do tipo selvagem, embora um complexo de hGH-PEG e um conjugado de hGH-PEG-albumina mostrem meia vida útil sete vezes e cinco vezes mais longas que a proteína do tipo selvagem, respectivamente (vide, Exemplo de Teste 2, Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos dos testes usando G-CSF, ¹⁷S-G-CSF, interferons ou EPO ao invés de hGH. Em comparação aos complexos de polipeptídeo ativos modificados apenas com PEG ou um complexo de PEG-albumina, o conjugado de proteína da presente invenção mostra aumentos consideráveis no tempo de residência ("MRT") e meia vida útil no soro, que são maiores em um fator de 2~70 que aqueles dos complexos convencionais (vide Exemplo 2 de Teste, Tabelas 4 a 7). Adicionalmente, conjugados de Fab'-PEG-IgG da presente invenção, isto é, conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG e Fab'-N-PEG-N-IgG, onde um complexo IgG-PEG é ligado a um grupo -SH adjacente ao terminal C de Fab' ou ao terminal N de Fab', respectivamente, mostram meia vida útil em soro duas a três vezes maiores que aquelas de um complexo Fab'-S-40K PEG (vide Exemplo 3 de Teste e Figura 12).

[049] Adicionalmente, os conjugados de proteína preparados por emprego de uma imunoglobulina aglicosilada mostram meia vida útil no sangue e atividades *in vitro* semelhantes às daquelas dos conjugados de proteína correspondentes, com-

preendendo imunoglobulina glicosilada (vide tabelas 4, 7 e 9 e Figuras 10 e 11).

[050] Os resultados das análises farmacocinéticas mostram que os conjugados de proteína da presente invenção aplicados aos vários polipeptídeos incluindo hGH, interferon, EPO, G-CSF ou seu derivado e um fragmento de antígeno exibem excelentes características de desempenho, em termos de meia vida útil no sangue e MRT e assim, podem ser vantajosamente empregados na preparação de uma formulação de medicamento de polipeptídeo possuindo uma meia vida útil prolongada *in vivo*.

[051] Adicionalmente, de acordo com os testes *in vivo* usando modelos animais, o conjugado hGH-PEG-IgG da invenção mostra uma excelente atividade *in vivo*. Especificamente, o efeito gerado pela administração do conjugado de hGH-PEG-IgG uma vez/6 dias em uma quantidade correspondendo a um terço da dose do tipo selvagem é igual ou melhor que a administração diária do tipo selvagem, o que significa que a atividade *in vivo* do conjugado de hGH-PEG-IgG é 3 vezes superior àquela do tipo selvagem (vide Figura 14).

[052] O conjugado PEG-IgG derivado de ¹⁷S-G-CSF da invenção exibe uma atividade *in vivo* três vezes superior àquela do complexo 20 kDa PEG-G-CSF e, quando administrado uma vez/5 dias, gera efeito duas vezes maior para recuperação de neutrófilos que o G-CSF do tipo selvagem administrado diariamente na mesma quantidade total de administração (Figura 15). Além disso, o conjugado de EPO-PEG-IgG induz uma razão maior e mais rápida de aumento no nível de hematócrito que a EPO do tipo selvagem e um EPO altamente glicosilado e mantém tal atividade *in vivo*, por um tempo longo (Figura 16).

[053] Esses resultados mostram que o conjugado de proteína da presente invenção aumenta, significativamente a meia vida útil no sangue e atividade *in vivo* de um polipeptídeo fisiologicamente ativo, enquanto supera o problema dos peptídeos do tipo selvagem que requerem administração frequente.

[054] Classes exemplares de polipeptídeos fisiologicamente ativos incluem os seguintes polipeptídeos e muteínas e outros análogos dos mesmos: hormônio, citocina, enzima, anticorpo, fator de crescimento, fator regulador de transcrição, fator do sangue, vacina, proteína estrutural, proteína ligante e receptor.

[055] Exemplos específicos dos polipeptídeos fisiologicamente ativos apropriados para preparação do conjugado de proteína da invenção incluem hormônio do crescimento humano, hormônio de liberação do hormônio do crescimento, peptídeo de liberação do hormônio do crescimento, interferons (por exemplo, interferons α , β e γ), fator estimulador de colônia, interleucinas (por exemplo, interleucina-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -12, -13, -14, -15, -16, -17, -18, -19, -20, -21, -22, -23, -24, -25, -26, -27, -28, -29 e -30), glicocerebrosidase, fator ativador de macrófago, peptídeo de macrófago, fator de célula B, fator de célula T, proteína A, fator supressor de alergia, glicoproteína de necrose celular, imunotoxina, linfotoxina, fator de necrose de tumor, fator inibidor de tumor, fator transformador de crescimento, alfa-1 antitripsina, albumina, apolipoproteína-E, eritropoietina, eritropoietina hiperglicosilada, fator VII, fator VIII, fator IX, ativador de plasminogênio, uroquinase, estreptoquinase, proteína C, proteína reativa C, inibidor de renina, inibidor de colágeno, superóxido dismutase, leptina, fator do crescimento derivado de plaqueta, fator do crescimento epidérmico, fator do crescimento osteogênico, proteína estimuladora da osteogênese, calcitonina, insulina, atriopeptina, fator de indução de cartilagem, proteína ativadora de tecido conjuntivo, hormônio de estimulação folicular, hormônio luteinizante, hormônio de liberação de FSH, fator de crescimento de nervos, hormônio da parati-reóide, relaxina, secretina, somatomedina, fator do crescimento semelhante a insulina, hormônio adrenocorticotrófico, glucagon, colecistocinina, polipeptídeo pancreático, peptídeo de liberação de gastrina, fator de liberação de corticotropina, hormônio estimulador da tireoide, receptor (por exemplo, TNFR(P75) e TNFR(P55), antagonista de receptor (por exemplo, IL1-Ra), antígeno de superfície de célula (por exemplo,

CD2, 3, 4, 5, 7, 11a, 11b, 18, 19, 20, 23, 25, 33, 38, 40, 45 e 69), anticorpo monoclonal, anticorpo policlonal, fragmento de anticorpo e antígeno de vacina derivado de vírus.

[056] O fragmento de anticorpo se refere a um fragmento de um anticorpo capaz de ligar-se a um antígeno específico, por exemplo, Fab, Fab', F(ab')₂, Fd e scFv, onde Fab' é preferido. O fragmento Fab consiste nos domínios variáveis e nos primeiros domínios de constante (domínios C_H1) de cadeias leve e pesada de um anticorpo; fragmento Fab', um fragmento Fab mais vários resíduos de aminoácido contendo um ou mais resíduos de cisteína de uma região de articulação, anexados ao terminal C do domínio C_H1; fragmento F(ab')₂, dois fragmentos Fab' ligados entre si por uma ligação de dissulfeto ou por uma região química; e fragmento Fd, região variável e o primeiro domínio de constante (C_H1) de uma cadeia pesada. O fragmento scFv é uma cadeia de polipeptídeo simples consistindo em regiões variáveis de uma cadeia pesada e leve ligada uma a outra por um ligante de peptídeo.

[057] Um polipeptídeo especificamente preferido é o selecionado do grupo consistindo em hormônio do crescimento humano, interferons (por exemplo, interferons α , β e γ), fator estimulador da colônia de granulócito e eritropoietina em vista do fato de que esses polipeptídeos precisam de administração mais frequente que outros para a finalidade de tratar ou prevenir doenças relevantes.

[058] A lista de polipeptídeos fisiologicamente ativos, a qual a presente invenção pode ser aplicada, não é limitada aqueles citados acima, porém inclui quaisquer muteínas ou derivados das mesmas, à medida que, a função, estrutura, atividade e estabilidade da muteína ou derivado podem ser reconhecidas como equivalentes ou superiores aquelas dos polipeptídeos do tipo selvagem.

[059] Outro aspecto da presente invenção é o fornecimento de um processo para preparação de conjugado de proteína, que compreende as etapas de:

(a) ligação covalente de pelo menos um polipeptídeo fisiologicamente ativo

a pelo menos uma imunoglobulina com pelo menos um polímero não peptídico possuindo grupos reativos em ambas extremidades; e

(b) isolamento do conjugado de proteína compreendendo, essencialmente, o polipeptídeo fisiologicamente ativo, a imunoglobulina e o polipeptídeo não peptídico, que são interligados covalentemente.

[060] Na etapa (a) do processo acima, polipeptídeos, imunoglobulinas e polímeros não peptídicos podem ser covalentemente ligados por uma reação de duas etapas ou uma reação simultânea. A reação de duas etapas (por exemplo, um polímero não peptídico é covalente ligado ao polipeptídeo ativo ou uma imunoglobulina e, então, o complexo resultante é covalentemente ligado a um polipeptídeo ativo ou uma imunoglobulina para fornecer um conjugado do mesmo, onde o polipeptídeo ativo e a imunoglobulina são ligados entre si, através de um polímero não peptídico) é vantajosa na redução da produção de subprodutos indesejados.

[061] Consequentemente, a etapa (a) do processo acima pode compreender:

(a1) acoplamento covalente de uma extremidade do polímero não peptídico com uma imunoglobulina ou um polipeptídeo fisiologicamente ativo;

(a2) isolamento da mistura de reação de um complexo compreendendo polímero não peptídico com a imunoglobulina ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo; e

(a3) acoplamento covalente da extremidade livre do polímero não peptídico do complexo com a imunoglobulina ou polipeptídeo fisiologicamente ativo, para produzir um conjugado de proteína onde o polímero não peptídico interliga, covalentemente, o polipeptídeo fisiologicamente ativo e a imunoglobulina.

[062] A razão molar do polipeptídeo fisiologicamente ativo para o polímero não peptídico na etapa (a1) pode preferivelmente variar de 1:2,5 a 1:5 e a razão molar de imunoglobulina para o polímero não peptídico na etapa (a1), preferivelmente de 1:5 a 1:10. A razão molar do complexo obtido na etapa (a2) para o polipeptídeo

fisiologicamente ativo ou imunoglobulina na etapa (a3) pode variar de 1:0,5 a 1:20, preferivelmente 1:1 a 1:5.

[063] As etapas (a1) e (a3) podem ser preferivelmente realizadas em presença de um agente de redução, que pode ser selecionado do grupo consistindo em cianoboroidreto de sódio, boroidreto de sódio, borato de dimetilamina e borato de piridina.

[064] Os procedimentos para conduzir as etapas (a2) e (b) podem ter como base processos convencionais usados para purificar proteínas, tais como, cromatografia de exclusão por tamanho, cromatografia de troca de íon, etc. e uma combinação das mesmas, de acordo com a extensão da pureza necessária e das propriedades do conjugado resultante incluindo peso molecular e eletricidade.

[065] Ainda outro aspecto da presente invenção é a provisão de uma composição farmacêutica de um polipeptídeo fisiologicamente ativo possuindo meia vida útil *in vivo* prolongada, em comparação aos polipeptídeos não modificados, que compreende um conjugado de proteína da invenção e um veículo farmacêuticamente aceitável (excipiente).

[066] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser administrada através de várias vias incluindo introdução oral, transdérmica, subcutânea, intravenosa e intramuscular, a injeção sendo a mais preferida. A composição da invenção pode ser formulada de modo a prover uma liberação rápida, prolongada ou retardada do ingrediente ativo, após o mesmo ter sido administrado a um paciente, por emprego de qualquer um dos procedimentos bem conhecidos na técnica. A formulação pode estar na forma de um comprimido, pílula, pó, sachê, elixir, suspensão, emulsão, solução, aerossol, xarope, cápsula de gelatina dura e macia, solução injetável estéril, pó embalado estéril e semelhantes. Exemplos de veículos apropriados, excipientes ou diluentes são lactose, dextrose, sacarose, sorbitol, manitol, amidos, goma acácia, alginatos, gelatina, fosfato de cálcio, silicato de cálcio, polivinilpir-

rolidona, celulose, metilcelulose, celulose microcristalina, água, metilidroxibenzoatos, propilidroxibenzoatos, talco, estearato de magnésio e óleo mineral. A formulação pode incluir adicionalmente cargas, agentes anticoagulantes, agentes lubrificantes, agentes umectantes, agentes aromatizantes, emulsificadores, preservativos e semelhantes.

[067] A quantidade de ingrediente ativo realmente administrado deve ser determinada a luz dos vários fatores relevantes incluindo a condição a ser tratada, a via de administração escolhida, a idade, sexo e peso corpóreo do paciente individual e a gravidade dos sintomas do paciente, especialmente o tipo de ingrediente ativo. Devido à estabilidade melhorada de um conjugado de proteína da invenção, o número total e frequência de administração da formulação de medicamento de polipeptídeo compreendendo o conjugado de proteína pode ser consideravelmente reduzida.

[068] A presente invenção é adicionalmente definida nos exemplos que se seguem. Deve ser entendido que esses exemplos, embora indicando concretizações preferidas da invenção, são fornecidos apenas como ilustração e não devem limitar o escopo da invenção.

Exemplo 1: Preparação do conjugado I hGH-PEG-IgG

(Etapa 1) Preparação do Complexo de hGH-PEG

[069] Hormônio do crescimento humano (hGH, P. M. 22 kDa) foi dissolvido em 100 mM de solução de tampão fosfato a uma concentração de 5 mg/mL e polietileno glicol contendo grupos aldeído em ambas extremidades (ALD-PEG-ALD, Shearwater Inc. USA) que possui um peso molecular de 3,4 kDa foi adicionada à solução tampão resultante em uma quantidade correspondendo a uma razão molar hGH : PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 ou 1:20. Cianoboroidreto de sódio (NaCNBH_3 , Sigma) foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de reação foi agitada a 4°C por 3 horas. Para separar um complexo de hGH-

PEG no qual PEG é seletivamente ligado ao resíduo amino terminal de hGH em uma razão molar de 1:1, a mistura de reação foi submetida à cromatografia por exclusão de tamanho Superdex^R (Pharmacia, USA). O complexo hGH-PEG foi eluído e purificado da coluna com um tampão fosfato de potássio a 10 mM (pH 6,0) para remover contaminantes, tais como, hGH não modificado, PEG não reagido e subprodutos diméricos possuindo duas moléculas de hGH ligadas em ambas extremidades de PEG. O complexo hGH-PEG purificado foi concentrado para 5 mg/mL. Foi verificado que a razão molar hGH:PEG ótima para obtenção do melhor resultado estava na faixa de 1:2,5 a 1:5.

(Etapa 2) Formação do conjugado entre complexo hGH-PEG e IgG

[070] Imunoglobulina G (IgG, Green Cross, Coréia) possuindo um peso molecular de 150 kDa foi dissolvida em 100 mM de solução de tampão fosfato. Para conjugar IgG ao grupo aldeído do complexo PEG-hGH purificado no Exemplo 1, o complexo PEG-hGH foi adicionado a uma solução tampão contendo IgG, em uma quantidade correspondendo uma razão molar de complexo hGH-PEG:IgG de 1:1, 1:2, 1:4 ou 1:8. NaCNBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de reação foi gentilmente agitada a 4°C por 20 horas. Para purificar o conjugado hGH-PEG-IgG dos contaminantes após a reação de conjugação, a mistura de reação foi submetida à cromatografia de troca de ânion usando uma coluna DEAE (Pharmacia, USA) equilibrada com solução de tampão Tris de 20 mM (pH 7,5). A fase móvel foi mudada do Tampão A (tampão Tris 20 mM, pH 7,5) para Tampão B (tampão Tris 20 mM contendo 1,0 M NaCl, pH 7,5) com um gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0 M → 0,5 M). Para remover pequenas quantidades de IgG não reagido e hGH não modificado do conjugado hGH-PEG-IgG eluído, a solução de eluição foi submetida à cromatografia de troca de cátion usando uma coluna poliCAT (PolyLC, USA) equilibrada com acetato de sódio 10 mM (pH 4,5). A fase móvel foi alterada do Tampão A (10 mM de acetato

de sódio, pH 4,5) para Tampão B (10 mM acetato de sódio contendo 1,0 M NaCl, pH 7,5) em um modo linear (concentração de NaCl: 0 M $\rightarrow$ 0,5 M), o que resulta em purificação do conjugado hGH-PEG-IgG (Figura 1).

[071] Foi verificado que a razão molar do complexo hGH-PEG ótimo:IgG para obtenção do melhor resultado foi de 1:4.

Exemplo 2: Preparação do Conjugado II hGH-PEG-IgG

(Etapa 1) Preparação do Complexo IgG-PEG

[072] IgG (Green Cross, Coréia) foi dissolvido em 10 mM de tampão fosfato a uma concentração de 15 mg/mL e 3,4 kDa de ALD-PEG-ALD (Shearwater Inc, USA) foram adicionados à solução de tampão resultante em uma quantidade correspondendo a uma razão molar IgG:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 ou 1:20. NaC-NBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de reação foi agitada a 4°C por 3 horas. Para separar o complexo de IgG-PEG no qual PEG é seletivamente ligado ao resíduo amino terminal de IgG em uma razão molar de 1:1, a mistura de reação foi submetida a cromatografia por exclusão de tamanho Superdex^R (Pharmacia, USA). O complexo hGH-PEG foi eluído e purificado da coluna com um tampão fosfato de potássio a 10 mM (pH 6,0) para remover contaminantes, tais como, IgG não modificado, PEG não reagido e subprodutos diméricos possuindo duas moléculas de IgG ligadas em ambas extremidades de PEG. O complexo IgG-PEG purificado foi concentrado para 15 mg/mL. Foi verificado que a razão molar IgG:PEG ótima para obtenção do melhor resultado estava na faixa de 1:5 a 1:10.

(Etapa 2) Formação do conjugado entre complexo IgG-PEG e hGH

[073] Para conjugar hGH (P. M. 22 kDa) ao complexo de IgG-PEG purificado no Exemplo 1, hGH dissolvido em tampão fosfato 100 mM foi reagido com complexo IgG-PEG em uma razão molar de 1:1, 1:1,5, 1:3 ou 1:6. NaCNBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de rea-

ção foi gentilmente agitada a 4°C por 20 horas. A mistura de reação foi submetida a purificação de acordo com o mesmo processo descrito na etapa 2 do Exemplo 1, para remover substâncias não reagidas e subprodutos e o conjugado de IgG-PEG-hGH foi purificado da mesma.

Exemplo 3: Preparação de conjugado IFN α -PEG-IgG

[074] Um conjugado IFN α -PEG-IgG foi preparado e purificado de acordo com o mesmo processo descrito no Exemplo 1, exceto que interferon alfa 2b (IFN α 2b, P. M. 20 kDa) foi empregado ao invés de hGH e a razão molar de IFN α 2b:ALD-PEG-ALD (peso molecular 3,4 kDa) foi de 1:5.

Exemplo 4: Preparação de conjugado G-CSF-PEG-IgG humano

[075] Um conjugado G-CSF-PEG-IgG foi preparado e purificado de acordo com o mesmo processo descrito no Exemplo 1, exceto que o fator de estimulação de colônia de granulócito humano (G-CSF, peso molecular 18,7 kDa) foi empregado ao invés de hGH e a razão molar G-CSF:ALD-PEG-ALD (P. M. 3,4 kDa) foi de 1:5.

[076] Adicionalmente, o conjugado PEG-IgG derivado de G-CSF foi preparado e purificado de acordo com o mesmo processo descrito acima usando (^{17}S -G-CSF) derivado de G-CSF que foi obtido por substituição do 17º aminoácido de G-CSF selvagem com serina.

Exemplo 5: Preparação de conjugado EPO-PEG-IgG

[077] Um conjugado EPO-PEG-IgG foi preparado e purificado de acordo com o mesmo processo descrito no Exemplo 1, exceto que eritropoietina humana (EPO, P. M. 35 kDa) foi empregada ao invés de hGH e a razão molar de EPO:ALD-PEG-ALD (peso molecular 3,4 kDa) era 1:5.

Exemplo 6: Preparação do conjugado de proteína usando PEG possuindo um grupo funcional diferente

[078] Conjugados hGH-PEG-IgG foram preparados conforme se segue, usando um PEG possuindo grupos funcionais diferentes que outros grupos aldeído

em ambas extremidades do mesmo. 10 mg de hGH dissolvidos em 100 mM tampão fosfato foram reagidos com grupos propionato succinimidila contendo PEG (SPA) em ambas extremidades (SPA-PEG-SPA, Shearwater Inc., USA, peso molecular 3,4 kDa) em uma quantidade correspondendo a uma razão molar hGH:PEG de 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10 ou 1:20. A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 2 horas. Para obter um complexo hGH-PEG onde PEG é seletivamente ligado ao resíduo de lisina de hGH em uma razão molar de 1:1, a mistura de reação foi submetida a cromatografia por exclusão de tamanho Superdex^R (Pharmacia, USA). O complexo hGH-PEG foi eluído e purificado da coluna com um tampão fosfato de potássio a 10 mM (pH 6,0) para remover contaminantes, tais como, hGH não modificado, PEG não reagido e subprodutos diméricos possuindo duas moléculas de hGH ligadas em ambas extremidades de PEG. O complexo hGH-PEG purificado foi concentrado para 5 mg/mL. Foi preparado um conjugado de hGH-PEG-IgG usando complexo hGH-PEG concentrado de acordo com o mesmo processo descrito no Exemplo 1. Foi verificado que uma razão molar hGH:PEG ótima para obtenção do melhor resultado estava na faixa de 1:2,5 a 1:5.

[079] Outro conjugado hGH-PEG-IgG foi preparado e purificado de acordo com o mesmo processo descrito acima, exceto que grupos N-hidroxisuccinimidila contendo PEG (NHS) em ambas extremidades (NHS-PEG-NHS, Shearwater Inc, USA) foram empregados ao invés de SPA-PEG-SPA.

Exemplo 7: Preparação do conjugado de proteína usando PEG possuindo um peso molecular diferente

[080] Um complexo hGH-PEG foi preparado e purificado de acordo com o mesmo processo descrito na etapa 1 do Exemplo 1, exceto que grupos aldeído contendo PEG em ambas as extremidades e possuindo um peso molecular de 10.000 Dalton (ALD-PEG-ALD, Shearwater Inc, USA) foi empregado. Nessa hora, foi verificado que uma razão molar de hGH:PEG ótima para obtenção do melhor resultado

estava na faixa de 1:2,5 a 1:5. O complexo hGH-PEG purificado foi concentrado a 5 mg/mL. Um conjugado hGH-PEG-IgG foi preparado usando o complexo concentrado hGH-PEG de acordo com o mesmo processo descrito na etapa 2 do Exemplo 1.

Exemplo 8: Preparação do conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG (grupo SH)

(Etapa 1) Expressão e Purificação de Fab'

[081] *Escherichia coli* BL21/poDLHF (Depósito número: KCCM 10511) expressando anti-TNF- α Fab' foi inoculado em 100 mL de meio LB e cultivado por toda a noite com agitação. O caldo LB cultivado foi transferido para um fermentador de 5 L (Marubishi) e cultivado sob a condição de temperatura de 30°C, razão de aeração 20 vvm, velocidade de agitação 500 rpm. Com o progresso da fermentação, quantidades apropriadas de glicose e extrato de levedura foram adicionadas à cultura para suplementação de racionamento de fontes de energia causado pelo desenvolvimento de micro-organismos. Quando a absorvência a 600 nm do caldo cultivado alcançou 80, IPTG foi adicionado à cultura para induzir a expressão da proteína. O cultivo continuou por mais 40 a 45 horas até a absorvência a 600 nm do caldo cultivado alcançar 120 a 140. O caldo de cultura resultante foi centrifugado a 20.000 x g por 30 minutos para obter um sobrenadante.

[082] O sobrenadante foi submetido ao seguinte processo de purificação cromatográfico de três etapas para a purificação de anti-TNF- α Fab'. O sobrenadante foi carregado em uma coluna de Proteína HiTrap G (5 mL, Pharmacia, Alemanha) equilibrada com 20 mM de tampão fosfato (pH 7,0) e eluída com 100 mM de tampão glicina (pH 3,0). A fração de Fab' eluída foi carregada em uma coluna Superdex 200 (Pharmacia, Alemanha) equilibrada com 10 mM de salmoura tamponada de fosfato (PBS, pH 7,3) e eluída com o mesmo tampão. A fração Fab' eluída foi carregada em um poliCAT 21 x 250 (PolyLC Inc., USA) e eluída com 10 mM de tampão acetato (pH 4,5) sob um gradiente de concentração linear de NaCl (0,15 M -> 0,4 M) para obter uma fração anti-TNF- α Fab' pura.

(Etapa 2) Preparação de um complexo IgG-PEG

[083] 150 mg de imunoglobulina G (IgG, P. M. 150 kDa, Green Gross Inc., Coréia) foi dissolvido em 100 mM de PBS (pH 6,0) a uma concentração de 5 mg/mL, e NHS-PEG-MAL (PESO MOLECULAR 3400 Da, Shearwater Inc., USA) foi adicionado à solução resultante em uma quantidade correspondendo a uma razão molar IgG:PEG de 1:10. A mistura de reação foi gentilmente agitada a 4°C por 12 horas.

[084] Após término da reação, o tampão de reação foi alterado para 20 mM de PBS (pH 6,0) para remover NHS-PEG-MAL não reagido. Após isso, a mistura de reação foi carregada em uma coluna polyCAT 21 x 250 (PolyLC Inc., USA) e eluída com 20 mM de PBS (pH 6,0) usando um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl 0,15 M -> 0,5 M) para obter um complexo IgG-PEG. O IgG não reagido foi eluído depois do complexo IgG-PEG e descartado.

(Etapa 3) Preparação de conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG (grupo -SH)

[085] Fab' purificado obtido na etapa 1 foi dissolvido em 100 mM de PBS (pH 7,3) a uma concentração de 2 mg/mL e complexo de IgG-PEG preparado na Etapa 2 foi adicionado à solução resultante, em uma quantidade correspondendo à razão molar Fab':complexo de 1:5. A mistura de reação foi concentrada a uma concentração de proteína de 50 mg/mL e o concentrado foi gentilmente agitado a 4°C por 24 horas.

[086] Mediante término da reação de acoplamento, a mistura de reação foi carregada a uma coluna Superdex 200 (Pharmacia, USA) equilibrada com 10 mM de PBS (pH 7,3) e eluída com o mesmo tampão a uma razão de fluxo de 1 mL/min para obter uma fração de conjugado Fab' -S-PEG-N-IgG possuindo um peso molecular superior eluído anteriormente e o complexo IgG-PEG e Fab' foram eluídos depois que o conjugado e descartados. A fim de remover o restante do complexo IgG-PEG não reagido, a fração de conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG foi carregada em uma coluna polyCAT 21 x 250 (PolyLC Inc, USA) e eluída com 20 mM de PBS (pH 6,0)

usando um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0,15 M -> 0,5 M). Consequentemente, uma fração contendo conjugado Fab'-S-PEG-N-IgG puro foi obtida, onde o complexo IgG-PEG foi ligado ao grupo -SH adjacente ao terminal C de Fab'.

Exemplo 9: Preparação de conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG (terminal N)

(Etapa 1) Preparação de complexo Fab'-PEG (terminal N)

[087] 40 mg de Fab' purificado na etapa 1 do Exemplo 8 foram dissolvidos em 100 mM de PBS (pH 6,0) a uma concentração de 5 mg/mL e ButylALD-PEG-ButylALD (PESO MOLECULAR 3400 Da, Shearwater Inc., USA) foi adicionado à solução resultante em uma quantidade correspondendo a uma razão molar Fab':PEG de 1:5. NaCNBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de reação foi gentilmente agitada a 4°C por 2 horas.

[088] Mediante término da reação, o tampão foi alterado para 20 mM de PBS (pH 6,0). Após a alteração no tampão, a mistura foi carregada em uma coluna polyCAT 21 x 250 (PolyLC Inc., USA) e eluída com 20 mM de PBS (pH 4,5) usando um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0,15 M -> 0,4 M) para obter uma fração contendo um complexo Fab'-PEG. O Fab' não reagido foi eluído depois que o complexo é descartado.

(Etapa 2) Preparação de conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG (terminal N)

[089] O complexo Fab'-PEG purificado obtido na etapa 1 foi dissolvido em 100 mM de PBS (pH 6,0) a uma concentração de 10 mg/mL e IgG (PESO MOLECULAR 150 kDa, Green Cross Ind, Coréia) foi adicionado à solução resultante em uma quantidade correspondendo à razão molar complexo : IgG de 1:5. A mistura de reação foi concentrada a uma concentração de proteína de 50 mg/mL. NaCNBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de reação foi gentilmente agitada a 4°C por 24 horas.

[090] Mediante término da reação de acoplamento, a mistura de reação foi carregada em uma coluna Superdex 200 (Pharmacia, USA) equilibrada com 10 mM de PBS (pH 7,3) e eluída com o mesmo tampão a uma razão de fluxo de 1 mL/min para obter uma fração contendo um conjugado Fab'-N-PEG-IgG. O conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG possuindo um peso molecular maior eluiu mais cedo e a imunoglobulina não reagida e o complexo Fab'-PEG foi eluído depois do conjugado e descartado. A fim de remover a imunoglobulina não reagida restante, a fração de conjugado de Fab'-N-PEG-N-IgG foi carregada em uma coluna polyCAT 21 x 250 (PolyLC Inc., USA) e eluída com 20 mM de PBS (pH 6,0) usando um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0,15 M -> 0,5 M). Consequentemente, uma fração contendo conjugado Fab'-N-PEG-N-IgG puro foi obtida, onde o complexo IgG-PEG foi ligado ao terminal N de Fab'.

Exemplo 10: Preparação de IgG aglicosilado (AG IgG)

[091] 200 mg de imunoglobulina G (Green Cross Inc., Coréia) foram dissolvidos em 100 mM de tampão fosfato (pH 7,5) a uma concentração de 2 mg/mL e 300 U/mg de uma aglicosilase, PNGase F (NEB Inc., Reino Unido) foram adicionados. A mistura foi reagida a 37°C por 24 horas com agitação branda. Mediante término da reação, a mistura de reação foi carregada em uma coluna SP sepharose FF (Pharmacia, Alemanha) e eluída com 10 mM de tampão acetato (pH 4,5) usando um processo de gradiente de concentração linear empregando 1 M de NaCl (concentração de NaCl: 0,1 M -> 0,6 M) para obter uma fração de IgG aglicosilado, que foi eluída depois que o IgG do tipo selvagem.

Exemplo 11: Preparação de conjugado IFN α -PEG-AG IgG

[092] Um conjugado IFN α -PEG-AG IgG foi preparado como se segue, por conjugação de IgG(AG IgG) aglicosilado preparado no Exemplo 10 a um complexo IFN α -PEG preparado no Exemplo 3.

[093] O AG IgG (peso molecular: cerca de 147 kDa) foi dissolvido em 10

mM de tampão fosfato. O complexo IFN α -PEG foi adicionado ao tampão contendo AG IgG em uma quantidade correspondendo a uma razão molar de complexo IFN α -PEG: AG IgG de 1:1, 1:2, 1:4 ou 1:8. A mistura resultante foi ajustada para 100 mM de tampão fosfato e NaCNBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução. A mistura de reação foi gentilmente agitada a 4°C por 20 horas. Foi verificado que a razão molar de complexo IFN α -PEG:AG IgG para obtenção do melhor resultado foi de 1:2.

[094] Para purificar o conjugado IFN α -PEG-AG IgG de contaminantes após a reação de conjugação, a mistura de reação foi submetida a uma cromatografia de exclusão por tamanho. A mistura de reação foi carregada em uma coluna Superdex^R (Pharmacia USA) e eluída com 10 mM de PBS (pH 7,3) a uma razão de fluxo de 2,5 mL/min para obter uma fração de conjugado de IFN α -PEG-AG IgG e também para remover os contaminantes tal como Ag IgG e complexo IFN α -PEG não reagidos. A fração de conjugado IFN α -PEG-AG IgG assim obtida foi adicionalmente submetida à cromatografia de troca de cátion para remover pequenas quantidades de AG IgG e completo IFN α -PEG não reagidas. A fração foi carregada em uma coluna polyCAT LP (PolyLC, USA), equilibrada com 10 mM de tampão de acetato de sódio (pH 4,5) e eluída com 10 mM de tampão acetato de sódio (pH 4,5) contendo 1,0 M de NaCl usando um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0 M $\rightarrow$ 0,6 M) para obter uma fração de conjugado de IFN α -PEG-AG IgG. A fração assim obtida foi adicionalmente submetida a cromatografia de troca de ânion. A fração foi carregada em uma coluna PolyWAX LP (PolyLC Inc., USA) equilibrada com tampão 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) e eluída com tampão 10 mM Tris-HCl (pH 7,5) contendo 1,0 M de NaCl por um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0 M $\rightarrow$ 0,3 M) para obter um conjugado de IFN α -PEG-AG IgG puro.

Exemplo 12: Preparação de conjugado EPO-PEG-Ag IgG

[095] O procedimento do Exemplo 11 foi repetido por emprego do comple-

xo de EPO-PEG preparado no Exemplo 5 e o IgG aglicosilado preparado no Exemplo 10 para obter um conjugado EPO-PE-AG IgG.

[096] Exemplo Comparativo 1: Preparação do complexo PEG-hGH

[097] 5 mg de hGH foram dissolvidos em 100 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,0) para obter 5 mL de uma solução e um metóxi-PEG-ALD ativado possuindo 40 kDa de PEG foi adicionado à solução em uma quantidade correspondendo a uma razão molar hGH:PEG de 1:4. NaCNBH₄ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução e a mistura de reação foi gradualmente agitada a 4°C por 18 horas. Então, etanolamina foi adicionada a uma concentração final de 50 mM para inativar PEG não reagido.

[098] Para remover adicionalmente o PEG não reagido, a mistura de reação foi submetida a cromatografia de coluna Superdex^R G-25 (Pharmacia, USA). A coluna foi equilibrada com 2 volumes de coluna (CV) de 10 mM tampão Tris-HCl (pH 7,5) antes de carregar a mistura de reação. As frações de eluição foram analisadas quanto a absorvência em 260 nm usando um espectrofotômetro UV. O hGH modificado com PEG que tem um peso molecular maior foi eluído primeiro antes do PEG não reagido.

[099] O hGH modificado com PEG foi adicionalmente purificado da fração de eluição como se segue. Uma coluna carregada com 3 mL de PolyWAX LP (Polywax Inc., USA) foi equilibrada com 10 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,5). A fração de eluição contendo o hGH modificado com PEG foi carregada na coluna em uma razão de fluxo de 1 mL/min e a coluna foi lavada com 15 mL do tampão de equilíbrio. HGHs ligado a tri, di e mono-PEG foram fracionados em ordem por um processo de gradiente de concentração de sal (concentração de NaCl: 0% -> 100%) usando um tampão 1M de NaCl por 30 minutos.

[0100] Para purificar adicionalmente o completo hGH ligado a mono-PEG a partir da mistura, o efluente de coluna foi submetido à cromatografia de exclusão por

tamanho. O efluente concentrado foi carregado em uma coluna Superdex 200 (Pharmacia, USA) equilibrada com 10 mM de tampão fosfato de sódio e eluído com a mesma solução tampão a uma razão de fluxo de 1 mL/min. Os complexos hGH ligados tri e di-PEG que eluíram mais cedo que o complexo hGH ligado a mono-PEG foram removidos para obter complexo hGH ligado a mono-PEG purificado.

[0101] PEG-IFN, derivado de PEG-¹⁷S-G-CSF e PEG-G-CSF onde 40 kDa PEG são ligados aos resíduos de terminal amino de IFN α e G-CSF, respectivamente, foram preparados e purificados de acordo com o mesmo processo descrito acima.

Exemplo Comparativo 2: Preparação de complexo de albumina-hGH

[0102] De modo a conjugar albumina com o complexo hGH-PEG obtido no Exemplo 1, albumina de soro humano (HSA, peso molecular cerca de 67 kDa) (Green Cross, Coréia) dissolvida em 10 mM de solução de tampão fosfato foi reagida com o complexo hGH-PEG em uma quantidade correspondendo a razão molar do complexo hGH-PEG:HSA sendo de 1:1, 1:2, 1:4 ou 1:8. A mistura de reação foi concentrada para 100 mM de tampão fosfato e NaCNBH₃ foi adicionado a uma concentração final de 20 mM como um agente de redução. A mistura de reação foi agitada a 4°C por 20 horas. Foi verificado que uma razão molar ótima de complexo hGH-PEG:albumina para obtenção do melhor resultado foi de 1:2.

[0103] Após a reação de conjugação, a mistura de reação foi submetida à cromatografia de exclusão de tamanho Superdex para remover os materiais de partida não reagidos e subprodutos. A mistura de reação foi concentrada e carregada na coluna a uma razão de fluxo de 2,5 mL/min usando 10 mM de acetato de sódio (pH 4,5) para obter conjugado de hGH-PEG-albumina purificada. Uma vez que o conjugado de hGH-PEG-albumina purificado ainda foi contaminado por pequenas quantidades de albumina não reagida e dímero de hGH, a cromatografia de troca de cátion foi adicionalmente realizada para remover esses contaminantes. O efluente

de conjugado hGH-PEG-albumina foi carregado em uma coluna SP5PW (Waters, USA) equilibrada com 10 mM de acetato de sódio (pH 4,5) e fracionada com 10 mM de acetato de sódio (pH 4,5) contendo 1,0 M de NaCl com um gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0 M -> 0,5 M) para recuperar hGH-PEG-albumina.

[0104] IFN α -PEG-albumina, G-CSF-PEG-albumina e PEG-albumina derivada de ^{17}S -G-CSF onde a albumina é ligada a IFN α , ^{17}S -G-CSF e G-CSF respectivamente, foram preparados e purificados de acordo com o mesmo processo descrito acima.

[0105] Exemplo Comparativo 3: Preparação de complexo Fab'-S-40K PEG

[0106] Fab' purificado, obtido na etapa 1 do Exemplo 8 foi colocado em um tampão de ativação (20 mM PBS (pH 4,0) e (0,2 mM DTT) por 1 hora para ativar os grupos livres -SH do mesmo. O tampão foi carregado em um tampão de PEGilação (50 mM de fosfato de potássio (pH 6,5)). Maleimida-PEG (peso molecular 40 kDa, Shearwater Inc., USA) foi adicionado à solução resultante em uma quantidade correspondendo a razão molar de Fab':PEG de 1:10. A mistura de reação foi agitada gentilmente a 4°C por 24 horas.

[0107] Mediante término da reação, a mistura de reação foi carregada em uma coluna Superdex 200 (Pharmacia, USA) equilibrada com 10 mM de PBS (pH 7,3), e eluída com o mesmo tampão a uma razão de fluxo de 1 mL/min para obter uma fração contendo um complexo Fab'-S-40K PEG. O Fab' não reagido foi eluído depois do complexo e descartado. A fim de remover Fab' não reagido, a fração de complexo Fab'-S-40 K PEG foi carregada em uma coluna polyCAT 21 x 250 (PolyLC Inc., USA) e eluída com 20 mM PBS (pH 4,5) usando um processo de gradiente de concentração linear (concentração de NaCl: 0,15 M -> 0,5 M). Consequentemente, a fração contendo complexo Fab'-S-40K PEG puro foi obtida, onde 40 kDa PEG foi ligado ao grupo -SH adjacente ao terminal C de Fab'.

[0108] Exemplo de Teste 1: Confirmação e quantificação dos conjugados de proteína

(1) Confirmação dos conjugados de proteína

[0109] Os conjugados de proteína preparados nos Exemplos acima foram analisados quanto ao seu estado de modificação por SDS-PAGE usando um gel possuindo um gradiente de concentração de 4 a 20% e ELISA (R&D System, USA).

[0110] hGH, hGH-PEG, IFN e IFN-PEG foram independentemente revelados em SDS-PAGE e uma mistura com 50 mM de DTT (ditiotreitól), enquanto IgG, hGH-PEG-IgG e IFN-PEG-IgG sem DTT.

[0111] As Figuras 2 e 3 mostram os resultados de SDS-PAGE obtidos para os conjugados hGH-PEG-IgG e IFN-PEG-IgG, respectivamente. Os números listados na margem a esquerda são marcadores de peso molecular (kDa).

[0112] Conforme mostrado na Figura 2, o peso molecular aparente do conjugado hGH-PEG-IgG é de cerca de 170 kDa. Contudo, uma vez que é difícil de discriminar a diferença de peso molecular entre os conjugados de proteína IgG e IgG do tipo selvagem em SDS-PAGE, o conjugado hGH-PEG-IgG e IgG foram reduzidos por tratamento com DTT, separados em cadeia pesada e leve e confirmaram seu estado conjugado por SDS-PAGE, respectivamente (Figura 4).

[0113] Quando IgG foi tratado com DTT, a cadeia leve de IgG foi separada primeiro e a cadeia pesada de IgG, mais tarde, de acordo com seu peso molecular. As faixas de conjugado hGH-PEG-IgG tratadas com DTT apareceram nas posições correspondendo aos pesos moleculares calculados por adição do peso molecular de hGH-PEG (3,4 kDa) para o peso molecular de fragmentos de cadeia leve e pesada, respectivamente. A cadeia leve do conjugado hGH-PEG-IgG formou uma faixa em uma posição inferior (peso molecular menor) que a cadeia pesada do conjugado hGH-PEG-IgG cuja faixa foi encontrada em uma posição correspondendo a cerca de 80 kDa. A partir dos resultados acima, foi verificado que hGH acoplou às cadeias

leve e pesada com probabilidade igual e que IgG reage com hGH em uma razão molar de 1:1.

(2) Análise quantitativa dos conjugados de proteína

[0114] A quantidade de cada conjugado de proteína preparada nos Exemplos acima foi determinada por cálculo da área máxima do conjugado observada em uma cromatografia de exclusão de tamanho (coluna, Superdex, solução de eluição: 10 mM de tampão fosfato de potássio (pH 6,0) e comparando com o controle. Após condução da cromatografia de exclusão por tamanho usando hGH pré-quantificado, IFN, G-CSF, 17S-G-CSF, EPO e IgG, respectivamente, os fatores de resposta relativa das áreas máximas foram determinados. A cromatografia de exclusão por tamanho foi realizada usando uma quantidade constante de cada conjugado de proteína com a mesma condição e o valor quantitativo da proteína biologicamente ativa que existia em cada conjugado de proteína foi determinado subtraindo-se a área máxima correspondendo a IgG da área máxima de cada conjugado de proteína obtido acima.

[0115] Análise de ELISA (R&D System, USA) foi também realizada além da cromatografia. Se uma porção de IgG for conjugada a um sítio biologicamente ativo de um polipeptídeo, o valor obtido por ELISA usando um anticorpo específico para o sítio biologicamente ativo seria inferior ao valor calculado pela cromatografia. No caso do conjugado hGH-PEG-IgG, foi verificado que o valor medido por ELISA era apenas de cerca de 30% do valor determinado pela cromatografia.

(3) Confirmação da pureza e massa dos conjugados de proteína

[0116] A fim de examinar a pureza do complexo de INF α -PEG-IgG obtido no Exemplo 3, uma HPLC de fase reversa foi realizada usando uma coluna de fase reversa (coluna 259 VHP54, Vydac Inc., USA). O complexo foi eluído com acetonitrila por um processo de gradiente de concentração linear (concentração de acetonitrila: 40% -> 100%) em presença de 0,5% de TFA e detectado a 280 nm. Conforme

pode ser visto da Figura 5, a pureza do complexo é superior a 95%.

[0117] O conjugado de proteína obtido em cada Exemplo foi analisado quanto ao seu valor de absorvência em 280 nm durante cromatografia de exclusão por tamanho e verificou-se que hGH-PEG-IgG, IFN-PEG-IgG, G-CSF e ^{17}S -G-CSF-PEG-IgG mostraram, independentemente, uma máxima simples correspondendo a um peso molecular de cerca de 170.000 a 180.000 Dalton. A máxima de EPO-PEG-IgG foi observada em uma posição correspondendo a um peso molecular de 200.000 Dalton.

[0118] Para determinar o peso molecular exato de cada conjugado de proteína, as amostras purificadas simples foram analisadas usando espectrometria de massa em supavelocidade MALDI-TOF (Voyager DE-STR, Applied Biosystems, USA). Ácido sinapínico foi empregado como uma matriz. 0,5 μL de cada amostra foram dispersos sobre uma lâmina de vidro e secos ao ar. após um volume igual da matriz ser derramado, gota a gota sobre a lâmina de vidro, a mesma foi seca ao ar e instalada em uma fonte de íon. A detecção foi realizada por um equipamento TOF de modo linear usando um processo positivo e os íons foram acelerados por uma diferença em potencial total de cerca de 2,5 kV em uma fonte de fornecimento de extração dividida usando um extrator de íon retardado a um tempo de extração retardado de 750 ns/1.500 ns. Os resultados das análises de espectrometria de massa do conjugado hGH-PEG-IgG são mostrados na Tabela 1 e Figura 6.

Tabela 1 - Análise de espectrometria de massa de conjugados de proteína IgG

	Valor Teórico (kDa)	Valor medido (kDa)
HGH-PEG-IgG (Exemplo 1)	175,4	176,8
IFN α -PEG-IgG (Exemplo 3)	172,6	172,6
G-CSF-PEG-IgG (Exemplo 4)	172,1	173,0
PEG-IgG derivado de ^{17}S -G-CSF- (Exemplo 4)	171,9	172,2

EPO-PEG-IgG (Exemplo 5)	185,4	183,0
-------------------------	-------	-------

[0119] Os resultados mostraram que a pureza do conjugado hGH-PEG-IgG foi de 90% ou mais e que o peso molecular medido era aproximadamente igual ao valor teórico. Adicionalmente, o conjugado hGH-PEG-IgG estava na forma de IgG ligado ao complexo hGH-PEG em uma razão molar de 1:1.

[0120] Adicionalmente, o peso molecular de AG IgG preparado no Exemplo 10, conforme medido pelo processo MALDI-TOF acima era de 147 kDa, que era inferior a 3.000 Da em relação ao IgG do tipo selvagem (Figura 9). Esse peso molecular reduzido, 3.000 Da, corresponde ao tamanho teórico da cadeia de açúcar e, consequentemente, foi concluído que a cadeia de açúcar de IgG foi completamente removida.

[0121] A tabela 2 mostra os pesos moleculares dos conjugados de IFN α -PEG-AG IgG e EPO-PEG-AG IgG preparados nos Exemplos 11 e 12.

Tabela 2 - Análise de espectrometria de massa dos conjugados de proteína AG IgG

	Valor Teórico (kDa)	Valor medido (kDa)
IFN α -PEG-AG IgG (Exemplo 11)	169,6	170,0
EPO-PEG-AG IgG (Exemplo 12)	182,4	180,0

Exemplo de Teste 2: Análise de farmacocinética I

[0122] Estabilidades *in vivo* e coeficientes farmacocinéticos dos conjugados de proteína IgG, proteína PEG e complexos de albumina-proteína (grupo de teste) preparados nos Exemplos e Exemplos Comparativos foram comparados aqueles da proteína do tipo selvagem biologicamente ativa (grupo de controle). Cinco ratos Sprague-Dawley (SD) foram usados para do grupo nos experimentos que se seguem. Os camundongos receberam injeções subcutâneas de 100 μ g/kg de controle, complexo PEG, conjugado de albumina-proteína e conjugado de IgG-proteína, respectivamente. Amostras de sangue foram tomadas de um grupo de controle a 0,5,

1, 2, 4, 6, 12, 24, 30, 48, 72 e 96 horas após a injeção, e as amostras dos grupos de teste, em 1, 6, 12, 24, 30, 48, 72, 96, 120, 240 e 320 horas após a injeção. As amostras sanguíneas foram coletadas em um tubo revestido com heparina para impedir coagulação do sangue e submetidas à microcentrifugação em alta velocidade a 4°C, 3.000 x g por 30 minutos para remover as células. A concentração de proteína nos soros foi medida por processo ELISA usando o respectivo anticorpo específico para cada proteína biologicamente ativa.

[0123] Valores farmacocinéticos de hGH, IFN, G-CSF e EPO do tipo selvagem e conjugados de proteína, além de complexos dos mesmos são mostrados nas Tabelas 2 a 6, onde T_{max} significa o tempo par alcançar a concentração máxima de medicamento, $T_{1/2}$ a meia vida útil de um medicamento no sangue e MRT (tempo de residência médio), tempo de retenção médio em um corpo.

Tabela 3 - Valores farmacocinéticos de hGH

	hGH tipo selvagem	hGH-40K PEG (Ex. Comp. 1)	hGH-PEG-albumina (Ex. Comp. 2)	hGH-PEG-IgG (Ex. 1)
T_{max} (horas)	1,0	12	12	12
$T_{1/2}$ (horas)	1,1	7,7	5,9	13,9
MRT (horas)	2,1	18,2	13,0	19,0

Tabela 4 - Valores farmacocinéticos de IFN α

	IFN α tipo selvagem	IFN α -40K PEG (Ex.Comp. 1)	IFN α -PEG-albumina (Ex. Comp. 2)	IFN α -PEG-IgG (Ex. 3)	IFN α -PEG-AG IgG (Ex. 11)
T_{max} (horas)	1,0	30	123	30	24,0
$T_{1/2}$ (horas)	1,7	35,8	17,1	76,7	59,7
MRT (horas)	2,1	71,5	32,5	121,0	98,2

Tabela 5 - Valores farmacocinéticos de G-CSF

	G-CSF tipo selvagem	G-CSF-40K PEG (Ex. Comp. 1)	G-GSF-PEG-albumina (Ex. Comp. 2)	G-CSF-PEG-IgG (Ex. 4)
T _{max} (horas)	2,0	12	12	12
T _{1/2} (horas)	2,8	4,8	5,2	8,4
MRT (horas)	5,2	24,5	25,0	35,7

Tabela 6 - Valores farmacocinéticos de ¹⁷S-G-CSF

	Derivado de ¹⁷ S-G-CSF tipo selvagem	40K PEG derivado de ¹⁷ S-G-CSF - (Ex. Comp. 1)	PEG-albumina derivado de ¹⁷ S-G-CSF (Ex. Comp. 2)	PEG-IgG derivado de ¹⁷ S-G-CSF (Ex. 4)
T _{max} (horas)	2,0	24	24	48
T _{1/2} (horas)	2,9	4,3	6,4	7,2
MRT (horas)	5,8	24,4	25,1	42,6

Tabela 7 - Valores farmacocinéticos de EPO

	EPO tipo selvagem	EPO altamente glicosilado (Darbepoetin- α)	EPO-PEG-IgG (Exp. 5)	EPO-PEG-AG IgG (Exp. 12)
T _{max} (horas)	6,0	12	48,0	48,0
T _{1/2} (horas)	9,4	14,9	67,5	47,8
MRT (horas)	21,7	30,7	121,7	89,5

[0124] Conforme pode ser visto na Tabela 3, e na Figura 7, a meia vida útil do conjugado de hGH-PEG-IgG foi de 13,9 horas, o que é cerca de 13 vezes maior que a do hGH do tipo selvagem e cerca de 2 vezes maior aquela do complexo hGH-40K PEG (7,7 horas) preparado no Exemplo Comparativo 1. A meia vida útil do conjugado hGH-PEG-albumina onde albumina é ligada a uma extremidade de PEG, não

diretamente ao hGH, foi de 5,9 horas. Esse resultado confirma que o conjugado de proteína da invenção mostra durabilidade superior *in vivo*.

[0125] Adicionalmente, na tabela 4 e na Figura 10, os resultados para IFN α foram semelhantes aqueles para hGH, porém o efeito de aumentar a meia vida útil no sangue observado no conjugado de proteína da invenção foi maior. Embora a meia vida útil de IFN α do tipo selvagem fosse de 1,7 hora, a meia vida útil do complexo de 40 kDa PEG-IFN α aumentou para 35,8 horas e a meia vida útil do conjugado IFN α -PEG-albumina para 17,1 horas. Conforme comparado com esses, a meia vida útil do conjugado IFN α -PEG-IgG aumentou muito para 76,7 horas. Adicionalmente, a meia vida útil do conjugado de IFN α -PEG-AG IgG foi de 59,7 horas, que quase igual aquela do conjugado IFN α -PEG-IgG. Desse resultado, pode ser visto que a ausência de cadeia de açúcar não afeta a estabilidade *in vivo* do conjugado.

[0126] Conforme mostrado nas Tabelas 5 e 6, a durabilidade *in vivo* de G-CSF e seu derivado mostrou uma tendência semelhante aquela de hGH e IFN. A meia vida útil dos complexos de proteína modificados com 40 kDa PEG e conjugados de proteína foi maior que a meia vida útil de G-CSF do tipo selvagem e seu derivado. Contudo, o conjugado de proteína IgG da invenção mostrou uma meia vida muito maior. Tal capacidade do IgG conjugado de aumentar a estabilidade do medicamento no sangue foi também observada para derivados modificados de aminoácido. A partir desses resultados, pode ser antecipado que o conjugado de proteína da invenção aplicado a outras proteínas também exerceria o efeito desejado descrito acima.

[0127] A tabela 7 e as Figuras 8 e 11 mostram que o efeito de aumentar a meia vida útil no sangue do conjugado de proteína da invenção é evidente para EPO possuindo uma fração glicosilada. A saber, a meia vida útil no sangue de EPO do tipo selvagem foi de 9,4 horas e aquela do EPO altamente glicosilado possuindo alta

estabilidade no sangue, isto é, Darbepoetin- α (Aranesp, Amgen, USA) foi de 14,9 horas. No caso do conjugado de EPO-PEG-IgG, a meia vida útil no sangue aumentou marcadamente para 67,5 horas e aquela do conjugado EPO-PEG-AG IgG também aumentou para 47,8 horas.

[0128] Conforme pode ser visto dos resultados acima, os conjugados de proteína da invenção, onde um polipeptídeo fisiológico é covalentemente ligado a um polímero não peptídico e imunoglobulina, possui uma meia vida útil no sangue que é doze vezes maior que aquela da proteína do tipo selvagem. Adicionalmente, o efeito de aumentar a meia vida útil no sangue do conjugado de proteína é ainda mantida a um nível semelhante, mesmo se uma imunoglobulina aglicosilada for empregada.

[0129] Especialmente, quando comparado ao complexo de proteína modificado com 40 kDa PEG que possui a maior durabilidade no sangue entre as formulações de PEG reportadas anteriormente, o conjugado de proteína IgG da invenção exibe melhor durabilidade. Adicionalmente, em relação ao conjugado de proteína acoplado a albumina ao invés de IgG, o conjugado de proteína da invenção mostrou durabilidade muito mais alta. Esses resultados sugerem que o conjugado de proteína da invenção pode ser usado eficazmente para preparação de uma formulação prolongada de um medicamento de proteína. As presentes averiguações, de que os conjugados de proteína da invenção exibem estabilidade no sangue muito mais alta e MRT mais longa que a proteína de ligação PEG ou conjugado de proteína albumina reportados anteriormente, para uma ampla faixa de proteínas incluindo o derivado de G-CSF possuindo uma mutação de ponto, sugerem fortemente que tal efeito de aumentar a estabilidade no sangue e durabilidade observado com o conjugado de proteína da invenção também seria obtido para outros peptídeos biologicamente ativos.

[0130] A meia vida útil do conjugado de hGH-PEG-IgG (Exemplo 7) preparado usando 10 kDa de PEG como um polímero não peptídico foi medida pelo mesmo

processo descrito acima como sendo de 9,5 horas, que é ligeiramente mais curto que aquele do conjugado hGH-PEG-IgG usando 3,4 kDa PEG (13,9 horas). Os pesos moleculares aparentes e meia vida no sangue observados para aqueles preparados usando PEG possuindo grupos funcionais diferentes, por exemplo, propionato de succinimidila, N-hidroxisuccinimidila e grupos aldeído butila, foram semelhantes aos preparados usando PEG possuindo grupos aldeído.

Exemplo de Teste 3: Análise de farmacocinética II

[0131] A fim de medir as meia vidas no sangue dos conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG e Fab'-N-PEG-N-IgG preparados nos Exemplos 8 e 9, respectivamente, e complexo Fab'-S-40K PEG preparado no Exemplo Comparativo 3, uma análise de farmacocinética foi realizada de acordo com o processo do Exemplo de Teste 2, empregando os conjugados, o complexo e Fab' como um controle. O resultado é mostrado na Figura 12.

[0132] Conforme pode ser visto na Figura 12, os Fab'-S-PEG-N-IgG e Fab'-N-PEG-N-IgG mostraram meia vidas no sangue maiores que foram duas a três vezes mais longas que aquelas de Fab' e complexo Fab'-S-40K PEG.

Exemplo de Teste 4: Medição da atividade *in vitro*

(1) Comparação da atividade *in vitro* dos conjugados de proteína hGH

[0133] As atividades *in vitro* do conjugado hGH-PEG-IgG (Exemplo 1), complexo 40 kD PEG-hGH (Exemplo Comparativo 1) e conjugado hGH-PEG-albumina (Exemplo Comparativo 2) foram medidos usando linhagem de célula de linfoma de nodo de rato Nb2 (European Collection of Cell Cultures, ECCC #97041101) que sofreu mitose dependente de hGH como se segue.

[0134] As células Nb2 foram cultivadas em um meio de Fisher suplementado com soro bovino fetal a 10% (FBS), 0,075% de NaCO₃, 0,05 mM de 2-mercaptoetanol e 2 mM de glutamina. As células foram incubadas por 24 horas a mais no mesmo meio sem FBS a 10%. Após cerca de 2×10^4 células por poço se-

rem adicionadas a uma placa de 96 poços, várias diluições de hGH-PEG-IgG, 40 kDa PEG-hGH, hGH-PEG-albumina e um controle (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) foram adicionados a cada poço e as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em um incubador de CO₂. Para medir a extensão de um crescimento celular (o número de células existente em cada poço), 25 µL de 96 solução AQueous One de titulação de célula (Promega, USA) foram adicionados a cada poço e incubados por 4 horas a 37°C. Absorvência a 490 nm foi medida para calcular a titulação de cada amostra e as titulações calculadas conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8 - Análise de atividade *in vitro* de hGH

	Conc. (ng/mL)	Atividade Es- pecífica* (U/mg)	Atividade relativa para hGH do tipo selvagem (%)
hGH do tipo selvagem	100	2,7 E+06	100
Controle (NIBSC)	100	2,58 E+06	95,2
hGH -40K PEG	100	0,206 E+06	7,6
hGH -PEG-albumina	100	0,141 E+06	5,2
hGH -PEG-IgG	100	0,86 E+06	31,7
* Atividade específica = $1/ED_{50} \times 10^6$ (ED_{50} : a quantidade de proteína representando 50% do crescimento máximo da célula)			

[0135] Conforme pode ser visto da Tabela 8, todas as amostras usadas nos experimentos possuíam atividade *in vitro*. Além disso, a atividade *in vitro* de hGH modificado com PEG foi inferior aquela de hGH não modificado. No caso do interferon, foi reportado que conjugados 12 kDa PEG e 40 kDa PEG com IFNs mostraram atividades que foram apenas de 25% e 7% do tipo selvagem, respectivamente (P. Bailon e outros, Bioconjugate Chem. 12:196-202, 2001). Quanto mais o peso molecular de PEG aumenta, menos a atividade *in vitro* do complexo PEG diminui. A ativi-

dade *in vitro* de complexo hGH modificado com 40 kDa PEG foi apenas de cerca de 7,6% de hGH do tipo selvagem, e o conjugado de hGH-PEG-albumina também mostrou uma atividade *in vitro* muito baixa de cerca de 5,2% do tipo selvagem. Contudo, no caso de IgG conjugando com o complexo hGH-PEG, sua atividade relativa foi significativamente melhorada para 30% ou mais do tipo selvagem. Esses resultados sugerem que os conjugados de proteína da invenção possuem atividade *in vivo* superior bem como meia vida útil no sangue prolongada. No caso dos conjugados de proteína IgG da presente invenção, acredita-se que a atividade de proteína aumentada se deva à estabilidade no sangue aumentada causada por conjugação com IgG que desempenha o papel de preservar a afinidade de ligação com um receptor e o polímero não peptídico provendo ambiente espacial. Espera-se que tal efeito ocorra para conjugados de proteína IgG de quaisquer outras proteínas biologicamente ativas.

(2) Comparação da atividade *in vitro* de conjugados de proteína IFN α

[0136] Para comparar a atividade *in vitro* de conjugados de proteína IFN α , atividade antivirótica do complexo de IFN α -PEG-IgG (Exemplo 3), conjugado 40 kDa PEG-IFN α (Exemplo Comparativo 1) e conjugado de IFN α -PEG-albumina (Exemplo Comparativo 2) foi medida por um processo de biópsia de cultura de célula usando células renais bovinas Madin-Darby (células MDBK. ATCC CCL-22) saturadas com vírus de estomatite vesicular (VSV). IFN α 2b não possuindo modificação PEG (NIBSC IFN) foi empregado como controle.

[0137] As células MDBK foram cultivadas em MEM (meio essencial mínimo, JBI) suplementado com FBS a 10% e penicilina-estreptomicina a 1% a 37°C em um incubador de CO₂ a 5%. As amostras e um controle (NIBSC IFN) foram diluídas com o mesmo meio de cultura a uma concentração constante e 100 μ L de cada diluição foram adicionados a placa de 96 poços. 100 μ L da solução de célula cultivada foram adicionados a cada poça e as células foram incubadas a 37°C por cerca de 1 hora

em um incubador de CO₂ a 5%. Após uma hora, 50 µL de VSV possuindo concentração virótica de 5 ~7 x 10³ PFU foram adicionados a cada poça e adicionalmente incubados por 16 a 20 horas a 37°C sob CO₂ a 5%. As poças contendo apenas células e amostras sem vírus ou controle foram empregadas como um controle negativo, e os poços contendo apenas célula sem vírus adicionados como um controle positivo.

[0138] Para remover o meio de cultura e manchar as células vivas, foram adicionados 100 µL de uma solução vermelha neutra a cada poço e adicionalmente incubada a 37°C por 2 horas em um incubador de CO₂ a 5%. após remoção do sobrenadante por aspiração, a solução de extração (100 µL de uma mistura de etanol a 100% e acetato a 1% (1:1)) foi adicionada a cada poça. As células manchadas foram ressuspensas na solução de extração com agitação e absorvência a 540 nm foi medida. ED₅₀ representando 50% do crescimento máximo da célula foi calculado por consideração do crescimento da célula do controle positivo coo 100% em relação ao crescimento da célula de controle negativo.

Tabela 9 - Análise de atividade *in vitro* de IFN α

	Concentração (ng/mL)	ED50 (IU/mg)	Atividade relativa para IFN do tipo selvagem
IFN α tipo selvagem	100	4,24E+08	100
IFN α-40 K PEG	100	2,04E+07	4,8
IFN α-PEG-albumina	100	2,21E+07	5,2
IFN α-PEG-IgG	100	4,75E+07	11,2
IFN α-PEG-AG IgG	100	4,32E+07	10,2

[0139] Conforme mostrado na tabela 9, a atividade de IFN α modificado com PEG foi inferior aquela de IFN α não modificado. Especialmente, a estabilidade no sangue aumentou conforme o peso molecular da fração PEG aumentou, porém a atividade relativa diminuiu gradualmente. Um complexo α IFN modificado com 40

kDa PEG mostrou uma atividade *in vitro* muito baixa correspondendo a cerca de 4,8% da atividade do tipo selvagem. Conforme mencionado acima, existe um relato anterior de que IFNs conjugados com 12 kDa PEG e 40 kDa PEG mostraram cerca de 25% e 7% *in vitro* de atividade do tipo selvagem, respectivamente (P. Bailon e outros, *Bioconjugate Chem.* 12:196-202, 2001). A saber, uma vez que o peso molecular de PEG aumenta, a meia vida no sangue aumenta, porém seu efeito farmacêutico diminui bruscamente, havendo a necessidade de desenvolver-se uma substância possuindo atividade farmacêutica aumentada e meia vida prolongada. O conjugado de IFN α -PEG-albumina também mostrou uma atividade *in vitro* muito baixa correspondendo apenas a cerca de 5,2% do tipo selvagem. Contudo, no caso de modificação de IFN α com IgG (conjugado IFN α -PEG-IgG) a atividade relativa aumentou para 11,2% do tipo selvagem. Adicionalmente, o conjugado IFN α -PEG AG IgG mostrou atividade *in vitro* correspondente a 10,2% do tipo selvagem e, consequentemente, foi concluído que a ausência da cadeia de açúcar não possui efeito significativo na atividade do conjugado de proteína.

[0140] Esses resultados mostram que o conjugado de proteína IgG da invenção exibe alta atividade *in vivo* em conjunto com vida prolongada.

(3) Comparação da atividade *in vitro* de conjugados de proteína G-CSF

[0141] As atividades *in vitro* de G-CSF do tipo selvagem (Filgrastim), derivado de ^{17}Ser -G-CSF, complexo 20 kDa PEG-G-CSF (Neulasta, USA), complexo derivado de 40 kDa PEG- ^{17}S -G-CSF, conjugado PEG-albumina-derivado de ^{17}SER -G-CSF e do conjugado PEG-IgG-derivado de ^{17}SER -G-CSF- foram medidas.

[0142] Primeiro, as células originadas mielogenosas humanas, células HL-60 (ATCC CCL-240, paciente com leucemia promielocítica/36 anos, mulher, caucasiana), foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com FBS a 10% e o número de células foi ajustado para cerca de $2,2 \times 10^5$ células/mL. DMSO (dimetilsulfóxido, classificação de cultura/SIGMA) foi adicionado às células a uma concen-

tração de 1,25% (v/v). 90 µL de solução de cultura tratada com DMSO possuindo cerca de 2×10^4 células suspensas por poço foram adicionadas a uma placa de 96 poços (Corning/placa de 96 poços de baixa evaporação) e incubados a 37°C por 72 horas em um incubador CO₂ a 5%.

[0143] A concentração de cada amostra foi determinada por uso de um kit G-CSF ELISA (R & D Systems, USA) e cada amostra foi diluída com meio RPMI 1640 em uma razão apropriada a uma concentração de 10 µg/mL. A solução resultante foi submetida a 19 ciclos de meia diluição seqüencial com meio RPMI 1640.

[0144] 10 µL de cada amostra preparada acima foram adicionados a cada poço possuindo células HL-60 em cultivo, e a concentração foi reduzida a metade a partir de 1.000 ng/mL. As microplacas tratadas com amostras de proteína foram adicionalmente incubadas a 37°C por 72 horas.

[0145] Para examinar a extensão do crescimento da célula após incubação, o número de células foi determinado por medição da absorvência a 670 nm usando CellTiter96™(Promega, USA).

Tabela 10 - Análise da atividade *in vitro* do derivado G-CSF

	ED ₅₀ (IU/mL)	Atividade relativa para G-CSF do tipo selvagem (%)
G-CSF do tipo selvagem (Filgrastim)	0,30	100
Derivado de ¹⁷ Ser-G-CSF,	0,26	115
20 K PEG-G-CSF (Neulasta)	1,20	25
40 K PEG derivado de PEG- ¹⁷ S-G-CSF,	10,0	<10,0
PEG-albumina-derivado de ¹⁷ SER-G-CSF	1,30	23,0
PEG-IgG derivado de ¹⁷ SER-G-CSF	0,43	69,0

[0146] Conforme pode ser visto da Tabela 10, o conjugado de proteína IgG derivado de ¹⁷Ser-G-CSF possuindo uma modificação de aminoácido, mostrou um

efeito semelhante aquele observado para o conjugado de proteína do tipo selvagem. Já foi confirmado que o derivado de $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ modificado com PEG mostra uma meia vida mais longa porém uma atividade inferior a do não modificado (Pedido de Patente Coreano número 2003-17867). Especialmente, embora a estabilidade no sangue de PEG modificado com derivado de $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ aumente conforme o peso molecular da fração de PEG aumenta, sua atividade relativa diminuiu gradualmente. O completo derivado de $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ modificado com 20 kDa PEG mostrou uma atividade *in vitro* muito baixa correspondendo a cerca de 10% do tipo selvagem. A saber, conforme o peso molecular de PEG aumenta, a meia vida útil no sangue aumenta, porém seu efeito farmacêutico diminui bruscamente, havendo a necessidade de desenvolver-se uma substância possuindo atividade farmacêutica aperfeiçoada e meia vida útil prolongada. Nesse ínterim, o derivado de $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ modificado com albumina mostrou uma atividade *in vitro* relativamente baixa, correspondendo apenas a cerca de 23% do tipo selvagem. Contudo, no caso da modificação do derivado $^{17}\text{Ser-G-CSF}$ com IgG (conjugado $^{17}\text{Ser-G-CSF-PEG-IgG}$), sua atividade relativa aumentou em um nível que é 69% ou mais do tipo selvagem. Esses resultados mostram que o conjugado de proteína IgG da invenção exibe atividade *in vivo* alta em conjunto com a meia vida prolongada.

(4) Comparação da atividade *in vitro* dos conjugados de proteína EPO

[0147] As atividades *in vitro* de EPO(BRP, UK) do tipo selvagem, EPO altamente glicosilado (Aranesp, USA) e conjugado EPO-PEG-IgG foram medidas.

[0148] Primeiro, as células originadas da medula óssea humana, células TF-1 (ATCC CRL-2003, eritroleucemia), foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com FBS a 10% e 12 ng/mL de GM-CSF e então, no meio RPMI 1640 sem GM-CSF por um dia. 50 μL da solução de cultura possuindo cerca de 2×10^4 células foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços (Corning/placa de 96 poços de baixa evaporação) e incubados a 37°C por 72 horas em um incubador

CO₂ a 5%.

[0149] A concentração de cada amostra foi determinada por uso de um kit EPO ELISA (R & D Systems, USA) e cada amostra foi diluída com meio RPMI 1640 em uma razão apropriada a uma concentração de 10 µg/mL. A solução resultante foi submetida a 19 ciclos de diluição em série, duplas, com meio RPMI 1640.

[0150] 50 µL de cada amostra preparada acima foram adicionados a cada poço possuindo células TF-1 em cultivo, e a concentração foi reduzida à metade de 5 µg/mL. As microplacas tratadas com amostras de proteína foram adicionalmente incubadas a 37°C sob CO₂ a 5% por 72 horas.

[0151] Para examinar a extensão do crescimento da célula após a incubação, o número de células foi determinado por medição da absorvência a 490 nm usando CellTiter96™ AQueous One (Número de catálogo G3581, Promega, USA).

Tabela 11 - Análise de atividade *in vitro* de EPO

	Atividade Específica (U/mg)	Atividade relativa para EPO do tipo selvagem (%)
EPO do tipo selvagem (BRP)	8,9 x 10 ⁵	100
EPO altamente glicosilado (Aranesp)	6,8 x 10 ⁴	7,6
EPO-PEG-IgG	3,7 x 10 ⁴	4,2

[0152] Conforme pode ser visto da Tabela 11, todas as amostras usadas nos experimentos possuem atividade *in vitro* conforme aprovada por sua promoção do crescimento das células originárias da medula óssea humana. Além disso, atividades *in vitro* de EPO altamente glicosilado e EPO modificado com complexo PEG-IgG foram inferiores aquelas do EPO não modificado. Contudo, espera-se que o conjugado de proteína EPO da invenção tenha uma atividade *in vivo* superior a do EPO não modificado, devido a sua meia vida útil significativamente prolongada. No caso de conjugados de proteína EPO da presente invenção, acredita-se que a ativi-

dade da proteína aumentada seja devida à estabilidade no sangue aumentada, causada pela conjugação com IgG que desempenha o papel de preservar a afinidade de ligação com o receptor e o polímero não peptídico provendo um ambiente espacial.

(5) Neutralização da citotoxicidade por conjugados de proteína Fab'

[0153] Atividades *in vitro* dos conjugados Fab'-S-PEG-N-IgG e Fab'-N-PEG-N-IgG preparados nos Exemplos 8 e 9, respectivamente e complexo Fab'-S-40K PEG preparado no Exemplo Comparativo 3 foram examinadas por medição de sua capacidade de neutralizar a citotoxicidade de TNF- α em linhagem de célula de fibroblasto de camundongo L929 (ATCC CRL-2148), como se segue.

[0154] Cada um dos conjugados Fab' e o complexo foram submetidos a diluições, em série, duplas e cada uma das alíquotas de 100 μ L das diluições foi adicionada a um poço de uma placa de 96 poços. RhTNF- α (R&D Systems) e actinomicina D (Sigma), um inibidor de síntese de RNA, foram adicionados aos poços a concentrações de 10 ng/mL e 1 μ L/mL, respectivamente. Então, a mistura foi reagida a 37°C, 5% CO₂ por 30 minutos e transferida para uma microplaca de análise. 50 μ L de cada cultura de linhagem de célula L929 foram adicionados a cada poço a uma concentração de 5 x 10⁴ células/poço. As células foram incubadas a 37°C sob CO₂ a 5% por 24 horas. A solução de cultura no poço foi removida e 50 μ L de cada dos 5 mg/mL MTT (Sigma) em PBS foram adicionados a cada poço. As células foram incubadas a 37°C, CO₂ a 5% por 4 horas. 150 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço e dissolvidos. A absorvência a 540 nm foi medida para determinar a extensão de neutralização da citotoxicidade de RhTNF- α pelos conjugados de Fab' e complexo. Fab' purificado obtido na etapa 1 do Exemplo 8 foi empregado como um controle.

[0155] Conforme pode ser visto do resultado na Figura 13, todos os conjugados de proteína e complexo mostraram absorvências semelhantes aquelas de

Fab'. Esse resultado mostra que os conjugados Fab'-PEG-IgG, onde uma imunoglobulina é ligada ao terminal N ou ao grupo -SH livre adjacente ao terminal C de Fab', através de um espaçador PEG, mantêm a atividade biológica de Fab'.

[0156] Exemplo de Teste 5: Medição da atividade *in vivo* em um modelo animal

(1) Comparação da atividade *in vivo* dos conjugados de proteína hGH

[0157] Dez ratos Sprague Dawley, machos, hipsectomizados (5 semanas de idade, SLC, USA) foram empregados para cada grupo em um teste de ganho de peso corpóreo, para medir as atividades *in vivo* do conjugado hGH-PEG-IgG, complexo hGH-40K PEG e hGH do tipo selvagem. Um controle de solvente, hGH do tipo selvagem, conjugado de hGH-PEG-IgG e complexo hGH-40K PEG foram subcutaneamente injetados na parte posterior do dorso do rato usando uma seringa de 26G (1 mL, Korea Vaccine Co., Ltd.) de acordo com a programação de administração e dose descritas na Tabela 12. Os pesos dos ratos foram medidos antes da injeção e 16 horas após a injeção. Os ratos foram sacrificados com éter 24 horas após a injeção final e a presença da glândula pituitária foi examinada a olho nu para excluir dos resultados os ratos que possuíam glândula pituitária residual observável.

Tabela 12 - Condição para teste de atividade *in vivo* de hGH em modelos de animais

Grupo	Medicamento	Dose diária média	Quantidade total de administração	Programação de administração
1	Controle solvente	-	PBS (0,5 mL)	Uma vez/dia, administrada diariamente por 12 dias
2	HGH do tipo selvagem	30 µg	360 mIU (30 µg/vez)	Uma vez/dia, administrada diariamente por 12 dias

3	hGH-40K PEG	30 µg	360 mIU (180 µg/vez)	Uma vez/6 dias, administrada duas vezes
4	hGH-PEG- IgG	30 µg	360 mIU (180 µg/vez)	Uma vez/6 dias, administrada duas vezes
5	hGH-PEG- IgG	10 µg	120 mIU (60 µg/vez)	Uma vez/6 dias, administrada duas vezes

[0158] A alteração no peso após administração de cada amostra foi mostrada na Figura 14. Uma vez que hGH do tipo selvagem usado conforme um padrão (controle) deve se administrado a cada dia para manter sua atividade *in vitro*, ele foi administrado uma vez ao dia por 12 dias, e consequentemente, os ratos do Grupo 2 ganharam peso durante a administração. Nos ratos do Grupo 3, administrados com complexo hGH-40 kDa PEG uma vez/6 dias, o ganho de peso continuou até 3 dias após a administração e a razão de aumento tornou-se lenta, após isso. Esses resultados coincidiram com a expectativa baseada nos resultados dos Exemplos de Teste 1 e 2 de que o complexo hGH-PEG mostrou meia vida útil mais longa e superior na atividade *in vivo* que no hGH do tipo selvagem. Especialmente, o efeito gerado pela administração do conjugado hGH-PEG-IgG uma vez/6 dias em uma quantidade correspondendo a um terço da dose do tipo selvagem foi igual ou melhor que a administração diária do tipo selvagem. Isso significa que, a atividade *in vivo* do conjugado hGH-PEG-IgG é superior a três vezes aquela do tipo selvagem.

(2) Comparação da atividade *in vivo* de conjugados de proteína derivados de G-CSF

[0159] A fim de examinar o efeito dos conjugados de proteína da invenção com ¹⁷Ser-G-CSF possuindo uma substituição do 17º aminoácido por serina, as atividades *in vivo* de G-CSF do tipo selvagem, um complexo disponível comercialmente de 20 kDa PEG-G-CSF e conjugado de ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-IgG foram comparados. O conjugado de ¹⁷Ser-G-CSF-PEG-IgG da presente invenção foi dissolvido em

um solvente compreendendo 20 mM de fosfato de sódio, glicina a 1% e 0,25% de manitol (pH 7,0). O complexo G-CSF de metionila do tipo selvagem (Filgrastim, Amgen, USA) e G-CSF modificado com 20 kDa PEG (Neulasta, Amgen, USA) dissolvidos no mesmo solvente foram empregados como grupo comparativo. Camundongos ICR machos, com sete semanas de vida foram adquiridos da Samtaco Bio (Coréia) e submetidos a um período de aclimação por uma semana antes do experimento. No começo do experimento, o peso dos camundongos ICR estava na faixa de 30 ~35 g. Eles receberam alimento com fórmula (Samyang Corporation, Coréia) e água ingeridos livremente durante a aclimação e experimento, e mantidos em uma gaiola sob a condição de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$ de umidade relativa, 10 ~12 vezes/hora de ventilação, 150 ~200 lux ($2,19 \sim 2,92 \text{ watt/cm}^2$) de intensidade de iluminação e um ciclo de iluminação diária de 12 horas de luz/12 horas escuro. Cada grupo experimental consistiu em 5 camundongos, e um agente anticâncer complexo e cada amostra foram administrados aos camundongos de acordo com a programação de administração e dose descritos na Tabela 13. Modelo de animal neutropenia foi preparado por injeção, uma vez, de uma mistura de 130 mg/kg de cicloexamida (CPA; Sigma, USA), 4,5 mg/kg de doxorubicina (DXR; Sigma, USA) e 1 mg/kg de vincristina (VCR, Sigma, USA) na cavidade abdominal do camundongo ICR. Nenhum grupo de tratamento ficou sem receber a administração do agente anticâncer e não mostraram redução do neutrófilo. O controle de solvente é o grupo que recebeu agente anticâncer para reduzir o número de neutrófilos e apenas com adjuvante ao invés de uma amostra de medicamento. O G-CSF do tipo selvagem foi injetado subcutaneamente a uma dosagem de 100 $\mu\text{g/kg/dia}$ por volta de 10 horas da manhã, diariamente a partir do primeiro dia até o quinto dia antes a administração do agente anticâncer. Os complexos $^{17}\text{S-G-CSF-IgG}$ e 20 kDa PEG-G-CSF (Neulasta, Amgen, USA) foram injetados uma vez no primeiro dia após administração do agente anticâncer, a uma dosagem de 1.000 $\mu\text{g/kg}$ que corresponde a uma dosagem para cinco dias

quando uma quantidade dupla da dose do tipo selvagem foi considerada como uma dosagem diária (200 µg/kg/dia). 0,3 ~0,5 mL de sangue foram retirados da via orbital dos camundongos nos dias 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 8 após a administração do agente anti-câncer. A coleta do sangue foi realizada por volta das 4 horas da tarde, t horas após a injeção de uma amostra do medicamento. O número de leucócitos (WBC), hemácias (RBC) e plaquetas foi medido usando um contador de hematócito automático. Além disso, um espécime difundido no sangue foi preparado e submetido a coloração Giemsa. Cada hematócito foi calculado diferencialmente de modo a obter a razão de neutrófilos e então, o número de neutrófilos foi calculado pela fórmula 1, com base na razão de neutrófilos.

Fórmula 1

[0160] O número de neutrófilos (células/mm³) = número total de WBC (células/mm³) x razão de neutrófilos (%) x 1/100.

[0161] Análise estatística foi realizada com relação ao número de hematócitos e peso de cada grupo usando o test-t Student de modo a examinar o significado estatístico dos valores observados para o grupo sem tratamento, o grupo de controle de solvente e o grupo PEG-IgG derivado de 17S-G-CSF.

Tabela 13 - Condição para testar a atividade de uma proteína que aumenta o número de neutrófilos em um modelo animal

Grupo	Medicamento	Dose diária média (kg/dia)	Quantidade total de administração	Programação de administração
1	Nenhum tratamento	-	PBS (0,5 mL)	Uma vez/dia, administrada diariamente por 5 dias
2	Controle de solvente	-	PBS (0,5 mL)	Uma vez/dia, administrada diariamente por 5 dias
3	G-CSF tipo selvagem	100 µg	500 µg/kg/5 vezes	Uma vez/dia, administrada diariamente por 5 dias

	(Filgrastim)			
4	20K PEG-G-CSF (Neulasta)	200 µg	1.000 µg/kg/vez	Administrada uma vez
5	PEG-IgG derivado de ¹⁷ S-G-CSF	200 µg	1.000 µg/kg/vez	Administrada uma vez

[0162] A recuperação do neutrófilo após administração de cada amostra é mostrada na Figura 15. Quando G-CSF do tipo selvagem usado como um padrão foi injetado a cada dia por 5 dias, o número de neutrófilos diminuiu gradualmente durante a administração e finalmente alcançou um máximo no dia 5. Embora o complexo 20 kDa PEG-G-CSF administrado uma vez em quantidade dupla da dose diária mostrasse apenas dois terços da atividade *in vivo* observada para a administração diária de G-CSF do tipo selvagem, o conjugado PEG-IgG derivado de ¹⁷S-G-CSF exibiu uma atividade que era três vezes superior a atividade *in vivo* do complexo 20 kDa PEG-G-CSF. Adicionalmente, o conjugado de proteína da invenção gerou um efeito duas vezes maior para recuperação dos neutrófilos que a administração diária de G-CSF, o que coincidiu com a expectativa com base no resultado de que o conjugado de PEG-IgG derivado de ¹⁷S-G-CSF tinha meia vida útil no sangue significativamente mais longa e atividade *in vivo* superior em relação ao tipo selvagem. Esses resultados mostram que o mesmo efeito do conjugado de proteína da invenção causado por ligação covalente de IgG ao PEG pode ser esperado de um derivado de proteína possuindo uma modificação de aminoácido, bem como do tipo selvagem. Consequentemente, o conjugado de proteína da presente invenção pode ser efetivamente empregado como uma formulação de longa duração, satisfazendo os objetivos de aumento significativo da meia vida útil no sangue e atividade *in vivo* de G-CSF, enquanto superando o problema de G-CSF do tipo selvagem que requer

administrações muito freqüentes.

(3) Comparação da atividade *in vivo* de conjugado de proteína EPO

[0163] A fim de comparar as atividades *in vivo* de EPO do tipo selvagem, um EPO altamente glicosilado (Aranesp, USA) e um conjugado de EPO-PEG-IgG, foram examinadas alterações nos componentes sangüíneos de ratos que receberam as amostras de teste acima. O experimento foi realizado como se segue, com uma leve modificação do processo descrito por J.C. Egrie e Browne (*British Journal of Cancer* (2001) B4 (Suplemento 1), 3-10).

[0164] O conjugado de EPO-PEG-IgG da presente invenção foi dissolvido em um solvente compreendendo 20 mM de fosfato de sódio, 1% de glicina e 0,25% de manitol (pH 7,0). EPO do tipo selvagem e EPO altamente glicosilado dissolvidos no mesmo solvente foram empregados como grupos comparativos. Camundongos machos, com sete semanas de vida foram adquiridos da Daehan Biolink Inc. (Coreia) e submetidos a um período de aclimação por uma semana antes do experimento. No começo do experimento, o peso dos camundongos ICR estava na faixa de 200 ~ 250 g. Eles receberam alimento com fórmula (Cheiljedang Co., Coreia) e água ingeridos livremente durante a aclimação e experimento, e mantidos em uma gaiola sob a condição de $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$, $55 \pm 5\%$ de umidade relativa, 10 ~ 12 vezes/hora de ventilação, 150 ~ 200 lux ($2,19 \sim 2,92 \text{ watt/cm}^2$) de intensidade de iluminação e um ciclo de iluminação diária de 12 horas de luz/12 horas escuro. Cada grupo experimental consistiu em 5 camundongos, e cada amostra de teste preparada como acima foi injetada no dorso do camundongo usando uma seringa 26G (1 mL, Korea Vaccine Co., Ltd.) de acordo com a programação de administração e dose descritas na Tabela 14.

[0165] Após a administração, amostras de sangue integral foram retiradas da veia da cauda dos camundongos em um tubo contendo agente anti-coagulação (EDTA), a cada três dias por um mês. Os hematócritos das amostras sangüíneas

foram medidos com contador de hematócito automático (Vet ABC).

Tabela 14 - Condição para testar a atividade de uma proteína que aumenta o número de hematócitos nos modelos animais

Grupo	Medicamento	Quantidade total de administração	Programação de administração
1	Controle de solvente	PBS (0,5 mL)	Uma administração
2	EPO do tipo selvagem	8 µg/kg/5 vezes	Uma vez/dia, administrada diariamente por 5 dias
3	EPO altamente glicosilado (Anaesp)	8 µg/kg/vez	Uma administração
4	EPO-PEG-IgG	8 µg/kg/vez	Uma administração

[0179] A recuperação do hematócrito após a administração de cada amostra é mostrada na Figura 16. Quando EPO do tipo selvagem usado como padrão foi injetado a cada dia, por 5 dias, o hematócrito aumentou gradualmente durante a administração e finalmente alcançou um máximo no dia 9. Nos camundongos do grupo 3, que receberam EPO altamente glicosilado, o hematócrito aumentou rápido por 6 dias após a injeção, então diminuiu rapidamente após isso. Em contraste, o conjugado de EPO-PEG-IgG exibiu uma razão maior e mais rápida de aumento inicial de hematócrito que o EPO altamente glicosilado e manteve uma atividade *in vivo* mais alta que as outras proteínas de teste por mais de duas semanas. Esses resultados coincidiram com a expectativa, com base nos resultados do Exemplo de Teste 2, de que o conjugado de EPO-PEG-IgG mostrou uma meia vida útil no sangue mais longa que o EPO do tipo selvagem e o EPO altamente glicosilado. Consequentemente, o conjugado de proteína da presente invenção pode ser eficazmente empregado como uma formulação de longa duração, satisfazendo os objetivos de aumento significativo da vida útil no sangue e atividade *in vivo* de EPO, enquanto

supera o problema do EPO do tipo selvagem, que requer administração muito frequente.

REIVINDICAÇÕES

1. Conjugado de proteína **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende i) um polipeptídeo fisiologicamente ativo excluindo uma imunoglobulina e um fragmento do mesmo; ii) um polietileno glicol; e iii) uma imunoglobulina, os quais são covalentemente ligados uns aos outros nessa ordem, em que o polipeptídeo fisiologicamente ativo é hormônio do crescimento humano, interferon alfa, interferon beta, fator de estimulação da colônia de granulócito ou eritropoietina.

2. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polietileno glicol possui dois grupos reativos em ambas extremidades, através dos quais o polímero é covalentemente ligado ao polipeptídeo fisiologicamente ativo e à imunoglobulina.

3. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é covalentemente ligada a pelo menos dois complexos do polipeptídeo fisiologicamente ativo e o polietileno glicol.

4. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é selecionada do grupo consistindo em IgG, IgA, IgD, IgE e IgM.

5. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é selecionada do grupo consistindo em IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4.

6. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 4, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é uma imunoglobulina humana.

7. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é selecionada do grupo consistindo em uma imunoglobulina possuindo a glicosilação do tipo selvagem, uma

imunoglobulina possuindo um grau de glicosilação aumentado ou diminuído e uma imunoglobulina aglicosilada.

8. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 7, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o aumento ou diminuição do grau de glicosilação ou aglicosilação de uma imunoglobulina é conduzido por um processo selecionado do grupo consistindo em um processo químico, processo enzimático e processo biotecnológico.

9. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 2, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o grupo de reação do polietileno glicol é selecionado do grupo consistindo em aldeído, aldeído propiônico, aldeído butila, maleimida e derivado de succinimida.

10. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o derivado de succinimida é propionato de succinimidila, carboximetil succinimidila, succinimidila hidroxila ou carbonato de succinimidila.

11. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polietileno glicol possui grupos aldeído em ambas extremidades.

12. Conjugado de proteína, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o polietileno glicol é covalentemente ligado às extremidades do mesmo ao terminal amino, resíduo de lisina, resíduo de histidina ou resíduo de cisteína da imunoglobulina e o terminal amino, resíduo de lisina, resíduo de histidina ou resíduo de cisteína do polipeptídeo fisiologicamente ativo, respectivamente.

13. Processo para preparação do conjugado de proteína conforme definido na reivindicação 1, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende:

(a) ligação covalente de pelo menos um polipeptídeo fisiologicamente ativo,

pelo menos uma imunoglobulina com pelo menos um polietileno glicol possuindo grupos reativos em ambas extremidades; e

(b) isolamento de um conjugado de proteína compreendendo, essencialmente, o polipeptídeo ativo, a imunoglobulina e o polietileno glicol, que são interligados covalentemente.

14. Processo, de acordo com a reivindicação 13, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a etapa (a) compreende adicionalmente:

(a1) acoplamento covalente de uma extremidade do polietileno glicol com uma imunoglobulina ou um polipeptídeo fisiologicamente ativo;

(a2) isolamento da mistura de reação resultante de um complexo compreendendo o polietileno glicol acoplado a imunoglobulina ou o polipeptídeo fisiologicamente ativo; e

(a3) acoplamento covalente da extremidade livre do polietileno glicol do complexo com a imunoglobulina ou polipeptídeo fisiologicamente ativo, para produzir um conjugado de proteína compreendendo o polipeptídeo fisiologicamente ativo, o polietileno glicol e a imunoglobulina, que são covalentemente interligados.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a razão molar do polipeptídeo fisiologicamente ativo para o polietileno glicol na etapa (a1) varia de 1:2,5 a 1:5.

16. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a razão molar da imunoglobulina para o polietileno glicol na etapa (a1) varia de 1:5 a 1:10.

17. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a razão molar do complexo obtido na etapa (a2) para o polipeptídeo fisiologicamente ativo ou imunoglobulina na etapa (a3) varia de 1:1 a 1:3.

18. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **CARACTERIZADO** pelo fato de que as etapas (a1) e (a3) são realizadas na presença de um agente de redu-

ção.

19. Processo, de acordo com a reivindicação 18, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que o agente de redução é cianoboroidreto de sódio, boroidreto de sódio, borato de dimetilamina ou borato de piridina.

20. Composição farmacêutica possuindo uma meia vida prolongada de um polipeptídeo fisiologicamente ativo, **CHARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um conjugado de proteína conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11 e um veículo farmacêuticamente aceitável.

21. Processo para prolongar a meia vida *in vivo* de um polipeptídeo fisiologicamente ativo pela preparação do conjugado de proteína conforme definido na reivindicação 1, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que compreende a etapa de ligar covalentemente um polietileno glicol possuindo grupos de reação em ambas as extremidades com um polipeptídeo fisiologicamente ativo e uma imunoglobulina; em que o polipeptídeo fisiologicamente ativo é hormônio do crescimento humano, interferon alfa, interferon beta, fator de estimulação da colônia de granulócito ou eritropoietina.

22. Processo, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é ligada covalentemente a pelo menos dois complexos do polipeptídeo fisiologicamente ativo e ao polietileno glicol.

23. Processo, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é selecionada do grupo consistindo em IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM.

24. Processo, de acordo com a reivindicação 23, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é uma imunoglobulina humana.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 21, **CHARACTERIZADO** pelo fato de que a imunoglobulina é selecionada do grupo consistindo em uma imunoglobulina possuindo glicosilação do tipo selvagem, uma imunoglobulina possuindo um grau aumentado ou diminuído de glicosilação e uma imunoglobulina aglicosilada.

26. Processo, de acordo com a reivindicação 25, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o aumento ou a diminuição do grau de glicosilação ou aglicosilação de uma imunoglobulina é conduzido por um processo selecionado do grupo consistindo em um processo químico, processo enzimático e processo biotecnológico.

27. Processo, de acordo com a reivindicação 22, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o grupo reativo do polietileno glicol é selecionado do grupo consistindo em aldeído, aldeído propiônico, maleimida e derivado succinimida.

FIG. 1

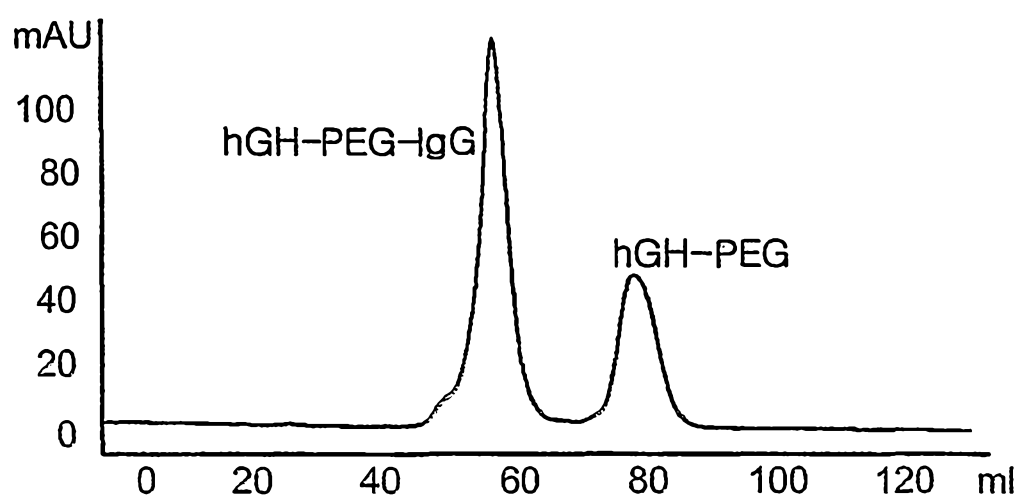


FIG. 2

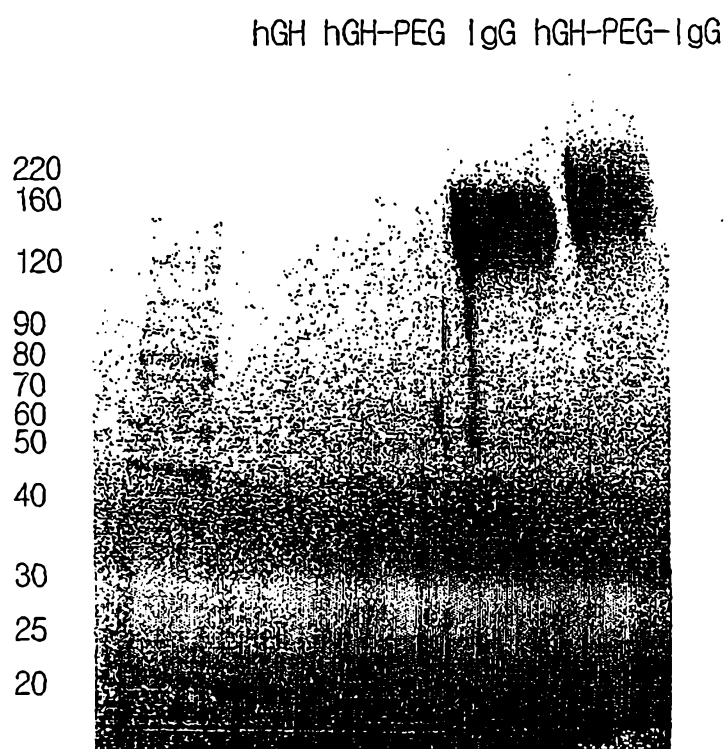


FIG. 3

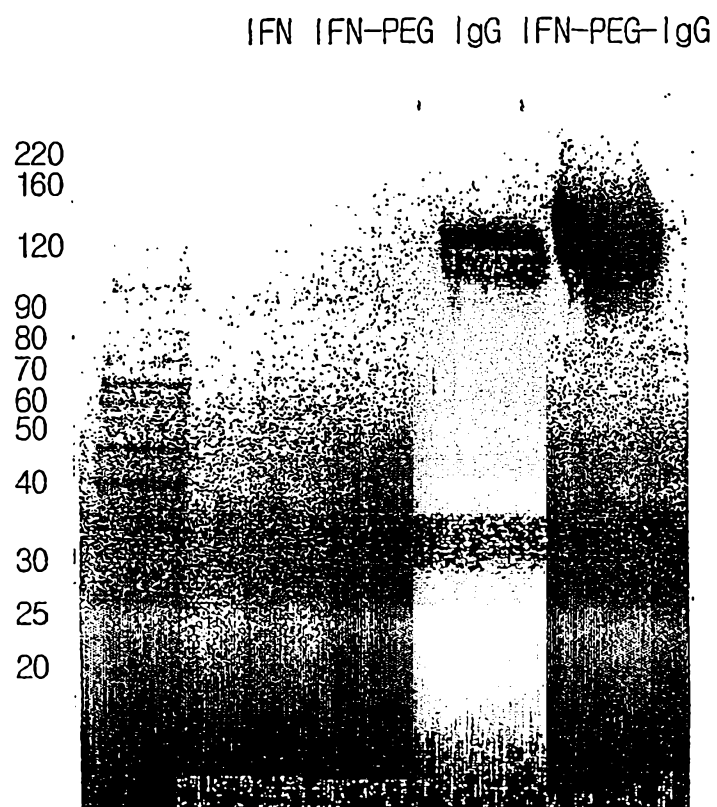


FIG. 4

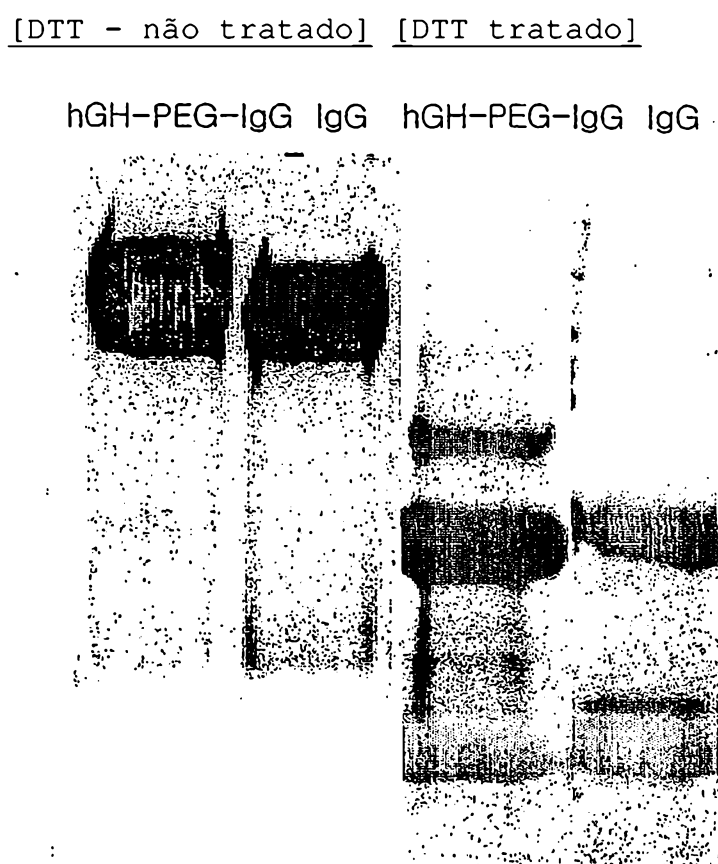


FIG. 5

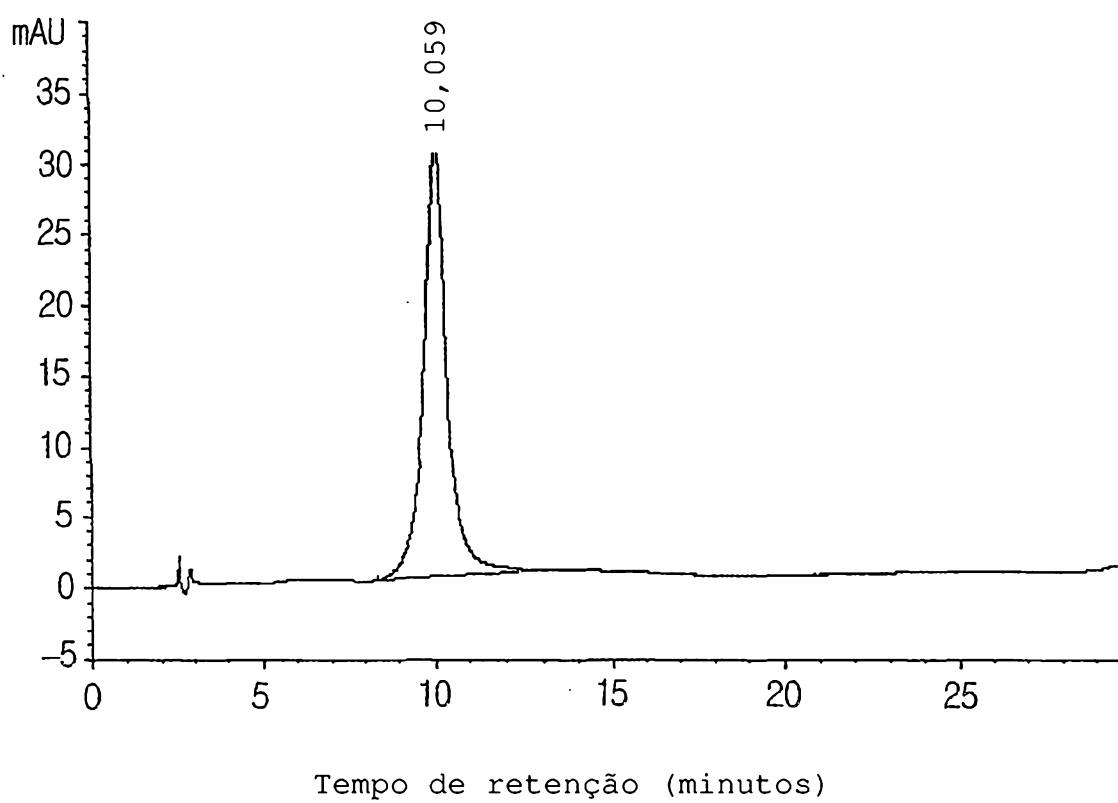


FIG. 6

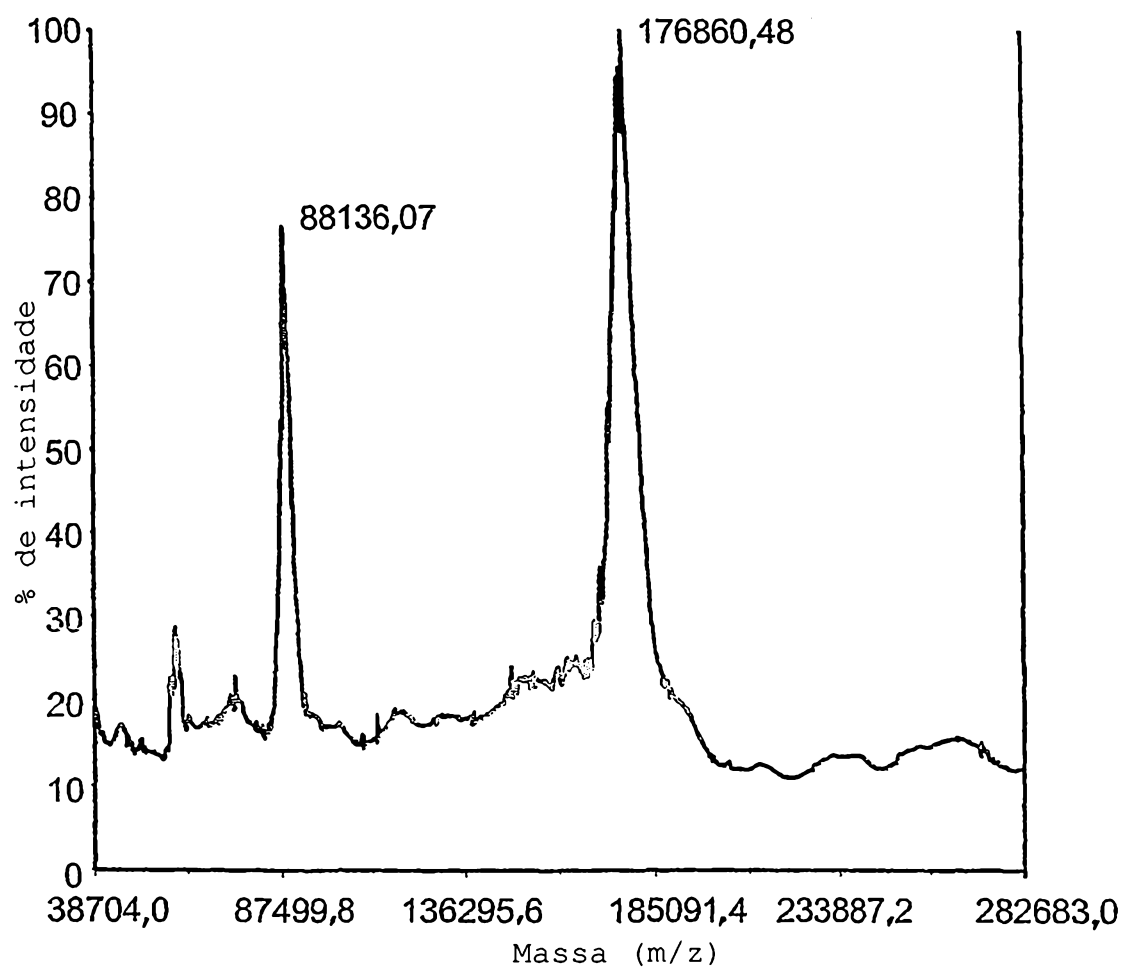


FIG. 7

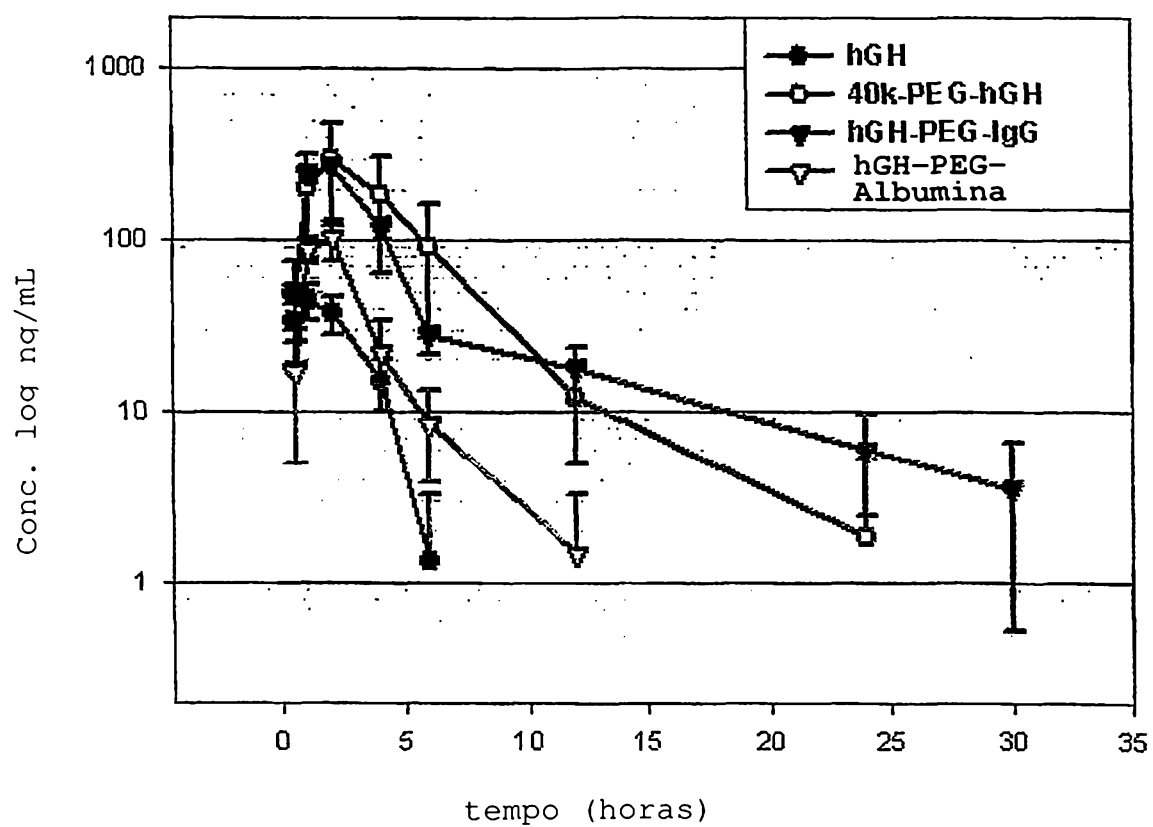


FIG. 8

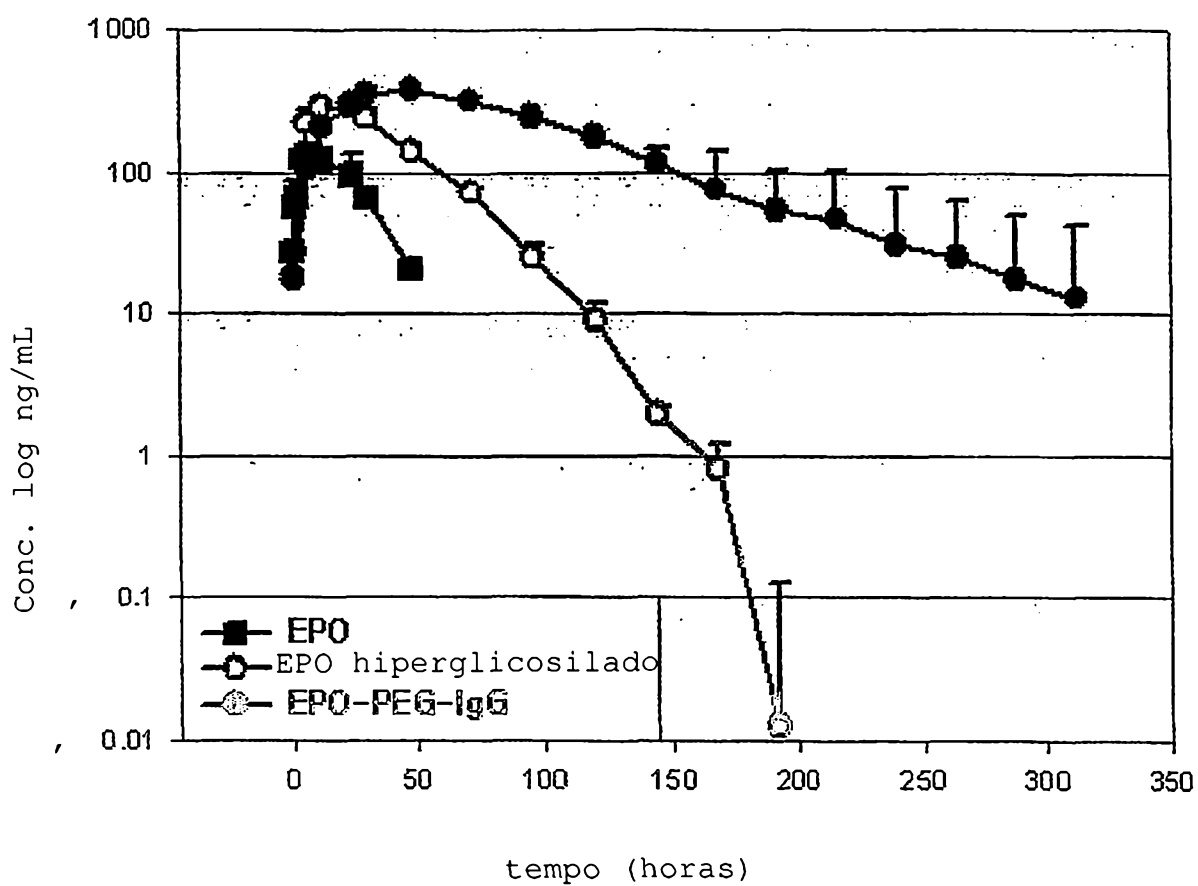


FIG. 9

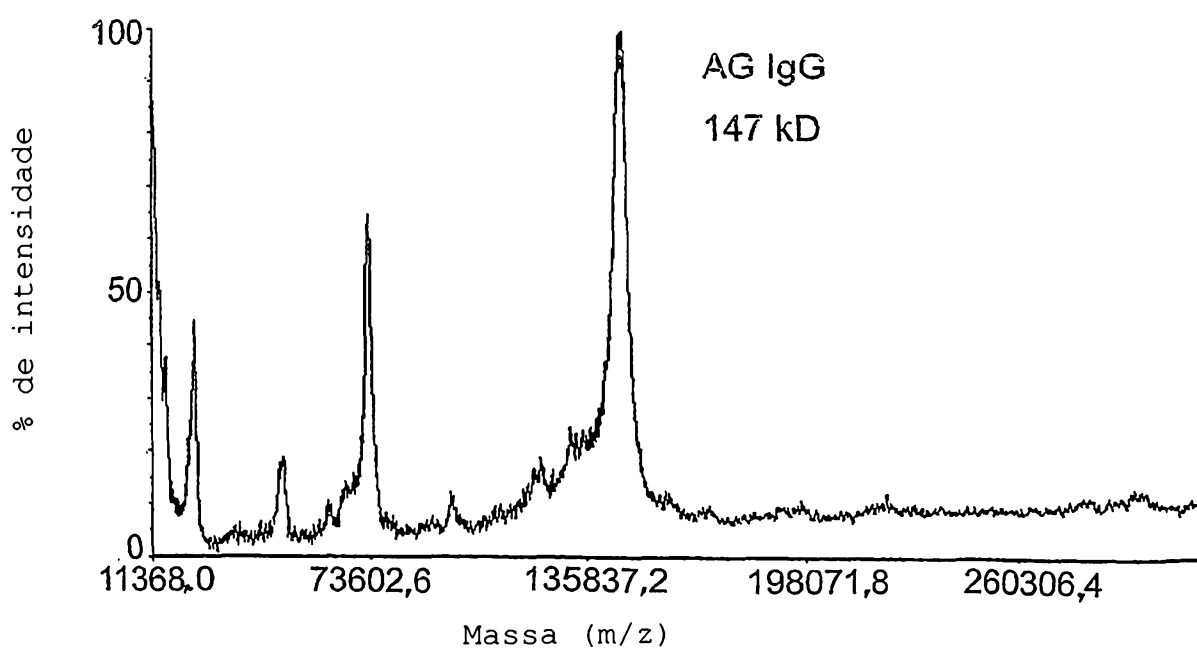
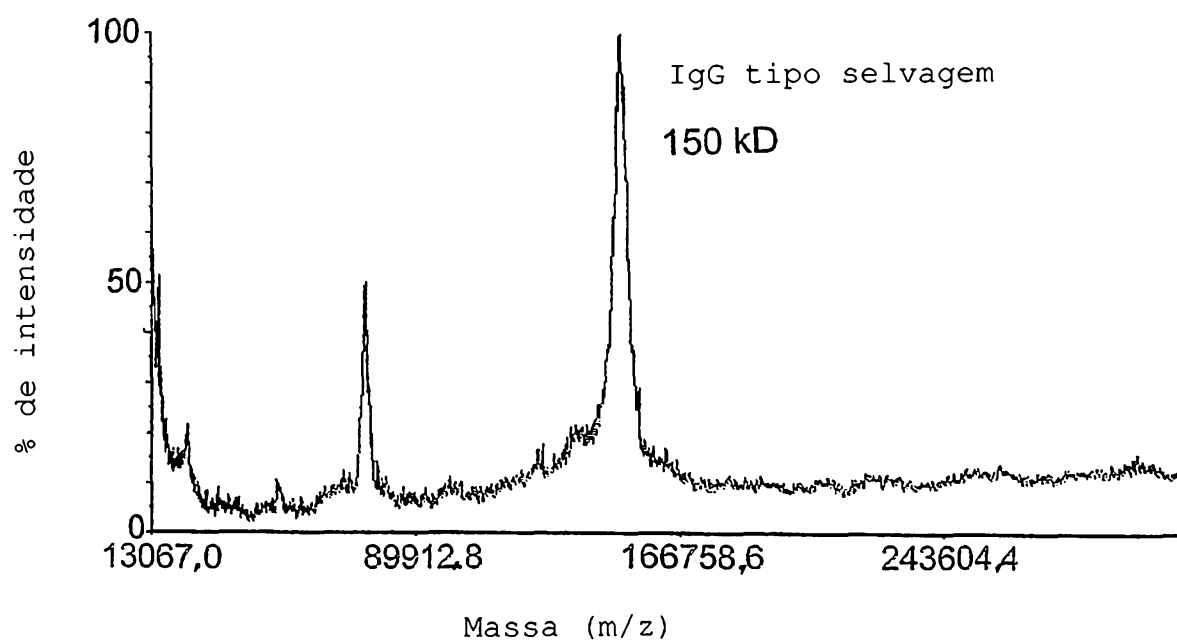


FIG. 10

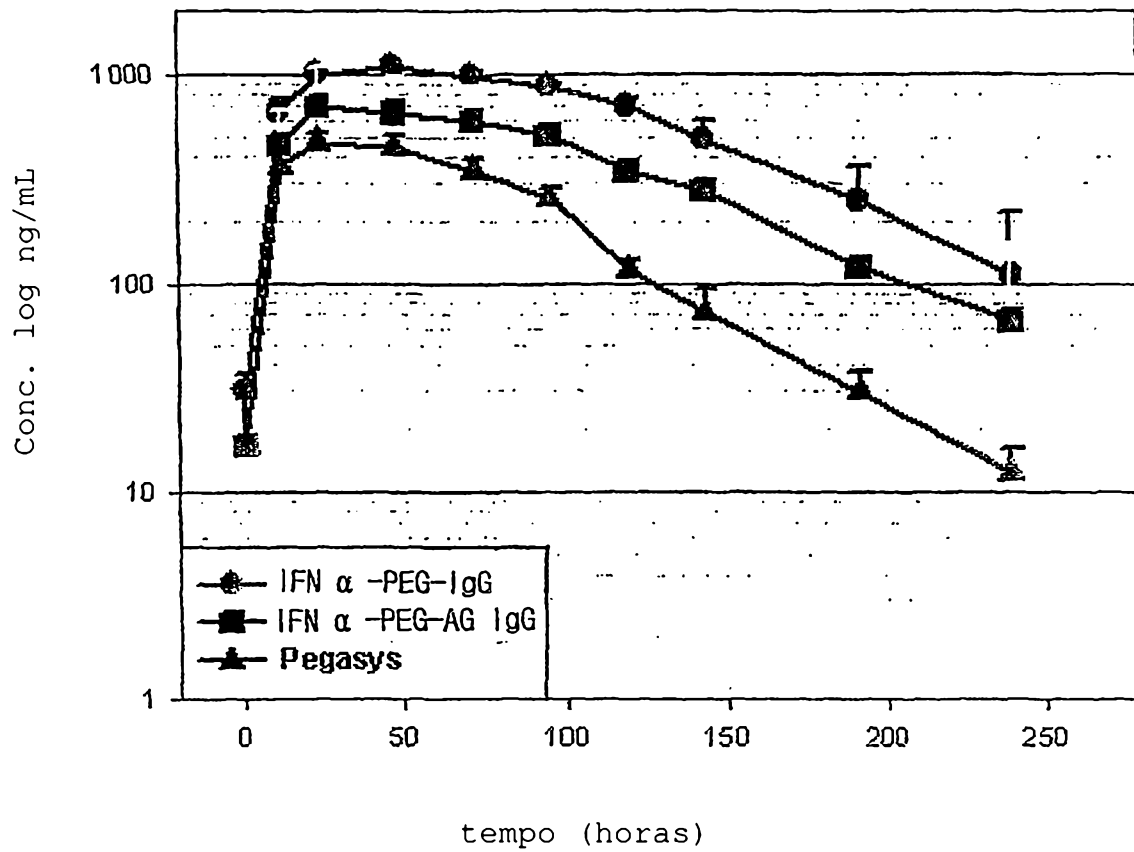


FIG. 11

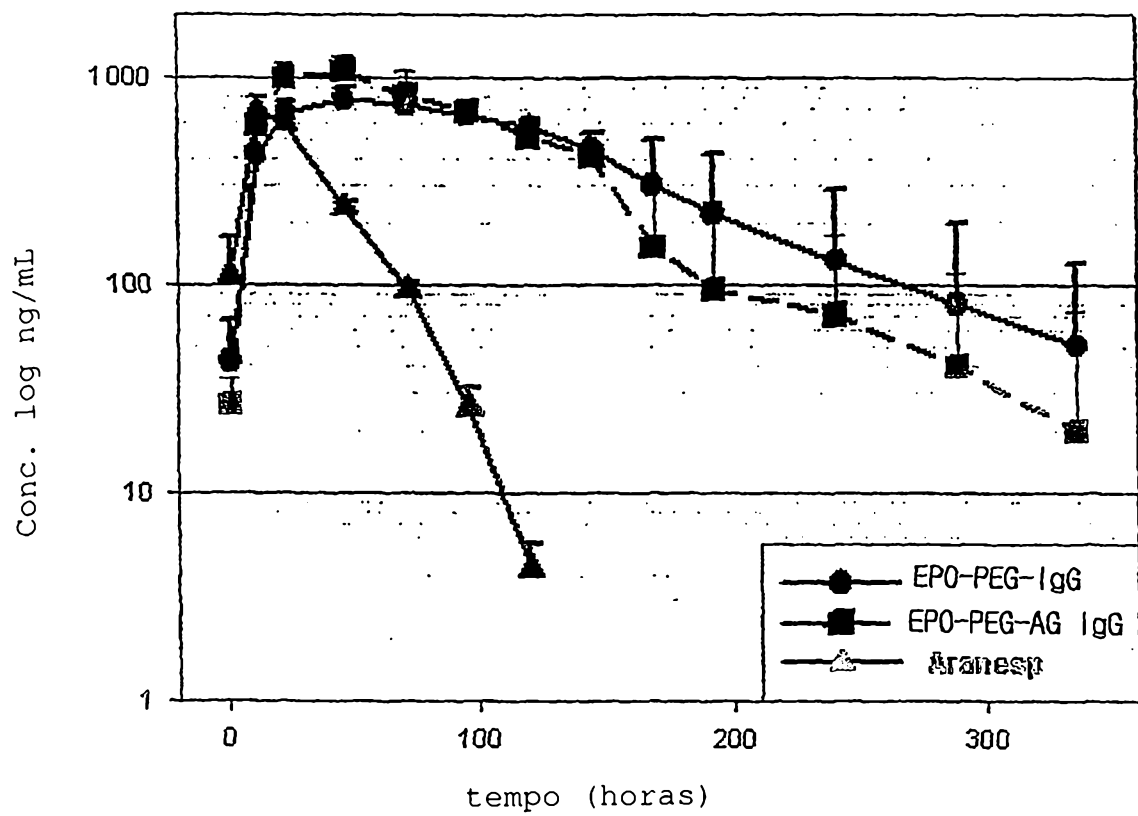


FIG. 12

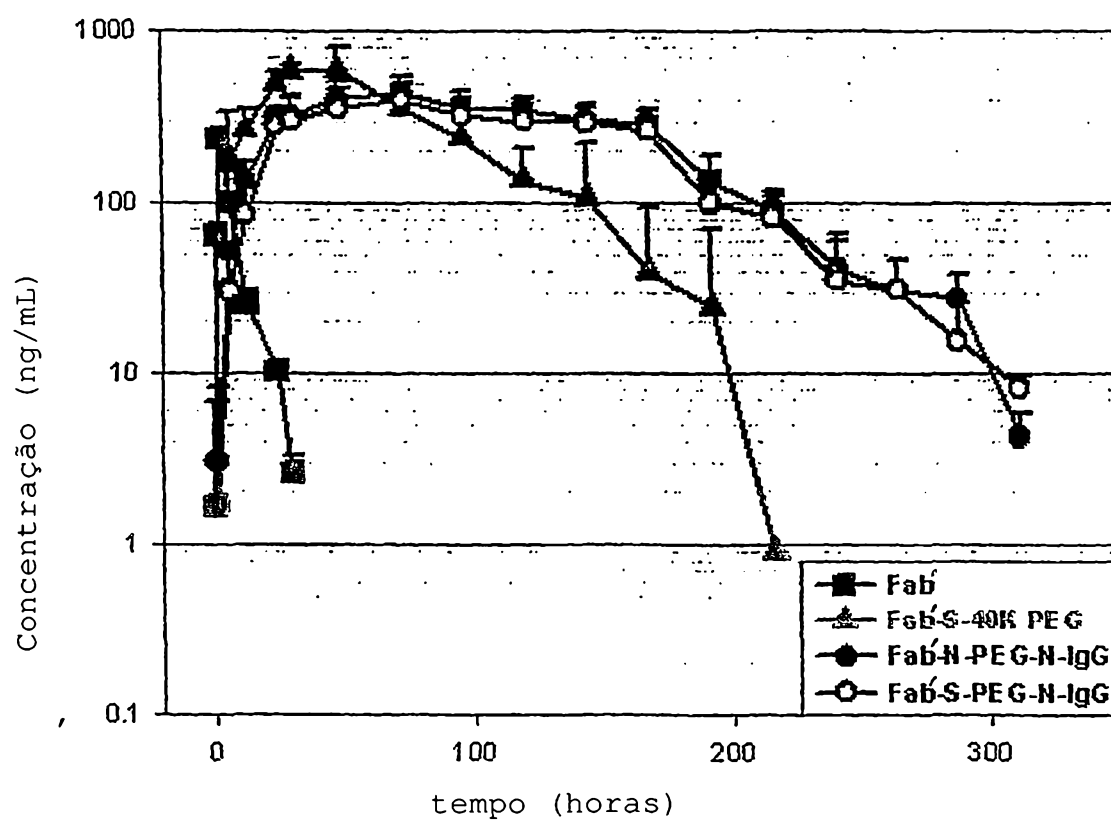


FIG. 13

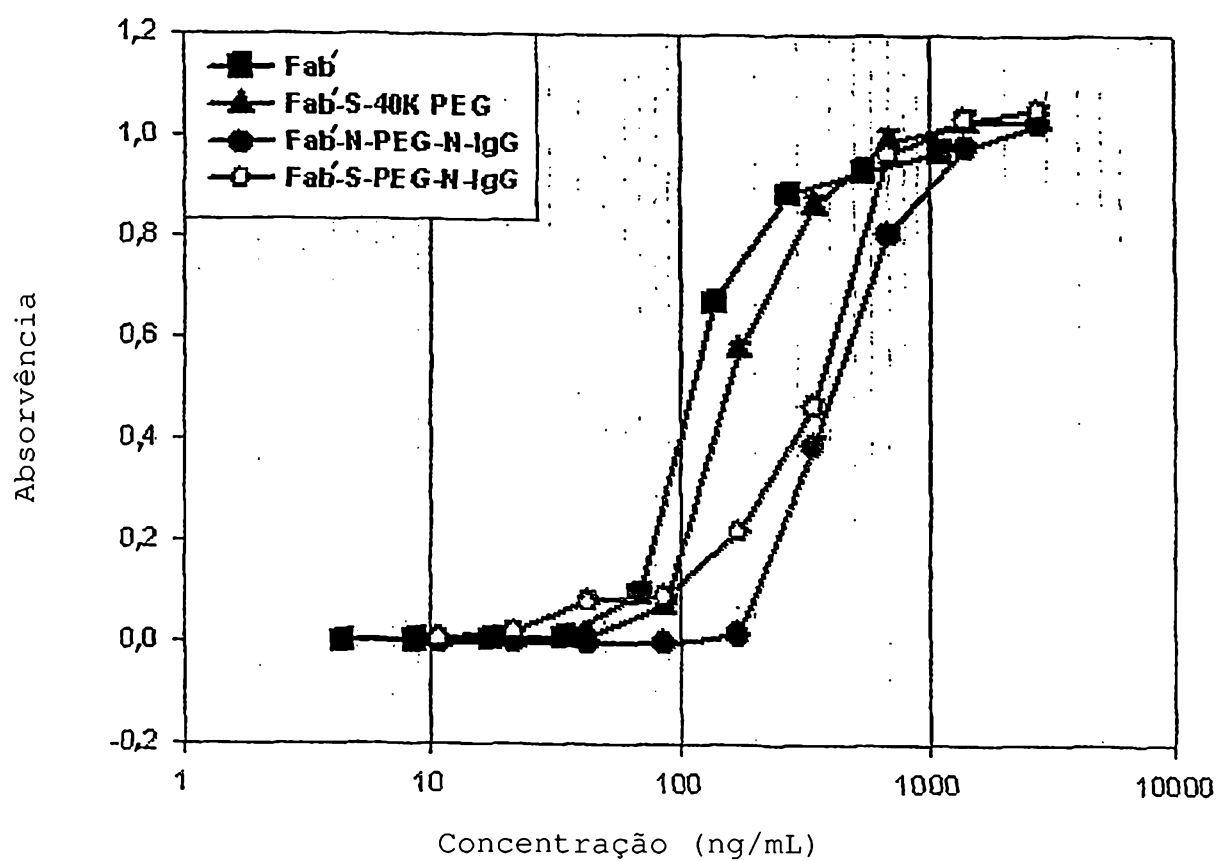


FIG. 14

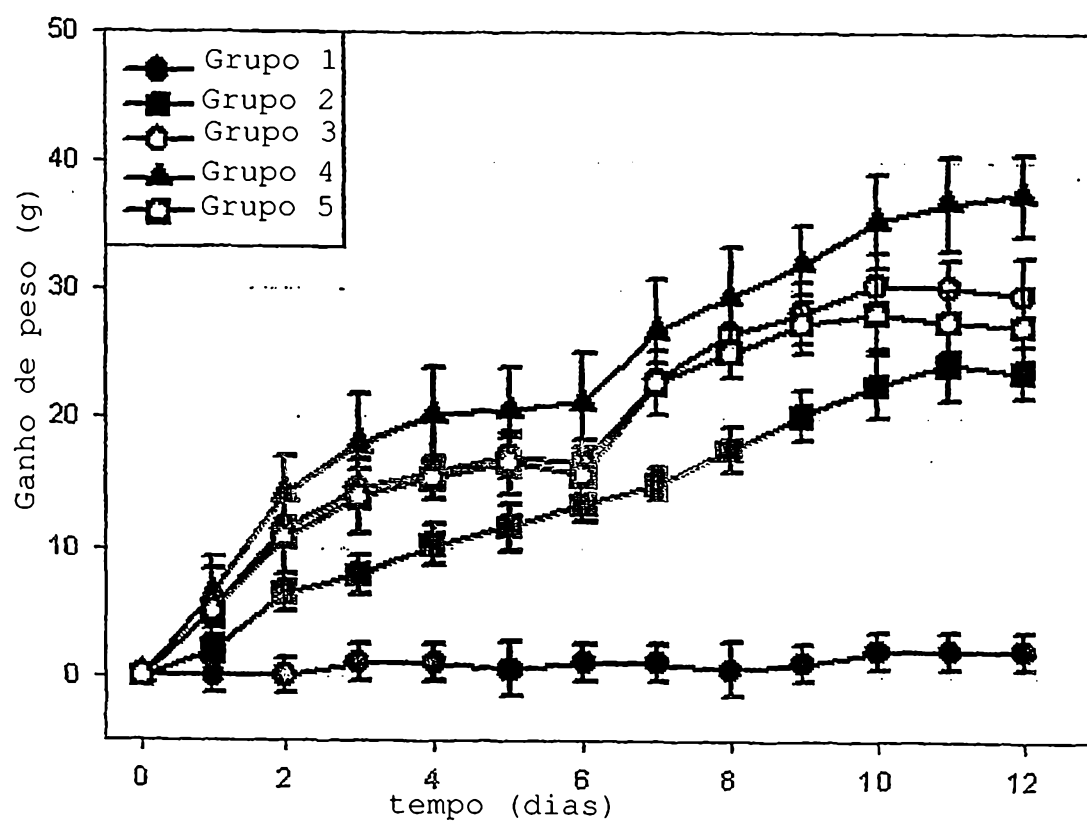


FIG. 15

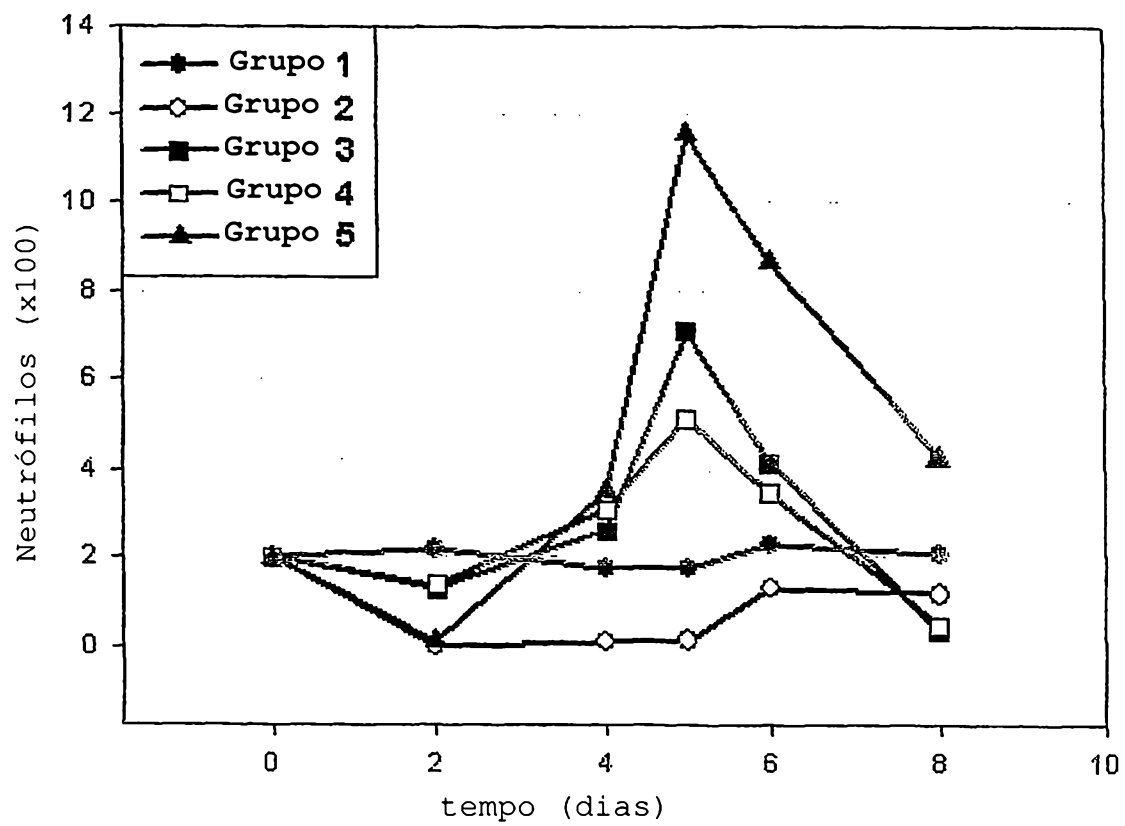


FIG. 16

