I693236

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本　**(11)證書號數：TW I693236 B**

(45)公告日： 中華民國 109 (2020) 年 05 月 11 日

(21)申請案號：103124093　(22)申請日： 中華民國 103 (2014) 年 07 月 14 日

(51)Int. Cl.：　*C07K16/46　(2006.01)*　*A61K47/50　(2017.01)*

(30)優先權：2013/07/12　南韓　10-2013-0082509

(71)申請人：南韓商韓美藥品股份有限公司 (南韓) HANMI PHARM. CO., LTD.　(KR)
南韓

(72)發明人：黃祥淵 HWANG, SANG YOUN (KR) ；李鍾守 LEE, JONG SOO (KR) ；洪性熙 HONG, SUNG HEE (KR) ；崔仁榮 CHOI, IN YOUNG (KR) ；鄭聖燁 JUNG, SUNG YOUB (KR) ；權世昌 KWON, SE CHANG (KR)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(56)參考文獻：

US	7736653B2	US	8029789B2
US	8124094B2	WO	2006107124A1

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：12 項　圖式數：4　共 48 頁

(54)名稱

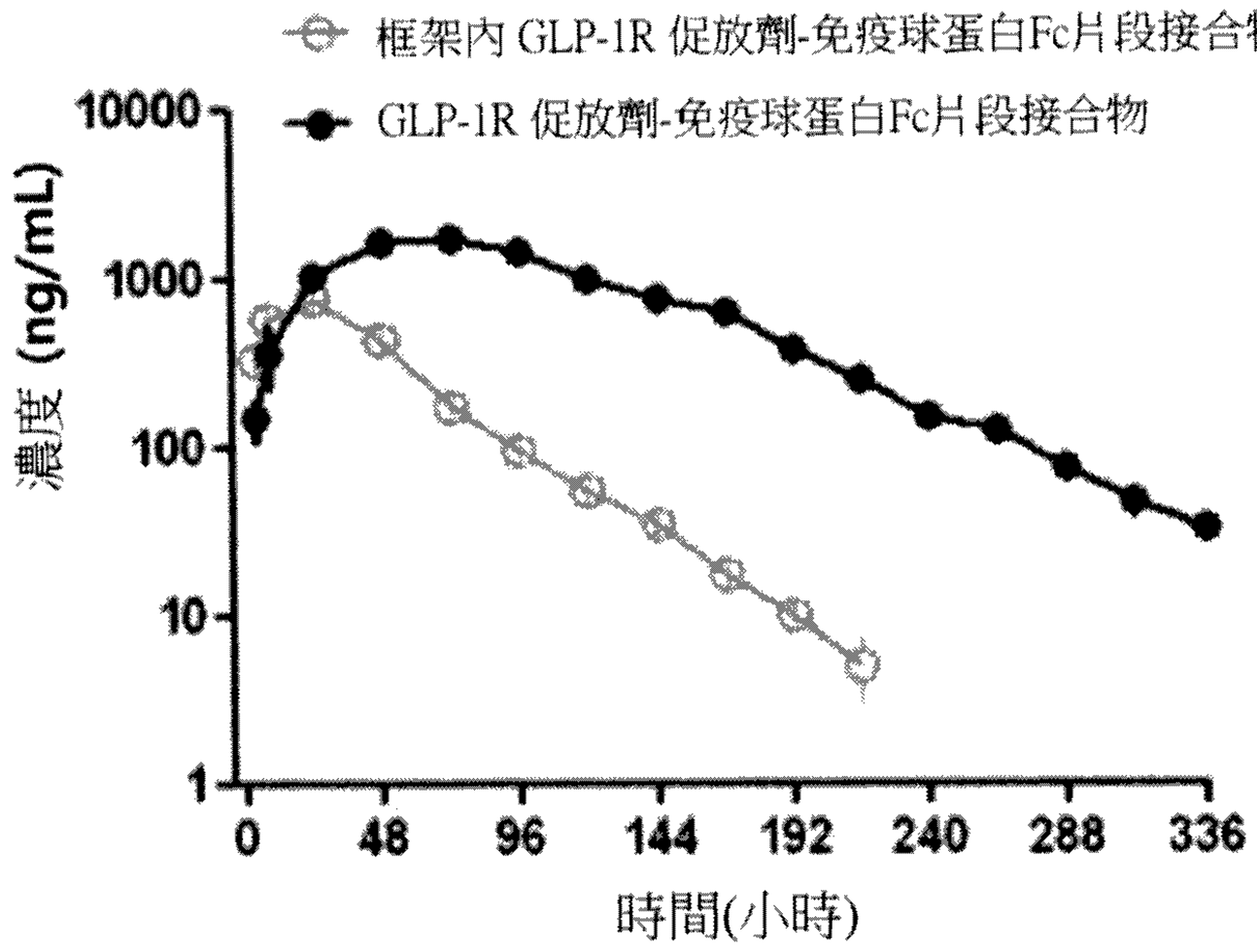
保留免疫球蛋白Ｆｃ片段對ＦｃＲｎ之結合親和力之免疫球蛋白Ｆｃ接合物

(57)摘要

本發明係有關一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子(linker)連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽及保留免疫球蛋白 Fc 片段之固有結合親和力；有關製備該接合物之方法；有關保留該接合物對 FcRn 的固有結合親和力之方法；及有關包含保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 的固有結合親和力之接合物之組成物。

The present invention relates to a physiologically active polypeptide-immunoglobulin Fc fragment conjugate, which comprises a physiologically active polypeptide linked via a non-peptidyl linker to an immunoglobulin Fc fragment having an FcRn-binding region and maintains the intrinsic binding affinity of the immunoglobulin Fc fragment, a method for preparing the conjugate, a method of maintaining the intrinsic binding affinity of the conjugate for FcRn, and a composition comprising the conjugate, which maintains the intrinsic binding affinity of the immunoglobulin Fc fragment for FcRn.

指定代表圖：


框架內 GLP-1R 促放劑-免疫球蛋白Fc片段接合物
GLP-1R 促放劑-免疫球蛋白Fc片段接合物
濃度 (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0
48
96
144
192
240
288
336
時間(小時)

第4圖

公告本

發明摘要

※申請案號：

※申請日：　　※IPC分類：

【發明名稱】(中文/英文)

保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力之免疫球蛋白 Fc 接合物

AN IMMUNOGLOBULIN Fc CONJUGATE WHICH MAINTAINS BINDING AFFINITY OF IMMUNOGLOBULIN Fc FRAGMENT TO FcRn

【中文】

本發明係有關一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子(linker)連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽及保留免疫球蛋白 Fc 片段之固有結合親和力；有關製備該接合物之方法；有關保留該接合物對 FcRn 的固有結合親和力之方法；及有關包含保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 的固有結合親和力之接合物之組成物。

【英文】

The present invention relates to a physiologically active polypeptide-immunoglobulin Fc fragment conjugate, which comprises a physiologically active polypeptide linked via a non-peptidyl linker to an immunoglobulin Fc fragment having an FcRn-binding region and maintains the intrinsic binding affinity of the immunoglobulin Fc fragment, a method for preparing the conjugate, a method of maintaining the intrinsic binding affinity of the conjugate for FcRn, and a composition comprising the conjugate, which maintains the intrinsic binding affinity of the immunoglobulin Fc fragment for FcRn.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 4 ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無指定代表化學式。

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】（中文/英文）

保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力之免疫球蛋白 Fc 接合物

AN IMMUNOGLOBULIN Fc CONJUGATE WHICH MAINTAINS BINDING AFFINITY OF IMMUNOGLOBULIN Fc FRAGMENT TO FcRn

【技術領域】

【0001】 本發明係有關一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物(conjugate)，其包含經由非肽基連接子(linker)連接至具有能保留免疫球蛋白質 Fc 片段固有結合親和力的 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽；有關製備該接合物之方法；有關保留該接合物對 FcRn 的固有結合親和力之方法；及有關包含能保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 的固有結合親和力之接合物之組成物。

【先前技術】

【0002】 針對包含連接至蛋白質俾使增加該蛋白質之血清半衰期之例如聚乙二醇聚合物、白蛋白、脂肪酸或抗體 Fc(恆定區)等載體之蛋白質接合物或複合物(complexes)，已進行各種研究。迄今，關於此類蛋白質接合物或複合物已知之研究大部分目的在於增加藥物之血清半衰期以縮短藥物投與間隔，從而增進病患便利性。然而，許多習知技術由於，舉例而言，治療用蛋白質與載體蛋白

質間之非專一性結合所引起之空間阻礙，而具有例如治療用蛋白質活性減少等問題。此外，於可逆地結合至血清白蛋白以增加其血清半衰期之脂肪酸接合物之情形下，因爲由蛋白質與脂肪酸間可逆結合造成蛋白質藥物最大損失之腎臟清除作用無法避免，使得蛋白質藥物血清半衰期之顯著增加受到限制。

【0003】 此外，已致力於使用免疫球蛋白片段以增加生理活性物質(包括蛋白質)之半衰期。免疫球蛋白 Fc 之 CH2-CH3 區包含延長抗體半衰期之 FcRn (保護受體)結合位點。FcRn 係表現於血管內皮細胞中之第 I 類 MHC 相關蛋白質，且其結合至 IgG 與白蛋白。典型地，IgG 與 FcRn 在弱酸性 pH 時彼此強力結合，於中性 pH 時互相解離。因此，當 IgG 藉由胞飲作用(pinocytosis)或胞吞作用(endocytosis)自血管進入血管內皮細胞及進入溶酶體(pH 6.0)中時，即受 FcRn 保護而不被降解。當 IgG 藉由回收(recycling)與細胞膜融合時，即於 pH 7.4 自 FcRn 解離，而被釋入血管中。由於此過程，包含 FcRn 結合位點之 IgG1、IgG2 與 IgG4 之活體內半衰期平均爲 3 週，比其他蛋白質更長。

【0004】 因此，當免疫球蛋白 Fc 片段連接至生理活性物質時，該生理活性物質之半衰期可藉由 FcRn 介導之回收而增加。在這方面，針對當生理活性物質與免疫球蛋白 Fc 片段連接在一起時，能保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力而不降低生理活性物質活性的方法之

開發有所需求。

【發明內容】

【0005】 於是，本發明人等業已廣泛致力於開發能保留免疫球蛋白 Fc 片段本身對 FcRn 之固有結合親和力而不降低生理活性多肽之活性，且於中性 pH 時可容易自 FcRn 解離之接合物。結果，本發明人等已發現，包含經由非肽基連接子連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽之接合物可保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力，及同時於中性 pH 7.4 時可容易地自 FcRn 解離，從而完成本發明。

[技術問題]

【0006】 本發明之目的在於提供一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽，其中 pH 6.0 時結合至 FcRn 之該接合物量與 pH 7.4 時結合至 FcRn 之該接合物量之結合比率(binding ratio)，係於該接合物所用相同條件下，藉由測量結合至 FcRn 之該免疫球蛋白 Fc 片段量所測得比率之 ± 6%範圍內。

【0007】 本發明之另一目的在於提供一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽，其中將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之該接合物量以及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之該接合物量帶入下述方程式 1 中測得之結合比率，係於該接合物所用相同條件下，藉由測量

結合至 FcRn 之該免疫球蛋白 Fc 片段量所測得比率之± 6%

範圍內：

方程式 1

結合比率(%) = (pH 7.4 時之結合量／pH 6.0 時之結合量) x 100。

【0008】 本發明之又另一目的在於提供用於製備保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 的固有結合親和力之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之方法，該方法包括：(a)將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段，以製備生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之混合物；及(b)自該混合物中分離出顯示結合比率在該免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率之± 6% 範圍內之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其中結合比率係將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之量及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之量帶入方程式 1 中測得。

【0009】 本發明之又另一目的在於提供保留生理活性多肽-免疫球蛋白Fc片段接合物對FcRn之固有結合親和力之方法，該方法包括將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段。

【0010】 本發明之又另一目的在於提供包含該生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之組成物，該組成物保留該免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力。

[技術解決方案]

【0011】 爲了達成上述目的，於一態樣中，本發明

提供一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽，其中 pH 6.0 時結合至 FcRn 之該接合物量與 pH 7.4 時結合至 FcRn 之該接合物量之結合比率，係在於該接合物所用相同條件下，藉由測量結合至 FcRn 之該免疫球蛋白 Fc 片段量所測得比率之±6%範圍內。

【0012】 於一具體實例中，根據本發明之接合物顯示在如使用下述方程式所測得該免疫球蛋白 Fc 片段結合比率之±6%範圍內之結合比率：

方程式 1

結合比率(%) = (pH 7.4 時之結合量／pH 6.0 時之結合量) × 100。

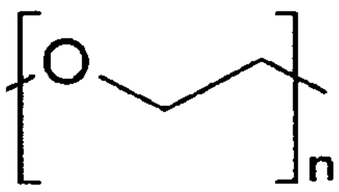
【0013】 於另一具體實例中，根據本發明之接合物可藉由將具有與其連接之非肽基連接子之生理活性多肽與免疫球蛋白 Fc 片段在 pH 4.0 至 9.0 反應，從而經由該非肽基連接子連接該生理活性多肽至該免疫球蛋白 Fc 片段之除了 FcRn 結合區以外之部分而獲得。

【0014】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該非肽基連接子可選自聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇-丙二醇共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多醣、葡聚醣、聚乙烯基乙醚、生物可降解聚合物、脂質聚合物、幾丁質、玻尿酸、及其組合物所組成之群組。

【0015】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該非肽基連接子可爲下式 1 所示之聚乙二醇聚

合物：

式 1



其中 n 係在 10 至 2400 之範圍。

【0016】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該非肽基連接子可具有選自乙醛基、丙醛基、丁醛基、馬來醯亞胺基、及琥珀醯亞胺衍生物所組成之群組之反應基。

【0017】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該生理活性多肽可選自類升糖素胜肽-1 (GLP-1)、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、人類生長激素(hGH)、紅血球生成素(EPO)、升糖素、調酸素、胰島素、生長激素釋放激素、生長激素釋放肽、干擾素、干擾素受體、G 蛋白質偶聯受體、介白素、介白素受體、酵素、介白素結合蛋白質、細胞介素結合蛋白質、巨噬細胞活化因子、巨噬細胞胜肽、B 細胞因子、T 細胞因子、蛋白質 A、過敏抑制劑、細胞壞死醣蛋白質類、免疫毒素、淋巴毒素、腫瘤壞死因子、腫瘤抑制因子、轉移生長因子、α-1 抗胰蛋白酶、白蛋白、α-乳白蛋白、脂蛋白元-E、高度糖基化紅血球生成素、血管生成素、血紅素、凝血酶、凝血酶受體活化肽、凝血酶調節素、血液因子 VII、VIIa、VIII、IX 與 XIII、纖維蛋白溶酶原活化因子、纖維蛋白結合肽、尿

激酶、鏈球菌激酶、水蛭素、蛋白質 C、C-反應蛋白質、腎素抑制劑、膠原蛋白酶抑制劑、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生之生長因子、上皮生長因子、表皮生長因子、血管抑制素、血管收縮素、骨生長因子、骨刺激蛋白質、降鈣素、心房肽、軟骨誘導因子、依降鈣素、結締組織活化因子、組織因子通道抑制劑、促卵泡激素、促黃體激素、促黃體激素釋放激素、神經生長因子、副甲狀腺激素、鬆弛素、分泌素、促生長因子、類胰島素生長因子、腎上腺皮質激素、膽囊收縮素、胰多肽、胃泌素釋放肽、促腎上腺皮質素釋放因子、促甲狀腺激素、自體毒素(autotaxin)、乳鐵蛋白、肌肉生長抑制素、細胞表面抗原、病毒衍生之疫苗抗原、單株抗體、多株抗體、及抗體片段所組成之群組。

【0018】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之含有 FcRn 結合區之該免疫球蛋白 Fc 片段可包含 CH2 功能區、CH3 功能區、或二者。

【0019】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該免疫球蛋白 Fc 片段可呈非糖基化形式。

【0020】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該免疫球蛋白 Fc 片段可包含鉸鏈區。

【0021】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明接合物中之該免疫球蛋白 Fc 片段可選自 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、其組合、及其雜合物(hybrids)所組成之群組。

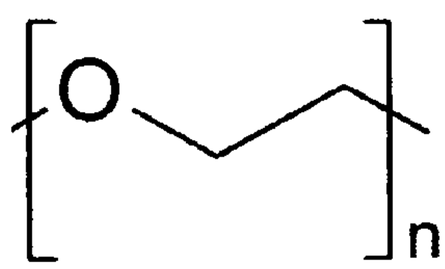
【0022】 於又另一具體實例中，包含於根據本發明

接合物中之該免疫球蛋白 Fc 片段可爲 IgG4 Fc 片段。

【0023】 於另一態樣中，本發明提供一種用於製備保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 的固有結合親和力之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之方法，該方法包括：(a)將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段，以製備生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之混合物；及(b)自該混合物中分離出顯示結合比率在該免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率之±6%範圍內之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其中該結合比率係將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之量及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之量帶入方程式 1 中測得。

【0024】 於一具體實例中，用於根據本發明製備方法中之該非肽基連接子可爲下式 1 所示之聚乙二醇聚合物：

式 1



其中 n 係在 10 至 2400 之範圍。

【0025】 於又另一具體實例中，於根據本發明製備方法步驟(b)中分離出之該接合物具有於其中該非肽基連接子結合至該免疫球蛋白 Fc 片段 N 終端之結構。

【0026】 於又另一態樣中，本發明提供一種保留生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物對 FcRn 之固有結合

親和力之方法，該方法包括將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段。

【0027】 於一具體實例中，固有結合親和力之保留係於活體內致效(effected)。

【0028】 於又另一態樣中，本發明提供一種包含生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之組成物，該組成物保留該免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力。

[有利功效]

【0029】 如上述，本發明之接合物保留該免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力，同時，在中性 pH，例如 pH 7.4 時，易於自 FcRn 解離；因此，其可有利地用以增加生理活性多肽之血清半衰期。

【圖式簡單說明】

【0030】

第 1 圖係顯示回收經結合至 FcRn 蛋白質過程之示意圖。

第 2 圖顯示酸性 pH 時，免疫球蛋白-蛋白質接合物結合至 FcRn 之感應圖(sensorgram)。

第 3 圖顯示中性 pH 時，免疫球蛋白-蛋白質接合物結合至 FcRn 之感應圖。

第 4 圖顯示 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白片段接合物之活體內藥物動力學比較試驗結果。

【實施方式】

【0031】 於一態樣中，本發明提供一種生理活性多

肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽，其中 pH 6.0 時結合至 FcRn 之該接合物量與 pH 7.4 時結合至 FcRn 之該接合物量之比率，係在於該接合物所用相同條件下，藉由測量結合至 FcRn 之該免疫球蛋白 Fc 片段量所測得比率之± 6%範圍內。

【0032】 本文所用之表示法“生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之結合量”係指在所關注之 pH，相對於結合或未結合至 FcRn 之該接合物蛋白質總濃度之結合至 FcRn 之該接合物蛋白質濃度比率。於本發明中，因爲此結合量係用以計算兩個 pH 時之結合量間之比率，結合量間之比率可從一 pH 時測量之結合絕對量計算，亦可藉由測量與所結合之接合物量成正比且容易測量之其他物理量所測定。舉例而言，結合量間之比率可藉由測量表面電漿共振(surface plasmon resonance，SPR)訊號，且計算 pH 6.0 與 pH 7.4 間之訊號比予以測定。此外，亦可使用其他方法測定結合量間之比率。

【0033】 具體而言，本發明提供一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其包含經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽，其中藉由將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之該接合物量及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之該接合物量帶入下述方程式 1 中所測得之結合比率，小於在該接合物所用相同條件下，藉由測量結合至 FcRn 之該免疫球蛋白 Fc 片段量所測得結合比率

之±6%範圍：

方程式 1

結合比率(%) = (pH 7.4 時之結合量／pH 6.0 時之結合量) × 100

【0034】 該結合比率可藉由將 pH 7.4 時結合至 FcRn 之接合物(或免疫球蛋白 Fc 片段)量除以 pH 6.0 時結合至 FcRn 之接合物(或免疫球蛋白 Fc 片段)量，所得商值乘以 100，呈百分比(%)值獲得。

【0035】 該結合比率可使用 Weirong Wang et al. (DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 39：1469-1477, 2011)所提出用於預測單株抗體半衰期之方法計算，但不特別限於此。於上述文獻所述方法中，具有高結合比率之單株抗體顯示短的活體內半衰期。

【0036】 用於測量結合比率之方法特別可使用表面電漿共振法進行，但不特別限於此。

【0037】 舉例而言，用於測量結合比率方法可藉由使用胺偶合套組等，將 FcRn 固定於生物感應器晶片(例如，Biacore CM5 生物感應器晶片)上進行，以含有待測量與 FcRn 結合程度的物質(例如，接合物或免疫球蛋白 Fc 片段)之酸性緩衝液(例如，pH 6.0 緩衝液)注入已固定有 FcRn 之生物感應器晶片中，然後注入中性緩衝液(例如，pH 7.4 緩衝液)於該生物感應器晶片。於此情形下，該結合比率可於完成注入 pH 6.0 緩衝液中之試樣至晶片中之前，藉由測量平衡狀態中之共振單位(resonance unit，RU)以測定 pH 6.0

之結合量；注入 pH 7.4 緩衝液後，測量共振單位以測定 pH 7.4 之結合量；然後將 pH 7.4 之結合量除以 pH 6.0 之結合量予以測定。當欲以百分比表示結合比率時，可將所得商值乘以 100。

【0038】 於上述方法中，pH 6.0 緩衝液之組成並未特別限制，只要其可誘發待測量與 FcRn 結合程度的物質與 FcRn 間之結合即可。舉例而言，pH 6.0 緩衝液可爲含有鹽(例如磷酸鹽)之緩衝液。緩衝液中鹽的濃度可爲 50 至 200 mM，但不限於此。又，緩衝液可於溫度約 25 ℃注入已固定有 FcRn 之生物感應器晶片中，惟測量溫度可於不改變緩衝液 pH 之溫度範圍內變化。

【0039】 此外，pH 6.0 緩衝液可含有待測量與 FcRn 結合程度之物質。於 pH 6.0 緩衝液中，待測量與 FcRn 結合程度物質之濃度並未特別限制，只要可測量與 FcRn 之結合程度即可。舉例而言，於 pH 6.0 緩衝液中，待測量與 FcRn 結合程度物質之濃度可介於 100 nM 與 12.5 nM 之間。

【0040】 於上述方法中，pH 7.4 緩衝液之組成並未特別限制，只要其可誘發待測量與 FcRn 結合程度的物質與 FcRn 間之解離即可。舉例而言，pH 7.4 緩衝液可爲含有磷酸鹽之緩衝液。緩衝液中鹽的濃度可爲 50 至 200 mM，但不限於此。又，pH 7.4 緩衝液可於溫度 25 至 37℃注入已固定 FcRn 之生物感應器晶片中，但不限於此。於特定具體實例中，結合量間之比率係於溫度 25℃測量。

【0041】 此外，於 pH 6.0，FcRn 和待測量與 FcRn 結

合程度的物質間之結合量可爲完成 pH 6.0 試樣注入前 2 至 60 秒所測量之共振單位值。FcRn 和待測量與 FcRn 結合程度的物質間之結合較佳係在測量時間點時呈平衡狀態。

【0042】 又，於 pH 7.4，FcRn 和待測量與 FcRn 結合程度的物質間之結合量可爲注射 pH 7.4 緩衝液後 10 至 20 秒所測量之共振單位值。測量時間點較佳爲介於 RU 值迅速變化與 RU 值達到 0 之時間點之間。

【0043】 於比較免疫球蛋白 Fc 片段與根據本發明接合物間之結合比率時，該等結合比率較佳爲於相同實驗條件下，藉由相同實驗方法測定，惟緩衝液之組成與溫度可視接合物種類而不同。

【0044】 如上述之表面電漿共振法係用於測定結合比率之一方法。除了表面電漿共振法外，任何方法可用於於本發明中，只要其爲可測量結合至 FcRn 之該接合物量之方法即可，例如酵素免疫吸附分析法 (enzyme-immunosorbent assay，ELISA)。此外，結合量之單元可視所用方法而不同。

【0045】 當包含經由非肽基連接子連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之結合比率，係如上述方法所測得，在該免疫球蛋白 Fc 片段本身結合比率之±6.0% 範圍內時，該生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物具有長的活體內半衰期。

【0046】 於本發明中發現，即使當生理活性多肽經

由非肽基連接子共價連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段而形成接合物時，亦可保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力，此表示可容易地發生免疫球蛋白 Fc 片段之分子內回收而增加活體內半衰期。尤其是，當非肽基連接子結合至免疫球蛋白 Fc 片段之除 FcRn 結合區以外之部分時，並不減少免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力。當非肽基連接子爲聚乙二醇(-[O-CH_2-CH_2]n-)時，-[O-CH_2-CH_2]n-中之 n 爲 10 或 10 以上，特別是 10 至 2400，更特別是 10 至 480，又更特別是 50 至 250，但不限於此。

【0047】 頃發現，當-[O-CH_2-CH_2]n-中之 n 特別爲 10 至 2400，更特別爲 50 至 2400 時，該聚乙二醇不會影響生理活性多肽活性及生理活性多肽各者與免疫球蛋白 Fc 片段之 FcRn 結合活性。本發明係基於此特性。

【0048】 本文中所用之術語“生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物”係指包含經由非肽基連接子共價連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽及顯示結合比率在該免疫球蛋白 Fc 片段結合比率之±6.0%範圍內之接合物，其中該結合比率係將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之量及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之量帶入方程式 1 中測得。

【0049】 該接合物中之非肽基連接子可連接至遠離免疫球蛋白 Fc 片段之 FcRn 結合區之胺基酸殘基，例如，對應於根據卡巴特(Kabat)編號系統編號之 CH2 之位置 252

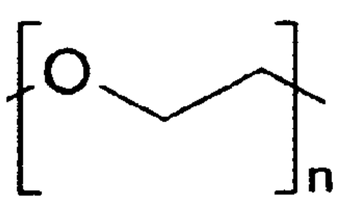
至 257 與 307 至 311 及 CH2 之位置 433 至 436。該非肽基連接子較佳可爲連接至免疫球蛋白 Fc 片段之 N 終端或 C 終端，更佳爲連接至 N 終端，但不限於此。

【0050】 當非肽基連接子連接至免疫球蛋白 Fc 片段之 N 終端或 C 終端時，不會實質降低免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力，因而可保留接合物之免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力。

【0051】 本文中所用之術語“非肽基連接子”係指由互相連接的二個或多個重複單元組成之生物相容性聚合物，其中重複單元係藉由任何非肽共價鍵互相連接。此非肽基連接子可具有二個或三個末端。

【0052】 本發明中所用之非肽基連接子可選自生物可降解之聚合物例如聚乙二醇、聚丙二醇、乙二醇與丙二醇之共聚物、聚氧乙基化多元醇、聚乙烯醇、多醣、葡聚醣、聚乙烯基乙醚、生物可降解之聚合物例如聚乳酸(PLA)與聚乳酸-乙醇酸(PLGA)、脂質聚合物、幾丁質、玻尿酸、及其組合物所組成之群組，但不限於此。較佳地，非肽基連接子係聚乙二醇，例如，惟不限於，下式 1 所示之聚乙二醇聚合物：

式 1



其中 n 係在 10 至 2400 之範圍，較佳爲 10 至 480，更佳爲

50至250，但不限於此。

【0053】 同時，具有相應於式1之聚乙二醇之分子量之其他非肽基連接子亦隸屬本發明範圍內。

【0054】 此外，此項技藝中已知之其衍生物及於此項技藝狀態中可輕易製備之非肽基連接子衍生物亦隸屬本發明範圍內。

【0055】 於本發明中用作爲非肽基連接子之聚乙二醇具有之優點爲，其不會在結合至其兩端之生理活性多肽及之免疫球蛋白Fc片段間產生空間阻礙，俾使該生理活性多肽之生理活性以及免疫球蛋白Fc片段對FcRn之結合親和力二者均可保留。

【0056】 於藉由習知框架內(in-frame)融合法製備之融合蛋白質中所用之肽基連接子具有之缺點爲，於活體內容易被蛋白酶裂解，因此無法獲得藉由載體增加活性藥物之血清半衰期的預期效果。然而，根據本發明之包含非肽基連接子之接合物顯著地克服此缺點。類似於載體者，非肽基連接子可爲對蛋白酶具抗性而保留胜肽之血清半衰期之聚合物。因此，任何非肽基連接子均可用於本發明而無任何限制，只要其爲具上述功能之聚合物，亦即，於活體內對蛋白酶具抗性之聚合物即可。

【0057】 此外，連接至本發明之免疫球蛋白Fc片段之非肽基連接子不僅可由一種聚合物所製成，亦可由不同種類之聚合物組合製成。

【0058】 於本發明中使用之非肽基連接子具有能結

合至免疫球蛋白 Fc 片段及生理活性多肽之反應基。

【0059】 於非肽基聚合物兩端之反應基較佳爲選自反應性乙醛基、丙醛基、丁醛基、馬來醯亞胺基、及琥珀醯亞胺衍生物所組成之群組。於此，琥珀醯亞胺衍生物可爲琥珀醯亞胺丙酸酯、羥基琥珀醯亞胺基、琥珀醯亞胺基羧甲基、或琥珀醯亞胺基碳酸酯。尤其是，當非肽基聚合物於其兩端具有反應性醛基時，生理活性多肽及免疫球蛋白分別有效地結合至非肽基連接子之兩端，同時使非專一性反應最小化。利用經由醛鍵之還原性烷基化反應所產生之終產物較經由醯胺鍵連接者更爲穩定。低 pH 時，醛反應基可選擇性地結合至 N 終端，高 pH 時，例如，pH 9.0 時，可與離胺酸殘基形成共價鍵。於此，非肽基連接子可包含二個或多個醛基或具有經包括醛之官能基取代之二個或多個醇基。

【0060】 於非肽基連接子兩端之反應基可相同或不同。舉例而言，非肽基連接子之一端可具有馬來醯亞胺基，另一端可具有乙醛基、丙醛基、或烷基醛基團例如丁基醛。於使用兩端具羥基反應基之聚乙二醇作爲非肽基連接子時，該等羥基基團可藉由已知化學反應活化成爲各種反應基。或者，可使用市售可得之具經修飾之反應基之聚乙二醇以製備本發明之接合物。

【0061】 本文中所用之術語“生理活性多肽”統指具活體內任何生理活性之多肽，其通常具多肽結構及具有各種生理活性。生理活性多肽包括具有調控基因表現與生

理功能及矯正涉及調控活體內諸多功能之物質之缺乏或過量引起之異常狀況者。生理活性多肽亦可包括一般蛋白質治療劑。此外，術語“生理活性多肽”不僅意指天然多肽，亦包括其衍生物。

【0062】 本發明接合物中生理活性多肽之種類與大小並無特別限制，只要其爲可藉由本發明接合物結構顯示血清半衰期增加之生理活性多肽即可。於本發明具體實例中，接合物係使用各種生理活性多肽予以製備，包括爲生理活性多肽代表性實例之胰島素、干擾素、人類生長激素與 GLP-1 促效劑，頃發現，可保留免疫球蛋白 Fc 片段本身對 FcRn 之固有結合親和力，而無關生理活性多肽之種類與大小。

【0063】 包含於根據本發明接合物中之生理活性多肽可選自類升糖素胜肽-1(GLP-1)、粒細胞群落刺激因子(G-CSF)、人類生長激素(hGH)、紅血球生成素(EPO)、升糖素、調酸素、胰島素、生長激素釋放激素、生長激素釋放肽、干擾素、干擾素受體、G 蛋白質偶聯受體、介白素、介白素受體、酵素、介白素結合蛋白質、細胞介素結合蛋白質、巨噬細胞活化因子、巨噬細胞胜肽、B 細胞因子、T 細胞因子、蛋白質 A、過敏抑制劑、細胞壞死醣蛋白質、免疫毒素、淋巴毒素、腫瘤壞死因子、腫瘤抑制因子、轉移生長因子、α-1 抗胰蛋白酶、白蛋白、α-乳白蛋白、脂蛋白元-E、高度糖基化紅血球生成素、血管生成素、血紅素、凝血酶、凝血酶受體活化肽、凝血酶調節素、血液因

子 VII、VIIa、VIII、IX 與 XIII、纖維蛋白溶酶原活化因子、纖維蛋白結合肽、尿激酶、鏈球菌激酶、水蛭素、蛋白質 C、C-反應蛋白質、腎素抑制劑、膠原蛋白酶抑制劑、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生之生長因子、上皮生長因子、表皮生長因子、血管抑制素、血管收縮素、骨生長因子、骨刺激蛋白質、降鈣素、心房肽、軟骨誘導因子、依降鈣素、結締組織活化因子、組織因子通道抑制劑、促卵泡激素、促黃體激素、促黃體激素釋放激素、神經生長因子、副甲狀腺激素、鬆弛素、分泌素、促生長因子、類胰島素生長因子、腎上腺皮質激素、膽囊收縮素、胰多肽、胃泌素釋放肽、促腎上腺皮質素釋放因子、促甲狀腺激素、自體毒素(autotaxin)、乳鐵蛋白、肌肉生長抑制素、細胞表面抗原、病毒衍生之疫苗抗原、單株抗體、多株抗體、及抗體片段所組成之群組，但不限於此。此外，本文所用之術語“生理活性多肽”，不僅包括天然生理活性多肽，亦包括各多肽之促效劑、前驅物、衍生物、片段或變異體。於此，調酸素衍生物之實例包括所有揭示於韓國專利申請公開案第 10-2012-0137271 號中者，胰島素-釋放肽衍生物之實例包括揭示於韓國專利申請公開案第 10-2009-0008151 號中者，但不限於此。

【0064】 本文中所用之術語“免疫球蛋白 Fc 片段”係指含有不包括免疫球蛋白之重鏈恆定區 1(CH1)及輕鏈恆定區 1(CL1)之免疫球蛋白之重鏈恆定區。Fc 片段可包括重鏈恆定區中之鉸鏈區(hinge region)。於本發明中，因爲

必須保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力，所以免疫球蛋白 Fc 片段較佳爲包含 CH2 功能區、CH3 功能區、或二者。

【0065】 又，本發明中之免疫球蛋白 Fc 區可爲除了免疫球蛋白之重鏈與輕鏈變異區之外，包含一部分或整個重鏈恆定區 1(CH1)及/或輕鏈恆定區 1(CL1)之延伸 Fc 片段，只要其即使連接至生理活性多肽及非肽基連接子時，保留對 FcRn 之固有結合親和力即可。

【0066】 由於免疫球蛋白 Fc 片段係於活體內代謝之生物可降解多肽，因此作爲藥物載體之用很安全。又，由於免疫球蛋白 Fc 片段具有低於整個免疫球蛋白分子之分子量，因此就接合物之製備、純化與產量而言頗爲有利。此外，由於抗體間之胺基酸序列差異而顯示高非同質性(non-homogeneity)之 Fab 區被移除，因此 Fc 片段具有顯著增加之同質性，且誘發血清抗原性之可能性低。

【0067】 於本發明中，免疫球蛋白 Fc 片段不僅包含天然胺基酸序列，亦包含其序列突變體。本文中所用之術語“胺基酸序列突變體”係指由於一或多個胺基酸殘基缺失、插入、非保留性(non-conservative)或保留性(conservative)置換或其組合，而與天然胺基酸序列不同之序列。舉例而言，於 IgG Fc 之情形，已知於結合中重要之位置 214 至 238、297 至 299、318 至 322 或 327 至 331 之胺基酸殘基可用作爲修飾之適當標的。

【0068】 此外，各種突變體亦可能，包括具有能形

成雙硫鍵區域之缺失、天然 Fc 的 N 終端之多種胺基酸殘基之缺失、或於天然 Fc 的 N 終端加入甲硫胺酸殘基之突變。再者，欲消除效應子(effector)功能，可移除補體結合位點，例如，C1q 結合位點，亦可移除抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)位點。製備此免疫球蛋白 Fc 片段之序列衍生物之技術係揭示於國際專利公開案第 WO 97/34631 號與第 WO 96/32478 號中。

【0069】 通常不改變分子活性之蛋白質與胜肽中之胺基酸交換爲此項技藝中已知(H. Neurath, R. L. Hill, The Proteins, Academic Press, New York, 1979)。最常出現之交換爲雙向之 Ala/Ser、Val/Ile、Asp/Glu、Thr/Ser、Ala/Gly、Ala/Thr、Ser/Asn、Ala/Val、Ser/Gly、Thy/Phe、Ala/Pro、Lys/Arg、Asp/Asn、Leu/Ile、Leu/Val、Ala/Glu、Asp/Gly。

【0070】 於若干情形下，免疫球蛋白 Fc 片段亦可藉由，例如，磷酸化、硫酸化、丙烯酸化、醣基化、甲基化、法尼基化(farnesylation)、乙醯化或醯胺化所修飾。

【0071】 上述 Fc 突變體爲與本發明 Fc 片段顯示相同生物活性，惟對熱、pH 等具有增進之結構穩定性之突變體。

【0072】 此外，該等 Fc 片段可從人類及包括牛、山羊、豬、小鼠、兔、倉鼠、大鼠與天竺鼠等動物單離之天然型獲得，或可爲從轉形之動物細胞或微生物獲得之重組型或其衍生物。於此，彼等可藉由從人類或動物生物體單離完整免疫球蛋白並以蛋白酶處理之自天然免疫球蛋白獲得。當以木瓜酶處理完整免疫球蛋白時，其裂解成爲 Fab

與 Fc。同時，以胃蛋白酶處理時，其裂解成爲 pF'c 與 $F(ab)_2$。該等片段可進行，例如，粒徑篩析層析法(size exclusion chromatography)以單離 Fc 或 pF'c。

【0073】 較佳爲，其係使用人類 Fc 片段自微生物獲得之重組免疫球蛋白 Fc 片段。

【0074】 此外，免疫球蛋白 Fc 片段可呈具天然糖鏈之形式、相較於天然形式增加之糖鏈或相較於該天然形式減少之糖鏈，或可呈去糖基化形式。免疫球蛋白 Fc 糖鏈之增加、減少或移除可使用習知方法進行，例如化學方法、酵素方法及使用微生物之遺傳工程方法進行。藉由自 Fc 移除糖鏈所獲得之免疫球蛋白 Fc 片段顯示對補體(c1q)結合親和力急劇減少，及抗體依賴性細胞介導之細胞毒性或補體依賴性細胞毒性之減少或喪失，因而不會誘發活體內不必要之免疫反應。在這方面，呈去糖基化或無糖基化形式之免疫球蛋白 Fc 片段可能更適合作爲藥物載體用。

【0075】 本文中所用之術語“去糖基化(deglycosylation)”係指從 Fc 片段酵素性移除糖基團，及術語“無糖基化(aglycosylation)”意指於原核生物(較佳爲大腸桿菌)中產生之未糖基化 Fc 片段。

【0076】 同時，免疫球蛋白 Fc 片段可源自人類或動物例如牛、山羊、豬、小鼠、兔、倉鼠、大鼠或天竺鼠；較佳地，其係源自人類。此外，免疫球蛋白 Fc 片段可爲衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE 與 IgM、其組合物、或雜合物之 Fc 片段。較佳地，其係人類血液中最豐富的蛋白質 IgG 或

IgM 所衍生，及最佳地，其係已知可提高配體-結合蛋白質半衰期之 IgG 所衍生。

【0077】 本文所用之術語“組合”係指相同來源之編碼單鏈免疫球蛋白 Fc 片段之多肽與不同來源之單鏈多肽間形成連結以成爲二聚體或多聚體。換言之，二聚體或多聚體可由選自 IgG Fc、IgA Fc、IgM Fc、IgD Fc、及 IgE Fc 片段所組成之群組之二或多個片段形成。

【0078】 本文中所用之術語“雜合物(hybrid)”係指於單鏈免疫球蛋白 Fc 片段中，存在對應於不同來源之免疫球蛋白 Fc 片段之二或多個序列。於本發明中，可能爲各種類型之雜合物。換言之，功能區雜合物可由選自 IgG Fc、IgM Fc、IgA Fc、IgE Fc 與 IgD Fc 之 CH1、CH2、CH3 及 CH4 所組成之群組之一至四個功能區構成，且可包含鉸鏈區。

【0079】 另一方面，IgG 可分爲 IgG1、IgG2、IgG3 與 IgG4 等亞型(subclasses)，其組合物或雜合物可用於本發明中；較佳爲 IgG2 與 IgG4 亞型；最佳爲罕見具有例如 CDC (補體依賴性細胞毒性)之效應子功能之 IgG4 Fc 片段。換言之，於本發明中作爲藥物載體用之最佳免疫球蛋白 Fc 片段爲人類 IgG4 衍生之未糖基化 Fc 片段。人類 Fc 片段較非人類 Fc 片段更佳，該非人類 Fc 片段於人體中可作爲抗原，且引起非所欲之免疫反應，例如產生對抗該抗原之新抗體。

【0080】 於本發明具體實例中，胰島素、干擾素、人類生長激素及 GLP-1 促效劑各者係經由非肽基連接子連

接至具結合 FcRn 能力之免疫球蛋白 Fc 片段，從而製備增加免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力且於中性 pH 可容易地自 FcRn 解離，亦可顯示與該免疫球蛋白 Fc 片段類似之解離程度(實施例及第 2 圖與第 3 圖)之接合物。此外，頃發現相較於框架內接合物，本發明接合物具較長之活體內持續作用(第 4 圖)。

【0081】 於又另一態樣中，本發明提供一種用於製備保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 的固有結合親和力之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之方法，該方法包括下述步驟：(a)將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至具有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段，以製備生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之混合物；及(b)自該混合物中分離出顯示結合比率在免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率之± 6%範圍內之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其中該結合比率係將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之量及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之量帶入方程式 1 中測得。

方程式 1

結合比率(%) = (pH 7.4 時之結合量／pH 6.0 時之結合量) × 100

【0082】 於此，生理活性多肽、免疫球蛋白 Fc 片段、非肽基連接子、接合物及結合比率之測定均如上述。

【0083】 本發明方法中之步驟(a)係將生理活性多肽經由非肽基連接子共價連接至免疫球蛋白 Fc 片段之步驟。步驟(a)可包含下述步驟：(i)連接生理活性多肽與免疫

球蛋白 Fc 片段任一者至非肽基連接子一端之反應基；及(ii)連接剩餘一者至非肽基連接子另一端之反應基。步驟(a)可於步驟(i)與(ii)之間進一步包括分離出連接至非肽基連接子一端之生理活性多肽或免疫球蛋白 Fc 片段之步驟。有關此接合物之製備，韓國專利第 10-0725315 號之揭示內容可併入本文以資參考。

【0084】 爲了將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至免疫球蛋白 Fc 片段除了 FcRn 結合區以外之部分，可使具有與其連接的非肽基連接子之生理活性多肽與免疫球蛋白 Fc 片段於 pH 4.0 至 9.0 反應。

【0085】 當藉由此程序製備接合物時，除了保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力之接合物外，可能產生例如顯示免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之結合親和力減少的接合物之副產物。基於此，於經由非肽基胜肽連接生理活性多肽至免疫球蛋白 Fc 片段之反應後，需要額外自接合物混合物中分離出保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 固有結合親和力之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段之步驟。

【0086】 因此，本發明方法包含步驟(b)：自接合物混合物中分離出顯示結合比率在免疫球蛋白 Fc 片段之該結合比率之± 6%範圍內之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，其中結合比率係將 pH 6.0 時結合至 FcRn 之量及 pH 7.4 時結合至 FcRn 之量帶入方程式 1 中測得。

【0087】 步驟(b)較佳爲用於分離於其中非肽基連接

子連接至遠離免疫球蛋白 Fc 片段之 FcRn 結合區的胺基酸殘基之接合物之步驟，該結合區例如，對應於根據 cobat 編號系統編號之 CH2 之位置 252 至 257 與 307 至 311 及 CH2 之位置 433 至 436 之區域。具體而言，步驟(b)係只用於選擇性地分離於其中非肽基連接子連接至免疫球蛋白 Fc 片段 N 終端之接合物，俾使得以保留 Fc 片段之固有結合親和力之步驟。

【0088】 步驟(b)中之分離及純化條件可視所用之非肽基連接子、生理活性多肽等之種類而不同。

【0089】 於又另一態樣中，本發明提供一種保留生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物對 FcRn 之固有結合親和力之方法，該方法包括將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段。

【0090】 於此，生理活性多肽、免疫球蛋白 Fc 片段、非肽基連接子及接合物均如上述。

【0091】 本發明具有之優點爲，由於生理活性多肽經由該非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段，因此保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力，同時，該免疫球蛋白 Fc 片段於中性 pH 時可容易地自 FcRn 解離且易於被回收，此表示該免疫球蛋白 Fc 片段之活體內半衰期可有效地增加。

【0092】 於此，固有結合親和力之保留可於活體內致效(effected)。

【0093】 於又另一態樣中，本發明提供一種包含生

理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之組成物，該組成物保留免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力。

【0094】 於此，生理活性多肽、免疫球蛋白 Fc 片段及接合物均如上述。

【0095】 下文中，將參照實施例進一步詳細敘述本發明。然而，應理解的是，該等實施例僅供說明用途而不擬對本發明範圍構成侷限。

【0096】 實施例：生理活性蛋白質與包含 FcRn 結合位點的 Fc 片段之接合物之製備

【0097】 (1)免疫球蛋白 Fc 片段之製備

根據以本發明人等之名義提出申請之韓國專利申請案第 10-2006-0077377 號 [案名“用於大量生產不含甲硫胺酸殘基之免疫球蛋白 Fc 區之方法(method for mass production of methionine residue-free immunoglobulin Fc region)”]揭示之方法製備免疫球蛋白 Fc 片段。

【0098】 (2)胰島素-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之製備

專一性地於胰島素 β 鏈 N 終端進行反應，使 3.4-kDa 丙(propion-)-ALD2 PEG (IDB，韓國)聚乙二醇化。使用陽離子交換管柱純化反應溶液。為了製備胰島素-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，使經純化之單-聚乙二醇化之胰島素與免疫球蛋白 Fc 反應。此時，於 pH 6.0 至 8.2 進行反應，俾使專一性地引導胰島素至免疫球蛋白 Fc 之 N 終端。反應完成後，首先使用陰離子交換管柱純化反應溶液，接著使用

疏水性管柱予以純化，從而獲得包含位點專一性地連接至免疫球蛋白之胰島素之胰島素接合物。

【0099】 (3)干擾素-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之製備

添加 3.4-kDa propion-ALD2 PEG(IDB，韓國)至含有溶於其中之人類干擾素 α-2b (hIFNα-2b；分子量：19 kDa)之緩衝液且使其反應。爲了獲得於其中 PEG 專一性地連接至干擾素-α 胺基末端且 PEG 與干擾素-α 以 1：1 比率互相連接之接合物，使反應混合物進行陰離子交換管柱層析法，以純化單-聚乙二醇化之 IFNα-2b。爲了引導經純化之單-聚乙二醇化之干擾素專一性地至免疫球蛋白 Fc 之 N 終端，於 pH 5.5 至 6.5 進行反應。經連接反應後，純化所產生之干擾素-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，使反應混合物通過陰離子交換管柱，以獲得干擾素-免疫球蛋白 Fc 片段接合物區分。另外使用疏水性管柱純化該接合物區分，從而獲得包含位點專一性地連接至免疫球蛋白 Fc 之干擾素之干擾素接合物。

【0100】 (4)人類生長激素-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之製備

添加 3.4-kDa propion-ALD2 PEG (IDB，韓國)至含有溶於其中之人類生長激素(hGH；分子量：22 kDa)之緩衝液且使其反應。爲了獲得於其中 PEG 專一性地連接至人類生長激素胺基末端且 PEG 與人類生長激素以 1：1 比率互相連接之接合物，使反應混合物進行陰離子交換管柱層析法，

以純化單-聚乙二醇化之人類生長激素(hGH)。爲了引導及專一性地連接經純化之單-聚乙二醇化之人類生長激素至免疫球蛋白 Fc 之 N 終端，於 pH 5.5 至 6.5 進行反應。經連接反應後，使用陰離子交換管柱純化反應混合物，從而獲得包含位點專一性地連接至免疫球蛋白 Fc 之激素生長激素之人類生長激素接合物區分。

【0101】 (5) GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之製備

使 3.4-kDa propion-ALD2 PEG (IDB，韓國)與咪唑-乙醯基-促胰島素分泌素-4 (CA 促胰島素分泌素-4，Bachem，瑞士)之離胺酸殘基進行位點專一性反應。爲了獲得於其中 PEG 與 GLP-1R 促效劑以 1：1 比率互相連接之接合物，接著使反應混合物進行陽離子交換管柱層析法以純化單-聚乙二醇化之促胰島素分泌素-4。爲了製備包含專一性地連接至免疫球蛋白 Fc N 終端之單-聚乙二醇化之促胰島素分泌素-4 之 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，於 pH 5.0 至 8.2 進行反應。經該偶合反應後，使用疏水性管柱與陰離子交換管柱進行兩步純化步驟，從而獲得包含位點專一性地連接至免疫球蛋白 Fc 之 GLP-1R 促效劑之 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物。

【0102】 比較例：包含框架內連接至免疫球蛋白片段的 GLP-1R 促效劑之接合物之製備

爲了與本發明接合物比較，藉由不使用連接子之基因重組法製備 GLP-1R 促效劑與包含約 50 kDa FcRn 位點之免

疫球蛋白 Fc 片段之融合蛋白質。使用親和性管柱，自培養物中純化包含框架內連接至免疫球蛋白 Fc 片段之 GLP-1R 促效劑之接合物(下文中亦稱爲“框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物”)。

【0103】 實驗例 1：對 FcRn 之結合親和力之評估

於藉由胞吞作用被引入細胞內之蛋白質中，於酸性 pH，具 FcRn 結合位點之蛋白質結合至 FcRn，而不結合至 FcRn 之蛋白質則藉由溶酶體降解而移除。於中性 pH，當結合至 FcRn 之蛋白質自 FcRn 解離時，即被釋放至細胞表面，其中未自 FcRn 解離之結合 FcRn 之蛋白質則遭到溶酶體降解。此機制示於第 1 圖。

因此，爲了檢驗經由非肽基連接子連接生理活性蛋白質於含有 FcRn 結合位點之免疫球蛋白 Fc 所獲得之實施例之接合物是否可保留免疫球蛋白 Fc 單獨對 FcRn 之結合親和力，或其是否可於中性 pH 容易地自 FcRn 解離且可被釋入血液中，進行下述實驗。

具體而言，爲了檢驗免疫球蛋白片段對 FcRn 之結合親和力是否即使於形成本發明接合物時亦不會變化，乃使用 SPR (表面電漿共振，BIACORE 3000)測量 FcRn 與實施例或比較例之接合物間之結合親和力。至於 FcRn，係使用 FCGRT & B2M 二聚體受體(Sino Biological Inc.)。使用胺偶合法，將 FcRn 固定於 CM5 晶片上，接著添加濃度介於 100 nM 至 12.5 nM 間之接合物以測量其間之結合親和力。然而，由於 FcRn 介導之半衰期增加之機制係取決於 pH，因

此於酸性 pH 及中性 pH 各自進行實驗。

【0104】 (1)酸性 pH 時免疫球蛋白-蛋白質接合物對 FcRn 之結合親和力之測量

由於酸性 pH 時，發生胞吞蛋白質結合至 FcRn，因此使用磷酸鹽緩衝液(pH 6.0)作爲操作緩衝液-1 俾使複製此結合。所有免疫球蛋白片段-蛋白質接合物均於操作緩衝液-1 中稀釋，以誘發結合；及接合物之解離亦使用操作緩衝液-1 進行。各個免疫球蛋白片段-蛋白質接合物均與已固定 FcRn 之晶片接觸 4 分鐘，以誘發其結合，接著進行解離程序 6 分鐘。然後，爲了測量不同濃度免疫球蛋白片段-蛋白質接合物之值，亦即，結合不同濃度免疫球蛋白片段-蛋白質接合物於晶片，使 pH 7.4 Hepes 緩衝液與結合至 FcRn 之免疫球蛋白片段-蛋白質接合物接觸約 30 秒。酸性 pH 時，各免疫球蛋白片段-蛋白質接合物對 FcRn 之結合親和力係使用 BIA 評估軟體中具漂移基線模式之 1：1 Langmuir 結合進行分析，分析結果示於第 2 圖。

【0105】 (2)中性 pH 時免疫球蛋白-蛋白質接合物對 FcRn 之結合親和力之測量

由於當 pH 從酸性 pH 變爲中性 pH 時，發生接合物結合至 FcRn 後自細胞釋出，因此使用 Hepes 緩衝液(pH 7.4)作爲操作緩衝液-2。然而，FcRn 與免疫球蛋白片段-蛋白質接合物各者間之結合係使用於操作緩衝液-1 中稀釋之含有免疫球蛋白片段-蛋白質接合物各者之試樣誘發 4 分鐘，然後使用操作緩衝液-2 誘發免疫球蛋白片段-蛋白質接合物

各者自 FcRn 之解離 1 分鐘。免疫球蛋白片段-蛋白質接合物之感應圖示於第 3 圖。免疫球蛋白片段-蛋白質接合物自 FcRn 之解離程度以根據下述方程式 2 之結合比率(%)表示。於此，選定完成 pH 6.0 試樣注射前 2 秒測量之共振單位作爲與 pH 6.0 之結合量成正比之物理量，選定於 pH 7.4 開始解離後 10 秒測量之共振單位作爲與 pH 7.4 之結合量成正比之物理量。使用選定之共振單位，根據下述方程式 2 計算結合比率：

方程式 2

結合比率(%) = (pH 7.4 時之結合量／pH 6.0 時之結合量) x 100

【0106】 本文中所用之術語“結合比率”係指免疫球蛋白片段-蛋白質接合物易於自 FcRn 解離之程度。可看出的是，隨著結合比率之值愈小，接合物於中性 pH 之解離愈佳，接合物之由 FcRn 介導之回收愈容易發生；反之，隨著結合比率之值愈大，接合物於中性 pH 之解離不足，使得接合物即使藉由結合至 FcRn 而被胞吞時，亦有可能藉由溶酶體降解被移除。

【0107】 結果，如第 2 圖與第 3 圖所示，實施例之各種免疫球蛋白片段-蛋白質接合物確實係以濃度依賴之方式結合至 FcRn。結果亦示於下表 1 中，使用方程式 2 計算接合物之解離程度示於下表 2。

【0108】 表 1：PH 6.0 時免疫球蛋白片段-蛋白質接合物對 FcRn 結合親和力之比較

測試物質	pH 6.0		
	Ka (1/Ms, $\times 10^{5}$)	Kd (1/s, $\times 10^{-3}$)	K_D (nM)
免疫球蛋白片段	4.8	10.5	22.0 ± 3.0
胰島素-免疫球蛋白片段接合物	3.1	7.1	22.6 ± 3.9
干擾素-免疫球蛋白片段接合物	3.0	9.3	30.0 ± 4.8
人類生長激素-免疫球蛋白片段接合物	1.2	3.6	26.8 ± 9.0
GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白片段接合物	3.8	9.5	24.7 ± 5.5
框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白片段接合物	3.2	5.3	17.0 ± 3.7

*ka：結合速率常數，kd：解離速率常數，K_D：親和力常數，結合比率：藉由將 pH 7.4 之結合量除以 pH 6.0 之結合量，所得商值乘以 100 獲得之值。

【0109】 表 2：免疫球蛋白片段-蛋白質接合物自 FcRn 解離程度之比較

測試物質	濃度 (nM)	pH6.0 之結合量 (RU)	pH7.4 之結合量 (RU)	結合比率 (%)	平均結合比率 (%)
免疫球蛋白片段	100	163.7	4.8	2.9	5.4 ± 2.0
	50	137.4	6.5	4.7	
	25	110.9	7.4	6.6	
	12.5	88.0	6.5	7.3	
胰島素-免疫球蛋白片段接合物	100	214.1	4.8	2.2	5.0 ± 2.2
	50	174.3	8.0	4.6	
	25	143.9	8.4	5.9	
	12.5	106.6	7.9	7.4	
干擾素-免疫球蛋白片段接合物	100	196.9	6.4	3.2	5.0 ± 1.6
	50	157.2	6.7	4.3	
	25	120.3	6.7	5.6	
	12.5	91.3	6.4	7.0	
人類生長激素-免疫球蛋白片段接合物	100	205.7	8.2	4.0	6.6 ± 2.6
	50	153.0	7.7	5.1	
	25	111.9	8.3	7.4	
	12.5	82.9	8.1	9.8	
GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白片段接合物	100	163.5	6.2	3.8	6.6 ± 2.6
	50	135.5	8.1	5.9	
	25	107.7	7.2	6.7	
	12.5	86.2	8.6	10.0	
框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白片段接合物	100	301.7	38.2	12.7	12.7 ± 0.3
	50	249.5	31.2	12.5	
	25	197.6	25.9	13.1	
	12.5	148.7	18.6	12.5	

【0110】 由上表 1 與 2 可看出，於單獨免疫球蛋白片段(其上未連接治療用蛋白質之獨立 Fc)與本發明接合物間，酸性 pH 或中性 pH 時之結合親和力並無顯著不同。換言之，頃發現於根據本發明產生之免疫球蛋白-蛋白質接合物之情形下，即使在免疫球蛋白結合至生理活性蛋白質時，免疫球蛋白片段對 FcRn 之結合親和力並無變化，尤其是，包含具不同大小的各種生理活性蛋白質之接合物顯示類似結果。然而，比較例之框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物則顯示高結合比率，因而中性 pH 時，無法適當地自 FcRn 解離，此表示相較於本發明接合物，於延長生理活性蛋白質半衰期上，具有較低之效果。

【0111】 實驗例 2：GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物間活體內藥物動力學之比較試驗

爲了比較實施例(5)之 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物與框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物間之活體內藥物動力學，使用正常 SD 大鼠分析接合物之血清濃度變化。

【0112】 具體而言，於生理鹽水中稀釋各個 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物(400 mcg/kg)及框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物(400 mcg/kg)，以 2 mL/kg 之劑量皮下投予動物。於投予測試物質 4、8、24、48、72、96、120、144、168、192、216、240、288、312 與 336 小時後，自大鼠頸動脈收集血液，自血液中分離血清。接著，藉由酵素連結免疫吸附分析法定量各個血

清試樣之藥物濃度，定量結果示於第 4 圖。

【0113】 結果，GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物與框架內 GLP-1R促效劑-免疫球蛋白Fc片段接合物之血清半衰期分別爲 40.9 小時與 28 小時，接合物之最大血清濃度分別爲 1758.6 ng/mL 與 742.7 ng/mL。換言之，當以相同劑量皮下投予正常大鼠該等藥物時，就活體內吸收與半衰期而論，其顯示相較於框架內 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，本發明之 GLP-1R 促效劑-免疫球蛋白片段接合物較優異(第 4 圖)。

【0114】 儘管已參照特定之說明性具體實例敘述本發明，然而熟習本發明所屬技藝者將理解，在不悖離本發明技術精神或本質特性下，本發明可以其他特定形式體現。因此，上文敘述之具體實例於各方面被視爲係說明性而非限制性。再者，本發明之範圍係由隨附申請專利範圍而非詳細說明所界定，應理解的是，衍生自本發明含義與範圍之所有修飾或變異及其對等物均包含於隨附專利申請之範圍內。

【符號說明】

無。

第103124093號專利申請案
108年3月29日修正替換頁

申請專利範圍

1. 一種生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物(conjugate)的群組，僅包含單體性接合物，其中該單體性接合物包含經由非肽基連接子(linker)連接至含有FcRn結合區之免疫球蛋白Fc片段之生理活性多肽之一個分子，該非肽基連接子結合至該免疫球蛋白 Fc 片段之 N 終端，

其中該接合物之結合比率(binding ratio)，係於該接合物所用相同條件下所測量該免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率之± 6%範圍內，其中該接合物之結合比率及該免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率

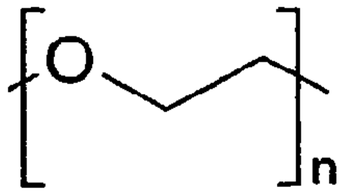
係使用下述方程式測量：

方程式 1

結合比率(%) = (pH 7.4 時對 FcRn 之結合量／pH 6.0 時對 FcRn 之結合量) × 100，

其中該非肽基連接子係下式 1 所示之聚乙二醇聚合物：

式 1



其中 n 係在 10 至 480 之範圍；以及

其中該生理活性多肽係選自類升糖素胜肽-1(GLP-1)、GLP-1 受體促效劑、紅血球生成素(EPO)、升

第103124093號專利申請案
108年3月29日修正替換頁

糖素、調酸素、胰島素、生長激素釋放激素、生長激素釋放肽、干擾素受體、G蛋白質偶聯受體、介白素、介白素受體、酵素、介白素結合蛋白質、細胞介素結合蛋白質、巨噬細胞活化因子、巨噬細胞胜肽、B細胞因子、T細胞因子、蛋白質A、過敏抑制劑、細胞壞死醣蛋白質、免疫毒素、淋巴毒素、腫瘤壞死因子、腫瘤抑制因子、轉移生長因子、α-1抗胰蛋白酶、白蛋白、α-乳白蛋白、脂蛋白元-E、高度糖基化紅血球生成素、血管生成素、血紅素、凝血酶、凝血酶受體活化肽、凝血酶調節素、血液因子 VII、VIIa、VIII、IX與 XIII、纖維蛋白溶酶原活化因子、纖維蛋白結合肽、尿激酶、鏈球菌激酶、水蛭素、蛋白質C、C-反應蛋白質、腎素抑制劑、膠原蛋白酶抑制劑、超氧化物歧化酶、瘦素、血小板衍生之生長因子、上皮生長因子、表皮生長因子、血管抑制素、血管收縮素、骨生長因子、骨刺激蛋白質、降鈣素、心房肽、軟骨誘導因子、依降鈣素、結締組織活化因子、組織因子通道抑制劑、促卵泡激素、促黃體激素、促黃體激素釋放激素、神經生長因子、副甲狀腺激素、鬆弛素、分泌素、促生長因子、類胰島素生長因子、腎上腺皮質激素、膽囊收縮素、胰多肽、胃泌素釋放肽、促腎上腺皮質素釋放因子、促甲狀腺激素、自體毒素(autotaxin)、乳鐵蛋白、肌肉生長抑制素、細胞表面抗原以及病毒衍生之疫苗抗原所組成之群組。

第103124093號專利申請案
108年3月29日修正替換頁

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該接合物係將該具有與其連接之非肽基連接子之生理活性多肽與該免疫球蛋白 Fc 片段在 pH 4.0 至 9.0 反應，從而經由該非肽基連接子連接該生理活性多肽至該免疫球蛋白 Fc 片段之除了 FcRn 結合區以外之部分而獲得。

3. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該非肽基連接子具有選自乙醛基、丙醛基、丁醛基、馬來醯亞胺基、及琥珀醯亞胺衍生物所組成之群組之反應基。

4. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該生理活性多肽係選自胰島素及 GLP-1 受體促效劑所組成之群組。

5. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該免疫球蛋白 Fc 片段包含含有 CH2 功能區、CH3 功能區、或二者之 FcRn 結合區。

6. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該免疫球蛋白 Fc 片段呈非糖基化形式。

7. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該免疫球蛋白 Fc 片段進一步包含鉸鏈區。

8. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該免疫球蛋白 Fc 片段係衍生自 IgG、IgA、IgD、IgE、IgM、其組合、及其雜合物(hybrids)所組成之群組的 Fc 片段。

9. 如申請專利範圍第 1 項所述之群組，其中該免疫球蛋白 Fc 片段為 IgG4 Fc 片段。

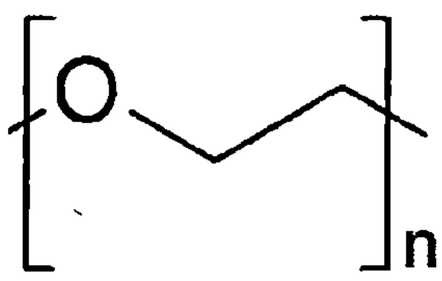
10. 一種用於製備如申請專利範圍第 1 項所述之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之群組的方法，該方法

第103124093號專利申請案
108年3月29日修正替換頁

包括下述步驟：

(a) 將生理活性多肽經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段，以製備生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之混合物，該非肽基連接子係下式 1 所示之聚乙二醇聚合物：

式 1



其中 n 係在 10 至 2400 之範圍；

(b-1) 藉由將 pH 6.0 時之結合量及 pH 7.4 時之結合量帶入下述方程式 1 中，而測量該接合物之結合比率及該免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率：

方程式 1

結合比率(%) = (pH 7.4 時之結合量／pH 6.0 時之結合量) × 100 及

(b-2) 自該混合物中分離出僅包含一個分子的經由非肽基連接子連接至含有 FcRn 結合區之免疫球蛋白 Fc 片段之生理活性多肽及顯示於該接合物所用相同條件下測量之結合比率，在該免疫球蛋白 Fc 片段之結合比率之± 6%範圍內之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物，及具有其中該非肽基連接子結合至該免疫球蛋白 Fc 片段之 N 終端之結構。

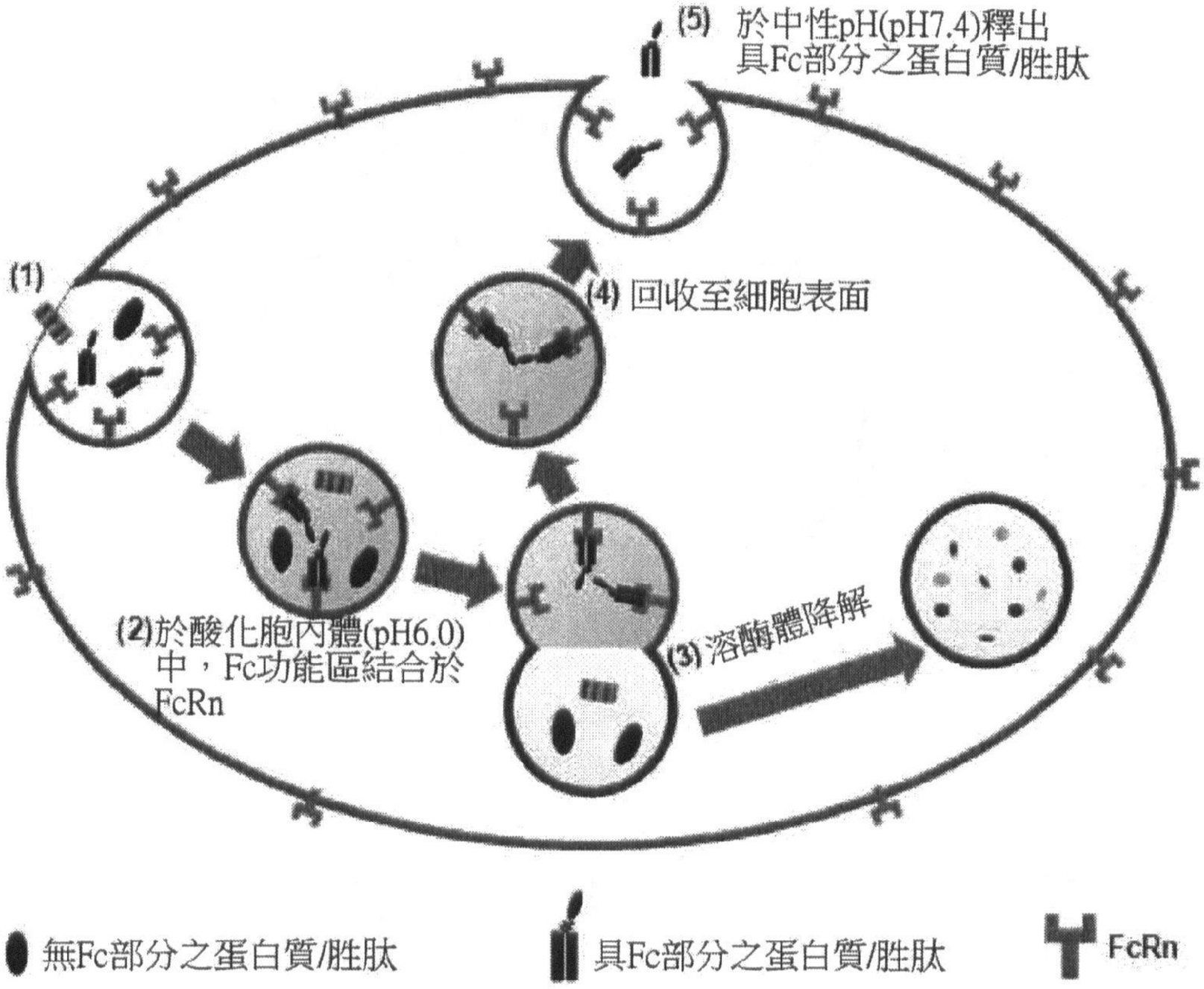
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中該生理活性

第103124093號專利申請案
108年3月29日修正替換頁

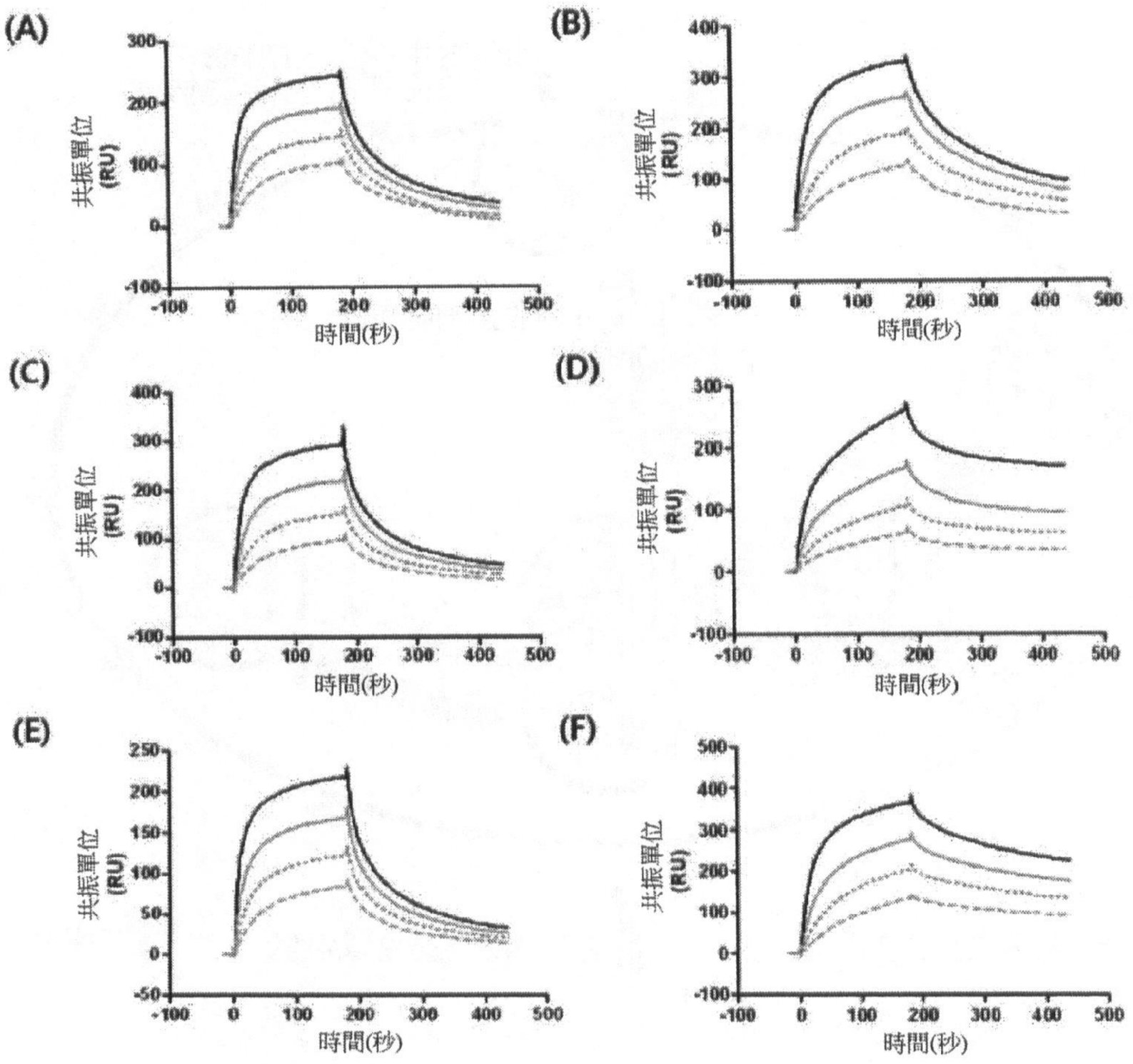
多肽係選自胰島素及GLP-1受體促效劑所組成之群組。

12. 一種組成物，其包含如申請專利範圍第 1 項所述之生理活性多肽-免疫球蛋白 Fc 片段接合物之群組，該組成物保留該免疫球蛋白 Fc 片段對 FcRn 之固有結合親和力。

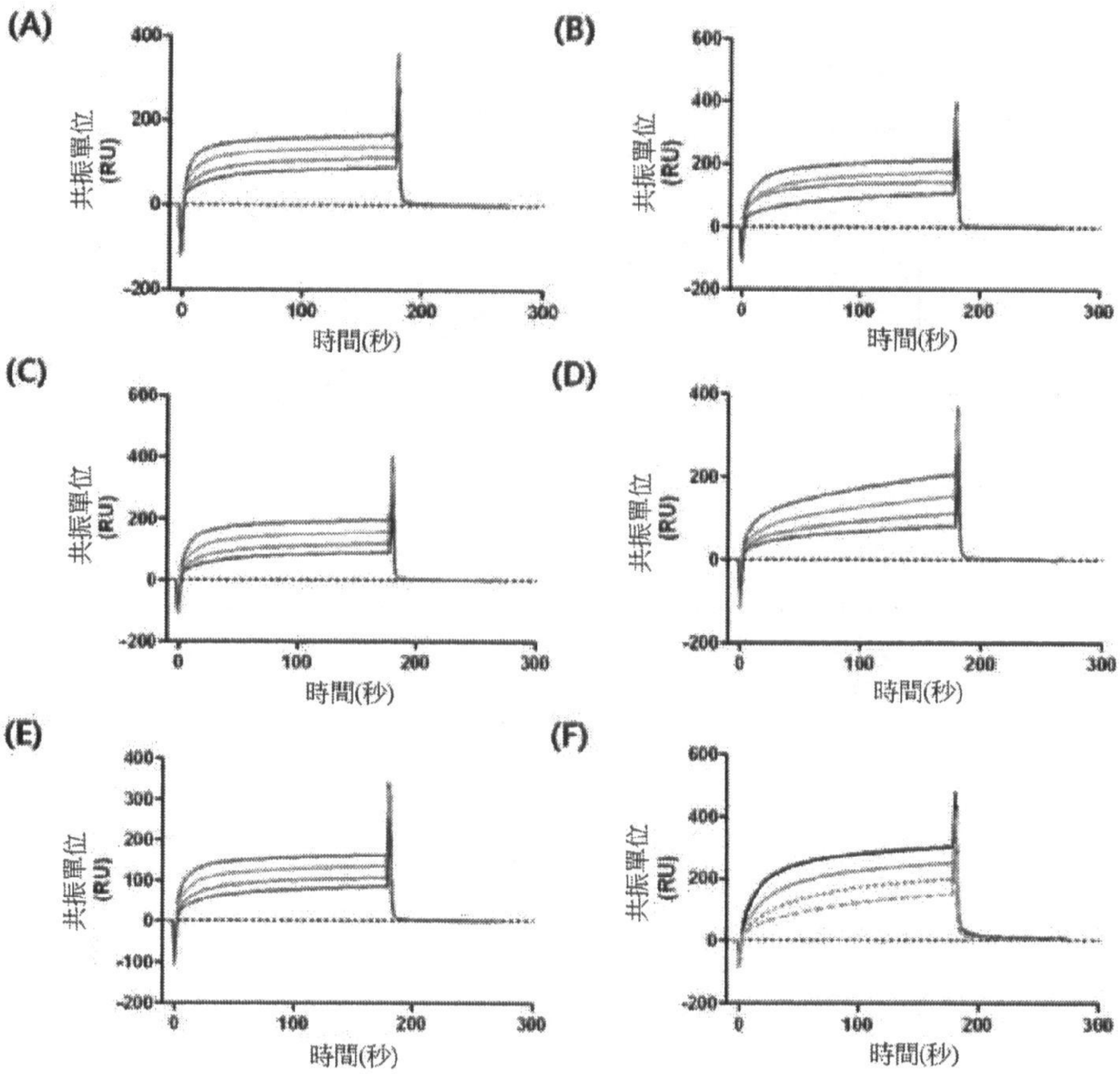
圖式


(5) 於中性pH(pH7.4)釋出
具Fc部分之蛋白質/胜肽
(1)
(4) 回收至細胞表面
(2)於酸化胞內體(pH6.0)
中，Fc功能區結合於
FcRn
(3) 溶酶體降解
無Fc部分之蛋白質/胜肽
具Fc部分之蛋白質/胜肽
FcRn

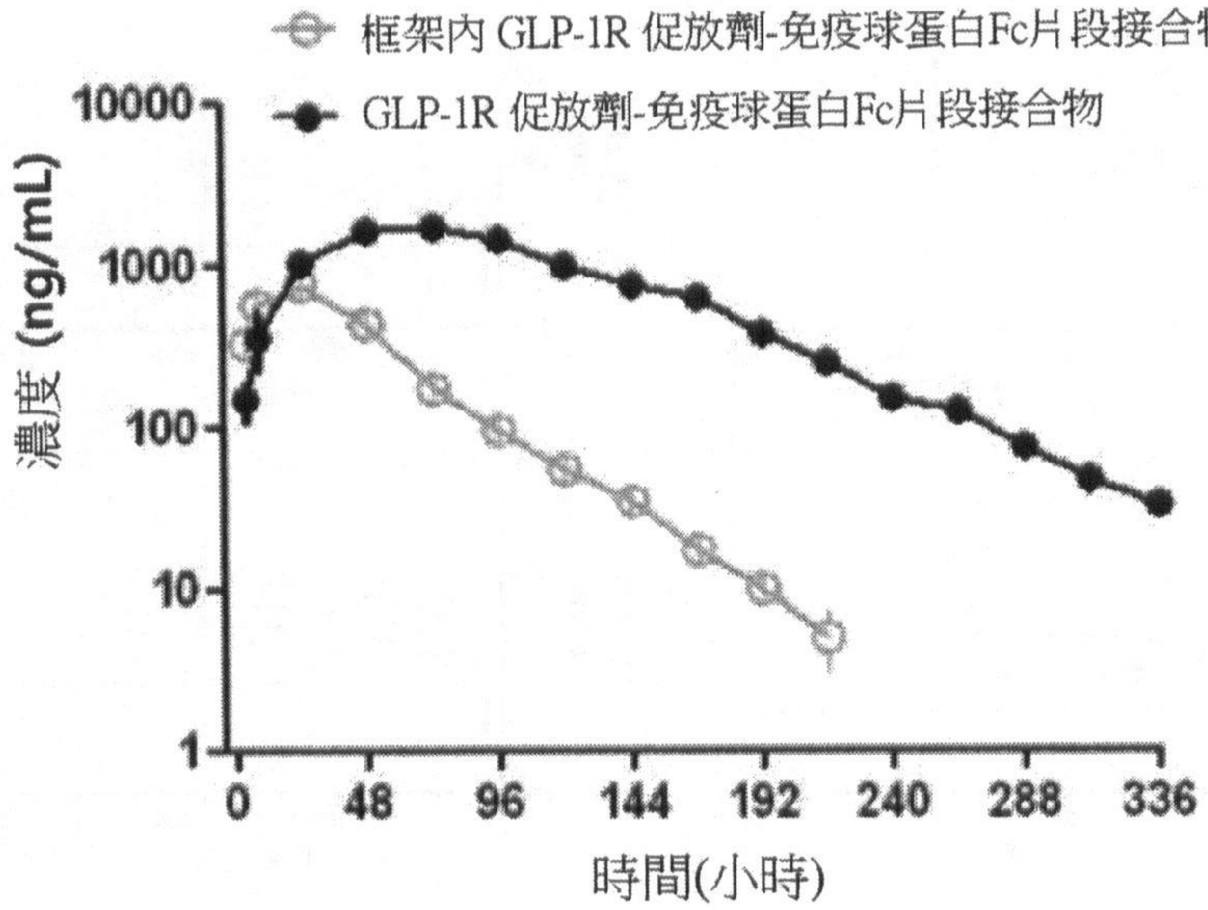
第1圖



第2圖



第3圖


框架內 GLP-1R 促放劑-免疫球蛋白Fc片段接合物
GLP-1R 促放劑-免疫球蛋白Fc片段接合物
濃度 (ng/mL)
10000
1000
100
10
1
0
48
96
144
192
240
288
336
時間(小時)

第4圖