

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034297**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.01.27

(51) Int. Cl. **C07K 19/00** (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)

(21) Номер заявки
201690114

(22) Дата подачи заявки
2014.07.14

(54) КОНЪЮГАТ Fc ИММУНОГЛОБУЛИНА, СОХРАНЯЮЩИЙ СПОСОБНОСТЬ СВЯЗЫВАНИЯ С FcRn

(31) 10-2013-0082509

(56) KR-A-1020060106486
KR-A-1020120138241
KR-A-1020090045953
KR-A-1020120041139
KR-A-1020120014936

(32) 2013.07.12

(33) KR

(43) 2016.07.29

(86) PCT/KR2014/006328

(87) WO 2015/005747 2015.01.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ХАНМИ ФАРМ. КО., ЛТД. (KR)

(72) Изобретатель:
Хванг Санг Юн, Ли Чжонг Соо, Хонг
Сунг Хее, Чхой Ин Юнг, Джун Сун
Юб, Квон Се Чанг (KR)

(74) Представитель:
Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатъев
А.В. (RU)

(57) Изобретение относится к конъюгату физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, где физиологически активный полипептид связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина посредством непептидного линкера, где конъюгат сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина; к способу получения конъюгата; к способу сохранения у конъюгата собственной аффинности связывания с FcRn и к композиции, содержащей конъюгат и сохраняющей собственную Fc-аффинность связывания фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

B1

034297

034297

B1

Область техники

Настоящее изобретение относится к физиологически активному конъюгату полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, содержащему физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, с FcRn-связывающей областью, способной поддерживать собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина, к способу получения конъюгата, к способу поддержания собственной аффинности связывания конъюгата с FcRn и к композиции, содержащей конъюгат, способный сохранять собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

Предшествующий уровень техники

Различные исследования были проведены на белковых конъюгатах или комплексах, которые содержат носитель, такой как полиэтиленгликолевый полимер, альбумин, жирная кислота или Fc антитела (константную область), связанный с белком, для того, чтобы увеличить время полувыведения белка в сыворотке. Известные на сегодняшний день исследования таких белковых конъюгатов или комплексов главным образом направлены на увеличение времени полувыведения лекарственного средства в сыворотке, чтобы сократить интервал между введением лекарственного средства, тем самым улучшая соблюдение пациентов схемы введения. Однако многие традиционные технологии имеют такие проблемы, как снижение активности терапевтического белка, например, из-за пространственных затруднений, вызванных неспецифическим связыванием терапевтического белка с белком-носителем. Кроме того, в случае конъюгатов жирных кислот, которые обратимо связываются с сывороточным альбумином, для увеличения их сывороточного времени полувыведения существует предел значительного увеличения сывороточного времени полувыведения белкового лекарственного средства, так как почечный клиренс, который является причиной наибольшей потери белкового лекарственного средства, не может быть предотвращен из-за обратимого связывания между белком и жирной кислотой.

Кроме того, были предприняты усилия, чтобы использовать фрагменты иммуноглобулина для увеличения времени полувыведения физиологически активных веществ, включающих белки. CH2-CH3 область Fc иммуноглобулина включает сайт связывания FcRn (рецептор защиты), который удлиняет время полувыведения антитела. FcRn представляет собой белок, родственный классу I MHC (главный комплекс гистосовместимости), экспрессируемый в эндотелиальных клетках сосудов, и связывается с IgG и альбумином. Характерно, что IgG и FcRn сильно связываются друг с другом при слабокислом pH и отделяются друг от друга при нейтральном pH. Таким образом, когда IgG входит в сосудистые эндотелиальные клетки из кровеносных сосудов посредством пиноцитоза или эндоцитоза и входит в лизосомы (pH 6,0), он защищен с помощью FcRn от разрушения. Когда IgG слит с клеточной мембраной при рециклинге, он отделяется от FcRn при pH 7,4 и высвобождается в кровеносные сосуды. Благодаря этой процедуре время полувыведения *in vivo* IgG1, IgG2 и IgG4, которые включают сайт связывания FcRn, составляет в среднем 3 недели, что является более продолжительным, чем время полувыведения других белков.

Таким образом, когда Fc-фрагмент иммуноглобулина связан с физиологически активным веществом, время полувыведения физиологически активного вещества может быть увеличено посредством FcRn-опосредованного рециклинга. В связи с этим существует необходимость в разработке способа, способного сохранять аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn без снижения активности физиологически активного вещества, когда физиологически активное вещество и Fc-фрагмент иммуноглобулина связаны вместе.

Описание изобретения

Техническая задача.

Авторы настоящего изобретения осуществили расширенные попытки разработать конъюгат, который может поддерживать собственную аффинность связывания самого Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn без снижения активности физиологически активного полипептида и может легко диссоциировать от FcRn при нейтральном pH. В результате авторы настоящего изобретения обнаружили, что конъюгат, содержащий физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеющим область связывания FcRn, может сохранять собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn и в то же время может легко отсоединяться от FcRn при нейтральном pH 7,4, таким образом, полностью осуществляя настоящее изобретение.

Техническое решение.

Целью настоящего изобретения является предложение конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который содержит физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn, где соотношение связывания между количеством конъюгата, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 7,4, находится в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения, определенного путем измерения величин связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn в тех же условиях, что были использованы для конъюгата.

Другой задачей настоящего изобретения является предложение конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который содержит физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим

область связывания FcRn, где соотношение связывания, определенное путем подстановки количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 7,4, в следующее уравнение 1, находится в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания, определенного путем измерения количеств Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанного с FcRn в тех же условиях, что были использованы для конъюгата.

Уравнение 1

Отношение связывания (%) = (количество, связанное при pH 7,4 / количество, связанное при pH 6,0) $\times 100$.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа получения конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn, где способ включает (а) связывание физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеющим область связывания FcRn, с получением смеси конъюгатов физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина; и (б) выделение из этой смеси конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который демонстрирует соотношение связывания в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания для Fc-фрагмента иммуноглобулина, которое определено путем подстановки количества, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества, связанного с FcRn при pH 7,4, в уравнение 1.

Еще одной задачей настоящего изобретения является предложение способа сохранения собственной аффинности связывания конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина с FcRn, где способ включает связывание физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn.

Еще одной задачей настоящего изобретения является создание композиции, содержащей конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

Положительные эффекты.

Как описано выше, конъюгат по настоящему изобретению сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn и в то же время легко отделяется от FcRn при нейтральном pH, таком как pH 7,4. Таким образом, его можно с успехом использовать для увеличения времени полувыведения физиологически активного полипептида в сыворотке.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 представлена схема, показывающая процесс рециклинга белка, связанного с FcRn.

На фиг. 2 показаны сенсограммы связывания конъюгатов иммуноглобулин-белок с FcRn при кислом pH.

На фиг. 3 показаны сенсограммы связывания конъюгатов иммуноглобулин-белок с FcRn при нейтральном pH.

На фиг. 4 показаны результаты теста по сравнению фармакокинетики конъюгата агонист GLP-1R - фрагмент иммуноглобулина *in vivo*.

Наилучший вариант осуществления изобретения

Для достижения вышеуказанных целей в одном аспекте настоящего изобретения предложен конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который содержит физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания с FcRn, где соотношение связывания количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 7,4, находится в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения, определенного путем измерения количеств Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанного с FcRn, в тех же условиях, что были использованы для конъюгата.

В одном воплощении конъюгат по настоящему изобретению демонстрирует соотношение связывания в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина, которое определено с помощью следующего уравнения:

Уравнение 1

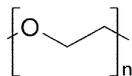
Соотношение связывания (%) = (количество, связанное при pH 7,4 / количество, связанное при pH 6,0) $\times 100$.

В другом воплощении конъюгат по настоящему изобретению может быть получен путем взаимодействия физиологически активного полипептида, имеющего непептидный линкер, связывающий его с Fc-фрагментом иммуноглобулина при pH 4,0-9,0, и, тем самым, связывания физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с частью, не включающей область связывания FcRn Fc-фрагмента иммуноглобулина.

В еще одном воплощении непептидный линкер, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может быть выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера,

хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинации.

В еще одном воплощении непептидный линкер, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может представлять собой полимер полиэтиленгликоля, представленный следующей формулой 1:



где n варьируется от 10 до 2400.

В еще одном воплощении непептидный линкер, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может иметь реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидных производных.

В еще одном воплощении физиологически активный полипептид, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может быть выбран из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), человеческого гормона роста (hGH), эритропоэтина (EPO), глюкагона, окситоцидина, инсулина, гормона высвобождения гормона роста, пептида высвобождения гормона роста, интерферонов, рецепторов интерферона, рецептора, сопряженного с белком G, интерлейкинов, рецепторов интерлейкина, ферментов, интерлейкинсвязывающих белков, цитокинсвязывающих белков, фактора активации макрофагов, пептида макрофага, В-клеточного фактора, Т-клеточного фактора, протеина А, ингибитора аллергии, гликопротеинов некроза клеток, иммунотоксина, лимфотоксина, фактора некроза опухоли, онкосупрессоров, фактора роста метастазов, альфа-1 антитрипсина, альбумина, α -лактальбумина, аполипопротеина-Е, высокогликозилированного эритропоэтина, ангиопоэтинов, гемоглобина, тромбина, пептида, активирующего рецептор тромбина, тромбомодулина, факторов крови VII, VIIa, VIII, IX и XIII, фактора активации плазминогена, фибринсвязывающего пептида, урокиназы, стрептокиназы, гирудина, протеина С, С-реактивного белка, ингибитора ренина, ингибитора коллагеназы, супероксиддисмутазы, лептина, тромбоцитарного фактора роста, эпителиального фактора роста, эпидермального фактора роста, ангиостатина, ангиотензина, фактора роста кости; белка, стимулирующего рост кости; кальцитонина, атриопептина, хрящевого индуцирующего фактора, элкатонина, фактора активации соединительной ткани, ингибитора пути тканевого фактора, фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, гормона высвобождения лютеинизирующего гормона, факторов роста нервов, паратиреоидного гормона, релаксина, секретина, соматомедина, инсулиноподобного фактора роста, гормона коры надпочечников, холецистокинина, полипептида поджелудочной железы, гастринвысвобождающего пептида, кортикотропинвысвобождающего фактора, тиреостимулирующего гормона, аутотоксина, лактоферрина, миостатина, антигенов клеточной поверхности; полученных из вируса вакцинных антигенов, моноклональных антител, поликлональных антител и фрагментов антител.

В еще одном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина, содержащий область связывания FcRn, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может содержать домен CH2, домен CH3 или оба домена.

В еще одном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может находиться в негликозилированной форме.

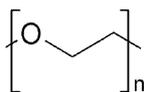
В еще одном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может содержать шарнирную область.

В еще одном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может быть выбран из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, их комбинаций и их гибридов.

В еще одном воплощении Fc-фрагмент иммуноглобулина, который включен в конъюгат по настоящему изобретению, может представлять собой Fc-фрагмент IgG4.

В другом аспекте настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, сохраняющего собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn, включающий (а) связывание физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn с физиологически активным полипептидом посредством непептидного линкера, с получением смеси конъюгатов физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина; и (б) выделение из смеси конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который демонстрирует соотношение связывания в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания для Fc-фрагмента иммуноглобулина, которое определено путем подстановки в уравнение 1 величины связывания с FcRn при pH 6,0 и величины связывания с FcRn при pH 7,4.

В одном воплощении непептидный линкер, который используют в способе получения по настоящему изобретению, может представлять собой полимер полиэтиленгликоля, представленный следующей формулой 1:



где n варьируется от 10 до 2400.

В еще одном воплощении конъюгат, выделенный на стадии (б) способа получения по настоящему изобретению, может иметь структуру, в которой непептидный линкер связан с N-концом Fc-фрагмента иммуноглобулина.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ сохранения собственной аффинности связывания конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина с FcRn, включающий связывание физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn.

В одном воплощении сохранение собственной аффинности связывания может быть осуществлено *in vivo*.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

Способ осуществления изобретения

В одном аспекте настоящего изобретения предложен конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который содержит физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn, где соотношение количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 7,4, находится в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения, определенного измерением количеств Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанных с FcRn в тех же условиях, что были использованы для конъюгата.

При использовании в данном описании изобретения выражение "величина связывания конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина" относится к отношению концентрации конъюгата белка, связанного с FcRn, относительно общей концентрации конъюгата белка, связанного или несвязанного с FcRn при интересующем pH интерес. В настоящем изобретении, так как величину связывания используют для расчета соотношения между величинами связывания при двух pH, соотношение между величинами связывания может быть рассчитано из абсолютной величины связывания, измеренной при одном pH, и также может быть определено путем измерения других физических величин, которые пропорциональны количеству связанного конъюгата и которые легко измерить. Например, соотношение между величинами связывания может быть определено посредством измерения сигналов поверхностного плазмонного резонанса (SPR) и расчета соотношения между сигналами при pH 6,0 и pH 7,4. Кроме того, также можно использовать другие способы для определения соотношения между величинами связывания.

Конкретно, в настоящем изобретении предложен конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который содержит физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания с FcRn, где соотношение связывания, определенное путем подстановки количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества конъюгата, связанного с FcRn при pH 7,4, в следующее уравнение 1 меньше чем диапазон $\pm 6\%$ от соотношения связывания, определенного путем измерением количеств Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанного с FcRn в тех же условиях, что были использованы для конъюгата

Уравнение 1

Соотношение связывания (%) = $(\text{количество, связанное при pH 7,4} / \text{количество, связанное при pH 6,0}) \times 100$

Соотношение связывания может быть получено в виде процентного значения (%) путем деления количества конъюгата (или Fc-фрагмента иммуноглобулина), связанного с FcRn при pH 7,4, на количество конъюгата (или Fc-фрагмента иммуноглобулина), связанного с FcRn при pH 6,0, и умножения результата деления на 100.

Соотношение связывания можно рассчитать, используя способ, предложенный Weirong Wang et al. (DRUG METABOLISM AND DISPOSITION 39:1469-1477, 2011), для прогнозирования времени полувыведения моноклонального антитела, но без ограничения им. В способе, описанном в указанном выше документе, моноклональное антитело, имеющее высокое соотношение связывания, демонстрировало короткое время полувыведения *in vivo*.

Способ измерения соотношения связывания может быть выполнен, в частности, с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса, но без ограничения им.

Например, способ измерения соотношения связывания может быть выполнен путем иммобилизации FcRn на биосенсорный чип (например, биосенсорный чип Biacore CM5) с использованием набора для аминного связывания или подобного, введения на FcRn-иммобилизованный биосенсорный чип ки-

слотного буфера (например, буфера с рН 6,0), содержащего вещество (например, конъюгат или Fc-фрагмент иммуноглобулина), у которого следует измерить степень связывания с FcRn, и последующего введения нейтрального буфера (например, буфера с рН 7,4) в биосенсорный чип. В этом случае соотношение связывания можно определить путем измерения резонансной единицы (RU) в равновесном состоянии до завершения введения образца в буфере с рН 6,0 в чип для определения количества, связанного при рН 6,0, измерения резонансной единицы после введения буфера с рН 7,4, для определения количества, связанного при рН 7,4, с последующим делением количества, связанного при рН 7,4, на количество, связанное при рН 6,0. Если соотношение связывания должно быть выражено в виде процентов, результат деления может быть умножен на 100.

В описанном выше способе состав буфера, имеющего рН 6,0, не ограничен конкретным образом, до тех пор, пока он может индуцировать связывание между веществом, для которого измеряют степень связывания с FcRn, и FcRn. Например, буфер, имеющий рН 6,0, может представлять собой буфер, содержащий соль, такую как фосфат. Концентрация соли в буфере может составлять 50-200 мМ, но не ограничена этими значениями. Также буфер может быть введен в FcRn-иммобилизованный биосенсорный чип при температуре примерно 25°C, но температура измерения может меняться в пределах диапазона температур, в котором рН буфер не меняется.

Кроме того, буфер, имеющий рН 6,0, может содержать вещество, для которого измеряют степень связывания с FcRn. Концентрация вещества, для которого измеряют степень связывания с FcRn, в буфере, имеющем рН 6,0, не ограничена конкретным образом, до тех пор, пока может быть измерена степень связывания с FcRn. Например, концентрация вещества, для которого измеряют степень связывания с FcRn, в буфере, имеющем рН 6,0, может составлять от 100 до 12,5 нМ.

В описанном выше способе состав буфера, имеющий рН 7,4, не имеет конкретных ограничений при условии, что он может индуцировать диссоциацию между веществом, для которого измеряют степень связывания с FcRn, и FcRn. Например, буфер, имеющий рН 7,4, может представлять собой буфер, содержащий фосфат. Концентрация соли в буфере может составлять 50-200 мМ, но не ограничена этими концентрациями. Также буфер, имеющий рН 7,4, может быть введен в FcRn-иммобилизованный биосенсорный чип при температуре 25-37°C, но без ограничения этими значениями. В конкретном воплощении соотношение между величинами связывания измеряют при температуре 25°C.

Кроме того, величина связывания между FcRn и веществом, для которого определяют степень связывания с FcRn, при рН 6,0, может представлять собой величину резонансной единицы, измеряемой за 2-60 с до завершения введения образца с рН 6,0. Связывание между FcRn и веществом, для которого определяют степень связывания с FcRn, предпочтительно находится в равновесном состоянии во время измерения.

Также величина связывания между FcRn и веществом, для которого измеряют степень связывания с FcRn, при рН 7,4 может представлять собой величину резонансной единицы, измеренную через 10-20 с после введения буфера, имеющего рН 7,4. Момент времени измерения предпочтительно находится между временной точкой, в которой значение RU быстро меняется, и до того как значение RU достигнет 0.

При сравнении соотношения связывания между Fc-фрагментом иммуноглобулина и конъюгатом по настоящему изобретению значения соотношений связывания предпочтительно представляют собой значения, определенные тем же экспериментальным способом, в тех же экспериментальных условиях, но составы и температуры буферов могут варьироваться в зависимости от типа конъюгата.

Способ поверхностного плазмонного резонанса, как описано выше, представляет собой один из способов определения соотношения связывания. В дополнение к способу поверхностного плазмонного резонанса можно использовать любой способ в настоящем изобретении при условии, что он представляет собой такой способ, как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), который может измерять количество конъюгата, связанного с FcRn. Кроме того, единица количества связывания может варьироваться в зависимости от используемого способа.

Когда соотношение связывания конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, содержащего физиологически активный полипептид, связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеющим область связывания FcRn, находится в диапазоне $\pm 6,0\%$ от соотношения связывания самого Fc-фрагмента иммуноглобулина, измеренного посредством вышеописанного способа, конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина имеет продолжительное время полувыведения *in vivo*.

В настоящем изобретении было обнаружено, что даже когда физиологически активный полипептид был ковалентно связан посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеющим область связывания FcRn, с образованием конъюгата, внутренняя аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn могла быть сохранена; это означает, что внутриклеточный рециклинг Fc-фрагмента иммуноглобулина может происходить без труда с увеличением времени полувыведения *in vivo*. В частности, когда непептидный линкер связывается с частью Fc-фрагмента иммуноглобулина, за исключением области связывания с FcRn, это не уменьшает аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn. Когда непептидный линкер представляет собой полиэтиленгликоль

($[-O-CH_2-CH_2]_n-$), n в $[-O-CH_2-CH_2]_n-$ составляет 10 или выше, в частности 10-2400, более предпочтительно 10-480 и еще более предпочтительно 50-250, но не ограничен этим значениями.

Было обнаружено, что когда n в $[-O-CH_2-CH_2]_n-$ представляет собой, в частности, 10-2400 и особенно 50-2400, полиэтиленгликоль не влияет на физиологическую активность и FcRn-связывающую активность каждого из физиологически активного полипептида и Fc-фрагмента иммуноглобулина. Настоящее изобретение основано на этом свойстве.

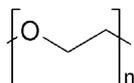
При использовании в данном описании изобретения термин "конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина" относится к конъюгату, который содержит физиологически активный полипептид, ковалентно связанный посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеющим область связывания с FcRn, и демонстрирует соотношение связывания в диапазоне $\pm 6,0\%$ от соотношения связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина, определенное путем подстановки величины связывания с FcRn при pH 6,0 и величины связывания с FcRn при pH 7,4 в уравнение 1.

Непептидный линкер в конъюгате может быть связан с аминокислотными остатками вдали от FcRn-связывающей области Fc-фрагмента иммуноглобулина, например области, соответствующей положениям 252-257 и 307-311 СН2 и положениям 433-436 СН2, пронумерованным в соответствии с системой нумерации Kabat. Непептидный линкер предпочтительно может быть связан с N-концом или C-концом Fc-фрагмента иммуноглобулина и более предпочтительно связан с N-концом, но не ограничен этим.

Когда непептидный линкер связан с N-концом или C-концом Fc-фрагмента иммуноглобулина, это существенно не уменьшает аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn, и, таким образом, собственная аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn может быть сохранена у конъюгата.

При использовании в данном описании изобретения термин "непептидный линкер" относится к биосовместимому полимеру, состоящему из двух или более повторяющихся звеньев, связанных друг с другом, в котором повторяющиеся звенья связаны друг с другом посредством любой непептидной ковалентной связи. Этот непептидный линкер может иметь два или три конца.

Непептидный линкер, используемый в настоящем изобретении, может быть выбран из группы, состоящей из биоразлагаемых полимеров, таких как полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль, сополимер этиленгликоля с пропиленгликолем, полиоксиэтилированный полиол, поливиниловый спирт, полисахарид, декстран, поливинилэтиловый эфир, биоразлагаемые полимеры, такие как полимолочная кислота (PLA) и сополимер полимолочной и гликолевой кислот (PLGA), липидные полимеры, хитины, гиалуроновая кислота и их комбинация, но не ограничен ими. Предпочтительно непептидный линкер представляет собой полиэтиленгликоль, например полимер полиэтиленгликоля, представленный следующей формулой 1, но не ограничен им



где n варьируется от 10 до 2400, предпочтительно от 10 до 480 и более предпочтительно от 50 до 250, но не ограничен этими значениями.

Между тем другие непептидные линкеры, имеющие молекулярную массу, соответствующую молекулярной массе полиэтиленгликоля формулы 1, также входят в объем настоящего изобретения.

Кроме того, их производные, известные в данной области, и производные непептидного линкера, которые могут быть легко получены на данном уровне техники, также входят в объем настоящего изобретения.

Полиэтиленгликоль, который используют в качестве непептидного линкера в настоящем изобретении, имеет то преимущество, что он не приводит к пространственным затруднениям между физиологически активным полипептидом и Fc-фрагментом иммуноглобулина, связанным с обоими его концами, так что и физиологическая активность физиологически активного полипептида, и аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn могут быть сохранены.

Пептидный линкер, который используют в слитом белке, полученном с помощью обычного способа слияния внутри рамки считывания, имеет недостаток, заключающийся в том, что белок легко расщепляется протеазой *in vivo*, и поэтому ожидаемый эффект увеличения времени полувыведения активного лекарственного средства в сыворотке с помощью носителя не может быть получен. Однако конъюгат, содержащий непептидный линкер по настоящему изобретению, в значительной степени преодолевает этот недостаток. Непептидный линкер может быть полимером, который устойчив к протеазе, для сохранения времени полувыведения в сыворотке пептида, аналогичного этому параметру у носителя. Таким образом, любой непептидный линкер может быть использован в настоящем изобретении без каких-либо ограничений при условии, что полимер имеет вышеописанную функцию, то есть полимер обладает устойчивостью к протеазе *in vivo*.

Кроме того, непептидный линкер, который связан с Fc-фрагментом иммуноглобулина по настоящему изобретению, может быть сделан не только из одного типа полимера, но также из комбинации различных типов полимеров.

Непептидный линкер, который используется в настоящем изобретении, имеет реакционноспособ-

ные группы, способные связываться с Fc-фрагментом иммуноглобулина и физиологически активным полипептидом.

Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного полимера предпочтительно выбирают из группы, состоящей из реакционноспособной альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцимидного производного. При этом сукцимидное производное может представлять собой сукцинимидилпропионат, гидроксисукцинимидил, сукцинимидилкарбоксиметил или сукцинимидилкарбонат. В частности, когда непептидный линкер имеет реакционноспособную альдегидную группу на обоих концах, физиологически активный полипептид и иммуноглобулин эффективно связываются с обоими концами непептидного линкера соответственно при минимизации неспецифических реакций. Конечный продукт, образованный посредством восстановительного алкилирования по альдегидной связи, является более стабильным, чем связанный посредством амидной связи. Альдегидная реакционноспособная группа может селективно связываться с N-концом при низком pH и может образовывать ковалентную связь с остатком лизина при высоком pH, например при pH 9,0. В данном изобретении непептидный линкер может содержать две или более альдегидных группы или иметь две или более спиртовых группы, замещенные функциональными группами, включающими альдегид.

Реакционноспособные группы на обоих концах непептидного линкера могут быть одинаковыми или разными. Например, один конец непептидного линкера может иметь малеимидную группу, и другой конец может иметь альдегидную группу, пропиональдегидную группу или алкилальдегидную группу, такую как бутилальдегид. Когда полиэтиленгликоль, имеющий гидроксильные реакционноспособные группы на обоих концах, используют в качестве непептидного линкера, гидроксигруппы могут быть активированы в различные реакционноспособные группы посредством известной химической реакции. В качестве альтернативы для получения конъюгата по настоящему изобретению может быть использован имеющийся в продаже полиэтиленгликоль, имеющий модифицированную реакционноспособную группу.

При использовании в данном описании изобретения термин "физиологически активный полипептид" в собирательном значении относится к полипептидам, обладающим любой физиологической активностью *in vivo*, которые обычно имеют полипептидную структуру и обладают различными физиологическими активностями. Физиологически активные полипептиды включают полипептиды, которые функционируют так, чтобы регулировать экспрессию генов и физиологическую функцию и корректировать аномальное состояние, вызванное отсутствием или избыточной секрецией вещества, которое вовлечено в регуляцию функций *in vivo*. Физиологически активные полипептиды также могут включать общие белковые терапевтические агенты. Кроме того, подразумевается, что термин "физиологически активный полипептид" включает не только нативные полипептиды, но также их производные.

Вид и размер физиологически активного полипептида в конъюгате по настоящему изобретению не имеет конкретных ограничений при условии, что физиологически активный полипептид может продемонстрировать увеличение времени полувыведения в сыроворотке в конъюгатной структуре по настоящему изобретению. В одном воплощении настоящего изобретения конъюгаты получали, используя различные физиологически активные полипептиды, включая инсулин, интерферон, человеческий гормон роста и агонист GLP-1 (глюкагоноподобный пептид-1), которые являются типичными примерами физиологически активных полипептидов, при этом было установлено, что собственная аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn может быть сохранена независимо от вида и размера физиологически активного полипептида.

Физиологически активный полипептид, включенный в конъюгат по настоящему изобретению, может быть выбран из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), человеческого гормона роста (hGH), эритропоэтина (EPO), глюкагона, окситоцидина, инсулина, гормона высвобождения гормона роста, пептида высвобождения гормона роста, интерферонов, рецепторов интерферона, рецептора, сопряженного с белком G, интерлейкинов, рецепторов интерлейкина, ферментов, интерлейкинсвязывающих белков, цитокинсвязывающих белков, фактора активации макрофагов, пептида макрофага, В-клеточного фактора, Т-клеточного фактора, протеина А, ингибитора аллергии, гликопротеинов некроза клеток, иммунотоксина, лимфотоксина, фактора некроза опухоли, онкосупрессоров, фактора роста метастазов, альфа-1-антитрипсина, альбумина, α -лактальбумина, аполипептида-Е, высокогликозилированного эритропоэтина, ангиопоэтинов, гемоглобина, тромбина; пептида, активирующего рецептор тромбина; тромбомодулина, факторов крови VII, VIIa, VIII, IX и XIII, фактора активации плазминогена, фибринсвязывающего пептида, урокиназы, стрептокиназы, гирудина, протеина С, С-реактивного белка, ингибитора ренина, ингибитора коллагеназы, супероксиддисмутазы, лептина, тромбоцитарного фактора роста, эпителиального фактора роста, эпидермального фактора роста, ангиостатина, ангиотензина, фактора роста кости; белка, стимулирующего рост кости; кальцитонина, атриопептина, хрящевого индуцирующего фактора, элкатонина, фактора активации соединительной ткани, ингибитора пути тканевого фактора, фолликуло-стимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, гормона высвобождения лютеинизирующего гормона, факторов роста нервов, паратиреоидного гормона, релаксина, секретина, соматомедина, инсу-

линоподобного фактора роста, гормона коры надпочечников, холецистокинина, полипептида поджелудочной железы, гастринвысвобождающего пептида, кортикотропинвысвобождающего фактора, тиреостимулирующего гормона, аутокотоксина, лактоферрина, миостатина, антигенов клеточной поверхности, полученных из вируса антигенов вакцины, моноклональных антител, поликлональных антител и фрагментов антител, но не ограничен ими. Кроме того, подразумевается, что термин "физиологически активный полипептид" при использовании в данном описании изобретения включает не только естественные физиологически активные полипептиды, но также агонисты, предшественники, производные, фрагменты или варианты каждого полипептида. В данном описании изобретения примеры производных оксинтомодулина включают все соединения, раскрытые в публикации корейской патентной заявки 10-2012-0137271, и примеры производных инсулинвысвобождающего пептида включают соединения, раскрытые в публикации корейской патентной заявки 10-2009-0008151, но не ограничены ими.

При использовании в данном описании изобретения термин "Fc-фрагмент иммуноглобулина" относится к белку, который содержит константный участок тяжелой цепи иммуноглобулина, не включающий константный участок легкой цепи 1 (CH1) и константный участок легкой цепи 1 (CL1) иммуноглобулина. Фрагмент Fc может включать шарнирную область в константном участке тяжелой цепи. В настоящем изобретении Fc-фрагмент иммуноглобулина предпочтительно содержит домен CH2, домен CH3 или оба, так как должна быть сохранена аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

Также Fc-участок иммуноглобулина в настоящем изобретении может представлять собой удлиненный Fc-фрагмент, который включает часть или целый константный участок тяжелой цепи 1 (CH1) и/или константный участок легкой цепи 1 (CL1), за исключением вариабельных областей тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина, при условии сохранения собственной аффинности связывания с FcRn, даже когда он связан с физиологически активным полипептидом и непептидным линкером.

Поскольку Fc-фрагмент иммуноглобулина представляет собой биоразлагаемый полипептид, метаболизируемый *in vivo*, он является безопасным для использования в качестве носителя лекарственного средства. Кроме того, поскольку Fc-фрагмент иммуноглобулина имеет молекулярную массу меньше, чем вся молекула иммуноглобулина, это полезно с точки зрения получения, очистки и выхода конъюгата. Кроме того, поскольку область Fab, которая демонстрирует высокую неоднородность из-за различия аминокислотной последовательности у антител, удалена, Fc-фрагмент имеет значительно повышенную гомогенность и низкий потенциал индукции антигенности сыворотки.

В настоящем изобретении Fc-фрагмент иммуноглобулина включает не только нативную аминокислотную последовательность, но также ее мутантную последовательность. При использовании в данном описании изобретения термин "мутантная аминокислотная последовательность" относится к последовательности, которая отличается от нативной аминокислотной последовательности в результате делеции, вставки, неконсервативной или консервативной замены одного или более аминокислотных остатков или их комбинации. Например, в случае Fc IgG аминокислотные остатки в положениях 214-238, 297-299, 318-322 или 327-331, которые известны как важные для связывания, могут быть использованы в качестве подходящей мишени для модификации.

Кроме того, также возможны различные мутанты, в том числе мутанты, имеющие делецию области, способной образовывать дисульфидную связь, делецию нескольких аминокислотных остатков на N-конце нативного Fc или добавление остатка метионина к N-концу нативного Fc. Кроме того, чтобы ликвидировать эффекторные функции, можно удалить сайт связывания комплемента, например можно удалить C1q-связывающий сайт, и также можно удалить сайт антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Способы получения таких производных последовательности Fc-фрагмента иммуноглобулина раскрыты в международной патентной публикации WO 97/34631 и WO 96/32478.

Аминокислотные замены в белках и пептидах, которые обычно не изменяют активности молекул, известны в данной области (H. Neurath, R.L. Hill, *The Proteins*, Academic Press, New York, 1979). Наиболее часто встречающиеся замены представляют собой 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 в обоих направлениях.

В некоторых случаях Fc-фрагмент иммуноглобулина также может быть модифицирован посредством, например, фосфорилирования, сульфатирования, акрирования, гликозилирования, метилирования, фарнезилирования, ацетилирования или амидирования.

Вышеописанные мутанты Fc представляют собой мутанты, которые показывают такую же биологическую активность, что и Fc-фрагмент по настоящему изобретению, но имеют улучшенную структурную стабильность в отношении нагрева, pH или тому подобного.

Кроме того, эти фрагменты Fc могут быть получены из нативных форм, выделенных от людей и животных, включая коров, коз, свиней, мышей, кроликов, хомяков, крыс и морских свинок, или могут представлять собой рекомбинантные формы или их производные, полученные из трансформированных животных клеток или микроорганизмов. В данном описании изобретения они могут быть получены из нативного иммуноглобулина путем выделения целого иммуноглобулина из живого организма людей или животных и обработки его протеазой. При обработке целого иммуноглобулина папаином он расщепляется на Fab и Fc. Между тем при обработке пепсином он расщепляется на pF'c и F(ab)₂. Эти фрагменты мо-

гут быть подвергнуты, например, гель-хроматографии, чтобы выделить Fc или rF'c.

Предпочтительно рекомбинантный Fc-фрагмент иммуноглобулина получен из микроорганизма с использованием человеческого Fc-фрагмента.

Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина может быть в форме, имеющей нативные сахарные цепи, увеличенные сахарные цепи по сравнению с нативной формой или уменьшенные сахарные цепи по сравнению с нативной формой, или может находиться в дегликозилированной форме. Увеличение, уменьшение или удаление сахарных цепей Fc иммуноглобулина может быть выполнено с использованием обычных способов, таких как химический способ, ферментативный способ и способ генной инженерии с использованием микроорганизма. Fc-фрагмент иммуноглобулина, полученный посредством удаления сахарных цепей из Fc, демонстрирует резкое уменьшение аффинности связывания с комплементом (c1q) и уменьшение или потерю антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности или комплементзависимой цитотоксичности и, таким образом, не индуцирует ненужные иммунные ответы *in vivo*. В связи с этим Fc-фрагмент иммуноглобулина в дегликозилированной или агликозилированной форме может быть более подходящим для применения в качестве носителя лекарственного средства.

При использовании в данном описании изобретения термин "дегликозилирование" относится к ферментативному удалению сахарных группировок из Fc-фрагмента, и термин "агликозилирование" означает негликозилированный Fc-фрагмент, продуцируемый в прокариотах, предпочтительно в *E. coli*.

При этом Fc-фрагмент иммуноглобулина может происходить из людей или животных, таких как крупный рогатый скот, козы, свиньи, мыши, кролики, хомяки, крысы или морские свинки. Предпочтительно он происходит из человека. Кроме того, Fc-фрагмент иммуноглобулина может представлять собой Fc-фрагмент, который происходит из IgG, IgA, IgD, IgE и IgM, их комбинаций или их гибридов. Предпочтительно он происходит из IgG или IgM, который является одним из наиболее распространенных белков в крови человека и наиболее предпочтительно он происходит из IgG, который известен увеличением времени полувыведения лигандсвязывающих белков.

Термин "комбинация" при использовании в данном описании изобретения относится к образованию связи между полипептидными кодируемыми одноцепочечными Fc-фрагментами иммуноглобулина такого же происхождения и одноцепочечным полипептидом другого происхождения с образованием димера или мультимера. Другими словами, димер или мультимер может быть образован двумя или более фрагментами, выбранными из группы, состоящей из фрагментов Fc IgG, Fc IgA, Fc IgM, Fc IgD и Fc IgE.

При использовании в данном описании изобретения термин "гибрид" относится к присутствию двух или более последовательностей, соответствующих иммуноглобулиновым Fc-фрагментам разного происхождения в одноцепочечном Fc-фрагменте иммуноглобулина. В настоящем изобретении возможны различные типы гибридов. Другими словами, доменные гибриды могут состоять из 1-4 доменов, выбранных из группы, состоящей из CH1, CH2, CH3 и CH4 из Fc IgG, Fc IgM, Fc IgA, Fc IgE и Fc IgD и могут включать шарнирную область.

С другой стороны, IgG может быть разделен на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и их комбинации или гибриды могут быть использованы в настоящем изобретении, предпочтительно подклассы IgG2 и IgG4 и наиболее предпочтительно Fc-фрагмент IgG4, редко обладающий эффекторными функциями, такими как CDC (комплементзависимая цитотоксичность). Другими словами, наиболее предпочтительный Fc-фрагмент иммуноглобулина для применения в качестве носителя лекарственного средства по настоящему изобретению представляет собой негликозилированный Fc-фрагмент, происходящий из человеческого IgG4. Человеческий Fc-фрагмент является более предпочтительным, чем нечеловеческий Fc-фрагмент, который может действовать в качестве антигена в организме человека и вызывать нежелательные иммунные реакции, такие как производство нового антитела против антигена.

В одном воплощении настоящего изобретения каждый из инсулина, интерферона, человеческого гормона роста и агониста GLP-1 связан посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, обладающим способностью связываться с FcRn, с получением, таким образом, конъюгатов, которые увеличивают собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn и могут легко диссоциировать от FcRn при нейтральном значении pH, а также могут показывать степень диссоциации, аналогичную степени диссоциации Fc-фрагмента иммуноглобулина (примеры и фиг. 2 и 3). Кроме того, было обнаружено, что конъюгат по настоящему изобретению имеет большую продолжительность действия *in vivo* по сравнению с конъюгатом в рамке считывания (фиг. 4).

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ получения конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn, включающий стадии (а) связывания физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, имеющим область связывания FcRn, с получением смеси конъюгатов физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина; и (б) выделение из этой смеси конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, демонстрирующего соотношение связывания в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина, определенное путем подстановки количества, связанного с FcRn при pH 6,0, и количества, связанного с FcRn при pH 7,4, в следующее уравнение 1:

Уравнение 1

Отношение связывания (%)=(количество, связанное при рН 7,4/количество, связанное при рН 6,0)×100.

В данном описании изобретения физиологически активный полипептид, Fc-фрагмент иммуноглобулина, непептидный линкер, конъюгат и определение соотношения связывания являются такими, как описано выше.

Стадия (а) в способе по настоящему изобретению представляет собой стадию ковалентного связывания физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина. Стадия (а) может включать стадии (1) связывание любого физиологически активного полипептида и Fc-фрагмента иммуноглобулина с реакционноспособной группой на одном конце непептидного линкера и (2) связывание оставшегося с реакционноспособной группой на другом конце непептидного линкера. Стадия (а) может, кроме того, включать между стадиями (1) и (2) стадию отделения физиологически активного полипептида или Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанных с одним концом непептидного линкера. В отношении получения данного конъюгата описание изобретения Корейского патента 10-0725315 может быть включено сюда посредством ссылки.

Для того чтобы связать физиологически активный полипептид посредством непептидного линкера с частью Fc-фрагмента иммуноглобулина, не включающей область связывания FcRn, физиологически активный полипептид, имеющий непептидный линкер, связанный с ним, может взаимодействовать с Fc-фрагментом иммуноглобулина при рН 4,0-9,0.

Когда конъюгат получают посредством этого способа, побочные продукты, такие как конъюгат, демонстрирующий уменьшение аффинности связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn, может образоваться в дополнение к конъюгату, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn. По этой причине после взаимодействия, которое связывает физиологически активный полипептид посредством непептидного пептида с Fc-фрагментом иммуноглобулина, дополнительно требуется процесс выделения из смеси конъюгатов физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

Таким образом, способ по настоящему изобретению включает стадию (б) выделения из смеси конъюгатов конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, демонстрирующего соотношение связывания в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина, определенное путем подстановки количества, связанного с FcRn при рН 6,0, и количества, связанного с FcRn при рН 7,4, в уравнение 1.

Стадия (б) предпочтительно представляет собой процесс выделения конъюгата, в котором непептидный линкер связан с аминокислотными остатками вдали от FcRn-связывающей области Fc-фрагмента иммуноглобулина, например области, соответствующей положениям 252-257 и 307-311 в СН2 и положениям 433-436 в СН2, пронумерованным в соответствии с системой нумерации Kabat. В частности, стадия (б) представляет собой процесс селективного выделения только конъюгата, в котором непептидный линкер соединен с N-концом Fc-фрагмента иммуноглобулина таким образом, что собственная аффинность связывания Fc-фрагмента с FcRn сохраняется.

Условия выделения и очистки на стадии (б) могут варьироваться в зависимости от природы используемого непептидного линкера, физиологически активного полипептида и т.п.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен способ сохранения собственной аффинности связывания с FcRn у конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, включающий связывание физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn.

В данном описании изобретения физиологически активный полипептид, Fc-фрагмент иммуноглобулина, непептидный линкер и конъюгат являются такими, как описано выше.

Преимуществом настоящего изобретения является то, что, поскольку физиологически активный полипептид связан посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим область связывания FcRn, собственная аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn сохраняется, в то время как Fc-фрагмент иммуноглобулина может легко диссоциировать от FcRn при нейтральном рН и может быть легко использован повторно, давая основание предположить, что *in vivo* время полувыведения Fc-фрагмента иммуноглобулина может быть эффективно увеличено.

В данном изобретении сохранение собственной аффинности связывания может быть осуществлено *in vivo*.

В еще одном аспекте настоящего изобретения предлагается композиция, содержащая конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.

При этом физиологически активный полипептид, Fc-фрагмент иммуноглобулина и конъюгат являются такими, как описано выше.

Далее настоящее изобретение будет описано более подробно со ссылкой на примеры. Следует по-

нимать, однако, что эти примеры приведены только в иллюстративных целях и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения.

Примеры

Получение конъюгатов физиологически активного протеина и Fc-фрагмента, содержащего FcRn-связывающий сайт.

(1) Получение Fc-фрагмента иммуноглобулина.

Fc-Фрагмент иммуноглобулина был получен в соответствии со способом, описанным в Корейской патентной заявке 10-2006-0077377 (озаглавленной "Способ массового производства Fc-участка иммуноглобулина, не содержащего остатков метионина"), поданной от имени авторов настоящего изобретения.

(2) Получение конъюгата инсулин-Fc-фрагмент иммуноглобулина.

Взаимодействие выполняли для осуществления пегилирования с помощью 3,4 кДа пропион-ALD2 ПЭГ (IDB, Корея) конкретно на N-конце бета-цепи инсулина. Реакционный раствор очищали, используя катионообменную колонку. Для получения конъюгата инсулин-Fc-фрагмент иммуноглобулина проводили взаимодействие между очищенным монопегилированным инсулином и Fc иммуноглобулина. В это время взаимодействие выполняли при pH 6,0-8,2 для того, чтобы направить инсулин непосредственно на N-конец Fc иммуноглобулина. После завершения реакции реакционный раствор сначала очищали, используя анионообменную колонку, и затем очищали, используя гидрофобную колонку, получая посредством этого конъюгат инсулина, содержащий инсулин, сайт-специфически связанный с иммуноглобулином.

(3) Получение конъюгата интерферон-Fc-фрагмент иммуноглобулина.

Добавляли 3,4 кДа пропион-ALD2 ПЭГ (IDB, Корея) и проводили взаимодействие с буфером, содержащим человеческий интерферон альфа-2b (hIFN α -2b; молекулярная масса: 19 кДа), растворенный в нем. Для получения конъюгата, в котором ПЭГ связан конкретно с аминоконцом интерферона-альфа, ПЭГ и интерферон-альфа связаны друг с другом в соотношении 1:1, реакционную смесь подвергали анионообменной колоночной хроматографии для очистки монопегилированного IFN α -2b. Чтобы направить очищенный монопегилированный интерферон конкретно к N-концу Fc иммуноглобулина, взаимодействие проводили при pH 5,5-6,5. После реакции связывания для очистки полученного конъюгата интерферон-Fc-фрагмент иммуноглобулина, реакционную смесь пропускали через анионообменную колонку с получением фракции конъюгата интерферон-Fc-фрагмент иммуноглобулина. Фракцию конъюгата дополнительно очищали, используя гидрофобную колонку, посредством чего получали конъюгат интерферона, содержащий интерферон, сайт-специфически связанный с Fc иммуноглобулина.

(4) Получение конъюгата человеческого гормона роста - Fc-фрагмент иммуноглобулина.

Добавляли 3,4 кДа пропион-ALD2 ПЭГ (IDB, Корея) и проводили взаимодействие с буфером, содержащим человеческий гормон роста (hGH; молекулярная масса: 22 кДа), растворенный в нем. Для получения конъюгата, в котором ПЭГ связан конкретно с концевой аминоконцепцией человеческого гормона роста, и ПЭГ и человеческий гормон роста связаны друг с другом в соотношении 1:1, реакционную смесь подвергали анионообменной колоночной хроматографии для очистки монопегилированного человеческого гормона роста (hGH). Чтобы направить и связать очищенный монопегилированный человеческий гормон роста конкретно с N-концом Fc иммуноглобулина, взаимодействие проводили при pH 5,5-6,5. После реакции связывания реакционную смесь очищали, используя анионообменную колонку, таким образом получая фракцию конъюгата человеческого гормона роста, содержащую гормон роста, сайт-специфически связанный с Fc иммуноглобулина.

(5) Получение конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина.

3,4 кДа пропион-ALD2 ПЭГ (IDB, Корея) взаимодействовал сайт-специфически с остатком лизина имидазо-ацетил-эксендина-4 (CA exendin-4, Bachem, Switzerland). Для получения конъюгата, в котором ПЭГ и агонист GLP-1R (рецептора глюкагон-подобного белка-1) связаны друг с другом в соотношении 1:1, реакционную смесь затем подвергали катионообменной колоночной хроматографии для очистки монопегилированного эксендина-4. Для получения конъюгата агонист GLP-1 R-Fc-фрагмент иммуноглобулина, содержащего монопегилированный эксендин-4, связанный конкретно с N-концом Fc иммуноглобулина, взаимодействие проводили при pH 5,0-8,2. После реакции соединения осуществляли двухстадийный процесс очистки, используя гидрофобную колонку и анионообменную колонку, посредством чего получали конъюгат агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина, содержащий агонист GLP-1R, сайт-специфически связанный с Fc иммуноглобулина.

Сравнительный пример. Получение конъюгата, содержащего агонист GLP-1 R, связанный в рамках считывания с фрагментом иммуноглобулина.

Для сравнения с конъюгатом по настоящему изобретению был получен слитый белок агониста GLP-1R с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащий примерно 50 кДа сайт FcRn, посредством метода рекомбинации генов без использования линкера. Конъюгат, содержащий агонист GLP-1R, связанный в рамках считывания с Fc-фрагментом иммуноглобулина (ниже также называемый "внутрирамочный конъюгат агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина") очищали из культуры, используя аффинную колонку.

Экспериментальный пример 1. Оценка аффинности связывания с FcRn.

Среди белков, введенных в клетки посредством эндоцитоза, белок, имеющий сайт связывания FcRn, связывается с FcRn при кислом pH, в то время как белок, который не связывается с FcRn, удаляют путем лизосомального разрушения. Когда белок, связанный с FcRn, отделяется от FcRn при нейтральном pH, он высвобождается на клеточную поверхность, в то время как FcRn-связанный белок, который не диссоциирует от FcRn, подвергается лизосомальному разрушению. Этот механизм показан на фиг. 1.

Таким образом, для того, чтобы определить, может ли сохранить конъюгат из примера, полученный посредством связывания физиологически активного белка через непептидный линкер с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим сайт связывания FcRn, аффинность связывания одного Fc иммуноглобулина с FcRn или может ли он легко диссоциировать от FcRn при нейтральном pH и может ли он высвобождаться в кровь, выполняли следующий эксперимент.

В частности, для того, чтобы определить, не меняется ли аффинность связывания фрагмента иммуноглобулина с FcRn даже при образовании конъюгата по настоящему изобретению, измеряли аффинность связывания между FcRn и конъюгатом из примера или сравнительным примером, используя SPR (поверхностный плазмонный резонанс, BIACORE 3000). В качестве FcRn использовали FCGRT & B2M димерный рецептор (Sino Biological Inc.). FcRn был иммобилизован на чип CM5 с использованием способа аминного сочетания, и затем к нему добавляли конъюгат в концентрации от 100 до 12,5 нМ для измерения аффинности связывания между ними. Однако, так как механизм FcRn-опосредованного увеличения времени полувыведения зависит от pH, эксперимент выполняли для каждого из кислого значения pH и нейтрального значения pH.

(1) Измерение аффинности связывания конъюгата иммуноглобулин-протеин с FcRn при кислом значении pH.

Поскольку связывание подвергнутого эндоцитозу белка с FcRn происходит при кислом pH, использовали фосфатный буфер (pH 6,0) в качестве подвижного буфера-1 для того, чтобы воспроизвести это связывание. Все конъюгаты фрагмент иммуноглобулина-белок разбавляли в подвижном буфере-1 для индукции связывания, и диссоциацию конъюгатов также выполняли, используя подвижный буфер-1. Каждый из конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок приводили в контакт с FcRn-иммобилизованным чипом на 4 мин для индукции их связывания и затем подвергали процессу диссоциации в течение 6 мин. Затем для того чтобы измерить значения для конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок при разных концентрациях, то есть связывание конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок при разных концентрациях с чипом, pH 7,4 Нерес буфер был приведен в контакт с конъюгатами фрагмент иммуноглобулина-белок, связанными с FcRn, в течение примерно 30 с. Аффинность связывания каждого из конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок с FcRn при кислом pH анализировали, используя 1:1 связывание Ленгмюра с дрейфующей базовой моделью с помощью программного обеспечения VIAevaluation, и результаты анализа представлены на фиг. 2.

(2) Измерение аффинности связывания конъюгата иммуноглобулин-белок с FcRn при нейтральном значении pH.

Поскольку высвобождение конъюгата из клеток после связывания с FcRn происходит при изменении pH от кислого до нейтрального, использовали Нерес буфер (pH 7,4) в качестве подвижного буфера-2. Однако связывание между FcRn и каждым из конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок индуцировали в течение 4 мин, используя образец, содержащий каждый из конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок, который был разведен в подвижном буфере-1, и затем индуцировали диссоциацию каждого из конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок от FcRn в течение 1 мин, используя подвижный буфер-2. Сенсограммы конъюгатов фрагмент иммуноглобулина-белок показаны на фиг. 3. Степень диссоциации конъюгата фрагмент иммуноглобулина-белок от FcRn выражали в виде соотношения связывания (%) в соответствии со следующим уравнением 2. В данном описании изобретения резонансная единица, измеренная за 2 с до завершения введения образца с pH 6,0, была выбрана в качестве физического количества, которое пропорционально количеству, связанному при pH 6,0, и резонансная единица, измеренная через 10 с после начала диссоциации при pH 7,4, была выбрана в качестве физического количества, которое пропорционально количеству, связанному при pH 7,4. Используя выбранные резонансные единицы, соотношение связывания рассчитывали в соответствии со следующим уравнением 2:

Уравнение 2

Соотношение связывания (%) = $\frac{\text{количество, связанное при pH 7,4}}{\text{количество, связанное при pH 6,0}} \times 100$

При использовании в данном описании изобретения термин "соотношение связывания" относится к степени легкости диссоциации конъюгата фрагмент иммуноглобулина-белок от FcRn. Можно видеть, что по мере уменьшения значения соотношения связывания диссоциация конъюгата при нейтральном pH улучшается и легко происходит FcRn-опосредованный рециклинг конъюгата, в то время как при увеличении соотношения связывания диссоциация конъюгата при нейтральном pH является недостаточной, так что конъюгат легче удаляется посредством лизосомального разрушения, даже когда он подвергается эндоцитозу путем связывания с FcRn.

В результате, как показано на фиг. 2 и 3, разные конъюгаты фрагмент иммуноглобулина-белок из

примера не связываются с FcRn зависимым от концентрации образом. Результаты также показаны в табл. 1 ниже, и степени диссоциации конъюгатов, рассчитанные с использованием уравнения 2, показаны в табл. 2 ниже.

Таблица 1
Сравнение аффинностей связывания с FcRn конъюгатов
фрагмент иммуноглобулина-белок при pH 6,0

Исследуемое вещество	pH 6,0		
	ka (1/Мс, $\times 10^5$)	kd (1/с, $\times 10^{-3}$)	K _D (нМ)
фрагмент иммуноглобулина	4,8	10,5	22,0 ± 3,0
конъюгат инсулин-фрагмент иммуноглобулина	3,1	7,1	22,6 ± 3,9
конъюгат интерферон-фрагмент иммуноглобулина	3,0	9,3	30,0 ± 4,8
конъюгат гормон роста человека - фрагмент иммуноглобулина	1,2	3,6	26,8 ± 9,0
конъюгат агонист GLP-1R -фрагмент иммуноглобулина	3,8	9,5	24,7 ± 5,5
внутрирамочный конъюгат агонист GLP-1R -фрагмент иммуноглобулина	3,2	5,3	17,0 ± 3,7

ka - константа скорости ассоциации, kd - константа скорости диссоциации, K_D - константа аффинности, соотношение связывания - значение, полученное путем деления величины связывания при pH 7,4 на величину связывания при pH 6,0 и умножения результата деления на 100.

Таблица 2
Сравнение степеней диссоциации конъюгатов
фрагмент иммуноглобулина-белок от FcRn

Исследуемое вещество	Концентрация (нМ)	Величина связывания (RU) при pH6,0	Величина связывания (RU) при pH7,4	Соотношение связывания (%)	Среднее соотношение связывания (%)
фрагмент иммуноглобулина	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	
конъюгат инсулин-фрагмент иммуноглобулина	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	
конъюгат интерферон-фрагмент иммуноглобулина	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	
конъюгат гормон роста человека-фрагмент иммуноглобулина	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	
конъюгат агонист GLP-1R -фрагмент иммуноглобулина	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	
внутрирамочный конъюгат агонист GLP-1R-фрагмент иммуноглобулина	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	

Как можно видеть из приведенных выше табл. 1 и 2, аффинность связывания при кислом pH или при нейтральном pH существенно не отличается у одного фрагмента иммуноглобулина (независимый Fc, не имеющий связанного с ним терапевтического белка) и у конъюгатов по настоящему изобретению. Другими словами, было обнаружено, что в случае конъюгатов иммуноглобулин-белок, полученных со-

гласно настоящему изобретению, аффинность связывания фрагмента иммуноглобулина с FcRn не меняется, даже когда иммуноглобулин связан с физиологически активным белком, и, в частности, конъюгаты, содержащие различные физиологически активные белки, имеющие разные размеры, демонстрируют похожие результаты. Тем не менее, внутрирамочный конъюгат агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина из сравнительного примера показал высокое соотношение связывания и, таким образом, не может подходящим образом отделяться от FcRn при нейтральном pH, что свидетельствует о том, что он оказывает незначительное влияние на увеличение времени полувыведения физиологически активного белка по сравнению с конъюгатом по настоящему изобретению.

Экспериментальный пример 2. Сравнительный анализ фармакокинетики между конъюгатами агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина *in vivo*.

Для того чтобы сравнить фармакокинетику *in vivo* конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина из примера (5) и внутрирамочного конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина, анализировали изменения в сывороточных концентрациях конъюгатов, используя нормальных SD крыс (крысы линии Спрег-Доули).

Конкретно, каждый из конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина (400 мкг/кг) и внутрирамочного конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина (400 мкг/кг) растворяли в физиологическом растворе и вводили подкожно животным в дозе 2 мл/кг. Через 4, 8, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192, 216, 240, 288, 312 и 336 ч после введения исследуемых веществ собирали кровь из яремной вены крыс, и отделяли сыворотку от крови. Затем определяли концентрацию лекарственного средства в каждом образце сыворотки с помощью ферментного иммуносорбентного анализа, результаты количественного анализа показаны на фиг. 4.

В результате время полувыведения в сыворотке конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина и внутрирамочного конъюгата агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина составляло 40,9 и 28 ч соответственно, и максимальные концентрации конъюгатов в сыворотке составляли 1758,6 и 742,7 нг/мл соответственно. Другими словами, когда лекарственные средства вводили подкожно нормальным крысам в той же дозе, было показано, что конъюгат агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению был превосходным с точки зрения абсорбции *in vivo* и времени полувыведения по сравнению с внутрирамочным конъюгатом агонист GLP-1R-Fc-фрагмент иммуноглобулина (фиг. 4).

Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на конкретные иллюстративные воплощения, специалистам в области техники, к которой относится данное изобретение, понятно, что настоящее изобретение может быть воплощено в других конкретных формах без отклонения от технической сущности или существенных характеристик настоящего изобретения. Таким образом, вышеописанные воплощения рассматриваются как иллюстративные, а не ограничивающие во всех отношениях. Кроме того, объем настоящего изобретения определяется прилагаемой формулой изобретения, а не подробным описанием изобретения, и следует понимать, что все модификации или варианты, производные от значений и объема настоящего изобретения, а также их эквиваленты включены в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, при этом физиологически активный полипептид связан с Fc-фрагментом посредством непептидного линкера, и при этом Fc-фрагмент содержит FcRn-связывающую область, где соотношение связывания между количеством конъюгата, связанного с FcRn при pH 6,0, и количеством конъюгата, связанного с FcRn при pH 7,4, находится в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения, определенного путем измерения количеств Fc-фрагмента иммуноглобулина, связанного с FcRn, в тех же самых условиях, которые были использованы для конъюгата.

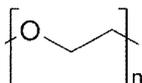
2. Конъюгат по п.1, где соотношение связывания конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина находится в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания для Fc-фрагмента иммуноглобулина, определенное при помощи следующего уравнения:

Соотношение связывания (%) = $(\text{количество, связанное при pH } 7,4 / \text{количество, связанное при pH } 6,0) \times 100$.

3. Конъюгат по п.1 или 2, полученный посредством взаимодействия физиологически активного полипептида, имеющего непептидный линкер, связывающий его с Fc-фрагментом, при pH 4,0-9,0, посредством чего физиологически активный полипептид связывается с участком, не содержащим FcRn-связывающую область.

4. Конъюгат по п.1 или 2, где непептидный линкер выбран из группы, состоящей из полиэтиленгликоля, полипропиленгликоля, сополимера этиленгликоль-пропиленгликоль, полиоксиэтилированного полиола, поливинилового спирта, полисахарида, декстрана, поливинилэтилового эфира, биоразлагаемого полимера, липидного полимера, хитина, гиалуроновой кислоты и их комбинаций.

5. Конъюгат по п.1 или 2, где непептидный линкер представляет собой полимер полиэтиленгликоля формулы I



где n имеет значение от 10 до 2400.

6. Конъюгат по п.1 или 2, где непептидный линкер имеет реакционноспособную группу, выбранную из группы, состоящей из альдегидной группы, пропиональдегидной группы, бутиральдегидной группы, малеимидной группы и сукцинимидных производных.

7. Конъюгат по п.1 или 2, где физиологически активный полипептид выбран из группы, состоящей из глюкагоноподобного пептида-1 (GLP-1), гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), человеческого гормона роста (hGH), эритропоэтина (EPO), глюкагона, окситомодулина, инсулина, гормона высвобождения гормона роста, пептида высвобождения гормона роста, интерферонов, рецепторов интерферона, рецептора, сопряженного с белком G, интерлейкинов, рецепторов интерлейкинов, ферментов, интерлейкинсвязывающих белков, цитокинсвязывающих белков, фактора активации макрофагов, пептида макрофага, В-клеточного фактора, Т-клеточного фактора, протеина А, ингибитора аллергии, гликопротеинов некроза клеток, иммуноксина, лимфотоксина, фактора некроза опухоли, онкосупрессоров, фактора роста метастазов, альфа-1 антитрипсина, альбумина, α -лактальбумина, аполипептида-Е, высокогликозилированного эритропоэтина, ангиопоэтинов, гемоглобина, тромбина, пептида, активирующего рецептор тромбина, тромбомодулина, факторов крови VII, VIIa, VIII, IX и XIII, фактора активации плазминогена, фибринсвязывающего пептида, урокиназы, стрептокиназы, гирудина, протеина С, С-реактивного белка, ингибитора ренина, ингибитора коллагеназы, супероксиддисмутазы, лептина, тромбоцитарного фактора роста, эпителиального фактора роста, эпидермального фактора роста, ангиостатина, ангиотензина, фактора роста кости; белка, стимулирующего рост кости; кальцитонина, атриопептина, хрящевого индуцирующего фактора, элкатонина, фактора активации соединительной ткани, ингибитора пути тканевого фактора, фолликулостимулирующего гормона, лютеинизирующего гормона, гормона высвобождения лютеинизирующего гормона, факторов роста нервов, паратиреоидного гормона, релаксина, секретина, соматомедина, инсулиноподобного фактора роста, гормона коры надпочечников, холецистокинина, полипептида поджелудочной железы, гастринвысвобождающего пептида, кортикотропинвысвобождающего фактора, тиреостимулирующего гормона, аутоксина, лактоферрина, миостатина, антигенов клеточной поверхности; полученных из вируса вакцинных антигенов, моноклональных антител, поликлональных антител и фрагментов антител.

8. Конъюгат по п.1 или 2, где Fc-фрагмент иммуноглобулина, содержащий FcRn-связывающую область, содержит домен CH2, домен CH3 или оба домена.

9. Конъюгат по п.1 или 2, где Fc-фрагмент иммуноглобулина находится в негликозилированной форме.

10. Конъюгат по п.1 или 2, где Fc-фрагмент иммуноглобулина дополнительно содержит шарнирную область.

11. Конъюгат по п.1 или 2, где Fc-фрагмент иммуноглобулина выбран из группы, состоящей из IgG, IgA, IgD, IgE, IgM, их комбинаций и их гибридов.

12. Конъюгат по п.1 или 2, где Fc-фрагмент иммуноглобулина представляет собой Fc-фрагмент IgG4.

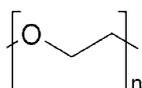
13. Способ получения конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который сохраняет собственную аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn, включающий:

(а) связывание физиологически активного полипептида посредством непептидного линкера с Fc-фрагментом иммуноглобулина, содержащим FcRn-связывающую область, с получением смеси конъюгатов физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина; и

(б) выделение из этой смеси конъюгата физиологически активный полипептид-Fc-фрагмент иммуноглобулина, который демонстрирует соотношение связывания в диапазоне $\pm 6\%$ от соотношения связывания для Fc-фрагмента иммуноглобулина, определенное путем подстановки величины связывания с FcRn при pH 6,0 и величины связывания с FcRn при pH 7,4 в следующее уравнение:

Соотношение связывания (%) = $\left(\frac{\text{количество, связанное при pH 7,4}}{\text{количество, связанное при pH 6,0}} \right) \times 100$.

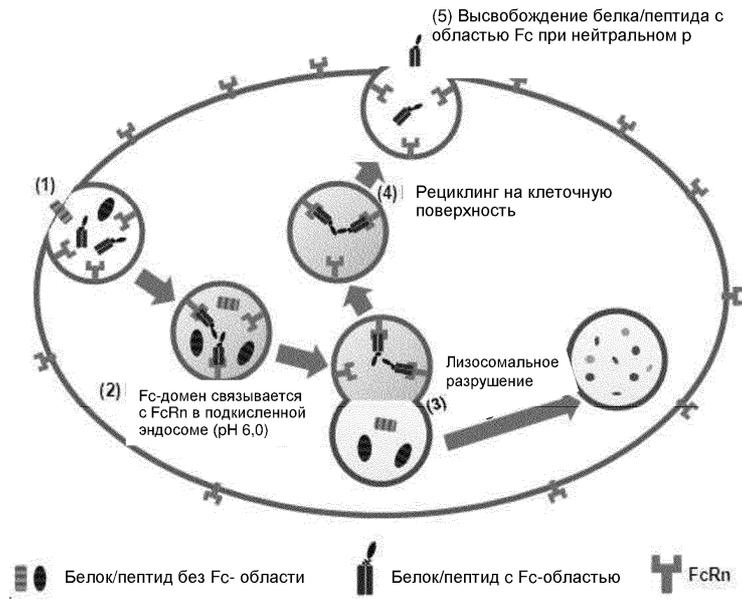
14. Способ по п.13, где непептидный линкер представляет собой полимер полиэтиленгликоля формулы 1



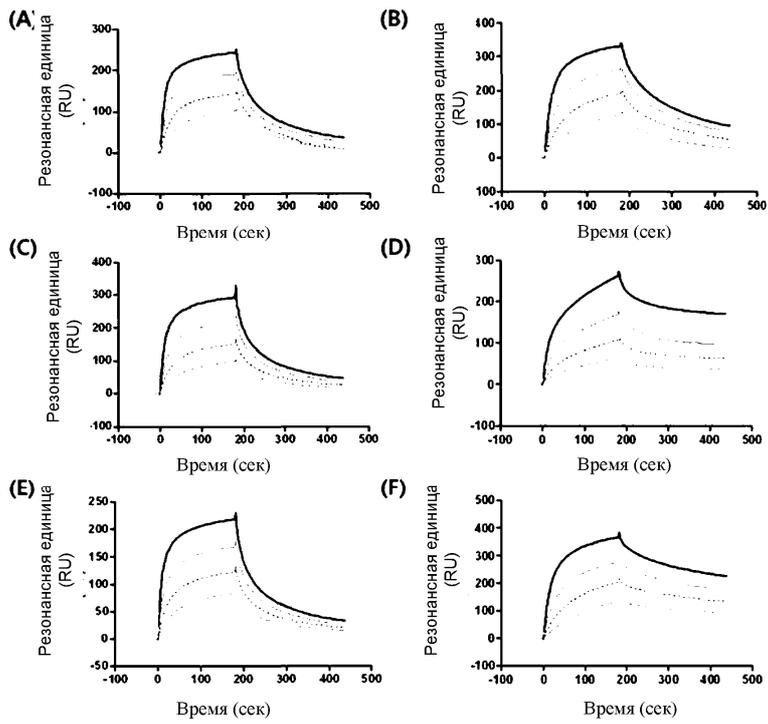
где n имеет значение от 10 до 2400.

15. Способ по п.13, где конъюгат, выделенный на стадии (б), имеет структуру, в которой непептидный линкер связан с N-концом Fc-фрагмента иммуноглобулина.

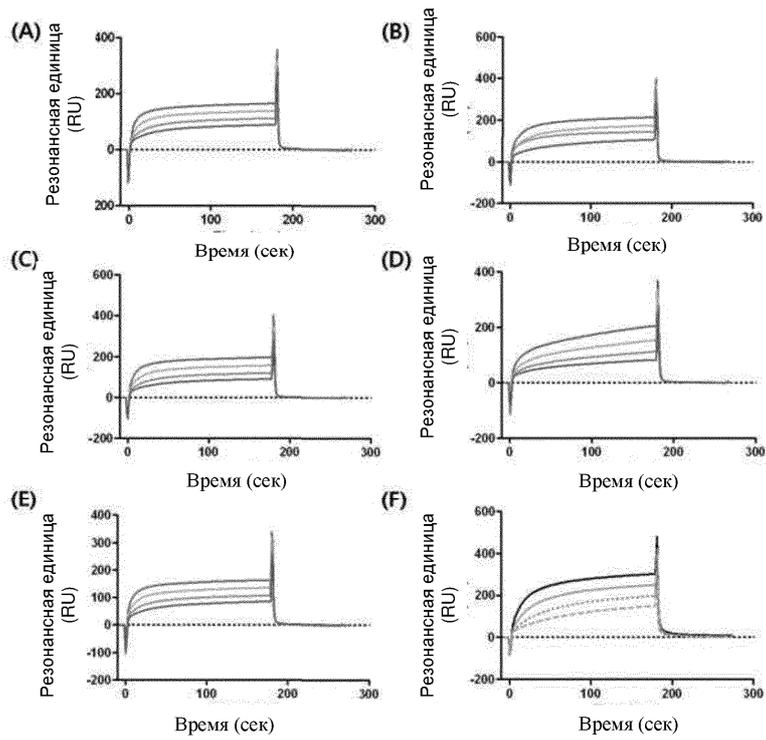
16. Композиция, содержащая конъюгат по п.1, при этом сохранена собственная аффинность связывания Fc-фрагмента иммуноглобулина с FcRn.



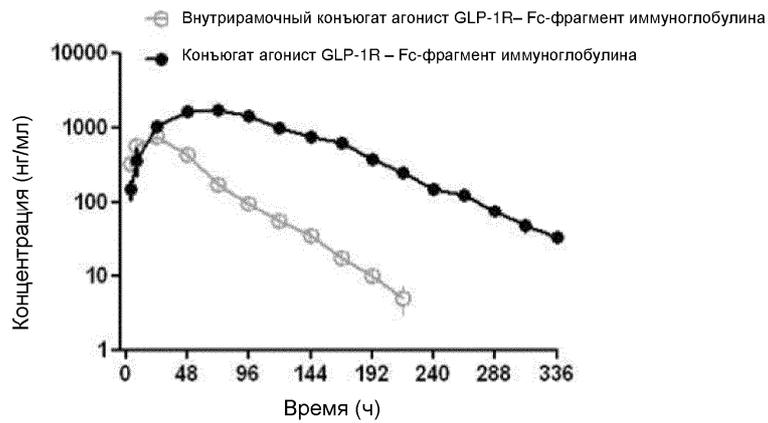
Фиг. 1



Фиг. 2



Фиг. 3



Фиг. 4

