



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2257311 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 47/48 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61P 7/04 (2006.01)
C07K 14/755 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.09.08
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.04.16
(86)	Europeisk søknadsnr	09714286.3
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.02.26
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2010.12.08
(30)	Prioritet	2008.02.27, US, 32006 2008.04.08, US, 43354 2008.06.04, US, 58869
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK TR
(73)	Innehaver	Novo Nordisk A/S, Novo Allé, 2880 Bagsværd, DK-Danmark
(72)	Oppfinner	DEFREES, Shawn, 126 Filly Drive, North Wales PA 19454, US-USA VANDAHN, Brian, Berg, Stidsen, Risbyvej 4, DK-2770 Kastrup, DK-Danmark BOLT, Gert, Bogemosen 14, 3500 Vaerlose, DK-Danmark STENNICKE, Henning, Ralf, Nordskraenten 59, 2980 Kokkedal, DK-Danmark THIM, Lars, Skiftevej 22, 2820 Gentofte, DK-Danmark STEENSTRUP, Thomas, Dock, Tinghojvej 63B, DK-2860 Soborg, DK-Danmark
(74)	Fullmektig	Onsagers AS, Postboks 1813 Vika, 0123 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Konjugerte faktor VIII-molekyler.
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A-2006/103298 WO-A-2007/126808 WO-A-2008/011633 WO-A-2008/151258 US-A1- 2006 115 876 SAENKO E L ET AL: "Strategies towards a longer acting factor VIII" HAEMOPHILIA, BLACKWELL SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 12, no. SUPPL. 3, 1 January 2006 (2006-01-01), pages 42-51, XP002434557 ISSN: 1351-8216 P. J. Lenting ET AL: "Factor VIII and von Willebrand factor - too sweet for their own good", Haemophilia, vol. 16, 22 June 2010 (2010-06-22), pages 194-199, XP055074419, ISSN: 1351-8216, DOI: 10.1111/j.1365-2516.2010.02320.x K. Julenius: "Prediction, conservation analysis, and structural characterization of mammalian mucin-type O-glycosylation sites", Glycobiology, vol. 15, no. 2, 1 September 2004 (2004-09-01), pages 153-164, XP055074420, ISSN: 0959-6658, DOI: 10.1093/glycob/cwh151

Oppfinnelsens område

Foreliggende oppfinnelse vedrører konjugerte koagulasjonsfaktor-VIII-molekyler. Nærmere bestemt vedrører foreliggende oppfinnelse konjugerte Faktor VIII-molekyler som har en modifisert, sirkulatorisk halveringstid.

5

Bakgrunn for oppfinnelsen

Hemofili-A er en arvelig blødningsforstyrrelse som forårsakes av mangel på eller mangelfull koagulasjonsfaktor-VIII (FVIII)-aktivitet. Den kliniske manifestasjonen er ikke på primær hemostase – dannelse av blodproppen foregår normalt – men
10 proppen er ustabil på grunn av en mangel på sekundær trombindannelse. Sykdommen blir behandlet med intravenøs injeksjon av koagulasjonsfaktor FVIII som enten er isolert fra blod eller fremstilt rekombinant.

Nåværende behandlingsanbefalinger beveger seg fra tradisjonell behandling ved behov til profylakse. Den sirkulatoriske halveringstiden av endogen FVIII er 12-14
15 timer og profylaktisk behandling må slik utføres flere ganger i uken for å oppnå et så å si symptomfritt liv for pasientene. IV-administrering er for mange, spesielt barn og unge mennesker, assosiert med vesentlig ubehag og/eller smerte. Det er slik et behov innen fagområdet for nye faktor-VIII-produkter med faktor-VIII-aktivitet som fortrinnsvis er homogene i struktur, fortrinnsvis sikre og som fortrinnsvis har
20 en forlenget sirkulatorisk halveringstid, for å redusere antall administreringer av faktor-VIII per uke. Det er videre et behov innen fagområdet for relativt enkle fremgangsmåter for å oppnå og produsere slike molekyler.

PEGylering av faktor-VIII for å forlenge sirkulatorisk halveringstid er kjent på fagområdet. Det har likevel vært et hinder å oppnå sikre produkter som har en
25 homogen struktur i tillegg til en vesentlig forbedret sirkulatorisk halveringstid. De tilgjengelige fremgangsmåtene for fremstilling av konjugerte faktor-VIII-molekyler er ofte arbeidskrevende og/eller har en tendens til å føre til lave utbytter og/eller produkter som ikke er homogene i struktur. Anvendelsen av kunstig fremstilte O-bundne glykosylerings seter for å oppnå terapeutiske proteiner som har forlenget
30 sirkulatorisk halveringstid for terapeutiske proteiner har blitt foreslått i WO2008011633, men likevel er ingen konjugerte faktor-VIII-molekyler tilkjennegett i denne.

Oppsummering av oppfinnelsen

35 I et første aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse et faktor-VIII-molekyl med trunkert B-domene med en modifisert sirkulatorisk halveringstid, der nevnte molekyl er kovalent konjugert med en hydrofil polymer via et O-bundet oligosakkarid i det trunkerte B-domenet, der faktor-VIII-aktivering fører til fjerning

av den kovalent konjugerte, hydrofile polymeren, der tungkjede- og lettkjedenhetene på FVIII-forløperpolypeptidet er separert med en linker, der sekvensen til linkerens er avledet fra FVIII-B-domenet, og der linkerens omfatter et gjenkjenningssete for proteasen som separerer det B-domenetrunkerte FVIII-forløperpolypeptidet til den lette og tunge kjeden.

I andre aspekter vedrører foreliggende oppfinnelse videre fremgangsmåter for å oppnå slike molekyler, slike molekyler for anvendelse i terapi og farmasøytiske sammensetninger som omfatter slike molekyler.

Det som slik blir tilveiebrakt er et konjugert faktor-VIII-molekyl med modifisert sirkulatorisk halveringstid, der den konjugerte sidegruppen (f.eks. hydrofil polymer) blir fjernet ved aktivering. Molekylet ifølge oppfinnelsen er fortrinnsvis homogent i struktur – i det minste med hensyn på posisjon for den hydrofile polymeren i det trunkerte B-domenet – og har fortrinnsvis en fordelaktig sikkerhetsprofil. Likeledes blir relativt enkle fremgangsmåter for å oppnå slike molekyler tilveiebrakt her.

Fortrinnsvis er aktiverte faktor-VIII-molekyler ifølge oppfinnelsen liknende endogent aktivert faktor-VIII.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

Definisjoner:

Faktor-VIII-molekyler: FVIII/faktor-VIII er et stort komplekst glykoprotein som primært blir produsert av hepatocytter. FVIII består av 2351 aminosyrer, inkludert signalpeptid, og inneholder flere distinkte domener, som definert ved homologi. Det finnes tre A-domener, et unikt B-domene og to C-domener. Rekkefølgen av domener kan bli beskrevet som NH₂-A1-A2-B-A3-C1-C2-COOH. FVIII sirkulerer i plasma som to kjeder som er separert ved B-A3-grensen. Kjeden er forbundet ved bivalente metallionbindinger. A1-A2-B-kjeden blir betegnet den tunge kjeden (HC) mens A3-C1-C2 blir betegnet den lette kjeden (LC).

Endogene faktor-VIII-molekyler sirkulerer *in vivo* som en mengde molekyler med B-domener med ulike størrelser. Det som sannsynligvis skjer *in vivo* er en gradvis enzymatisk fjerning av B-domenet som fører til en mengde av molekyler med B-domener av ulike størrelser. Det er generelt antatt at kløyving på posisjon 740, ved hvilken den siste delen av B-domenet blir fjernet, forekommer i sammenheng med trombinaktivering. Det kan likevel ikke utelukkes at en faktor-VIII-variant der f.eks. kløyvingssetet på posisjon 740 har blitt ødelagt, kan være aktiv.

«Faktor-VIII» eller «FVIII» blir her benyttet for å referere til et humant plasma-glykoprotein som er et medlem av den indre koaguleringsveien og er essensiell for blodkoagulering. «Nativ FVIII» er det humane fullengde-FVIII-molekylet vist ifølge SEQ ID nr. 1 (aminosyrene 1-2332). B-domenet dekker aminosyrene 741-1648 i SEQ ID nr. 1.

SEQ ID nr. 1:

ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPSFPPNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIA
 KPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREK
 EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSL
 AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG
 LIGCHRKSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTITFLTAQTLLMDLGQFLL
 FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFI
 QIRSVAKKHPPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDR SYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFM
 AYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG
 VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKES
 VDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYV
 FDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLPFSGETVFM SMEN
 PGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSR
 HPSTRQKQFNATTIPENDIEKTD PWF AHRTPMPKIQNVSSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEA
 KYETFSDDPSPGAIDSNNSLSEMTFRPQLHHSGDMVFTPE SGLQLRLNEKLGTTAATELKKL
 DFKVSSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLD TFLGKKSSPLTESGGPLSLS
 EENND SKLLESGLMNSQESSWGKNVSSSTESGRLFKGKRAHGPA LLTKDNALFKVSISLLKTN
 KTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNI LESDTEFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNH
 MSNKTTSKNMEMVQKKKEGPIPPDAQNPDMSFFKMLFLPESARWIQRT HGKNSLNSGQGP
 SPKQLVSLGPEKSVEGQNFLSEKNKVVGKGFTKDVGLKEMVFPSSRNLF LTNLDNLHENN
 THNQEKKIQEEIEKKETLIQENVVLPQIHTVTGKTNFMKNLFLSTRQNVESYDGAYAPVLQ
 DFRSLNDSTNRKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQRSK
 RALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLTR
 SHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESSHFLQGAKKN
 NLSLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVL PKPDLPKTSGKVELLPKVHIYQK
 DLFP TETSNGSPGHLDLVEGSL LGTEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLA
 WDNHYGTQIPKEEWKSQEKSPKTAFFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAK
 QQRTERLCSQNPPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQ
 KKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPPQFKKVVFQFTDGSFTQPLYRGELNE
 HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKPNETKTYFW
 KVQH HMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCITNTL NPAHGRQVTVQEFAL
 FFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRI
 RWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLI
 GEIHLHAGMSTFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQGWAPKLARLHYSGSINAWS
 TKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDOKKWQTYRGNSTGTLMVFF
 QNVDS SGIKHNIENPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITA
 SSYFTNM FATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTOGVKSL
 TSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFPQGNQDSFTPVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWV
 HQIALRMEVLGCEAQDLY

- Faktor-VIII-molekylene ifølge foreliggende oppfinnelse er faktor-FVIII-molekyler
 med trunkert B-domene der de gjenværende domenene tilsvarende sekvensene som er
 5 lagt frem ved aminosyrene 1-740 og 1649-2332 ifølge SEQ ID nr. 1. Det følger at
 molekylene ifølge oppfinnelsen er rekombinante molekyler som er produsert i
 transformerte vertsceller, fortrinnsvis av pattedyropphav. De gjenværende
 domenene (dvs., de tre A-domenene og de to C-domenene) kan likevel være noe
 forskjellig, f.eks. omtrent 1 %, 2 %, 3 %, 4 % eller 5 % fra aminosyresekvensen
 10 ifølge SEQ ID nr. 1 (aminosyrene 1-740 og 1649-2332). Spesifikt er det plausibelt
 at aminosyremodifiseringene (substitusjoner, delesjoner osv.) er introdusert i de
 gjenværende domene, f.eks. for å modifisere bindingskapasiteten til FVIII med
 ulike andre komponenter slik som f.eks. vW-faktor, LPR, ulike reseptorer, andre
 koaguleringsfaktorer, celleoverflater osv. Videre er det plausibelt at faktor-VIII-

molekylene ifølge oppfinnelsen omfatter andre post-translasjonelle modifiseringer i f.eks. det trunkerte B-domenet og/eller i ett eller flere av de andre domenene i molekylet. Disse andre post-translasjonelle modifiseringene kan foreligge i form av ulike molekyler konjugert til faktor-VIII-molekylet ifølge oppfinnelsen slik som

5 f.eks. polymere forbindelser, peptidforbindelser, fettsyreavledede forbindelser osv.

Faktor-VIII-molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse, uavhengig av om de er modifisert på utsiden av B-domenet eller ikke, har andre post-translasjonelle modifiseringer eller ikke, har alle faktor-VIII-aktivitet, noe som betyr evnen til å virke i koagulasjonskaskaden på en måte som er funksjonelt likende eller ekvivalent med FVIII, indusere dannelsen av FXa via interaksjon med FIX på en aktivert blodplate, og understøtter dannelsen av en blodpropp. Aktiviteten kan bli undersøkt *in vitro* ved hjelp av teknikker som er velkjente på fagområdet slik som f.eks. blodproppanalyse, endogen trombinpotensial-analyse, osv. Faktor-VIII-molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse har FVIII-aktivitet som er minst omtrent 10 %,

10 minst 20 %, minst 30 %, minst 40 %, minst 50 %, minst 60 %, minst 70 %, minst 80 %, minst 90 % og 100 % eller til og med mer enn 100 % av aktiviteten til nativ, human FVIII.

B-domene: B-domenet i faktor-VIII dekker aminosyrene 741-1648 ifølge SEQ ID nr. 1. B-domenet blir kløyd på flere ulike steder, og genererer stor heterogenitet i sirkulerende FVIII-molekyler i plasma. Den eksakte funksjonen til det tungt glykosylerte B-domenet er ukjent. Det som er kjent er at domenet er unnværlig for FVIII-aktiviteten i koagulasjonskaskaden. Denne øyensynlige mangelen på funksjon er understøttet ved det faktum at FVIII med fjernet/trunkert B-domene ser ut til å ha *in vivo*-egenskaper identiske med de som observeres for nativt fullengde-FVIII.

20 Med det sagt er det indikasjoner på at B-domenet kan redusere assosieringen med cellemembranen, i det minste ved serumfrie betingelser.

Faktor-VIII-molekyl med trunkert/fjernet B-domene: Endogent fullengde-FVIII blir syntetisert som et enkeltkjedet forløperprotein. Før utskilling blir forløperen kløyd i den tunge og lette kjeden. Rekombinant FVIII med fjernet B-domene kan bli

30 fremstilt ved to ulike strategier. Enten blir den tunge kjeden uten B-domenet og den lette kjeden syntetisert individuelt som to ulike polypeptidkjeder (to-kjedestrategi) eller FVIII med fjernet B-domene blir syntetisert som en enkelt forløper-polypeptidkjede (enkeltkjedestrategi) som blir kløyd i den tunge og lette kjeden på samme måte som fullengde-FVIII-forløperen.

35 I et FVIII-forløperpolypeptid med fjernet B-domene er normalt tung- og lettkjede-enhetene separert med en linker. For å minimere risikoen for å introdusere immunogene epitoper i FVIII med fjernet B-domene så er sekvensen til linkeren fortrinnsvis avledet fra FVIII-B-domenet. Linkeren må omfatte et gjenkjenningssete for proteasen som separerer det B-domenefjernede FVIII-forløperpolypeptidet i den

40 tunge og lette kjeden. I B-domenet til fullengde-FVIII utgjør aminosyrene 1644-

1648 dette gjenkjenningssetet. Trombinsetet som fører til fjerning av linkeren ved aktivering av den B-domene fjernede FVIII er lokalisert på tungkjeden. Slik er det usannsynlig at størrelsen og aminosyresekvensen til linkeren påvirker dens fjerning fra det gjenværende FVIII-molekylet ved trombinaktivering. Delesjon av B-domenet er en fordel ved produksjon av FVIII. Likevel kan deler av B-domenet bli inkludert i linkeren uten å redusere produktiviteten. Den negative effekten av B-domenet på produktivitet har ikke blitt tilskrevet noen spesiell størrelse eller sekvens for B-domenet.

Det trunkerte B-domenet kan inneholde flere O-glykosyleringsseter. Fortrinnsvis omfatter molekylet kun ett, alternativt to, tre eller fire O-bundne oligosakkarider i det trunkerte B-domenet.

Det trunkerte B-domenet omfatter kun ett potensielt O-glykosyleringssete og den hydrofile polymeren er kovalent konjugert til dette O-glykosyleringssetet.

De O-bundne oligosakkaridene i de B-domenetrunkerte molekylerne ifølge oppfinnelsen kan være festet til O-glykosyleringsseter som enten er kunstig dannet på rekombinant måte og/eller ved eksponering av «skjulte» O-glykosyleringsseter ved trunkering av B-domenet. I begge tilfeller kan slike molekyler bli fremstilt ved å designe en B-domenetrunkert Faktor-VIII-aminosyresekvens og deretter utsette aminosyresekvensen for en *in silico*-analyse for å predikere sannsynligheten for O-glykosyleringsseter i det trunkerte B-domenet. Molekyler med en relativt høy sannsynlighet for å ha glykosyleringsseter kan bli syntetisert i en passende vertscelle etterfulgt av analyse av glykosyleringsmønstret og påfølgende utvelgelse av molekyler som har O-bundet glykosylering i det trunkerte B-domenet. Passende vertsceller for produksjon av rekombinant faktor-VIII-protein er fortrinnsvis av pattedyropphav for å sikre at molekylet blir glykosylert. I utøvelsen av foreliggende oppfinnelse er cellene pattedyrceller, mer foretrukket en etablert pattedyrcellelinje, inkludert men ikke begrenset til CHO- (f.eks. ATCC CCL 61), COS-1- (f.eks. ATCC CRL 1650), babyhamsternyre- (BHK) og HEK293- (f.eks. ATCC CRL 1573, Graham et al., J.Gen.Virol., 36:59-72, 1977)-cellelinjer. En foretrukket BHK-cellelinje er tk-ts13-BHK-cellelinjen (Waechter og Baserga, Proc.Natl.Acad.Sci., USA 79:1106-1110, 1982), heretter referert til som BHK 570-celler. BHK 570-cellelinjen er tilgjengelig fra the American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Dr., Rockville, MD 20852, under ATCC-aksesjonsnummer CRL 10314. En tk-ts13-BHK-cellelinje er også tilgjengelig fra ATCC under aksjonsnummer CRL1632. En foretrukket CHO-cellelinje er CHO-K1-cellelinjen som er tilgjengelig fra ATCC under aksjonsnummeret CC161 i tillegg til cellelinjene CHO-DXB11 og CHO-DG44.

Andre passende cellelinjer inkluderer uten begrensning Rat Hep I- (rottehepatom, ATCC CRL 1600), Rat Hep II- (rottehepatom, ATCC CRL 1548), TCMK- (ATCC CCL 139), humane lunge- (ATCC HB 8065), NCTC 1469- (ATCC CCL 9.1),

DUKX-celler (CHO-cellelinje) (Urlaub og Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci., USA 77:4216-4220, 1980) (DUKX-celler som også blir referert til som DXB11-celler), og DG44- (CHO-cellelinje) (Cell, 33:405, 1983 og Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555, 1986). Også nyttig er 3T3-celler, Namalwa-celler, myelomer og myelomer og fusjoner av myelomer med andre celler. I noen utførelsesformer kan cellene være mutante eller rekombinante celler, slik som f.eks. celler som uttrykker et kvalitativt eller kvantitativt ulikt spektrum av enzymer som katalyserer post-translasjonell modifisering av proteiner (f.eks. glykosyleringsenzymer slik som glykosyltransferaser og/eller glykosidaser, eller prosesseringsenzymer slik som propeptider) enn celletypen de ble utledet fra. DUKX-celler (CHO-cellelinje) er spesielt foretrukket.

Per i dag foretrukne celler er HEK293, COS, kinesisk hamsterovarie (CHO)-celler, babyhamsternyre (BHK)- og myelomceller. Spesielt kinesiske hamsterovarie (CHO)-celler.

Lengden på B-domenet i wt-FVIII-molekylet er omtrent 907 aminosyrer. Lengden på det trunkerte B-domenet i molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse kan variere fra omtrent 10 aminosyrer til omtrent 700 aminosyrer, slik som omtrent 12-500 aminosyrer, 12-400 aminosyrer, 12-300 aminosyrer, 12-300 aminosyrer, 15-100 aminosyrer, 15-75 aminosyrer, 15-50 aminosyrer, 15-45 aminosyrer, 20-45 aminosyrer, 20-40 aminosyrer eller 20-30 aminosyrer. Det trunkerte B-domenet kan omfatte fragmenter av den tunge kjeden og/eller den lette kjeden og/eller en kunstig introdusert sekvens som ikke finnes i wt-FVIII-molekylet. Uttrykkene «B-domenetrunkert» og «med fjernet B-domene» kan bli benyttet om hverandre.

Modifisert sirkulatorisk halveringstid: Molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse har en modifisert sirkulatorisk halveringstid sammenlignet med villtype-faktor-VIII-molekylet, fortrinnsvis en økt sirkulatorisk halveringstid. Sirkulatorisk halveringstid er fortrinnsvis økt med minst 10 %, fortrinnsvis minst 15 %, fortrinnsvis minst 20 %, fortrinnsvis minst 25 %, fortrinnsvis minst 30 %, fortrinnsvis minst 35 %, fortrinnsvis minst 40 %, fortrinnsvis minst 45 %, fortrinnsvis minst 50 %, fortrinnsvis minst 55 %, fortrinnsvis minst 60 %, fortrinnsvis minst 65 %, fortrinnsvis minst 70 %, fortrinnsvis minst 75 %, fortrinnsvis minst 80 %, fortrinnsvis minst 85 %, fortrinnsvis minst 90 %, fortrinnsvis minst 95 %, fortrinnsvis minst 100 %, mer foretrukket minst 125 %, mer foretrukket minst 150 %, mer foretrukket minst 175 %, mer foretrukket minst 200 % og mest foretrukket minst 250 % eller 300 %. Enda mer foretrukket har slike molekyler en sirkulatorisk halveringstid som er økt med minst 400 %, 500 %, 600 % eller til og med 700 % relativt i forhold til den sirkulatoriske halveringstiden til villtype-FVIII.

Hydrofil polymer: Den modifiserende gruppe/hydrofile polymeren ifølge foreliggende oppfinnelse er fortrinnsvis ikke-naturlig forekommende. I ett eksempel den «ikke-naturlig forekommende modifiserende gruppen» en polymer

modifiserende gruppe, der minst én polymerenhet er ikke-naturlig forekommende. I et annet eksempel er den ikke-naturlig forekommende gruppen et modifisert karbohydrat. Stedet for funksjonalisering med den modifiserende gruppen er valgt slik at det ikke forhindrer det «modifiserte sukkeret» fra å bli addert enzymatisk på et polypeptid. «Modifisert sukker» refererer også til enhver glykosylhermende enhet som er funksjonalisert med en modifiserende gruppe og som er et substrat for et naturlig eller modifisert enzym, slik som en glykotransferase.

Den polymere modifiserende gruppen addert på et polypeptid kan endre en egenskap for et slikt polypeptid, f.eks. dets biologiske tilgjengelighet, biologiske aktivitet eller dets halveringstid i kroppen. Eksempler på polymerer ifølge oppfinnelsen inkluderer vannløselige polymerer som kan være lineære eller forgrenede og kan inkludere én eller flere uavhengig utvalgte polymerenheter, slik som poly(alkylenglykol) og derivater derav. Den polymere modifiserende gruppen ifølge oppfinnelsen kan inkludere en vannløselig polymer, f.eks. poly(etylenglykol) og derivater derav (PEG, m-PEG), poly(propylenglykol) og derivater derav (PPG, m-PPG).

Uttrykket «vannløselig» refererer til enheter som har en påvisbar grad av løselighet i vann. Fremgangsmåter for å påvise og/eller kvantifisere vannløselighet er velkjente på fagområdet. Eksempler på vannløselige polymerer ifølge oppfinnelsen inkluderer peptider, sakkarider, poly(etere), poly(aminer), poly(karboksylysyrer). Peptider kan ha blandede sekvenser og være sammensatt av en enkelt aminosyre, f.eks. poly(lysin). Et eksempel på polysakkarid er poly(sialinsyre). Et eksempel på poly(eter) er poly(etylenglykol), f.eks. m-PEG. Poly(etylenimin) er et eksempel på polyamin, og poly(akryl)-syre er en representativt poly(karboksylsyre).

Polymergrunnstrukturen til den vannløselige polymeren ifølge oppfinnelsen kan være poly(etylenglykol) (dvs., PEG). Uttrykket PEG i sammenheng med foreliggende oppfinnelse inkluderer poly(etylenglykol) i enhver av sine former, inkludert alkoksy-PEG, difunksjonell PEG, flerarmet PEG, forgrenet PEG, delt PEG, forgrenet PEG, vedhengende PEG (dvs., PEG eller relaterte polymerer som har én eller flere funksjonelle grupper hengende på polymergrunnstrukturen), eller PEG med nedbrytbare koblinger deri.

Polymergrunnstrukturen kan være lineær eller forgrenet. Forgrenede polymergrunnstrukturer er generelt kjent på fagområdet. Typisk har en forgrenet polymer en sentral forgreningskjerne-enhet og et flertall av lineære polymerkjeder koblet til den sentrale forgreningskjernen. PEG blir ofte benyttet i forgrenede former som kan bli fremstilt ved addisjon av etylenoksid på ulike polyoler, slik som glyserol, pentaerytritol og sorbitol. Den sentrale forgreningsenheten kan også være utledet fra flere aminosyrer, slik som lysin eller cystein. I ett eksempel kan den forgrenede poly(etylenglykol) bli representert i generell form som $R(-PEH-OH)_m$ der R representerer kjerne-enheten, slik som glyserol eller pentaerytritol, og m

representerer antallet armer. Flerarmede PEG-molekyler, slik som de som er beskrevet i US 5,932,462, som i sin helhet er inntatt her ved referanse, kan også bli benyttet som polymergrunnstrukturen.

- Figur 8 viser en representativ forgrenet PEG-polymer for anvendelse i utførelsesformer av oppfinnelsen, som her refereres til som «SA-glyserol-PEG». Figur 8 viser et eksempel på en SA-glyserol-PEG-komponent av CMP-SA-glyserol-PEG eller av en SA-glyserol-PEG koblet til et glykan eller en aminosyre på et polypeptid. Figur 8B viser SA-glyserol-PEG-enheten koblet til et glykan eller polypeptid gjennom en Gal-rest. Figur 8C viser SA-glyserol-PEG-enheten koblet til et glykan eller polypeptid gjennom en Gal-GalNAc-enhet. Figur 8D viser SA-glyserol-PEG-enheten koblet til en aminosyre på et polypeptid gjennom en Gal-GalNAc-enhet. I ulike utførelsesformer er AA treonin eller serin. I en eksempelutførelsesform blir AA konvertert til et O-bundet glykosyleringssete ved delesjon av B-domenet på FVIII-polypeptidet. Diskusjonen vedrørende molekulvekten på polymeren i avsnitt nr. 2 etter dette avsnittet er generelt anvendelig på den forgrenede PEG vist på figur 8. På figur 8 representerer «n» ethvert heltall som gir en lineær (og dermed en forgrenet) m-PEG med den ønskede molekulvekten som diskutert i avsnitt nr. 2 etter dette avsnittet. I ulike utførelsesformer er «n» valgt slik at den lineære m-PEG-enheten er på omtrent 20 kDa til omtrent 40 kDa, f.eks. omtrent 20 kDa, omtrent 30 kDa eller omtrent 40 kDa. Heltall som tilsvarer disse m-PEG-molekulvektene tilsvarer omtrent 400 (f.eks. omtrent 455) til omtrent 900 (f.eks. omtrent 910). Dermed er «n» valgt for å gi en forgrenet PEG som er omtrent 40 kDa til omtrent 80 kDa, f.eks. omtrent 40 kDa til omtrent 50 kDa, omtrent 60 kDa, omtrent 70 kDa eller omtrent 80 kDa.
- Mange andre hydrofile polymerer er også passende for oppfinnelsen. Polymergrunnstrukturer som ikke er av peptidtype og vannløselige er spesielt nyttige i oppfinnelsen. Eksempler på passende polymerer inkluderer andre poly(alkylenglykoler) slik som poly(propylenglykol) («PPG»), kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol, poly(oksyetylert polyol), poly(olefmisk alkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(hydroksypropylmetakrylamid), poly([alfa]-hydroksysyre), poly(vinylalkohol), polyfosfazen, polyoksazolin, poly(N-akryloylmorfolin), slik som beskrevet i US patent nr. 5,629,384, i tillegg til kopolymerer, terpolymerer og blandinger derav.
- Selv om molekulvekten til hver kjede på polymergrunnstrukturen kan variere så er den typisk i området fra omtrent 100 Da til omtrent 160 000 Da, slik som f.eks. fra omtrent 5 000 Da til omtrent 100 000 Da. Mer spesifikt kan størrelsen på hver konjugerte, hydrofile polymer ifølge foreliggende oppfinnelse variere fra omtrent 500 Da til omtrent 80 000 Da, slik som f.eks. omtrent 1 000 Da til omtrent 80 000 Da, omtrent 2 000 Da til omtrent 70 000 Da, omtrent 5 000 Da til omtrent 70 000 Da, omtrent 5 000 Da til omtrent 60 000 Da, omtrent 10 000 til omtrent 70 000 Da, omtrent 20 000 til omtrent 60 000 Da, omtrent 30 000 til omtrent 60 000 Da,

omtrent 30 000 til omtrent 50 000 Da, eller omtrent 30 000 til omtrent 40 000 Da.

Det er på det rene at disse størrelsene representerer estimerer heller enn eksakte mål. Ifølge en foretrukket utførelsesform er molekylene ifølge oppfinnelsen

konjugert med en heterogen populasjon av hydrofile polymerer, slik som f.eks. PEG
 5 av en størrelse på f.eks. 10 000, 40 000 eller 80 000 Da +/- omtrent 5 000, omtrent
 4 000, omtrent 3 000, omtrent 2 000 eller omtrent 1 000 Da.

O-koblet oligosakkarid: Både N-glykaner og O-glykaner blir festet til proteiner av
 cellene som produserer proteinet. Det cellulære N-glykosyleringsmaskineriet
 gjenkjenner og glykosylerer N-glykosyleringssignaler (N-X-S/T-motiver) i
 10 aminosyrekjeden, når nakent protein blir translokalisert fra ribosomet til det
 endoplasmatiske retikulum (Kiely et al., 1976, Glabe et al., 1980).

Likeledes blir O-glykaner festet på spesifikke O-glykosyleringsseter på
 aminosyrekjeden med motivene som utløser O-glykosylering er mye mer heterogene
 enn N-glykosyleringssignalene, og vår evne til å forutsi O-glykosyleringsseter på
 15 aminosyresekvenser er fremdeles ikke god nok (Julenius et al., 2004).

Konstruksjonen av kunstige O-glykosyleringsseter er slik forbundet med noe
 usikkerhet. Den generelle antagelsen er at det native FVIII-molekylet ikke
 inneholder noen O-glykosyleringsseter, og at fagmannen derfor vil forvente at i det
 minste ett kunstig O-glykosyleringssete vil måtte bli konstruert og satt inn i B-
 20 domenet i forbindelse med utøvelse av foreliggende oppfinnelse.

Det O-bundne oligosakkaridet i et trunkert faktor-VIII-B-domene kan slik være
 kovalent bundet til en naturlig forekommende O-bundet glykosyleringssekvens eller
 en O-bundet glykosyleringssekvens som har blitt kunstig konstruert ved hjelp av
 rekombinante teknikker.

Fortrinnsvis er det O-bundne oligosakkaridet koblet til en naturlig forekommende
 O-bundet glykosyleringssekvens som ikke er eksponert overfor glykosylering i
 villtype-faktor-VIII-molekylet men som blir tilgjengelig for O-glykosylering som en
 konsekvens av trunkering av B-domenet. Ett eksempel derav er vist i eksemplene i
 25 SEQ ID nr. 2 (det trunkerte B-domenet tilsvarer aminosyrene 742-763). Det er
 30 plausibelt at det «skjulte» O-glykosyleringssetet i SEQ ID nr. 2 også vil bli
 glykosylert selv om B-domenet er trunkert på et noe forskjellig sted, dvs., dersom
 det trunkerte B-domenet er noe kortere (f.eks. 1, 2, 3, 4 eller 5 aminosyrer kortere
 enn SEQ ID nr. 2) eller lengre (slik som 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30,
 35, 40, 45 eller 50 aminosyrer) sammenlignet med SEQ ID nr. 2. Denne
 35 tilnærmingen med aktivering av et «skjult» O-glykosyleringssete ved trunkering av
 et B-domene heller enn dannelse av et kunstig O-glykosyleringssete har fordelen av
 å danne et molekyl med en fordelaktig sikkerhetsprofil (dvs., redusert allergenisitet
 osv.). Andre O-glykosyleringsseter i faktor-VIII-B-domenet kan likeledes bli
 aktivert ved å trunkere molekylene på ulike måter.

Glyko-PEGylering av O-bundet oligosakkarid: Biosyntesen av O-glykaner kan bli modifisert og terminert med addisjonen av sialinsyrerester relativt tidlig i biosyntese. Visse sialyltransferaseenzymer er i stand til å virke på GalNAc α -Ser/Thr, eller tidlige O-glykankjerneundertyper etter Core-1-GalT-virkning.

- 5 Uttrykket T-antigen er assosiert med tilstedeværelsen av Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr-disakkarid. Produksjon av disse strukturene involverer en konkurranse blant glykosyltransferaser for det samme substratet og slik bestemmer uttrykkningsnivåene og de subcellulære fordelingene av glykosyltransferaser innenfor Golgi-apparatet det strukturelle resultatet i O-glykanbiosyntese og -diversifisering. Som vist på
- 10 figur 1 er kun Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr-disakkaridet underkastet glykoPEGylering.

Likevel kan den tilgjengelige mengden av denne strukturen bli kraftig forsterket ved behandling av proteinet med sialidase eller Core1-GalT eller en kombinasjon derav. Som et resultat av glykoPEGyleringsprosessen blir sialinsyre-PEG addert på den native strukturen via en α 3-binding til Gal β 1-3GalNAc α -Ser/Thr-disakkaridet på

15 målproteinet (figur 1).

- Andre hydrofile polymerer kan også bli festet til O-bundne oligosakkarider. Det grunnleggende kravet for enzymatisk konjugering av andre hydrofile polymerer til FVIII via O-glykan er evnen til å koble dem til glyserylsialinsyrederivatet via den frie aminogruppen som tilkjennegitt i WO 03031464. Dette kan bli oppnådd ved
- 20 hjelp av en stor mengde koplingskemier som er kjent for fagfolk på området. Eksempler på aktiverte biologisk kompatible polymerer inkluderer polyalkylenoksider slik som uten begrensning polyetylenglykol (PEG), 2-(metakryloyloksy)etyl-fosforylkolin (mPC)-polymerer (som beskrevet i WO 03062290), dekstraner, kolominsyrer eller andre karbohydratbaserte polymerer,
- 25 polymerer av aminosyrer eller av spesifikke peptidsekvenser, biotinderivater, polyvinylalkohol (PVA), polykarboksylater, polyvinylpyrrolidon, polyetylen-ko-maleinsyreanhydrid, polystyren-ko-eplesyreanhydrid, polyoksazolin, polyakryloylmorfolin, heparin, albumin, celluloser, hydrolysater av kitosan, stivelser slik som hydroksyetyl-stivelser og hydroksypropyl-stivelser, glykogen, agaroser og
- 30 derivater derav, guar gummi, pullulan, inulin, xantangummi, karragenan, pektin, alginsyrehydrolysater, andre biopolymerer og ekvivalenter derav.

Farmasøytisk sammensetning: En farmasøytisk sammensetning er her fortrinnsvis ment å skulle omfatte sammensetninger omfattende faktor-VIII-molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse som er passende for parenteral administrering, slik som

35 f.eks. brukerklare, sterile, vandige sammensetninger eller tørre, sterile sammensetninger som kan bli rekonstituert i f.eks. vann eller en vandig buffer. Sammensetningene ifølge oppfinnelsen kan omfatte ulike, farmasøytisk akseptable eksipienter eller stabilisatorer.

- Ytterligere ingredienser i slike sammensetninger kan inkludere fuktemidler,
- 40 emulgatorer, antioksidanter, fyllmidler, tonisitetsmodifiserende midler, chelaterende

- midler, metallioner, oljeholdige vehikler, proteiner (f.eks. humant serumalbumin, gelatin eller proteiner) og et zwitterion (f.eks. en aminosyre slik som betain, taurin, arginin, glysin, lysin og histidin). Slike ytterligere ingredienser bør selvfølgelig ikke skadelig påvirke den overordnede stabiliteten til den farmasøytiske
- 5 formuleringen ifølge foreliggende oppfinnelse. Parenteral administrering kan bli utført ved subkutan, intramuskulær, intraperitoneal eller intravenøs injeksjon ved hjelp av en sprøyte, eventuelt en pennliknende sprøyte. Alternativt kan parenteral administrering bli utført ved hjelp av en infusjonspumpe. En ytterligere mulighet er en sammensetning som kan være en løsning eller suspensjon for administreringen
- 10 av FVIII-forbindelsen i formen av en nesespray eller pulmonal spray. Som ytterligere en mulighet kan de farmasøytiske sammensetningene inneholdende FVIII-forbindelsen ifølge oppfinnelsen også bli tilpasset transdermal administrering, f.eks. ved nålfri injeksjon eller fra et plaster, eventuelt et iontoforetisk plaster, eller transmukosal, f.eks. buccal administrering.
- 15 I et første aspekt vedrører slik foreliggende oppfinnelse et B-domenetrunkert faktor-VIII-molekyl med en modifisert halveringstid, der nevnte molekyl er kovalent konjugert til en hydrofil polymer via et O-bundet oligosakkarid i det trunkerte B-domenet, der faktor-VIII-aktivering (aktivering av molekylet) fører til fjerning av den kovalent konjugerte hydrofile polymeren, der tungkjede- og lett kjede-enhetene
- 20 på FVIII-forløperpolypeptidet er separert med en linker, der sekvensen til linkeren er avledet fra FVIII-B-domenet, og der linkeren omfatter et gjenkjenningssete for proteasen som separerer det B-domenetrunkerte FVIII-forløperpolypeptidet til den lette og tunge kjeden.
- Ifølge én utførelsesform er den hydrofile polymeren PEG. Størrelsen på PEG-polymeren kan variere fra omtrent 10 000 til omtrent 160 000 Da, slik som 10 000
- 25 til 80 000 Da, slik som f.eks. omtrent 10 000, 15 000, 20 000, 25 000, 30 000, 35 000, 40 000, 45 000, 50 000, 55 000, 60 000, 65 000, 70 000, 75 000 eller 80 000 Da.
- Ifølge en spesielt foretrukket utførelsesform omfatter molekylet ifølge foreliggende
- 30 oppfinnelse aminosyresekvensen ifølge SEQ ID nr. 2. Slike molekyler har et unikt trekk ved at det aktiverte FVIII-molekylet er identisk med det native, aktive FVIII-molekylet. Dette trekket ser ut til å være fordelaktig ved vurdering av sikkerhet.
- Foreliggende oppfinnelse vedrører også farmasøytiske sammensetninger som omfatter molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse.
- 35 Foreliggende oppfinnelse vedrører ytterligere en fremgangsmåte for å oppnå et molekyl ifølge foreliggende oppfinnelse, der nevnte fremgangsmåte omfatter å konjugere et B-domenetrunkert faktor-VIII-molekyl med en hydrofil polymer slik som f.eks. en PEG-gruppe, via et O-bundet oligosakkarid i det trunkerte B-domenet. Det følger at foreliggende oppfinnelse også vedrører molekyler som er oppnådd ved
- 40 eller som er mulig å oppnå ved slike fremgangsmåter.

I et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse molekylet som definert i kravene for anvendelse i behandlingen av en hemofili-sykdom omfattende administrering til en pasient med behov derav av en terapeutisk effektiv mengde med et molekyl ifølge kravene.

- 5 Uttrykket «behandling» refererer slik det blir benyttet her til den medisinske terapien av ethvert humant eller annet dyreindivider med behov derav. Nevnte individ er forventet å ha gjennomgått fysisk undersøkelse av en medisinsk utøver, som har gitt en tentativ eller definitiv diagnose som vil indikere at anvendelsen av nevnte spesifikke behandling er fordelaktig for helsetilstanden til nevnte humane individ
- 10 eller annet dyreindivider. Timingen og formålet med nevnte behandling kan variere fra ett individ til et annet, i overensstemmelse med status quo for individets helsetilstand. Slik kan nevnte behandling være profylaktisk, lindrende, symptomatisk o/eller kurerende.

- I nok et annet aspekt vedrører foreliggende oppfinnelse et molekyl ifølge kravene for anvendelse som et medikament.
- 15

Kort beskrivelse av tegningene

I figurene er størrelsen på de konjugerte gruppene enkelte ganger henvist til som «K», som heri er ment å være ekvivalent til KDa (kiloDalton).

- 20 Figur 1: Skjematisk tegning av glukose-PEGyleringsprosessen for O-bundne oligosakkarider. Figuren representerer en mulig måte å komme frem til produktene som er oppnådd i eksemplene på.

Figur 2: Ionebytterkromatografi av reaksjonsblandingen på Source 15Q (A). SDS-PAGE med molekylmarkører (venstre) av samlet fraksjon (B).

- 25 Figur 3: Rensing av det kappede produktet på superdex 200 størrelseseksklusjonskromatografi.

Figur 4: Koaguleringsaktivitet for O-glykoPEGylert rFVIII ved å benytte ulike aPTT-reagenser. (A) viser ratio mellom koaguleringsaktiviteten og den kromogene aktiviteten. (B) viser den spesifikke koaguleringsaktiviteten.

- 30 Figur 5: In vivo-effekter (tid til okklusjon) i FVIII-KO-mus med 40K-PEG-[O]-N8.

Figur 6: Flytdiagram som viser prosessstrinnene involvert i produksjon av glykoPEGylert faktor-VIII ifølge oppfinnelsen.

Figur 7: Skjematisk representasjon av et faktor-VIII-molekyl ifølge foreliggende oppfinnelse produsert i eksemplene.

Eksempler

Eksempel 1

Produksjon av rekombinant, B-domenetrunkert, O-glykosylert faktor-VIII

5 Et eksempel på aminosyresekvensen til et B-domenefjernet faktor-VIII-molekyl er gitt i SEQ ID nr. 2. Dette polypeptidet kan også bli referert til som «N8». Dette molekylet omfatter en 21 aminosyrer lang linkersekvens (SFSQNSRHPSQNPVLKRHQR – den understrekede S er serinresten med O-glykanet som er pegylert i eksempel 2).

10 Faktor-VIII-molekyler ifølge foreliggende oppfinnelse kan i eksemplene bli referert til på ulike måter – men alle referanser til faktor-VIII-molekyler refererer til faktor-VIII-molekyler ifølge oppfinnelsen, eller alternativt faktor-VIII-molekyler som er i ferd med å bli konvertert til faktor-VIII-molekyler ifølge oppfinnelsen.

SEQ ID nr. 2

ATTRYYLGAVELSDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFPFNTSVVYKKTFLFVEFTDHLFNIA
KPRPPWMGLLGPTIQAQEVYDVTVTITLKNMASHPVSLHAGVGSYWKASEGAQYDDQTSQREK
EDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDVKDLNSGLIGALLVCREGSL
AKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPG
LIGCHRSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLIMDLGQFLL
FCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNDDNSPSFI
QIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFM
AYTDETFTKTRIAIQHESGILGPLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKG
VKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLI CYKES
VDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNMHSINGYV
FDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFM SMEN
PGLWLGCNDSFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSR
HPSQNPVLKRHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRH
YFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGGL
GPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVVQH
HMAPTKDEFDCAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHITNTLNPAGHRQVTVQEFALFFTIF
DETKSWYFTENMERNCRAPCNQIMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYL
LSMGSNENIHSIHSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHL
HAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPF
SWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVD
SSGJIKHNIFNPPIIARYIRLHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFT
NMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTOGVKSLLTSMY
VKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIAL
15 RMEVLGCEAQDLY

Cellelinje og dyrkningsprosess:

20 Ved å benytte faktor-VIII-cDNA ble et pattedyrekspresjonsplasmid som koder for B-domenefjernet faktor-VIII med en aminosyresekvens som vist i SEQ ID nr. 2 konstruert. Plasmidet koder for en faktor-VIII-tungkjede omfattende aminosyrene 1-740 av human fullengde-faktor-VIII og faktor-VIII-lettkjede omfattende aminosyrene 1649-2332 av human fullengdefaktor-VIII. Tungkjede- og

lettkjedesekvensen er forbundet med en 21 aminosyrer lang linker med sekvensen med aminosyrene 741-750 og 1638-1648 av human fullengde-faktor-VIII. Kinesiske hamsterovarie (CHO)-celler ble transfektert med det BDD-faktor-VIII-kodende plasmidet og selektert med dihydrofolatreduktasesystemet som til slutt fører til en

5 klonsuspensjons-prduserende celle dyrket i dyrekomponentfritt medium.

Det første trinnet i prosessen er inokuleringen med et cellerør, fra et arbeidscellebankrør, inn i et kjemisk definert og dyrekomponentfritt vekstmedium. I første omgang, etter opptining, blir cellene inkubert i en T-flaske. Én eller to dager etter tining blir cellene overført til en risteflaske, og dyrkingsvolumet blir

10 ekspandert ved suksessive fortyndinger for å holde celletettheten mellom $0,2-3,0 \times 10^6$ celler/ml. Det neste trinnet er overføringen av risteflaskekulturen til utsåings-biorekatorer. Dyrkningsvolumet blir her ytterligere ekspandert før den endelige overføringen til produksjons-bioreaktoren. Det samme kjemisk definerte og dyrekomponentfrie mediet blir benyttet i alle inokulum-ekspansjonstrinnene.

15 Etter overføring til produksjons-bioreaktoren blir mediet tilført komponenter som øker produktkonsentrasjonen. I produksjons-bioreaktoren blir cellene dyrket i en repetert-Batch-prosess med en syklustid på tre dager. Ved høsting blir 80-90 % av kulturvolumet overført til en høstetank. Det gjenværende kulturfluidet blir deretter fortynt med friskt medium for å oppnå den opprinnelige celletettheten, og deretter

20 blir en ny vekstperiode satt i gang.

Høstebatchen blir klaret ved sentrifugering og filtrering og blir overført til en holdetank før igangsettelse av renseprosessen. En buffer blir tilsatt til det cellefrie høstede produktet i holdetanken for å stabilisere pH.

Ved slutten av produksjonsløpet blir cellene samlet og frosset ned for å lagre

25 produksjonsslutt-cellebank. Denne cellebanken blir testet for mykoplasma, sterilitet og viruskontaminering.

Rensing:

For isoleringen av B-domenefjernet faktor-VIII fra cellekulturmedium ble en

30 firetrinns renseprosedyre benyttet, inkludert et konsentrasjonstrinn på en Capto MMC-kolonne, et immunabsorberende kromatografitrinn, en anionbytter-kromatografering og til slutt et gelfiltreringstrinn. Typisk ble den følgende prosedyren benyttet: 11 liter med strilfiltrert medium ble pumpet over på en kolonne (1,6 x 12 cm) med Capto MMC (GE Healthcare, Sweden) balansert i buffer A: 20

35 mM imidazol, 10 mM CaCl_2 , 50 mM NaCl, 0,02 % Tween 80, pH 7,5 ved en strømning på 15 ml/min. Kolonnen ble vasket med 75 ml buffer A etterfulgt av vasking med 75 ml buffer A inneholdende 1,5 M NaCl. Proteinet ble eluert med 20 mM imidazol, 10 mM CaCl_2 , 0,02 % Tween 80, 2,5 M NaCl, 8 M etylenglykol, pH 7,5 ved en strømning på 1 ml/min. Fraksjoner på 8 ml ble samlet og analysert for

faktor-VIII-aktivitet (CoA-test). Faktor-VIII-inneholdende fraksjoner ble slått sammen og normalt ble et samlingsvolum på rundt 50 ml oppnådd.

Et monoklonalt antistoff mot faktor-VIII har blitt utviklet (Kjalke Eur. J. Biochem. 234, 773). Ved hjelp av epitopkartlegging (resultater ikke vist) ble dette antistoffet, F25, funnet å gjenkjenne den ytterste C-terminale sekvensen av den tunge kjeden fra aminosyrerest 725 til 740. F25-antistoffet ble koblet til NHS-aktivert Sepharose 4 FF (GE healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sverige) ved en tetthet på 2,4 mg per ml med gel essensielt som beskrevet av produsenten. Samlingsvolumet det forrige trinnet ble fortynnet 10 ganger med 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 0,02 % Tween 80, pH 7,3 og påført F25-Sepharose-kolonnen (1,6 x 9,5 cm) balansert med 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0,02 % Tween 80, 1 M glyserol, pH 7,3 ved en strømningshastighet på 0,5 ml/min. Kolonnen ble vasket med likevektsbuffer inntil UV-signalet var konstant og deretter med 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 0,65 mM NaCl, pH 7,3 inntil UV-signalet var konstant igjen. Faktor-VIII ble eluert med 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 0,02 % Tween 80, 2,5 M NaCl, 50 %etylenglykol, pH 7,3 ved en strømning på 1 ml/min. Fraksjoner på 1 ml ble samlet opp og analysert for faktor-VIII-aktivitet (CoA-test). Faktor-VIII-inneholdende fraksjoner ble slått sammen og normalt ble et samlingsvolum på omtrent 25 ml oppnådd.

En buffer A: 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 0,02 % tween 80, 1 M glyserol, pH 7,3 og en buffer B: 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 0,02 % Tween 80, 1 M glyserol, 1 M NaCl, pH 7,3 nle klargjort for ionerbyttertrinnet. En kolonne (1 x 10 cm) med Macro-Prep 25Q Support (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) ble balansert med 85 % buffer A/15 % buffer B ved en strømning på 2 ml/min. Samlingsvolumet fra det forrige trinnet ble fortynnet 10 ganger med buffer A og pumpet over på kolonnen med en strømning på 2 ml/min. Kolonnen ble vasket med 85 % buffer A/15 % buffer B ved en strømning på 2 ml/min og faktor-VIII ble fortynnet med en lineær gradient fra 15 % buffer B til 70 % buffer B over 120 ml ved en strømning på 2 ml/min. Fraksjoner på 2 ml ble samlet og analysert for faktor-VIII-aktivitet (CoA-test). Faktor-VIII-inneholdende fraksjoner ble slått sammen og normalt ble et samlingsvolum på rundt 36 ml oppnådd.

Samlingsvolumet fra forrige trinn ble satt på en Superdex 200 prep grade (GE Healthcare, Bio-Sciences AB, Uppsala, Sverige)-kolonne (2,6 x 60 cm) balansert og eluert ved 1 ml/min med 20 mM imidazol, 10 mM CaCl₂, 0,02 % Tween 80, 1 M glyserol, 150 mM NaCl, pH 7,3. Fraksjoner på 3 ml ble samlet og analysert for faktor-VIII-aktivitet (CoA-test). Faktor-VIII-inneholdende fraksjoner ble slått sammen og normalt ble et samlingsvolum på omtrent 57 ml oppnådd. Samlingsvolumet inneholdende faktor-VIII ble lagret ved -80 °C.

Ved hjelp av firetrinns-rensprosessen ovenfor ble et totalt utbytte på omtrent 15 % oppnådd som vurdert med CoA-aktivitet og ELISA-målinger.

Cellelinjen som ble benyttet til produksjon av N8 er en rekombinant kinensisk hamsteroarie (CHO)-ellelinje som er stabilt transfektert med ekspresjonsplasmid #814 F8-500 i pTSV7 bestående av pTSV7-ekspresjonsvektoren med et innskudd inneholdende cDNA som koder for F8-500-proteinet. «N8» er her ment å tilsvare et protein som har en aminosyresekvens som vist i SEQ ID nr. 2. Ved å starte på N-terminalen består F8-500-proteinet av FVIII-signalpeptidet (aminosyrene -19 til -1) etterfulgt av FVIII-tungkjeden uten B-domenet (aminosyrene 1-740), en linker på 21 aminosyrer (SFSQNSRHP SQNPPVLKRHQR) og FVIII-lettkjeden (aminosyrene 1649-2332 på human villtype FVIII). Sekvensen til linkeren på 21 aminosyrer er avledet fra FVIII-B-domenet og består av aminosyrene 741-750 og 1638-1648 i fullengde-FVIII.

CHO-celler ble transfektert med 814 F8-500 i pTSV7 og selektert med dihydrofolatreduktase-systemet som til slutt fører til en klonal suspensjonsprodusentcelle dyrket i dyrekomponentfritt medium. En dager. produksjonskjøring blir satt i gang ved å tine opp et arbeidscellebankrør og ekspandere cellene inntil overføring i en produksjons-bioreaktor. Det samme kjemisk definerte og dyrekomponentfrie mediet blir benyttet i alle inokulumekspansjonstrinnene. Etter overføring til produksjons-bioreaktoren blir mediet tilsatt komponenter som øker produktkonsentrasjonen. I produsjons-bioreaktoren blir cellene dyrket i en repetert batch-prosess med en syklustid på tre dager. Ved høsting blir 80-90 % av dyrkingsvolumet overført til en høstetank. Det gjenværende dyrkningsfluidet blir deretter fortynnet med friskt medium for å oppnå den opprinnelige celletettheten, og deretter blir en ny vekstperiode igangsatt. Den høstede batchen blir klaret med sentrifugering og filtrering og overført til en holdetank før igangsettelse av renseprosessen. En buffer blir tilsatt til det cellefrie høstede produktet i holdetanken for å stabilisere pH.

Eksempel 2

PEGylering av rekombinant B-domenetrunkert og O-glykosylert faktor-VIII:

De rekombinante faktor-VIII-molekylene oppnådd i eksempel 1 blir konjugert med polyetylenglykol (PEG) ved å benytte den følgende prosedyren:

For at glykoPEGyleringen av de rekombinante faktor-VIII-molekylene oppnådd i eksempel 1 skal være effektiv er en FVIII-konsentrasjon > 5 mg/ml foretrukket. Fordi FVIII ikke normalt er løselig ved konsentrasjonen ble en screening av valgte buffersammensetninger utført (se noen av disse resultatene i tabell 1).

Basert på disse overveielsene ble en buffer inneholdende 50 mM MES, 50 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 20 % glyserol, pH 6,0 funnet å være en passende reaksjonsbuffer.

Tabell 1. Evaluering av påvirkning av reaksjonsbetingelser på FVIII-løselighet og –aggregering.

Reaksjonsbuffer-sammensetning	Presipitat	% Aggregering
10 mM histidin, 260 mM glycin, 1 % sukrose, 10 mM CaCl ₂ ,	JA	n.d
50 mM HEPES, 10 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, pH 7	JA	n.d
50 mM MES, 10 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, pH 6,0	JA	n.d
50 mM MES, 50 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, pH 6,0	NEI	8
50 mM MES, 50 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, 10 % glyserol, pH 6,0	NEI	5
50 mM MES, 50 mM CaCl ₂ , 150 mM NaCl, 20 % glyserol, pH 6,0	NEI	1,0-1,7

- 5 Rekombinant FVIII som hadde blitt rensset som beskrevet ovenfor ble konsentrert i reaksjonsbuffer enten ved ionebytting på en Poros 50 HQ-kolonne ved å benytte trinneluering, på et Sartorius Vivaspin (PES)-filter, 10 kDa cut-off eller et Amicon 10 kDa MWCO PES-filter til en konsentrasjon på 6-10 mg/ml. GlykoPEGyleringen av FVIII ble satt i gang ved å blande faktor-VIII (BDD) (~ 4,7 mg/ml endelig) med
- 10 sialidase (*A. urifaciens*), CMP-SA-glyserol-PEG-40 kDa (5 mole.eq.) og MBP-ST3Gal1 (540 mU) i reaksjonsbuffer (50 mM MES, 50 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 20 % glyserol, 0,5 mM antipain, pH 6,0). Reaksjonsblandingen ble inkubert ved 32 °C inntil et konverteringsutbytte på ~ 20-30 % av totalen.

- Etter inkuberingen ble prøven fortynnet med Buffer A (25 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 20 mM NaCl, 20 % glyserol, pH 7,5) og satt på en Source 15Q-kolonne (1 cm id x 6
- 15

cm, 4,7 ml, 1 ml/min, 280 nm). Det bundne materialet ble vasket med Buffer A og eluert ved å benytte en trinngradient med Buffer B (25 mM Tris, 5 mM CaCl₂, 1 M NaCl, 20 % glyserol, pH 7,5). GlykoPEGylert faktor-VIII-(O)-SA-glyserol-PEG-40 kDa ble eluert fra kolonna ved ~ 25 % Buffer B. Figur 2 viser

5 ionebytterkromatografi av reaksjonsblandingen på Source 15Q.

For å blokkere frie galaktose-enheter som hadde blitt eksponert på N-glykanene under sialidasebehandlingen så ble de sammenslåtte fraksjonene av faktor-VIII-SA-glyserol-PEG-40 kDa (1,0 mg/ml endelig) blandet med CMP-SA (2 000 mol eq) og MBP-SBD-ST3Gal3 (400 mU/ml) i reaksjonsbuffer 50 mM MES, 20 mM CaCl₂,

10 150 mM NaCl, 10 mM MnCl₂, 20 % glyserol, pH 6,0 og inkubert ved 32 °C i 11 timer.

Den resulterende, kappede glykoPEGylerte faktor-VIII-SA-glyserol-PEG-40 kDa ble separert fra CMP-SA og ST3GalIII ved gelfiltrering på en Superdex 200-kolonne (10 cm id x 300 mm, 280 nm) balansert med 50 mM MES, 50 mM CaCl₂,

15 150 mM NaCl, 10 % glyserol, pH 6,0, strømningshastighet på 0,25 ml/min. Produktet, faktor-VIII-SA-glyserol-PEG-40 kDa elueres ved 38 min. Figur 3 viser rensing av det kappede produktet ved å benytte Superdex 200-størrelseseksklusjonskromatografi. Toppfraksjonen ble samlet, delt opp og ytsatt for påfølgende analyse.

20 Formålet med kapping-prosedyren er å redusere in vivo-fjerning av det konjugerte faktor-VIII-molekylet.

Eksempel 3

Aktivitet av O-glykan-PEGylert rFVIII i kromogen FVIII-aktivitetsanalyse.

25 Aktiviteten til det O-glykoPEGylerte rFVIII oppnådd i eksempel 2 ble analysert i en kromogen FVIII-analyse ved å benytte Coatest SP reagenser (Chromogenix) som følger: rFVIII-prøver og kalibrator (den 7. internasjonale FVIII-standarden fra NIBSC) ble fortynnet i Coatest-analysebuffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 % BSA, pH 7,3, med preserveringsmiddel). Femti µl med prøver, standarder og

30 negativbufferkontroll ble tilsatt i 96 brønners mikrotiterplate (Ninc) i duplikater. Faktor-IXa/faktor-X-reagenset, forfolipidreagenset og CaCl₂, fra Coatest SP-settet ble blandet 5:1:3 (vol:vol:vol) og 75 µl av dette tilsatt brønnene. Etter 15 minutter med inkubering ved romtemperatur ble 50 µl av faktor-Xa-substratet S-

35 2765/trombin-inhibitor I-2581-blanding tilsatt og reaksjonene inkubert 10 minutter ved romtemperatur før 25 µl 1 M sitronsyre, pH 3 ble tilsatt. Absorbansen ved 620 nm ble benyttet som en referansebølgelengde. Verdien for den negative kontrollen ble trukket fra alle prøver og en kalibreringskurve ble klargjort ved lineær regresjon av absorbanseverdiene plottet mot FVIII-konsentrasjon. Den spesifikke aktiviteten ble beregnet ved å dele aktiviteten til prøvene med proteinkonsentrasjonen bestemt

ved størrelseseksklusions-HPLC ved å integrere lettkjede-toppen i HPLC-kromatogrammet, dvs., PEG-enheten ble ikke inkludert. Dataene i tabell 2 viser at den spesifikke kromogene aktiviteten ble opprettholdt for O-glykoPEGylerte rFVIII-forbindelser, noe som betyr at faktor-VIII-aktivitet ser ut til å bli opprettholdt i PEGylerte varianter.

Tabell 2. Spesifikk kromogen aktivitet for O-glykoPEGylert rFVIII med ulik PEG-gruppestørrelse.

rFVIII-forbindelse	Spesifikk kromogen aktivitet (IU/mg)
rFVIII	11819±727 (5)
10kDa-PEG-[O]-rFVIII	Omtrent 8331 (1)
40kDa-PEG-[O]-rFVIII	9760±886 (8)
80kDa-PEG-[O]-rFVIII	12129±2643 (3)

Data er gjennomsnitt og standardavvik av antallet uavhengige bestemmelser gitt o
parenteser.

Eksempel 4

Aktivitet av O-glykan-PEGylert rFVIII i koaguleringsaktivitetsanalyse

Aktiviteten til den O-glykoPEGylerte rFVIII ble ytterligere evaluert i FVIII-koaguleringsanalyse. rFVIII-prøver ble fortynnet i HBS/BSA (20 mM Hepes, 150 mM NaCl, pH 7,4 med 1 % BSA) til omtrent 10 IU/ml etterfulgt av 10 ganger fortynning i FVIII-manglende plasma inneholdende VWF (Dade Behring). Prøvene og en kalibrert plasmastandard (HemosIL California Plasma fra Instrumentation Laboratory) ble deretter fortynnet i HBS/BSA til fire (prøver) eller seks (kalibrator) ulike konsentrasjoner. Koaguleringstiden ble målt på et ACL9000-instrument (Instrumentation Laboratory) ved å benytte enkeltfaktorprogram, der prøbene/standardene ble blandet med like volumer FVIII-manglende plasma med VWF (Dade Behring), kalsium og aPTT-reagenser, og koaguleringen ble målt. Som reagenser ble de følgende benyttet: Synthasil (HemosIL, Instrumentation Laboratory), Actin FS (Activated PTT Reagent, Dade Behring), Stago (STA®PTT-A, Stago) og dAPPTin (DAPPTIN®TC, Technoclone). Aktivitetene i prøvene ble beregnet basert på et semi-log-plott av koaguleringstid versus konsentrasjon av kalibratoren.

Koaguleringsaktiviteten (figur 4) av de O-glykoPEGylerte rFVIII-forbindelsene (kontroll, 10, 40 og 80 kDa PEG) ble minsket i ulik grad avhengig av PEG-

størrelsen og aPTT-reagenset som ble benyttet. Anvendelse av Synthasil eller dAPPTin som aPTT-reagenser førte til en gradvis minking av koaguleringsaktivitet med PEG-størrelse. Med Stagos aPTT-reagens ble en 50 % lavere spesifikk koaguleringsaktivitet observert for alle tre O-glykoPEGylerte N8-forbindelser som ble evaluert. Når Actin FS ble benyttet som aPTT-reagens ble en spesifikk koaguleringsaktivitet rundt 10 000 IU/mg opprettholdt. Dataene tyder på at aPTT-analysen blir påvirket av tilstedeværelsen av en PEG-enhet, men ved å benytte et utvalgt aPTT-reagens, f.eks. Actin FS, så blir likevel ikke den spesifikke koaguleringsaktiviteten til rFVIII ødelagt ved O-glykoPEGylering.

Eksempel 5.

Effekt av O-bundet PEGylering av rFVIII på kofaktoraktivitet og hastighet av FVIII-aktivering

Inkorporering av aktivert FVIII inn i FIXa-FVIIIa-komplekset forsterker den katalytiske effektiviteten til FIXa-katalysert FX-aktivering i størrelsesorden fem ganger (van Dieijen et al., (1981) J. Biol. Chem., 256:3433) og karakterisering av FIXa-FVIIIa-komplekssammensetting og FX-aktiveringskinetikk er et sensitivt mål på den funksjonelle integriteten til FVIII-molekyler. Kofaktoraktiviteten til trombinaktivert rFVIII eller PEG-rFVIII ble karakterisert ved bestemmelse av de kinetiske parameterne til FIXa-katalysert FX-aktivering i nærværet av fosfolipider og trombinaktivert rFVIII eller PEG-rFVIII. Ved å benytte FVIIIa-aktivitetsanalysen (FIXa-kofaktoraktivitetsanalyse) ble resiproke titreringer av FIXa og FVIIIa mot en fiksert konsentrasjon (0,1 nM) av henholdsvis rFVIII eller FIXa utført for å oppnå åpenbart affinitet av FIXa for rFVIIIa ($K_{1/2\text{FIXa}}$) og funksjonell FVIIIa-konsentrasjon. Michaelis-konstanten (K_m) og omsetningstall (K_{cat}) for FX-aktivering ble oppnådd fra titreringer av FX mot en fiksert konsentrasjon av FIXa-FVIIIa-kompleks.

FIXa-kofaktoraktivitetsanalysene ble utført som følger: Trombinaktivert rFVIII og PEG-rFVIII-varianter ble klargjort friskt for hver test ved inkubering av rFVIII (vanligvis 0,7 nM, 1 U/ml) med 5 nM humant α -trombin i eksakt 30 sekunder ved 37 °C. Deretter ble hastigheten for FX-aktivering kvantifisert ved å ta prøver av aktiveringsreaksjonen ovenfor og overført i en klargjort blanding av FIXa, fosfolipidvesikler (Phospholipid TGT fra Rossix [Mölndal, Sverige]), hirudin, Pefabloc Xa og CaCl_2 , og FX-aktivering ble satt i gang ved tilsetning av FX og tillatt å fortsette i enten 30 eller 60 sekunder ved 37 °C. Aktivering ble stoppet ved fortykning av FX-aktiveringsreaksjonen inn i iskald buffer inneholdende EDTA. Ved å benytte et FXa-spesifikt kromogent substrat ble konsentrasjonen av FXa kvantifisert ved å avlese absorbans ved 405 nm i en ELISA-avleser. En referansekurve klargjort ved å benytte rensert FXa ble benyttet til å konvertere absorbans til FXa-konsentrasjon. Omsetningstallet for FIXa-rFVIIIa-komplekser ble

satt sammen fra aktivert rFVIII eller PEG-rFVIII-varianter ble benyttet for å konvertere hastigheten av FX-aktivering til rFVIIIa-konsentrasjon.

Hastigheten for trombin-katalysert rFVIII-aktivering ble målt ved å kvantifisere den opprinnelige (0 til 3 min) dannelsen av rFVIIIa i en blanding inneholdende 0,7 nM rFVIII eller PEG-rFVIII og 0,13 nM humant α -trombin. Dannelse av FVIII var lineær i tid. Hastigheten for FVIIIa-aktivering ble uttrykt som mol rFVIIIa dannet per minutt per mol med rFVIII opprinnelig til stede ($v/[rFVIII]_0$).

O-bundet glykoPEGylering av rFVIII påvirket ikke hastigheten av trombin-katalysert rFVIII-aktivering eller k_m eller k_{cat} for FIXa-katalysert aktivering av FX i nærværet av aktivert rFVIII (se tabell 3). Videre påvirket ikke O-bundet glykoPEGylering den øyensynlige K_d for rFVIIIa-FIXa-interaksjonen ($K_{1/2FIXa}$).

Figur 4 viser koaguleringsaktivitet for O-glykoPEGylert rFVIII ved å benytte ulike PTT-reagenser. Data er vist som ratio mellom koaguleringsaktiviteten og den kromogene aktiviteten (A) eller som den spesifikke koaguleringsaktiviteten (B). Gjennomsnittlig og standardavvik for verdier fra tre uavhengige eksperimenter er vist.

Tabell 3. Hastigheten av rFVIII-aktivering og kinetiske konstanter for FX-aktivering ved FIXa

FVIII-molekyl	Hastighet for FVIII-aktivering	$K_{1/2FIXa}$	FX-aktivering	
			K_m	K_{cat}
	$10^{-3} \times \text{min}^{-3}$	nM	nM	S^{-1}
rFVIII	$10,4 \pm 1,9$	$0,88 \pm 0,46$	$7,9 \pm 1,7$	$4,5 \pm 1,9$
40K-PEG-[O]-rFVIII	$9,9 \pm 3,8$	$0,42 \pm 0,02$	$6,4 \pm 0,8$	$4,7 \pm 0,2$
80K-PEG-[O]-rFVIII	$9,8 \pm 3,4$	$1,11 \pm 0,12$	$8,2 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,4$

Data er gjennomsnitt og standardavvik fra 3-6 målinger.

Eksempel 6

Farmakokinetikk for glykoPEGylert B-domenefjernet (BDD)-FVIII i FVIII-KO-mus og vWF-KO-mus

Farmakokinetikken til BDD-FVIII glykoPEGylert med ulike PEG-størrelser ble undersøkt etter i.v.-administrering av 280 IU/kg til FVIII-KO-mus.

- De følgende forbindelsene ble undersøkt: BDD-FVIII, BDD-FVIII-10K PEG (O-glykan, 0129-0000-1005), BDD-FVIII-40K PEG (O-glykan, 0129-000-1003), BDD-FVIII-2x40K PEG (O-glykan og N-glykan 0129-000-1008-1A), BDD-FVIII-80K PEG (N-glykan, 0129-0000-1012, O-glykan 0129-0000-1009).

Design av dyreforsøk:

- Faktor-VIII-knockout (FVIII-KO)-mus ble alet opp hos Taconic M&B, basert på ekson 16-KO i C57B1/6-bakgrunn. En blanding av hanner og hunner (ca 1:1) med en passende vekt på 25 g og et aldersspenn fra 19-26 uker ble benyttet. Musene var ikke fullstendig tilbakekrysset. Ikke noe FVIII er påvist i denne musestammen.

- Musene ble gitt single i.v.-injeksjoner på 280 IU/kg i halevenen med forbindelsene listet opp ovenfor. Dersom en mus ble dosert peri-venøst ble musen byttet ut med en annen mus. Etter dosering ble blodprøver fra orbitalt plexus tatt fra pre-dosering inntil 64 timer etter dosering ved å benytte ikke-belagte kapillærglassrør. Tre prøver ble tatt fra hver mus, og 2, 3 eller 4 prøver ble samlet inn på hvert tidspunkt. Blod ble stabilisert i natriumsitrat (9:1) og fortynnet i FVIII-COA-SP-buffer (1:4) før sentrifugering i 5 minutter ved 4000 g. Plasma oppnådd fra fortynnet blod ble frosset på tørris og holdt ved -80 °C før kvantitativ analyse ved hjelp av FVIII-kromogen aktivitet og/eller FVIII-antigenanalyse.

Kvantitativ plasmaanalyse:

- Den FVIII-kromogene aktiviteten ble bestemt ved anvendelsen av reagenser fra Coatest SP-settet (Chromogenix). Fortynnete plasmaprøver, kalibratorer (ILS-kalibreringsplasma) i Coatest SP-buffer, og negativ bufferkontroll (50 µl) ble tilsatt 96 brønners mikrotiterplater (Nunc) i duplikater. Faktor-IXa/faktor-X-reagenset, fosfolipidreagenset og CaCl₂ fra Coatest SP-settet ble blandet 5:1:3 (vol:vol:vol) og 75 µl av dette tilsatt brønnene. Etter 15 minutter inkubering ved romtemperatur ble 50 µl av faktor-Xa-substratet S-2765/trombininhibitor I-2581-blanding tilsatt og reaksjonene inkubert 10 minutter ved romtemperatur før 25 µl 2 % sitronsyre ble tilsatt. Absorbansen ved 405 nm ble målt på en Spectramax-mikrotiterplateavleser (Molecular Devices). FVIII-aktivitet i plasmaprøvene ble beregnet fra kalibreringskurven laget med fortynninger av den kalibrerte internasjonale plasmastandarden (ILS).
- FVIII-antigenanalysen var et kommersielt tilgjengelig ELISA-sett fra Diagnostica Stago (Asserachrom VIII:Ag) som benytter to monoklonale antistoffer rettet mot lett kjeden på human faktor-VIII. Kalibratorer (fortynninger av forbindelsene) eller plasmaprøver ble fortynnet minst 50 ganger i coatest-SP-fortynningsbuffer levert i settet ble påsatt de forhåndsbelagte brønnene og ELISA-testen utført i

overensstemmelse med produsentens instruksjoner. Verdiene benyttet for å rapportere den farmakokinetiske undersøkelsen er basert på standardkurven fra forbindelsene selv.

5 Estimeringer av farmakokinetiske parametere

- Farmakokinetisk analyse ble utført med non-compartmental-fremgangsmåter (NCA) for data ved å benytte ILS som kalibrator (data basert på kromogen aktivitet), ved å benytte forbindelsene selv som kalibrator (data basert på ELISA). Fra dataene ble de følgende parameterne estimert: C_{max} (maksimal konsentrasjon, etter i.v.-administrering er dette på det første punktet for prøvetaking), T_{max} (tid for maksimal konsentrasjon, etter i.v.-administrering er dette det første tidspunktet), AUC_{0-∞} (areal under kurven fra tid 0 til uendelig), T_{1/2} (terminal halveringstid), CL (fjerning) og V_{ss} (volum av fordeling ved steady state). Alle beregninger ble utført ved å benytte WinNonlin Pro versjon 4.1.
- Etter i.v.-injeksjon av 280 IU/kg : BDD-FVIII, BDD-FVIII-10K PEG, BDD-FVIII-40K PEG, BDD-FVIII-2x40K PEG og BDD-FVIII-80K PEG til FVIII-KO-mus økte halveringstiden sammen med økt PEG-størrelse i området på 7,8 timer (BDD-FVIII) til 15-16 timer (tabell 4), som tilsvarer en 2 ganger økning. Likeledes ble fjerningen redeusert og MRT økte med økende PG-størrelser (tabell 4).

20

Tabell 4. Farmakokinetiske parameterestimer av FVIII glykoPEGylert med ulike størrelser av PEG etter i.v.-administrering til FVIII-KO-mus basert på kromogen aktivitet (BDD: B-domenefjernet).

Forbindelse	Dose (IU/kg)	T _{1/2} (t)	CL (ml/t/kg)	MRT (t)	Forlenging (ganger)
BDD-FVIII	280	6,7-9,3	8,1-10	9,9-11	1
BDD-FVIII 10kDa PEG (O-glykan	280	10	8,5	16	1,3
BDD-FVIII-2x40 kDa PEG	280	13	5,8	19	1,9-2,1
BDD-FVIII 40 kDa PEG (O-glykan)	280	15-16	3,6-3,8	20-22	1,7
BDD-FVIII 80 kDa PEG (O-glykan)	280	15	6,4	21	1,9

Konklusjon:

- 5 GlykoPEGylering av BDD-FVIII økte T1/2 1,3-2,1 ganger sammenlignet med BDD-FVIII etter i.v.-administrering av 280 IU/kg til FVIII-KO-mus. En økende T1/2 ble observert ettersom størrelsen på PEG-gruppen ble økt i området 10 kDa til 80 kDa PEG.

Eksempel 7

- 10 *Forlenget haemostatisk effekt av 40K-PEG-[O]-N8 sammenlignet med Advate i en FeCl3-indusert skademodel i hemofili-A-mus.*

Virkningsvarigheten av 40K-PEG-[O]-N8 versus rekombinant FVIII (Advate) ble undersøkt i en FeCl3-indusert skademodel i hemofili-A (F8-KO)-mus.

- 15 Mus ble bedøvet og plassert på en varmepute (37 °C) for å opprettholde kroppstemperatur. Halsarterien ble eksponert og en strømnings-probe (0,5PSB Nanoprobe) som måler blodstrøm ved hjelp av ultralyd ble plassert rundt arterien. Skaden (en jern-mediert kjemisk oksidasjon) ble indusert ved å påføre et filterpapir (2 x 5 mm) som kort er dyppet i en 10 % FeCl3-løsning rundt den eksponerte halsarterien. Filterpapiret ble fjernet etter 3 min. Arterien ble deretter vasket tre
- 20 ganger med 0,9 % NaCl og til slutt ble Surgilube (et akustisk kontaktmiddel) påført for å fortrenge luft i strømningsproben og sikre optimalisert måling av blodstrøm. Blodstrøm (ml/min) ble registrert i 25 minutter etter fjerning av det FeCl3-mettede filterpapiret og tiden til okklusjon ble bestemt ved å måle tiden (i min) fra fjerning av det FeCl3-mettede filterpapiret inntil blodstrømmen var 0 ml/min. Dersom
- 25 okklusjon ikke oppsto etter 25 minutter ble okklusjonstiden rapportert som 25 minutter selv om ingen okklusjon oppsto under observasjonsperioden. F8-KO-mus (n=6-10) ble behandlet med Advate (280 U/kg), 40K-PEG-[O]-N8 (280 U/kg) eller vehikkel. Den FeCl3-induserte skaden ble påført 5 minutter (akutt effekt) eller 24, 48, 60 og 72 timer etter dosering. Blodstrømmen (ml/min) ble registrert i 25
- 30 minutter etter fjerning av FeCl3, og deretter ble tiden til okklusjon bestemt.

- Ingen okklusjon oppsto i vehikkelbehandlede F8-KO-mus, mens okklusjon oppsto i alle mus behandlet med 40KDa-PEG-[O]-N8 og Advate 5 minutter etter dosering (akutt effekt) med en gjennomsnittlig okklusjonstid på henholdsvis 4,3 +/- 0,4 minutter og 5,2 +/- 0,7 minutter. I 40KDa-PEG-[O]-N8-behandlede F8-KO-mus
- 35 økte den gjennomsnittlige okklusjonstiden til 13,8 +/- 3,4 minutter ved 72 timer etter dosering. I motsetning til dette hadde de Advate-behandlede F8-KO-musene en okklusjonstid på henholdsvis 13,0 +/- 3,4 minutter og 15,9 +/- 2,9 minutter etter 24 og 48 timer. Viktig var at ingen okklusjoner ble observert 60 og 72 timer etter

administrering av Advate. I alle mus behandlet med 40KDaPEG-[O]-N8 ble okklusjon observert 24 timer etter dosering mens kun 67 % av musene behandlet med Advate okkluderte. Etter 72 timer ble okklusjon fremdeles observert i 63 % av musene behandlet med 40KDa-PEG-[O]-N8, mens ingen okklusjon ble observert 60 og 72 timer etter administrering med Advate.

Forlenget effekt av 40KDa-PEG-[O]-N8 i F8-KO-mus.

Den FeCl₃-induserte skaden ble påført 5 minutter (akutt effekt), 24, 48, 60 og 72 timer etter dosering 280 IU/kg 40KDa-PEG-[O]-N8, 280 IU/kg Advate eller vehikkel. Blodstrømmen (ml/min) ble registrert i 25 minutter etter fjerning av FeCl₃, og deretter ble tiden til okklusjon bestemt. Ved 60 og 72 timer etter dosering oppsto ingen okklusjon i mus dosert med Advate. Gjennomsnitt og SEM for 6-10 mus per gruppe er vist. Tid til okklusjon mellom de ulike gruppene ble sammenlignet ved å benytte Kruskal-Wallis-test inkludert Dunns post-test.*: p<0,05,**: p<0,01.

I konklusjon er den hemostatiske effekten av 40KDa-PEG-[O]-N8 vesentlig forlenget sammenlignet med Advate i en FeCl₃-indusert skademodell i F8-KO-mus.

PATENTKRAV

1. Faktor VIII-molekyl med trunkert B-domene med en modifisert sirkulatorisk halveringstid, der nevnte molekyl er kovalent konjugert med en hydrofil polymer via et O-bundet oligosakkarid i det trunkerte B-domenet, der:
 - 5 (i) faktor VIII-aktivering fører til fjerning av den kovalent konjugerte, hydrofile polymeren,
 - (ii) tungkjede- og lettkjede-enhetene på FVIII-forløperpolypeptidet er separert med en linker, der sekvensen til linkeren er avledet fra FVIII-B-domenet, og
 - (iii) linkeren omfatter et gjenkjenningssete for proteasen som separerer det B-
 - 10 domenetrunkerte FVIII-forløperpolypeptidet inn i den lette og tunge kjeden.
2. Molekyl ifølge krav 1, der lengden på B-domenet er 20-30 aminosyrer.
3. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-2, der den hydrofile polymeren er PEG.
- 15 4. Molekyl ifølge krav 3, der størrelsen på PEG er fra omtrent 10 000 til omtrent 160 000 Da.
5. Molekyl ifølge krav 4, der størrelsen på PEG er omtrent 40 000 Da.
- 20 6. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-2, der den hydrofile polymeren er polysakkarid.
7. Molekyl ifølge krav 6, der polysakkaridet er polysialinsyre.
- 25 8. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-7, omfattende aminosyresekvensen ifølge SEQ ID nr. 2.
9. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-7, der det trunkerte B-domenet er én
- 30 aminosyre kortere enn SEQ ID nr. 2.
10. Farmasøytisk sammensetning omfattende et molekyl ifølge ethvert av kravene 1-9.
- 35 11. Fremgangsmåte for fremstilling av et molekyl ifølge ethvert av kravene 1-9, der nevnte fremgangsmåte omfatter å konjugere et Faktor VIII-molekyl med trunkert B-domene med en hydrofil polymer via et O-bundet oligosakkarid på det trunkerte B-domenet.
- 40 12. Molekyl som kan oppnås ved en fremgangsmåte ifølge krav 11.

13. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-9 og 12 til anvendelse som et medikament til behandlingen av hemofili.
- 5 14. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-9 og 12, eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 10, til anvendelse i behandlingen av hemofili ved subkutan administrering.
- 10 15. Molekyl ifølge ethvert av kravene 1-9 og 12, eller en farmasøytisk sammensetning ifølge krav 10, til anvendelse i behandlingen av hemofili ved intravenøs administrering.

SEKVENSLISTING

<110> Novo Nordisk AS

DeFrees Shaw

<120> Konjugerte Faktor VIII Molekyler

<130> 101961-5191WO

<140>

<141> 2009-02-25

<150> us 61/032,006

<151> 2008-02-27

<150> us 61/043,354

<151> 2008-04-08

<150> us 61/058,869

<151> 2008-06-04

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Asp	Tyr
1				5					10					15	

Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Phe	Pro	Pro
			20					25					30		

Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	Tyr	Lys	Lys
		35					40					45			

Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	Ala	Lys	Pro
50						55					60				

Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	Ala	Glu	Val
65					70					75					80

Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	His	Pro	Val
				85					90					95	

Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala
			100					105					110		

GLU	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	Lys	Val
		115					120					125			

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735
 Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Thr Arg
 740 745 750
 Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp Ile Glu Lys
 755 760 765
 Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys Ile Gln Asn
 770 775 780
 Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser Pro Thr Pro
 785 790 795 800
 His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr Glu Thr Phe
 805 810 815
 Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn Ser Leu Ser
 820 825 830
 Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895

Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910

Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925

Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940

Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960

Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
 965 970 975

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990

Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005

Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020

Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035

Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050

Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065

Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080

Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095

Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110

Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125

Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140

Leu	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Val	Val	Gly	Lys	Gly	Glu	Phe	Thr
	1145					1150					1155			
Lys	Asp	Val	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro	Ser	Ser	Arg	Asn
	1160					1165					1170			
Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu	Asn	Asn	Thr	His
	1175					1180					1185			
Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Lys	Glu	Thr
	1190					1195					1200			
Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile	His	Thr	Val	Thr
	1205					1210					1215			
Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Thr	Arg
	1220					1225					1230			
Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Pro	Val	Leu
	1235					1240					1245			
Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn	Arg	Thr	Lys	Lys
	1250					1255					1260			
His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Glu
	1265					1270					1275			
Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu	Lys	Tyr	Ala	Cys
	1280					1285					1290			
Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln	Asn	Phe	Val	Thr
	1295					1300					1305			
Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg	Leu	Pro	Leu	Glu
	1310					1315					1320			
Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Thr
	1325					1330					1335			
Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Thr
	1340					1345					1350			
Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala	Ile	Thr	Gln	Ser
	1355					1360					1365			
Pro	Leu	Ser	Asp	cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
	1370					1375					1380			

Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Ser
	1385					1390					1395			
Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe	Gln	Asp	Asn	Ser
	1400					1405					1410			
Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Val
	1415					1420					1425			
Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu
	1430					1435					1440			
Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu
	1445					1450					1455			
Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser	Val	Thr	Tyr	Lys
	1460					1465					1470			
Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Thr
	1475					1480					1485			
Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His	Ile	Tyr	Gln	Lys
	1490					1495					1500			
Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Leu
	1505					1510					1515			
Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile
	1520					1525					1530			
Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Phe	Leu	Arg
	1535					1540					1545			
Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser	Lys	Leu	Leu	Asp
	1550					1555					1560			
Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln	Ile	Pro	Lys	Glu
	1565					1570					1575			
Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Ala	Phe	Lys
	1580					1585					1590			
Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys	Glu	Ser	Asn	His
	1595					1600					1605			
Ala	He	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu
	1610					1615					1620			

Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	Gln
	1625					1630					1635			
Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr
	1640					1645					1650			
Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile
	1655					1660					1665			
Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp
	1670					1675					1680			
Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr
	1685					1690					1695			
Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser
	1700					1705					1710			
Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro
	1715					1720					1725			
Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe
	1730					1735					1740			
Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu
	1745					1750					1755			
Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	Val
	1760					1765					1770			
Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser
	1775					1780					1785			
Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg
	1790					1795					1800			
Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys
	1805					1810					1815			
Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys
	1820					1825					1830			
Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His
	1835					1840					1845			
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu
	1850					1855					1860			

Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu
	1865					1870					1875			
Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu
	1880					1885					1890			
Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu
	1895					1900					1905			
Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly
	1910					1915					1920			
Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln
	1925					1930					1935			
Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile
	1940					1945					1950			
His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys
	1955					1960					1965			
Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe
	1970					1975					1980			
Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val
	1985					1990					1995			
Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu
	2000					2005					2010			
Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala
	2015					2020					2025			
Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr
	2030					2035					2040			
Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser
	2045					2050					2055			
Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val
	2060					2065					2070			
Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly
	2075					2080					2085			
Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile
	2090					2095					2100			

[illegible]

<210> 2

<211> 1445

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> B-domene trunkert human Faktor VIII

<400> 2

Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Asp	Tyr	1	5	10	15
Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	Phe	Pro	Pro	20	25	30	
Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	Tyr	Lys	Lys	35	40	45	
Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	Ala	Lys	Pro	50	55	60	
Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	Ala	Glu	Val	65	70	75	80
Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	His	Pro	Val	85	90	95	
Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Ala	100	105	110	
Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	Asp	Lys	Val	115	120	125	
Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	Lys	Glu	Asn	130	135	140	
Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	Tyr	Leu	Ser	145	150	155	160
His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Ala	Leu	165	170	175	
Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	Gln	Thr	Leu	180	185	190	
His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	Lys	Ser	Trp	195	200	205	
His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	Ala	Ala	Ser	210	215	220	

Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	Val	Asn	Arg
225					230					235					240
Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	Tyr	Trp	His
				245					250					255	
Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu
			260					265					270		
Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile
		275					280					285			
Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Gly
	290					295					300				
Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	Asp	Gly	Met
305					310					315					320
Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg
				325					330					335	
Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp
			340					345					350		
Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe
		355					360					365			
Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His
	370					375					380				
Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu
385					390					395					400
Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro
				405					410					415	
Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr
			420					425					430		
Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile
		435					440					445			
Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile
							455								
											460				
Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile
465					470					475					480

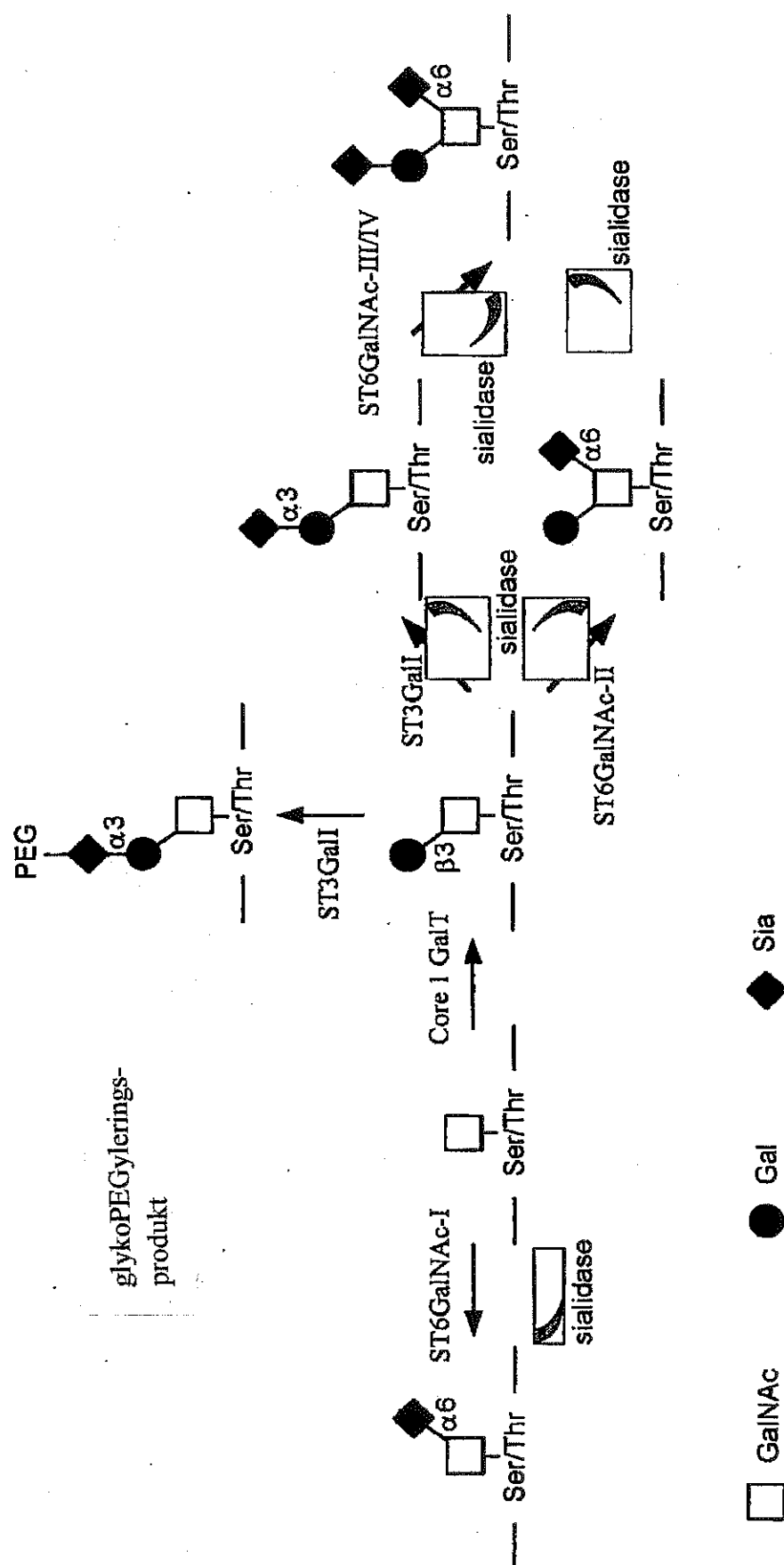
Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr
 645 650 655
 Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro
 660 665 670
 Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp
 675 680 685
 Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala
 690 695 700
 Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu
 705 710 715 720
 Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys Asn Asn Ala
 725 730 735

Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn
 740 745 750
 Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu
 755 760 765
 Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu
 770 775 780
 Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser
 785 790 795 800
 Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val
 805 810 815
 Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg
 820 825 830
 Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe
 835 840 845
 Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu
 850 855 860
 Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val
 865 870 875 880
 Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr
 885 890 895
 Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 900 905 910
 Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr
 915 920 925
 Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp
 930 935 940
 Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val
 945 950 955 960
 His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu
 965 970 975
 Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe
 980 985 990

Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met
		995					1000						1005		
Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	
	1010					1015					1020				
Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	
	1025					1030					1035				
Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	
	1040					1045					1050				
Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	
	1055					1060					1065				
Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	
	1070					1075					1080				
Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	
	1085					1090					1095				
Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	
	1100					1105					1110				
Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	
	1115					1120					1125				
Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	
	1130					1135					1140				
His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	
	1145					1150					1155				
Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	
	1160					1165					1170				
Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val	Asp	Leu	
	1175					1180					1185				
Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly	Ala	Arg	
	1190					1195					1200				
Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile	Met	Tyr	
	1205					1210					1215				
Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn	Ser	Thr	
	1220					1225					1230				

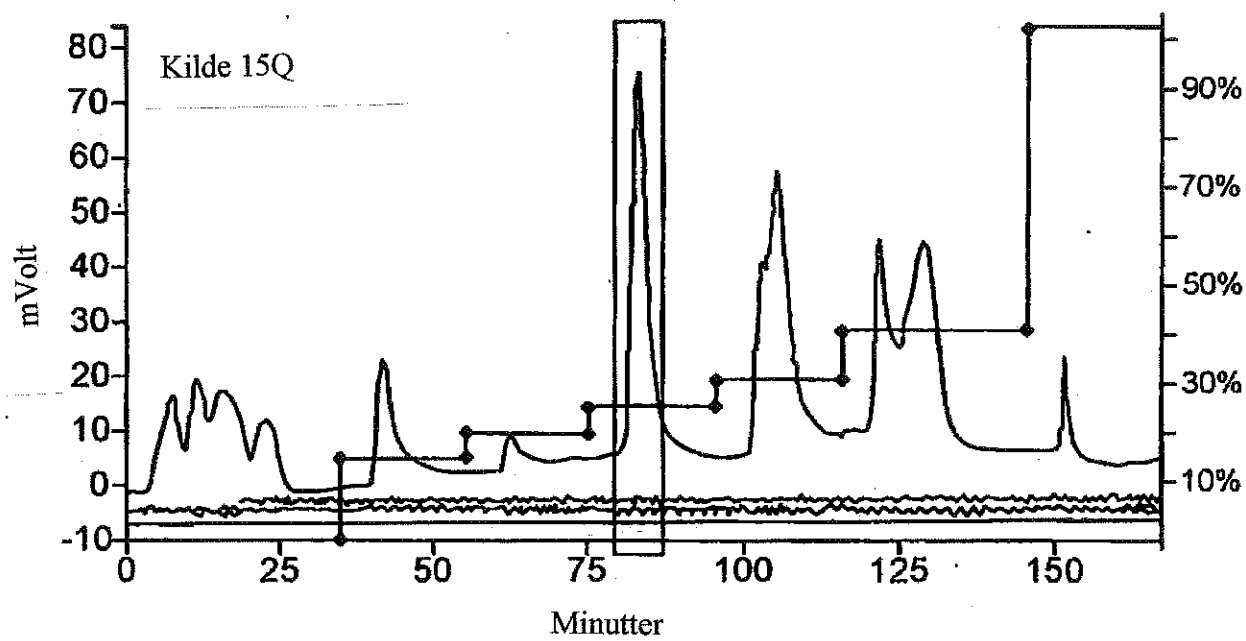
Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile
 1235 1240 1245
 Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg
 1250 1255 1260
 Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu
 1265 1270 1275
 Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met
 1280 1285 1290
 Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr
 1295 1300 1305
 Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu
 1310 1315 1320
 His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn
 1325 1330 1335
 Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
 1340 1345 1350
 Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met
 1355 1360 1365
 Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln
 1370 1375 1380
 Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
 1385 1390 1395
 Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro
 1400 1405 1410
 Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His
 1415 1420 1425
 Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp
 1430 1435 1440
 Leu Tyr
 1445

FIGUR 1



2/8

FIGUR 2

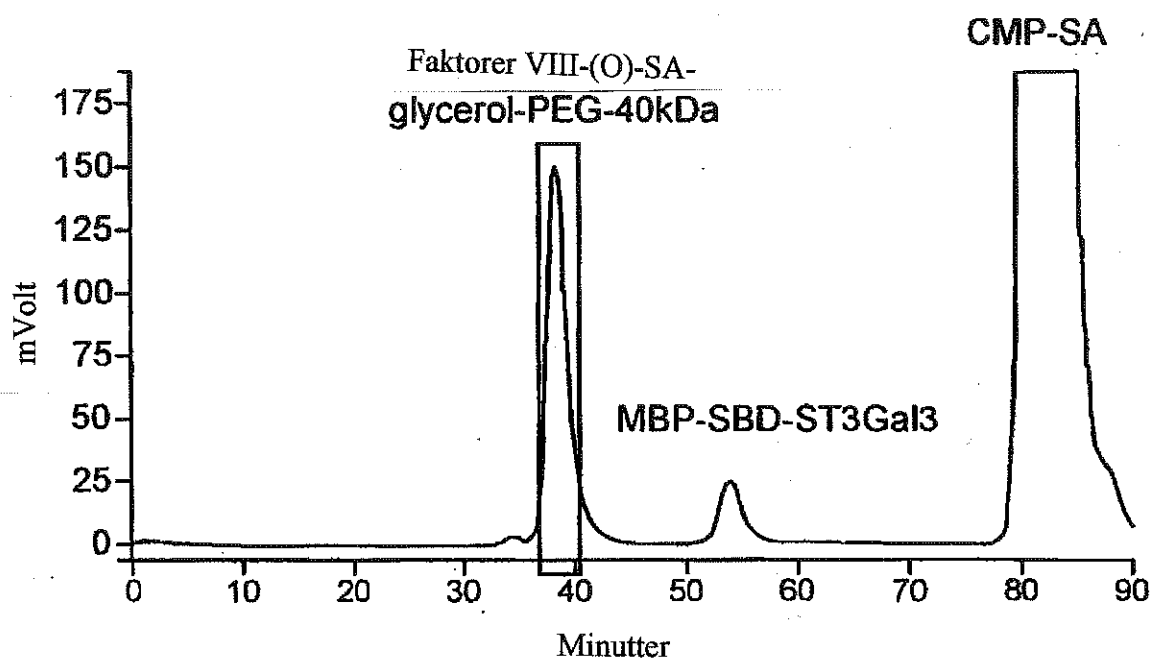


Produktfraksjon

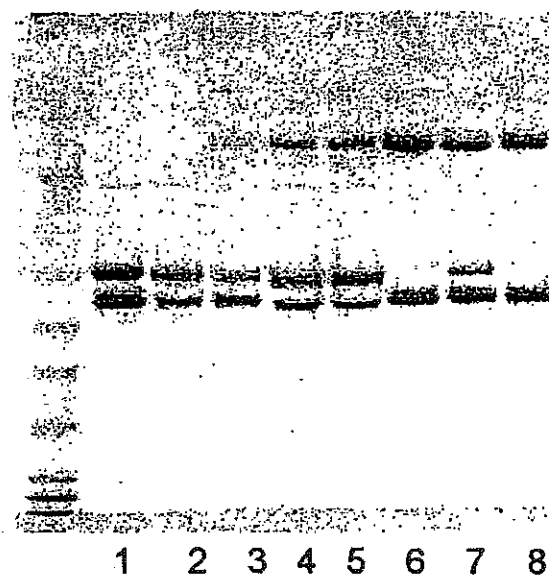


3/8

FIGUR 3

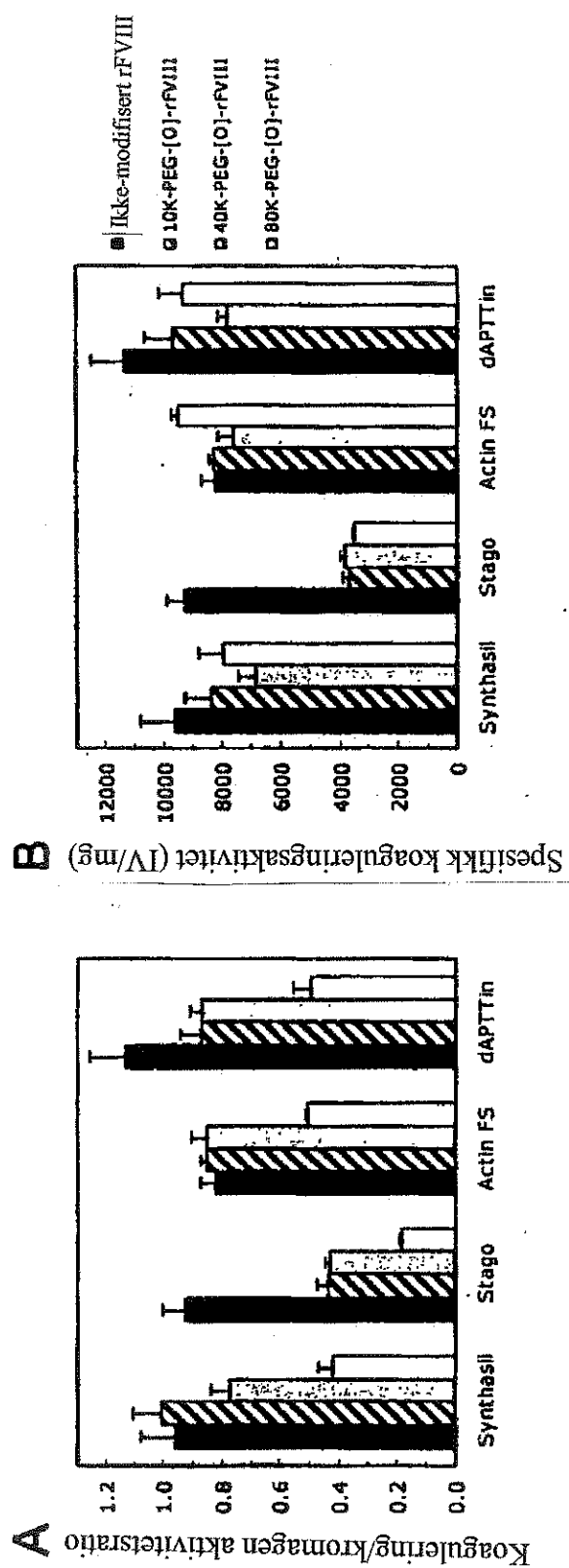


Spor 1; Faktor VIII (konsentrert)
 Spor 2; GlykoPEGylering, 0 timer
 Spor 3; GlykoPEGylering, 20 timer
 Spor 4; GlykoPEGylering, 43 timer
 Spor 5; GlykoPEGylering, 49 timer
 Spor 6; Kilde 15Q Produkt
 Spor 7; Kappingsreaksjon (11 timer)
 Spor 8; Superdex 200 Renset produkt



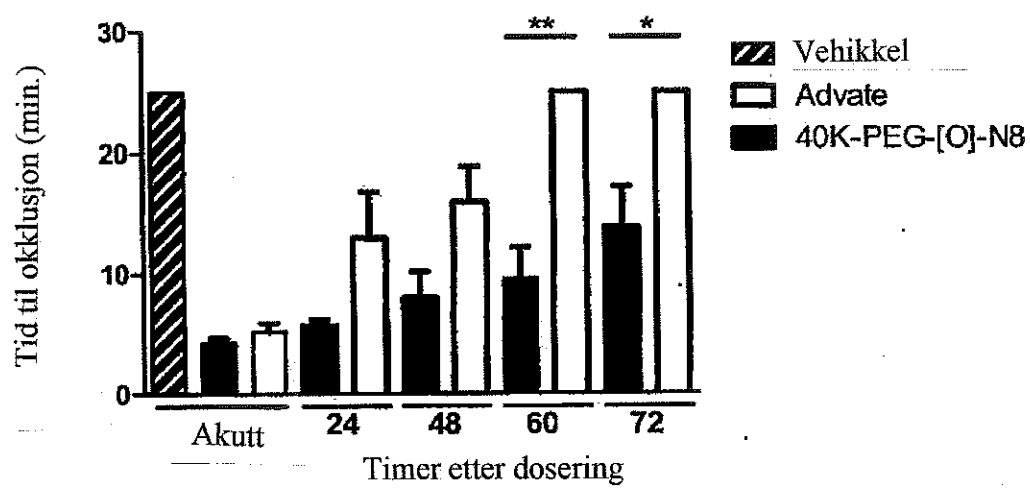
4/8

FIGUR 4



5/8

FIGUR 5



6/8

FIGUR 6

Medium



Innfanging: Capto MMC



Affinitetskromatografi: F25-antistoff



Anionbytterkromatografi



Gelfiltrering



Anionbytterkromatografi



GlykoPEGylering



Anionbytterkromatografi



Gelfiltrering



Sialylering (kapping)



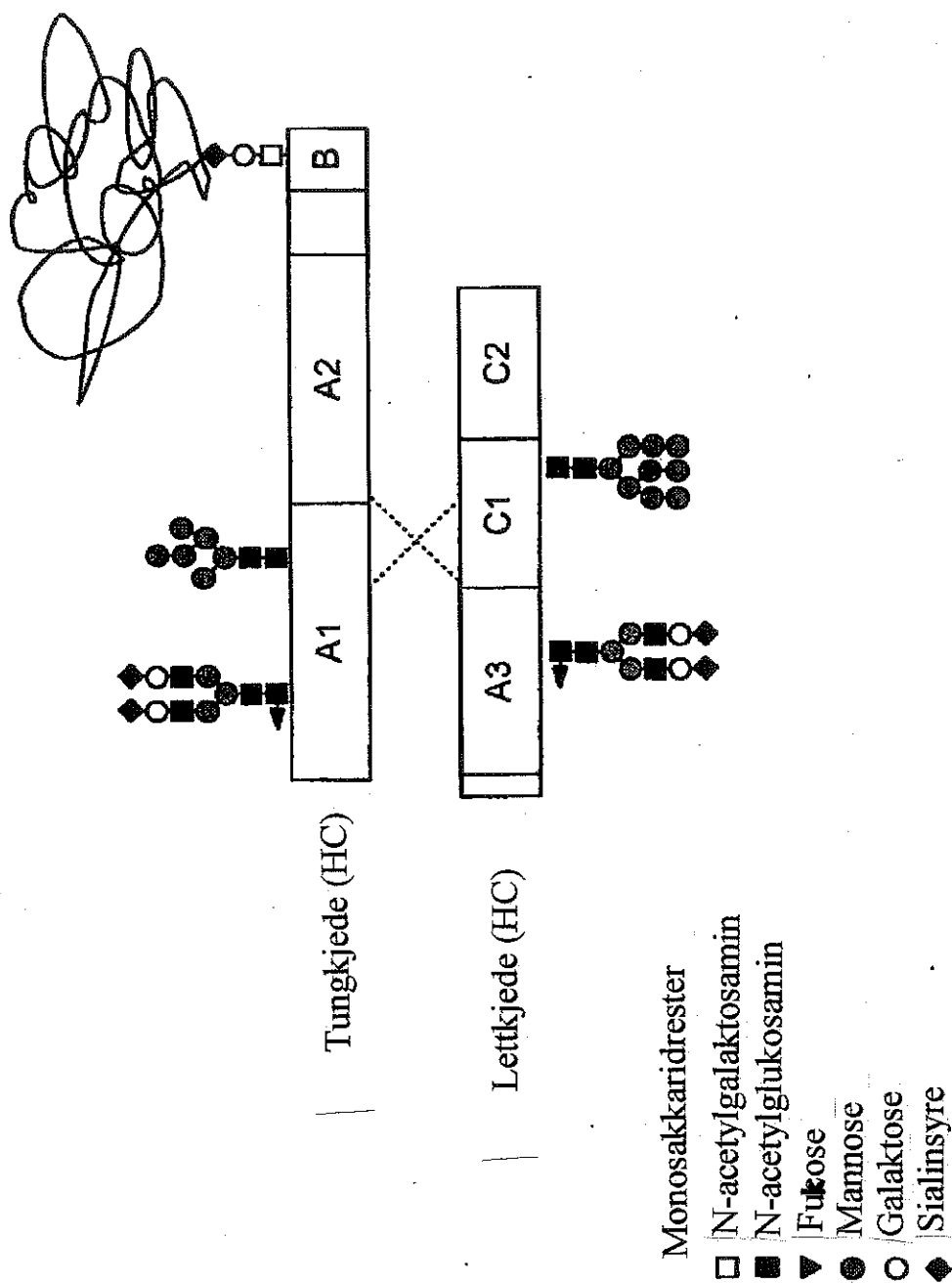
Gelfiltrering



GlykoPEGylert Faktor VIII

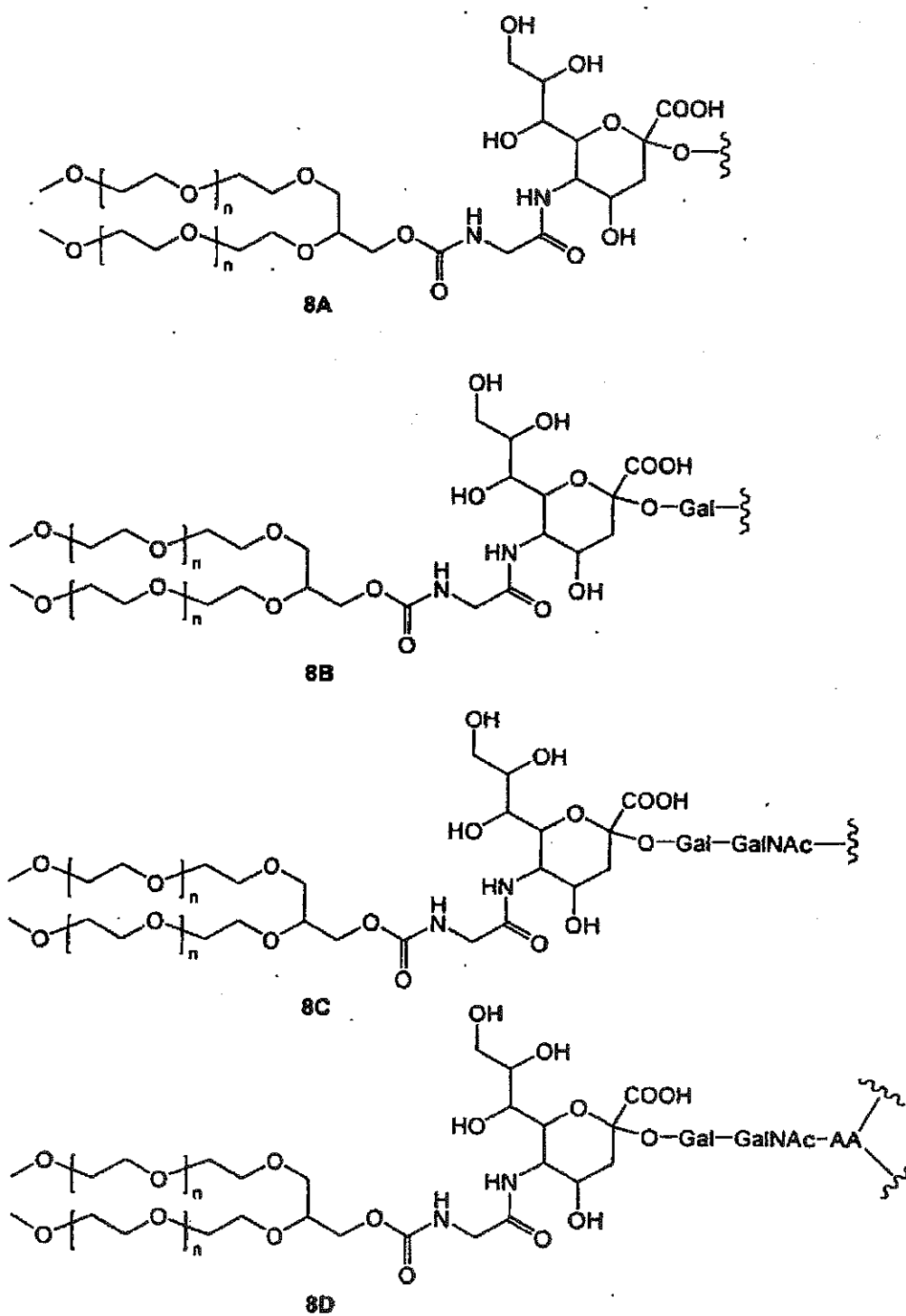
7/8

FIGUR 7



8/8

FIGUR 8


 $n > 400$ (eg ~ 455); $n > 900$ (eg ~ 910)