



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2318050 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/745 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.01.12
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.09.03
(86)	Europeisk søknadsnr	09790935.2
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.07.29
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.05.11
(30)	Prioritet	2008.08.01, US, 184567
(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 SM TR
(73)	Innehaver	Baxter International Inc., One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015, US-USA Baxter Healthcare SA, Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), CH-Sveits
(72)	Oppfinner	TURECEK, Peter, Weidling Hauptstrasse 59g, A-3400 Klosterneuburg, AT-Østerrike SIEKMANN, Juergen, Gerasdorfer Strasse 153/209, A-1210 Vienna, AT-Østerrike
(74)	Fullmektig	Curo AS, Industriveien 53, 7080 HEIMDAL, Norge

(54)	Benevnelse	Faktor VIII polymerkonjugater
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2008/074032 WO-A2-2006/071801 WO-A2-2008/025856 US-A1- 2007 244 301 US-A1- 2009 076 237 ZALIPSKY S ET AL: "HYDRAZIDE DERIVATIVES OF POLY(ETHYLENE GLYCOL) AND THEIR BIOCONJUGATES" WATER-SOLUBLE POLYMERS: SYNTHESIS, SOLUTION PROPERTIES AND APPLICATIONS, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, DC, US, 1 January 1997 (1997-01-01), pages 318-341, XP008064423 ISBN: 978-0-541-23408-9 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 DATABASE EMBASE [Online] ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL 1980 GEOGHEGAN K F ET AL: 'Periodate inactivation of ovotransferrin and human serum transferrin' Database accession no. EMB-1981102465 & GEOGHEGAN K F ET AL: "Periodate inactivation of ovotransferrin and human serum transferrin", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY 1980 US, vol. 255, no. 23, 1980, pages 11429-11434, ISSN: 0021-9258 LENTING PETER J ET AL: "The life cycle of coagulation factor VIII in view of its structure and function", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 92, no. 11, 1 December 1998 (1998-12-01), pages 3983-3996, XP002333863, ISSN: 0006-4971 ZENG YING ET AL: "High-efficiency labeling of sialylated glycoproteins on living cells", NATURE METHODS, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 6, no. 3, 1 March 2009 (2009-03-01), pages 207-209, XP002605857, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/NMETH.1305 [retrieved on 2009-02-22] PARTI R ET AL: "In vitro stability of recombinant human factor VIII (Recombinate)", HAEMOPHILIA, BLACKWELL SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 6, no. 5, 1 September 2000 (2000-09-01), pages 513-522, XP002694464, ISSN: 1351-8216, DOI: 10.1046/J.1365-2516.2000.00410.X [retrieved on 2001-12-25]

Beskrivelse**OPPFINNELSENS OMRÅDE**

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen er relatert til et proteinholdig produkt som omfatter koaguleringsfaktor VIII (FVIII) som er bundet til i det minste en vannløselig polymer, inkludert et poly(alkylenoksid), slik som polyetylenglykol. Den foreliggende oppfinnelsen er videre relatert til framgangsmåter for forlenging av *in vivo* halveringstid av FVIII i blodet hos et pattedyr med en bløderforstyrrelse forbundet med funksjonelle defekter eller mangler i FVIII.

OPPFINNELSENS BAKGRUNN

[0002] Koaguleringsfaktor VIII (FVIII) sirkulerer i plasma ved en svært lav konsentrasjon og er bundet ikke-kovalent til von Willebrand faktor (VWF). Under hemostase blir FVIII separert fra VWF og virker som en kofaktor for aktivert faktor IX (FIXa)-mediert faktor X (FX) -aktivering ved å fremme raten for aktivering i nærvær av kalsium og fosfolipider eller cellemembraner.

[0003] FVIII syntetiseres som en enkeltkjedet forløper på om lag 270-330 kD med domenestrukturen A1-A2-B-A3-C1-C2. Når renses fra plasma (for eksempel "plasma-avledet" eller "plasmatisk"), er FVIII sammensatt av en tung kjede (A1-A2-B) og en lett kjede (A3-C1-C2). Molmassen av den lette kjeden er 80 kD mens den tunge kjeden er i området 90-220 kD grunnet proteolyse i B-domenet.

[0004] FVIII blir også syntetisert som et rekombinant protein for terapeutisk bruk i blødningsforstyrrelser. Ulike analyser *in vitro* har blitt utviklet for å bestemme den potensielle effekt av rekombinant FVIII (rFVIII) som en terapeutisk medisin. Disse analysene speiler effektene *in vivo* av endogent FVIII. *In vitro* trombinbehandling av FVIII medfører en rask økning og påfølgende reduksjon i dens prokoagulante aktivitet, målt ved analyser *in vitro*. Denne aktivering og inaktivering sammenfaller med spesifikk begrenset proteolyse både i de tunge og de lette kjedene, som endrer tilgjengeligheten av ulike bindende epitoper i FVIII, for eksempel tillates FVIII å dissosiere fra VWF og bindes til en fosfolipidoverflate eller endre bindingsevnen til visse monoklonale antistoffer.

[0005] Mangelen eller feilfunksjonen av FVIII er forbundet med den hyppigst forekommende blødningsforstyrrelse, hemofili A. Behandlingen av valget for håndtering av hemofili A er erstatningsterapi med plasmaavledet eller rFVIII-konsentrater. Pasienter med alvorlig hemofili A med FVIII-nivå under 1 %, er generelt på profylaktisk terapi med det formål å holde

FVIII over 1 % mellom doser. Ved å ta i betraktning de midlere halveringstider for de ulike FVIII-produktene i sirkulasjonen, kan dette vanligvis oppnås ved å gi FVIII to til tre ganger i uka.

[0006] Det finnes mange konsentrater på markedet for behandlingen av hemofili A. Ett av disse konsentratene er det rekombinante produktet Advate®, som framstilles i CHO-celler og produseres av Baxter Healthcare Corporation. Ingen humane eller animalske plasmaproteiner eller albumin blir tilsatt i cellekultiveringsprosessen, rensingen eller sluttformuleringen av dette produktet.

[0007] Formålet for mange produsenter av FVIII-konsentrater og terapeutiske polypeptidmedikamenter er å utvikle et neste generasjons produkt med forbedrede farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper, og samtidig opprettholde alle andre produktkarakteristikker.

[0008] Terapeutiske polypeptidmedikamenter blir raskt degradert av proteolytiske enzymer og nøytralisert av antistoffer. Dette reduserer deres halveringstid og sirkulasjonstid, for derved å begrense deres terapeutiske effekt. Tilsatsen av en løselig polymer eller karbohydrat til et polypeptid har vist seg å hindre degradering og økning av polypeptidenes halveringstid. For eksempel vil PEGylering av polypeptidmedikamenter beskytte dem og forbedre deres farmakodynamiske og farmakokinetiske profiler (Harris J M et Chess R B, Nat Rev Drug Discov 2003;2:214-21). PEGyleringsprosessen fester repeterende enheter av polyetylenglykol (PEG) til et polypeptidmedikament. PEGylering av molekyler kan føre til økt motstand hos medikamenter mot enzymatisk degradering, økt halveringstid *in vivo*, redusert doseringsfrekvens, redusert immunogenisitet, økt fysikalsk og termisk stabilitet, økt løselighet, økt vækestabilitet, og redusert aggregering.

[0009] Tilsatsen av en løselig polymer, slik som ved PEGylering, er følgelig en tilnærming for å fremme egenskapene ved et FVIII-produkt. Den kjente teknikk er dokumentert av ulike patenter og patentsøknader:

[0010] US patentskrift 6,037,452 beskriver en poly(alkylenoksid)-FVIII eller et FIX-konjugat, der proteinet er bundet kovalent til et poly(alkylenoksid) gjennom karbonyl-grupper i denne FVIII.

[0011] WO2008025856 beskriver et B-domene-slettet FVIII bundet til polyetylenglykol gjennom oksiderte karbohydratrester.

[0012] EP1258497B1 beskriver en framgangsmåte for framstilling av konjugater av FVIII og en biokompatibel polymer. Dette patent ble supplert med en publisasjon av Röstin et al. (Bioconj

Chem 2000; 11:387-96). Konjugatene omfatter en B-domene-slettet rekombinant FVIII modifisert med mono-metoksy-polyetylenglykol. Konjugatet hadde redusert FVIII-funksjon og den koagulerende aktiviteten avtok raskt med graden av modifisering.

5 [0013] WO04075923 A3 beskriver polymer-FVIII molekylært konjugat omfattende et flertall konjugater der hvert konjugat har en til tre vannløselige polymerer kovalent bundet til et FVIII-molekyl. FVIII-molekylet er B-domene-slettet.

[0014] US patentskrift 4,970,300 beskriver en modifisert FVIII, der et usmeltelig konjugat omfattende et protein med FVIII-aktivitet ble bundet kovalent til en ikke-antigenisk ligand.

10 [0015] US patentskrift 6,048,720 beskriver konjugater av et polypeptid og en biokompatibel polymer.

[0016] WO94/15625 beskriver FVIII bundet til polyetylenglykol med en foretrukket molvekt på maksimalt 5 000 Dalton.

15 [0017] Det foreligger et behov for en FVIII med en løselig polymer bundet til samme for å forlenge halveringstiden av FVIII *in vivo*, for eksempel en PEGylert FVIII, slik som full-lengde FVIII med PEG over 10 000 Dalton konjugert til samme, som beholder funksjonell aktivitet og samtidig framskaffer en forlenget halveringstid *in vivo*, sammenliknet med ikke-PEGylert FVIII.

SAMMENDRAG AV OPPFINNELSEN

20 [0018] Den foreliggende oppfinnelsen er relatert til en framgangsmåte for konjugering av PEG, polysialsyre (PSA) eller dekstran til en oksidert karbohydratrest fra Faktor VIII i henhold til krav 1. Den foreliggende oppfinnelsen er også relatert til et proteinholdig molekyl i henhold til krav 6.

25 [0019] I henhold til den foreliggende oppfinnelsen er det framskaffet en framgangsmåte for konjugering av en vannløselig polymer til en oksidert karbohydratrest fra FVIII omfattende trinnene med å kontakte den oksiderte karbohydratresten med en aktivert vannløselig polymer under betingelser som tillater konjugering. Den vannløselige polymeren er valgt fra gruppen bestående av PEG, polysialsyre (PSA) og dekstran. Den aktiverte vannløselige polymeren er valgt fra gruppen bestående av PEG-hydrazid, PSA-hydrazin og aldehyd-aktivert dekstran. I et annet aspekt av oppfinnelsen oksideres karbohydratresten ved inkubering i en buffer omfattende NaIO₄. I nok et annet aspekt av oppfinnelsen er den oksiderte karbohydratresten fra FVIII lokalisert i B-domenet av FVIII.

[0020] I en annen utførelsesform av oppfinnelsen er det framskaffet en modifisert FVIII produsert med framgangsmåten i henhold til en av de forannevnte framgangsmåtene. I henhold til den foreliggende oppfinnelsen er det framskaffet et proteinholdig molekyl omfattende (a) et Faktor VIII-molekyl; og (b) i det minste en vannløselig polymer bundet til dette Faktor VIII-molekylet, der

5 den vannløselige polymeren er festet til Faktor VIII via en eller flere karbohydratrester lokalisert i B-domenet Faktor VIII. Den vannløselige polymeren er valgt fra gruppen bestående av PEG, PSA og dekstran.

FIGURER

[0021]

10 FIG. 1 viser utvidelsen og masseøkningen av FVIII etter konjugering med PEG målt ved SDS-PAGE med påfølgende immunofarging.

FIG. 2 viser farmakokinetikken for PEG-rFVIII-konjugat sammenliknet med ikke-konjugert FVIII i hemofil mus. Åpne kvadrat: PEGrFVIII, dose 200 IU FVIII/kg. Lukkede diamanter: naturlig rFVIII, dose 200 IU FVIII/kg.

15 FIG. 3 viser den detaljerte analyse av PEGyleringsseter ved SDS-PAGE ved bruk av ulike anti FVIII antistoffer.

FIG. 4 viser den trombin-induserte aktivering og inaktivering av naturlig og PEGylert rFVIII.

FIG. 5 viser båndene som viser domenene i naturlig og PEGylert rFVIII.

FIG. 6 viser graden av PEGylering av ulike domener av naturlig PEGylert rFVIII.

20 FIG. 7 viser trombininaktiveringsrate for naturlig og PEGylert rFVIII.

DETALJERT BESKRIVELSE AV OPPFINNELSEN

[0022] Oppfinnelsen er en proteinholdig konstruksjon som omfatter et FVIII-molekyl med i det minste en del av B-domenet intakt, bundet til en vannløselig polymer som inkluderer PEG, polysialsyre (PSA) eller dekstran. I en utførelsesform av oppfinnelsen er den vannløselige

25 polymeren et polyetylenglykolemolekyl med en molvekt på mer enn 10,000 Dalton. I en annen utførelsesform har den vannløselige polymeren en molvekt på mer enn 10 000 Da til om lag 125,000 Da, om lag 15,000 Da til 20,000 Da, eller om lag 18,000 Da til om lag 25,000 Da. I en utførelsesform beholder konstruksjonen hele sin funksjonelle aktivitet som standard terapeutiske

FVIII-produkter og framskaffer en forlenget halveringstid *in vivo* sammenliknet med standard terapeutiske FVIII-produkter. I en annen utførelsesform beholder konstruksjonen minst 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, 5 eller 150 prosent (%) biologisk aktivitet relativt til naturlig Faktor VIII. I et relatert aspekt bestemmes de biologiske aktiviteter av konstruksjonen og den naturlige Faktor VIII av forholdene for kromogen aktivitet mot FVIII antigen-verdi (FVIII:Chr:FVIII:Ag). I nok en utførelsesform av oppfinnelsen, blir halveringstiden for konstruksjonen redusert eller økt med et multiplum på 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, eller 10 i forhold til halveringstid *in* 10 *vivo* for naturlig Faktor VIII.

[0023] Utgangsmaterialet for den foreliggende oppfinnelsen er FVIII, som kan være avledet fra humant plasma eller produsert ved rekombinante konstruksjonsteknikker, som beskrevet i US patentskrift 4,757,006; US patentskrift 5,733,873; US patentskrift 5,198,349; US patentskrift 5,250,421; US patentskrift 5,919,766; EP 306 968.

15 **[0024]** Her viser betegnelsen "Faktor VIII" eller "FVIII" til ethvert FVIII-molekyl som har i det minste en del av B-domenet intakt og som oppviser biologisk aktivitet som er forbundet med naturlig FVIII. I en utførelsesform av oppfinnelsen er FVIII-molekylet full-lengde Faktor VIII. FVIII-molekylet er et protein som kodes for av DNA-sekvenser med evne til å hybridisere til DNA-kodende Faktor VIII:C. Et slikt protein kan inneholde aminosyreslettinger ved ulike seter mellom eller inne i 20 domene A1-A2-B-A3-C1-C2 (US patentskrift 4,868,112). FVIII-molekylet kan også være en analog av naturlig FVIII der en eller flere aminosyrerester har blitt erstattet ved sete-rettet mutagenese.

[0025] FVIII-molekylene som er nyttige i den foreliggende oppfinnelsen inkluderer full-lengdeproteinet, forløpere for proteinet, biologisk aktive eller funksjonelle underenheter eller fragmenter av proteinet og funksjonelle derivater av samme, samt varianter av samme som 25 beskrevet her nedenfor. Henvisning til FVIII er ment å inkludere alle potensielle former av slike proteiner og der hver form av FVIII har i det minste en del av eller hele den naturlige B-domenesekvensen intakt.

[0026] I henhold til den foreliggende oppfinnelsen, kan betegnelsen "rekombinant Faktor VIII (rFVIII)" inkludere enhver rFVIII, heterolog eller naturlig forekommende, framskaffet via 30 rekombinant DNA-teknologi, eller et biologisk aktivt derivat av samme. I visse utførelsesformer omfatter betegnelsen proteiner som beskrevet foran og nukleinsyrer, som koder for en rFVIII ifølge oppfinnelsen. Slike nukleinsyrer inkluderer for eksempel, gener, pre-mRNA, mRNA,

polymorfe varianter, alleler, syntetiske og naturlig forekommende mutanter. Proteiner som omfattes av betegnelsen rFVIII inkluderer for eksempel de proteiner og polypeptider som er beskrevet her foran, proteiner kodet av en nukleinsyre beskrevet foran, homologer fra ulike arter og andre polypeptider som: (1) har en aminosyresekvens som har mer enn om lag 60 %, om lag 65
 5 %, om lag 70 %, om lag 75 %, om lag 80 %, om lag 85 %, om lag 90 %, om lag 91 %, om lag 92 %, om lag 93 %, om lag 94 %, om lag 95 %, om lag 96 %, om lag 97 %, om lag 98 % eller om lag 99 % eller større aminosyresekvens-identitet, over et område på minst om lag 25, om lag 50, om lag 100, om lag 200, om lag 300, om lag 400, eller flere aminosyrer (opp til full-lengdesekvensen på 406 aminosyrer for det modne naturlige proteinet), til et polypeptid kodet av en referert
 10 nukleinsyre eller en aminosyresekvens beskrevet her; og/eller (2) bindes spesifikt til antistoffer, for eksempel, polyklonale eller monoklonale antistoffer, generert mot et immunogen som omfatter en referert aminosyresekvens som beskrevet her, et immunogent fragment av samme og/eller en konservativt modifisert variant av samme.

[0027] Polynukleotider som koder for en rFVIII ifølge oppfinnelsen inkluderer de som (1) spesifikt
 15 hybridiserer under stringente hybridiseringsbetingelser til en nukleinsyre som koder for en referert aminosyresekvens som beskrevet her, og konservativt modifiserte varianter av samme; (2) har en nukleinsyresekvens som har mer enn om lag 95 %, om lag 96 %, om lag 97 %, om lag 98 %, om lag 99 %, eller større nukleotidsekvens-identitet, over et område på minst om lag 25, om lag 50, om lag 100, om lag 150, om lag 200, om lag 250, om lag 500, om lag 1000, eller flere nukleotider (opp
 20 til full-lengdesekvensen på 1218 nukleotider av det modne proteinet), til en referansenukleinsyresekvens som beskrevet her.

[0028] Som brukt her, inkluderer "endogen FVIII" FVIII som har opphav fra pattedyret som skal motta behandling. Betegnelsen inkluderer også FVIII transkribert fra et transgen eller ethvert annet fremmed DNA til stede i dette pattedyret. Som brukt her, inkluderer "eksogen FVIII" FVIII
 25 som ikke har opphav fra dette pattedyret.

[0029] Variant- (eller analoge) polypeptider inkluderer innskuddsvarianter, hvorved en eller flere aminosyrerester er addert til en FVIII-aminosyresekvens ifølge oppfinnelsen. Innsettinger kan være lokalisert ved en eller begge ender av proteinet og/eller kan være posisjonert innenfor interne områder av FVIII-aminosyresekvensen. Innsettingsvarianter, med ekstra rester ved en eller begge
 30 ender, inkluderer for eksempel fusjonsproteiner og proteiner inkludert aminosyremerker eller andre aminosyremerkører. I ett aspekt kan FVIII-molekylet valgfritt inneholde en N-terminal Met, særlig når molekylet uttrykkes rekombinant i en bakteriecelle slik som E. coli.

[0030] I slettevarianter er en eller flere aminosyrerester i et FVIII polypeptid som beskrevet her fjernet. Slettinger kan utføres ved en eller begge ender av FVIII-polypeptidet og/eller ved fjerning av en eller flere rester inne i FVIII aminosyresekvensen. Slettevarianter inkluderer derfor alle fragmenter av en FVIII polypeptidsekvens.

- 5 **[0031]** I substitusjonsvarianter er en eller flere aminosyrerester av et FVIII polypeptid fjernet og erstattet med alternative rester. I ett aspekt er substitusjonene konservative av natur og konservative substitusjoner av denne typen er velkjent på fagområdet. Alternativt omfatter oppfinnelsen substitusjoner som også er ikke-konservative. Eksempler på konservative substitusjoner er beskrevet i Lehninger, [Biochemistry, 2. Utgave; Worth Publishers, Inc., New York
- 10 (1975), side 71-77] og fremsatt umiddelbart nedenfor.

KONSERVATIVE SUBSTITUSJONER

SIDEKJEDEKARAKTERISTIKK	AMINOSYRE
Ikke-polar (hydrofob):	
A. Alifatisk	A L I V P
B. Aromatisk	F W
C. Svovelholdig	M
D. Grense	G
Ladet-polar:	
A. Hydroksyl	S T Y
B. Amider	N Q
C. Sulfhydryl	C
D. Grense	G

SIDEKJEDEKARAKTERISTIKK	AMINOSYRE
Ikke-polar (hydrofob):	
Positivt ladet (basisk)	K R H
Negativt ladet (sur)	D E

Alternativt er eksempler på konservative substitusjoner fremsatt umiddelbart nedenfor.

KONSERVATIVE SUBSTITUSJONER II

OPPRINNELIG REST	EKSEMPEL-SUBSTITUSJON
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn

OPPRINNELIG REST	EKSEMPEL-SUBSTITUSJON
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

[0032] Et "naturlig forekommende" polynukleotid eller polypeptidsekvens er typisk fra et pattedyr inkludert primater, for eksempel menneske; gnagere for eksempel, rotte, mus, hamster; ku, gris, hest, sau, eller ethvert pattedyr. Nukleinsyrene og proteiner ifølge oppfinnelsen kan være rekombinante molekyler (for eksempel, heterologe og kode for den ville typen sekvens eller en variant av samme, eller ikke-naturlig forekommende). Referanse-polynukleotid og polypeptidsekvenser inkluderer for eksempel, UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN);Gitschier J et al., Characterization of the human Faktor VIII gene, Nature, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH et al., Structure of human Faktor VIII, Nature, 312(5992):337-42 (1984); og Thompson AR. Structure and Function of the Faktor VIII gen and protein, Semin Thromb Hemost, 2003:29;11-29 (2002).

[0033] Som brukt her inkluderer "biologisk aktivt derivat" eller "biologisk aktiv variant" ethvert derivat eller variant av et molekyl med hovedsakelig de samme funksjonelle og/eller biologiske egenskaper som molekylet, slik som bindingsegenskaper, og/eller den samme strukturelle basis, slik som en peptidstamme eller en basisk polymerenhet.

[0034] Som brukt her inkluderer "plasma-avledet FVIII " eller "plasmatisk" alle former av proteinet som finnes i blod skaffet fra et pattedyr med egenskapen å aktivere koaguleringsbanen.

[0035] I ulike aspekter inkluderer produksjon av rFVIII enhver metode kjent på fagområdet for (i) produksjonen av rekombinant DNA ved genetisk konstruksjon, (ii) innføring av rekombinant DNA i
 5 prokaryote eller eukaryote celler ved for eksempel, transfeksjon, elektroforese eller mikroinjeksjon, (iii) kultivering av de transformerte cellene, (iv) ekspresjon av rFVIII, for eksempel konstitutivt eller ved induksjon, og (v) isolering av denne rFVIII, for eksempel fra kultiveringsmediet eller ved høsting av de transformerte cellene, for å (vi) oppnå rensset rFVIII.

[0036] I andre aspekter produseres rFVIII ved uttrykking i et egnet prokaryot eller eukaryot
 10 vertssystem karakterisert ved produksjon av et farmakologisk akseptabelt rFVIII-molekyl. Eksempler på eukaryote celler er pattedyrceller, slik som CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, og HepG2.

[0037] I ytterligere andre aspekter brukes et bredt utvalg av vektorer for framstillingen av rFVIII og er valgt fra eukaryote og prokaryote ekspresjonsvektorer. Eksempler på vektorer for prokaryot
 15 uttrykking inkluderer plasmider slik som, pRSET, pET, og pBAD, hvorved promoterne som brukes i prokaryote ekspresjonsvektorer inkluderer en eller flere av lac, trc, trp, recA, eller araBAD. Eksempler på vektorer for eukaryot uttrykking inkluderer: (i) for uttrykking i gjær, vektorer slik som, pAO, pPIC, pYES, eller pMET, ved bruk av promotere slik som, AOX1, GAP, GAL1, eller AUG1; (ii) for uttrykking i insektceller, vektorer slik som pMT, pAc5, pIB, pMIB, eller pBAC, ved bruk av
 20 promotere slik som PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, eller polh, og (iii) for uttrykking i pattedyrceller, vektorer slik som pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, eller pBPV, og vektorer avledet fra, i ett aspekt, virale systemer slik som vaksinevirus, adeno-assosiert virus, herpesvirus eller retrovirus, ved bruk av promotere slik som CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, og β -actin.

[0038] FVIII-molekyler konjugeres til en vannløselig polymer med enhver kjemisk metode (Roberts
 25 JM et al., Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76). For eksempel kan FVIII PEGyleres ved konjugeringen av PEG til frie aminogrupper i proteinet ved bruk av N-hydroksysuccinimid (NHS) - estere. Den vannløselige polymeren, for eksempel PEG, kan være koplet til å være frie SH-grupper ved bruk av maleimidkjemi eller koplingen av PEG-hydrazider eller PEG-aminer til karbohydratrester i FVIII etter forutgående oksidasjon.

[0039] FVIII kan være konjugert til andre vannløselige polymerer der de vannløselige polymerene
 30 for eksempel er polyalkylenoksid, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, polyoksazolin, et polyakryloylmorfolin, karbohydrat eller et polysakkarid slik som polysialsyre (PSA) eller dekstran.

Koplingen av den vannløselige polymeren kan utføres ved direkte kopling til proteinet eller via lenkermolekyler. Ett eksempel på en kjemisk lenker er MBPH (4-[4-N-Maleimidofenyl]butansyre-hydrazid) som inneholder et karbohydrat-selektivt hydrazid og en sulfhydryl-reaktiv maleimidgruppe (Chamow et al., J Biol Chem 1992;267:15916-22).

- 5 **[0040]** Konjugeringen kan utføres ved direkte kopling (eller kopling via lenkersystemer) av den vannløselige polymeren til Faktor VIII under dannelsen av stabile bindinger. I tillegg kan det brukes degraderbare, frigjørbare eller hydrolyserbare lenkersystemer i den foreliggende oppfinnelsen (Tsubery et al. J Biol Chem 2004;279:38118-24 / Greenwald et al., J Med Chem 1999;42:3657-67 / Zhao et al., Bioconj Chem 2006;17:341-51/WO2006/138572A2/US7259224B2/US7060259B2).
- 10 **[0041]** Som diskutert her, er en utførelsesform av oppfinnelsen koplingen av den aktiverte løselige polymeren til den oksiderte karbohydratresten i FVIII. Betegnelsen "aktivert vannløselig polymer" brukes her til å vise til vannløselige polymerer som brukes for kopling til FVIII med en aktiv funksjonell gruppe, som tillater kjemisk konjugering av den vannløselige polymeren til en lenker eller direkte til FVIII (som inneholder en aktiv aldehydgruppe). Betegnelsen "oksidert
- 15 karbohydratrest" som brukt her, viser til FVIII som inneholder frie aldehydgrupper, som genereres av et oksidasjonsmiddel, slik som NaIO₄. I ett aspekt av oppfinnelsen er aldehyd-aktivert dekstran (som inneholder en aktiv aldehydgruppe) koplet til aldehydgruppene i FVIII via en dihydrazidlenker.

- [0042]** I henhold til glykosyleringsmønsteret for FVIII (Lenting et al; Blood, 92:3983-96(1998)), bør
- 20 konjugering av FVIII via karbohydratrester sannsynligvis skje i B-domenet av FVIII. Måling av B-domenet for slik konjugering reaksjoner er ønskelig siden B-domenet ikke spiller noen rolle i aktiviteten av FVIII. Enzymatisk glykokonjugering er beskrevet i US 2008/00700275.

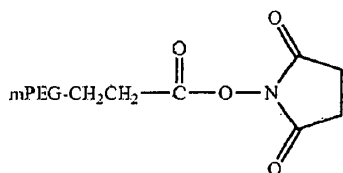
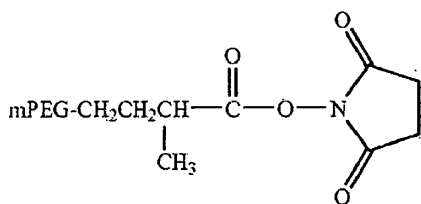
- [0043]** Også beskrevet her er modifiseringen av FVIII via lysinrester ved bruk av polyetylenglykolderivater som inneholder en aktiv N-hydroksysuccinimidester (NHS), slik som
- 25 succinimidylsuksinat, succinimidylglutarat eller succinimidylpropionat. Disse derivatene reagerer med lysinrester i FVIII under milde betingelser ved å danne en stabil amidbinding. Kjedelengden av PEG-derivatet kan være 5,000 Da. Andre PEG-derivater med kjedelengder på 500 til 2,000 Da, 2,000 kan være opptil 5,000 Da, større enn 5,000 opptil 10,000 Da eller større enn 10,000 opptil 20,000 Da, eller større enn 20,000 opptil 150,000 Da kan brukes inkludert lineære og forgrenede
- 30 strukturer.

[0044] Alternative framgangsmåter for PEGyleringen av aminogrupper er den kjemiske konjugering med PEG-karbonater ved dannelse av uretanbindinger, eller reaksjonen med aldehyder eller ketoner ved reduserende aminering for dannelse av sekundære amidbindinger.

[0045] Et FVIII-molekyl kan være kjemisk modifisert ved bruk av PEG-derivater som er kommersielt tilgjengelig. Disse PEG-derivatene kan ha lineære eller forgrenede strukturer. Eksempler på PEG-derivater som inneholder NHS-grupper er opplistet nedenfor.

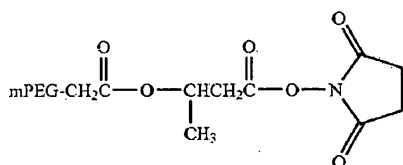
[0046] Følgende PEG-derivater er eksempler på de som er kommersielt tilgjengelig fra Nektar Therapeutics (Huntsville, Ala.; se www.nektar.com/PEG reagenskatalog; Nektar Advanced PEGylation, prisliste 2005-2006):

10 mPEG-Succinimidylpropionat (mPEG-SPA).

mPEG-Succinimidyl α -methylbutanoate (mPEG-SMB)

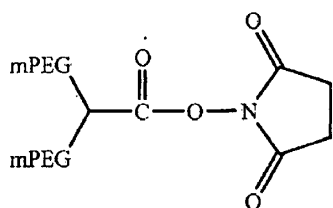
15

mPEG-CM-HBA-NHS (CM=karboksymetyl; HBA=Hydroksybutansyre)



Struktur av et forgrenet PEG-derivat (Nektar Therapeutics):

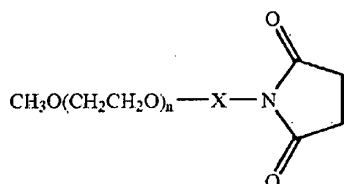
20 Forgrenet PEG N-Hydroksysuccinimid (mPEG2-NHS)



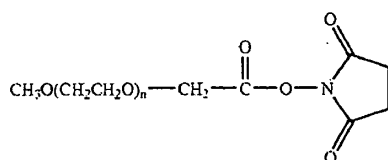
[0047] Dette reagenset med forgrenet struktur er beskrevet i nærmere detalj av Kozlowski et al. (BioDrugs 2001;5:419-29).

- 5 **[0048]** Andre eksempler på PEG-derivater er kommersielt tilgjengelig fra NOF Corporation (Tokyo, Japan; se www.nof.co.jp/english: Catalogue 2005)

Generell struktur for lineære PEG-derivater (NOF Corp.):

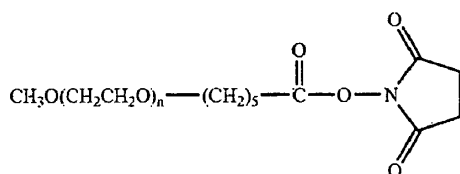


X=karboksymetyl

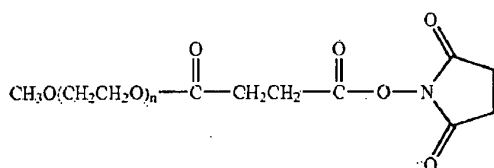


10

X=karboksy-pentyl

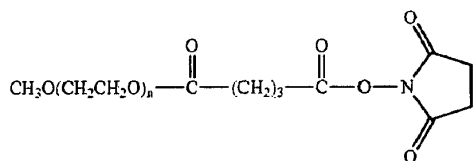


x=suksinat



- 15 mPEG Succinimidyl-suksinat

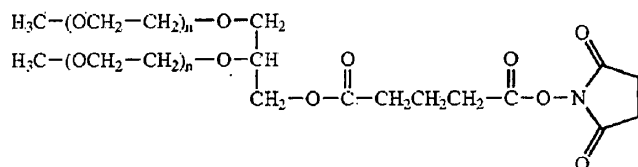
x=glutarat



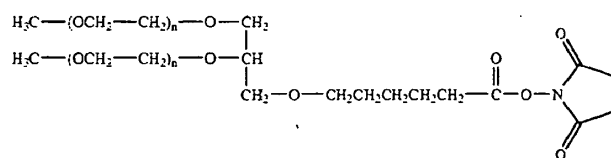
mPEG Succinimidyl-glutarat

Strukturer av forgrenede PEG-derivater (NOF Corp.): 2,3-Bis(metylpolyoxyetylen-oksy)-1-(1,5-

5 diokso-5-succinimidylloxy,pentylloxy)propan



2,3-Bis(metylpolyoxyetylen-oksy)-1-(succinimidylkarboksypentylloxy)propan



[0049] Disse propanderivatene viser en glyserolstamme med et 1,2 substitusjonsmønster.

10 Forgrenede PEG-derivater basert på glyserolstrukturer med 1,3-substitusjon eller andre forgrenede strukturer beskrevet i US2003/0143596A1 kan også benyttes.

[0050] PEG-derivater med degraderbare (for eksempel hydrolyserbare lenkere) som beskrevet av Tsubery et al. (J Biol Chem 2004;279:38118-24) og Shechter et al. (WO04089280A3) kan også benyttes.

15 **[0051]** Overraskende nok oppviser den PEGylerte FVIII ifølge den foreliggende oppfinnelsen full funksjonell aktivitet kombinert med en forlenget FVIII halveringstid *in vivo*. I tillegg ser det ut til at den PEGylerte rFVIII er mer bestandig mot trombininaktivering. Dette ble vist ved et utvalg metoder *in vitro* og *in vivo*, og er illustrert av følgende eksempler.

20 **[0052]** Som brukt her, inkluderer "sialyrerester" sialyremonomerer eller polymerer ("polysakkarider") som er løselige i en vannbasert løsning eller suspensjon og har liten eller ingen negativ påvirkning, slik som sideeffekter, på pattedyr ved administrering av PSA- FVIII-konjugatet i en farmasøytisk effektiv mengde. Det foreligger ingen spesiell begrensning på sialyreenheten som

brukes i henhold til den foreliggende oppfinnelsen. Polymerene er i ett aspekt karakterisert ved å ha fra 1 til 4 enheter. I visse aspekter er ulike sialsyreenheter kombinert i en kjede.

[0053] Sialsyreester kan være bundet til FVIII for eksempel ved framgangsmåten beskrevet i US Patent No. 4,356,170. I ulike utførelsesformer av oppfinnelsen er polysakkaridforbindelsen et naturlig forekommende polysakkarid, et derivat av et naturlig forekommende polysakkarid, eller et naturlig forekommende polysakkaridderivat. Generelt er alle sakkaridrestene i forbindelsen sialsyreester.

[0054] Andre teknikker for kopling av PSA til polypeptider er også kjent. For eksempel beskriver US publikasjon nr. 2007/0282096 konjugering av et amin- eller hydrazidderivat av, for eksempel, PSA, til proteiner. I tillegg beskriver US publikasjon nr. 2007 PSA-derivater som inneholder en aldehydgruppe for reaksjon med substrater (for eksempel, proteiner) ved den reduserende terminale enden.

[0055] I en utførelsesform av oppfinnelsen er polysialsyredelen av polysakkaridforbindelsen svært hydrofil, og i en annen utførelsesform er hele forbindelsen svært hydrofil. Hydrofilitet tildeles primært av de vedhengende karboksylgruppene i sialsyrenhetene, samt hydroksylgruppene. Sakkaridenheten kan inneholde andre funksjonelle grupper, slik som, amin-, hydroksyl- eller sulfatgrupper, eller kombinasjoner av slike. Disse gruppene kan være til stede på naturlig forekommende sakkaridforbindelser, eller introdusert inn i derivat-polysakkaridforbindelser.

[0056] Polysakkaridforbindelser for særlig bruk i oppfinnelsen er i ett aspekt de som produseres av bakterier. Noen av disse naturlig forekommende polysakkaridene er kjent som glykolipider. I en utførelsesform er polysakkaridforbindelser hovedsakelig fri for terminale galaktoseenheter.

[0057] I en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er halveringstiden *in vivo* for den proteinholdige konstruksjonen forlenget. I en relatert utførelsesform er halveringstiden *in vivo* av den proteinholdige konstruksjonen forlenget med en faktor på minst to, mens i en annen utførelsesform er halveringstiden *in vivo* forlenget med en faktor på minst tre, sammenliknet med FVIII som ikke er bundet til en vannløselig polymer.

[0058] I en utførelsesform kan den proteinholdige konstruksjonen ifølge den foreliggende oppfinnelsen administreres ved injeksjon, slik som intravenøs, intramuskulær eller intraperitoneal injeksjon.

- [0059]** For å administrere blandinger som omfatter en proteinholdig konstruksjon ifølge den foreliggende oppfinnelsen til menneske eller forsøksdyr, omfatter i ett aspekt, blandingen en eller flere farmasøytisk akseptable bærere. Betegnelsene "farmasøytisk" eller "farmakologisk akseptabel" viser til molekylære entiteter og blandinger som er stabile, hindrer proteindegradering slik som aggregerings- og splittingsprodukter, og som i tillegg ikke produserer allergiske eller andre negative reaksjoner når administrert ved bruk av ruter som er velkjente på fagområdet, som beskrevet nedenfor. "Farmasøytisk akseptable bærere" inkluderer ethvert og alle klinisk nyttige løsningsmidler, dispergeringsmedier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske og absorpsjonsforsinkende midler og liknende, inkludert de midlene som er beskrevet ovenfor.
- 5
- [0060]** Som brukt her, inkluderer "effektiv mengde" en dose som er egnet til behandling av et pattedyr med en blødningsforstyrrelse som skissert foran.
- [0061]** Blandingene kan administreres oralt, lokalt, transdermalt, parenteralt, ved inhaleringsspray, vaginalt, rektalt, eller ved intrakranial injeksjon. Betegnelsen parenteral som brukt her, inkluderer subkutane injeksjoner, intravenøs, intramuskulær, intracisternal injeksjon, eller infusjonsteknikker. Administrering ved intravenøs, intradermal, intramuskulær, intramammarisk, intraperitoneal, intrathekal, retrobulbar, intrapulmonær injeksjon og/eller kirurgisk implantasjon ved et spesifikt sted er også overveid. Generelt er blandinger fri for pyrogener samt andre urenheter som kan tenkes å være farlig for mottakeren.
- 15
- [0062]** Enkle eller multiple administreringer av blandingen kan utføres med dosenivåene og mønstre som er valgt av den behandlende lege. For forebygging eller behandling av sykdom, vil passende dose avhenge av typen sykdom som skal behandles, som beskrevet foran, alvorlighetsgraden og forløpet for sykdommen, hvorvidt medikamentet administreres for preventive eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons på medikamentet, og diskresjonen fra den nærværende lege.
- 20
- [0063]** Også beskrevet her er en farmasøytisk blanding omfattende en effektiv mengde av en proteinholdig konstruksjon som definert foran. Den farmasøytiske blandingen kan videre omfatte en farmasøytisk akseptabel bærer, tynner, salt, buffer eller bindemiddel. Den farmasøytiske blandingen kan brukes til behandling av blødningsforstyrrelsene definert foran. Den farmasøytiske blandingen ifølge oppfinnelsen kan være en løsning eller et lyofilisert produkt. Løsninger av den farmasøytiske blandingen kan underlegges enhver passende lyofiliseringsprosess.
- 25
- [0064]** Også beskrevet her er sett som omfatter en blanding ifølge oppfinnelsen pakket på en måte som fremmer dens bruk for administrering til subjekter. Et slikt sett inkluderer en forbindelse eller
- 30

blanding beskrevet her (for eksempel en blanding som omfatter en proteinholdig konstruksjon), pakket i en beholder, slik som en forseglet flaske eller beholder, med en etikett festet til beholderen eller inkludert i pakken som beskriver bruk av forbindelsen eller blandingen i utøvelse av framgangsmåten. I en utførelsesform inneholder settet en første beholder med en blanding

5 som omfatter en proteinholdig konstruksjon og en andre beholder med en fysiologisk akseptabel rekondisjoneringsløsning for blandingen i den første beholderen. I ett eksempel pakkes forbindelsen eller blandingen i en enhetsdose-form. Settet kan videre inkludere en anordning som er egnet til administrering av blandingen i henhold til en spesifikk rute for administrering. Settet inneholder fortrinnsvis en etikett som beskriver bruken av det terapeutiske proteinet eller

10 peptidblanding.

EKSEMPLER

Referanseeksempel 1

PEGylering av Lysinrester i rFVIII med mPEG Succinimidylsuksinat

[0065] En løsning av en rFVIII bulk avledet fra produksjonsprosessen Advate (3,400 U/ml) ble gelfiltrert ved bruk av Econo-Pac 10DG -kolonner (Bio-Rad) ved bruk av 20 mM Hepesbuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4, inneholdende 0,5 % sukrose og 0,1 % Polysorbat 80. Deretter ble mPEG Succinimidylsuksinat (Abuchowski et al. Cancer Biochim Biophys 1984;7:175-86) med en kjedelengde på 5,000 Da (PEG-SS 5000) tilsatt til denne løsningen under forsiktig omrøring (5 mg PEG-SS/mg protein) og pH-verdien ble justert til 7,4 ved dråpevis tilsats av 0,5 M NaOH. Deretter

20 ble PEGylering utført under forsiktig omrøring i 1 time ved romtemperatur.

[0066] Deretter ble reaksjonsblandingen påført på en ionebytterkromatografi-polymer i likevekt (Fractogel EMD TMAE 650M/Pharmacia XK-1,0-kolonne, senghøyde: 15,0 cm) i 20 mM Hepesbuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4, inneholdende 0,5 % sukrose og 0,1 % Polysorbat 80. Deretter ble kolonna vasket med 20 CV likevektsbuffer for å fjerne overskytende reagens og PEGylert rFVIII

25 ble eluert med elueringsbuffer (20 mM Hepes, 1,0 M NaCl, 0,5 % sukrose, 0,1 % Polysorbat 80, pH 7,4). Eluatet ble konsentrert ved ultrafiltrering/diafiltrering med en membran bestående av regenerert cellulose og en molvektavslutning på 30 kD ved bruk av et buffersystem bestående av 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,5 % sukrose, pH 7,4.

Referanseeksempel 2

30 **Biokjemisk karakterisering av PEGylert rFVIII *in vitro***

[0067] RFVIII avledet fra Advate-produksjonsprosessen ble PEGylert i henhold til eksempel 1 og det PEGylerte FVIII-produktet ble karakterisert biokjemisk. Den funksjonelle aktivitet av PEG-rFVIII ble bestemt ved bruk av FVIII kromogen analyse (Rosen S, Scand J Haematol 1984;33 (Suppl 40):139-45). Metoden er basert på Ph. Eur. 5. utgave (5.05) 2.7.4 Assay of Blood Coagulationfactor VIII.

[0068] En prøve som inneholder faktor VIII (FVIII:C) blandes med trombin, aktivert faktor IX (FIXa), fosfolipider og faktor X (FX) i en buffer som inneholder kalsium. FVIII aktiveres av trombin og danner deretter et kompleks med fosfolipider, FIXa og kalsiumioner. Dette komplekset aktiverer faktor X til faktor Xa, som i sin tur splitter det kromogene substratet FXa-1 (AcOH*CH₃OCO-D-CHA-Gly-Arg-pNA). Tidsforløpet for frigjort para-nitroanilin (pNA) måles med en mikroplateleser ved 405 nm. Stigningen av reaksjonen er proporsjonal med konsentrasjonen av faktor VIII i prøven. FVIII antigen-verdien ble målt ved bruk av et ELISA-system kommersielt tilgjengelig (Cedarlane, Hornby, Ontario, Canada) med mindre modifikasjoner. Fra disse verdiene ble verdiene for forholdene FVIII kromogen/FVIII antigen beregnet. Proteininnholdet i preparatene ble bestemt ved måling av den optiske densitet ved 280 nm. Fra disse data ble proteininnholdet beregnet (Hoyer LW in: Human Protein Data. Installments 1-6; Heberli Ed.; Wiley V C H, Weinheim, Tyskland, 1998) og uttrykt i mg/ml.

TABELL 1

	Naturlig rFVIII	PEG-rFVIII PEG-SS 5K (5 mg per mg protein)
FVIII:Chr aktivitet [U/ml]	3,430	64
FVIII:Ag [U/ml]	4,067	81
Ratio FVIII:Chr/FVIII:Ag	0,84	0,79
Gjenvinning av biologisk aktivitet (%)	100	94

[0069] Dataene i tabell 1 viser at den biologiske aktivitet i det PEGylerte rFVIII-preparatet (uttrykt av forholdet FVIII kromogen aktivitet mot FVIII antigen) gjenvinnes til mer enn 90 % sammenliknet med den biologiske aktivitet av det naturlige rFVIII (100 %).

Referanseeksempel 3

5 Karakterisering av PEGylert rFVIII ved SDS-PAGE og immunofargingsteknikker

[0070] Naturlig rFVIII ble karakterisert ved SDS PAGE under reduserende betingelser ved bruk av en 4-12 % polyakrylamid gradientgel skaffet fra Invitrogen (Carlsbad, Calif., USA) i henhold til instruksjonene fra produsenten. Som molvektmarkører (MW) ble det brukt Precision Plus-markører (10 kD-250 kD) skaffet fra Bio-Rad (Hercules, Calif., USA). Deretter ble proteiner overført på en PVDF-membran skaffet fra Bio-Rad (Hercules, Calif., USA) ved elektroblotting og deretter inkubert med en polyklonal sau anti-humant FVIII:C antistoff skaffet fra Cedarlane (Hornby, Ontario, Canada). De siste trinnene i immunofargingsprosedyren ble inkuberingen med en alkalisk fosfatase (ALP) konjugert anti-sau antistoff skaffet fra Accurate (Westbury, N.Y., USA) etterfulgt av den endelige visualisering ved bruk av et ALP substratsett (Bio-Rad, Hercules, Calif., USA).

15 Resultatene er oppsummert i figur 1. Analysen demonstrerer domenestrukturen hos naturlig og PEGylert rFVIII. Det er vist at den PEGylerte rFVIII har bredere bånd og høyere molmasser enn det naturlige rekombinante proteinet.

Referanseeksempel 4

Farmakokinetikk for PEGylert rFVIII i en FVIII Deficient Knock Out Musmodell

20 **[0071]** FVIII-fattige mus beskrevet i detalj av Bi et al. (Nat Genet 1995;10:119-21) ble brukt som en modell for alvorlig human hemofili A. Grupper på 5 mus mottok en bolusinjeksjon (10 ml/kg) via halevenen med enten PEG-rFVIII (PEG-SS, 5K) framstilt i henhold til eksempel 1 eller naturlig rFVIII i en dose på 200 IU FVIII/kg kroppsvekt. Citratplasma ved hjertepunktering etter anestesi ble framstilt fra de respektive gruppene, 5 minutter, 3, 6, 9 og 24 timer etter injeksjon. FVIII-

25 aktivitetsnivå ble målt i plasmaprøver. Resultatene fra dette forsøket er oppsummert i figur 2. Midlere halveringstid økte fra 1,9 timer (for naturlig rFVIII) til 4,9 timer (for PEGylert rFVIII), areal under kurve (AUC) økte fra 13,0 til 25,2 timer*IU/ml. Beregning av halveringstid ble utført med MicroMath Scientist, model 1 fra farmakokinetiske bibliotek (MicroMath, Saint Louis, Mo., USA).

Referanseeksempel 5

30 Detaljert Analyse av PEGylering av rFVIII ved SDS-PAGE og Immunofargingsteknikker

[0072] Naturlig og PEGylert rFVIII ble fordøyd med 1 nM trombin i 60 minutter ved 60 °C, som resulterte i spesifikk splitting av FVIII-molekylet med veldefinerte degraderingsprodukter. Disse tung- og lett-kjedede fragmentene ble separert ved SDS-PAGE etterfulgt av elektroblotting, som beskrevet i eksempel 3. For å visualisere de splittede fragmentene, ble det brukt et polyklonalt antistoff og monoklonale antistoffer mot den tunge kjeden A1 og A2-domener, B-domenet og det lettkjedede N-terminal A3 -domenet.

[0073] Som en kan se i FIG. 3, ble alle domener PEGylert, om enn i en annen grad. B-domenet ble sterkt PEGylert. Både A1- og A2-domene i den tunge kjeden ble PEGylert partielt. Ulike PEGyleringsgrader (mono-, di-, tri- ...) kunne observeres i det lettkjedede A3-domenet. I enighet med eksempel 6, så det ut til at PEGylert FVIII var mer bestandig mot trombin.

Referanseeksempel 6

Trombin-resistens for PEGylert rFVIII

[0074] *In vitro* trombinbehandling av FVIII medfører en rask økning og påfølgende reduksjon i sin prokoagulante aktivitet. Raten for aktivering og inaktivering, som avhenger av trombinkonsentrasjonen og av integriteten av FVIII, ble overvåket av en FIXa kofaktoranalyse, som følger:

[0075] FVIII ble inkubert ved 37 °C med 0,5 eller 1 nM trombin. Delprøver ble trukket ut ved tidsintervaller 0,5 til 40 minutter og tilsatt til en blanding av FIXa, FX, PL-vesikler og CaCl₂ som også inneholdt en spesifikk trombin-inhibitor for å stoppe de ytterligere trombin-medierte reaksjonene og inkubert i 3 minutter. En delprøve ble tilsatt til et kromogent substrat, som splittes selektivt med FXa og inneholdt EDTA for å stoppe ytterligere Xa-aktivisering. Etter 15 min inkubering, ble reaksjonen terminert med etansyre. Absorbans (A₄₀₅) -verdier, som er proporsjonale med FXa-konsentrasjonene, ble målt i en ELISA-leser og konvertert til FXa-konsentrasjoner ved bruk av en renset FXa referansekurve. De genererte Fxa-konsentrasjonene ble plottet mot inkubasjonstiden med trombin.

[0076] Pseudo første ordens inaktiveringsrate for FVIII ble bestemt ved å forsyne deklinasjonsdelen av kurvene med en enkelt eksponensialtilpasning.

TABELL 2

	Første ordens inaktiveringsrate k' (1/min)	
--	--	--

Trombin	Naturlig FVIII	PEG-FVIII	Relativ k' PEG/naturlig
0,5 nM	0,14	0,08	0,57
1 nM	0,24	0,14	0,58

[0077] Som vist i FIG. 4 og Tabell 2, viste PEGylert rFVIII en langsommere inaktiveringsrate ved begge trombinkonsentrasjoner som ble brukt.

Referanseeksempel 7

5 **PEGylering av Lysinrester i rFVIII med Forgrenet 2,3-Bis(metylpolyoksyetylen-oksy)-1-(1,5-diokso-5-succinimidyloksi, pentyloksy)propan**

- [0078]** En løsning av rFVIII i 20 mM Hepesbuffer pH 7,4 inneholdende 150 mM NaCl, 0,5 % sukrose og 0,1 % Polysorbat 80 ble framstilt fra bulkmateriale avledet fra Advate-produksjonsprosessen inneholdende 489 IU FVIII/ml. Et forgrenet PEG succinimidylglutarat (PEG-SG)-reagens (2,3-Bis(metylpolyoksyetylen-oksy)-1-(1,5-diokso-5-succinimidyloksi, pentyloksy) propan) skaffet fra NOF Corporation (Tokyo, Japan) med en molvekt på 20 kD ble tilsatt til 153 ml av denne løsningen under forsiktig omrøring (5 mg reagens/mg protein) og pH-verdien ble justert til 7,4 ved dråpevis tilsats av 0,5 M NaOH etter 10 minutter. Deretter ble PEGyleringen av rFVIII utført under forsiktig omrøring i 1 time ved romtemperatur.
- 15 **[0079]** Deretter ble reaksjonsblandingen påført på en ionebytter kromatografipolymer i likevekt (Fractogel EMD TMAE 650M/Pharmacia XK-50-kolonne, senghøyde: 14,5 cm) i 20 mM Hepesbuffer, 150 mM NaCl, pH 7,4, inneholdende 0,5 % sukrose og 0,1 % Polysorbat 80 ved bruk av en lineær strømningsrate på 1 cm/min. Kolonna ble vasket med 25 CV likevektsbuffer for å fjerne overskytende reagens (lineær strømningsrate: 2 cm/min) og den PEGylerte rFVIII ble eluert
- 20 med elueringsbuffer (20 mM Hepes, 1,0 M NaCl, 0,5 % sukrose, 0,1 % Polysorbat 80, pH 7,4) ved en lineær strømningsrate på 0,5 cm/min. Deretter ble eluatet konsentrert ved ultrafiltrering/diafiltrering med en membran bestående av regenerert cellulose og med en molvektsavkorting på 30 kD ved bruk av et buffersystem bestående av 20 mM Hepes, 150 mM NaCl, 0,5 % sukrose, pH 7,4.

25 **Referanseeksempel 8**

***In-vitro* Karakterisering av rFVIII PEGylert med Forgrenet PEG-SG 20 kD**

[0080] RFVIII avledet fra Advate-produksjonsprosessen ble PEGylert via lysinrester ved bruk av et forgrenet PEG-SG-reagens i henhold til Eksempel 7 og det PEGylerte rFVIII-produktet ble biokjemisk karakterisert som beskrevet i Eksempel 2.

5 **TABELL 3**

	Naturlig rFVIII	PEG-rFVIII PLG-SG 20K (5 mg per mg protein)
FVIII:Chr aktivitet [U/ml]	9,950	1,040
FVIII:Ag [U/ml]	20,807	1,763
Ratio PVIII:Chr/FVIII:Ag	0,48	0,59
Gjenvinning av biologisk aktivitet (%)	100	120

[0081] Dataene i Tabell 3 viser at den biologiske aktivitet (uttrykt som forholdet FVIII kromogen aktivitet mot FVIII antigen) i det PEGylerte rFVIII-preparatet ble fullstendig gjenvunnet sammenliknet med den biologiske aktivitet i den naturlige rFVIII (100 %).

- 10 **[0082]** Den PEGylerte rFVIII ble karakterisert ved SDS-PAGE og immunofargingsteknikker under reduserende betingelser ved bruk av en 4-12 % polyakrylamid-gradientgel som beskrevet i Eksempel 3. Resultatene er oppsummert i FIG. 5. Flekkene demonstrerer domenestrukturen for naturlig og PEGylert rFVIII. Det er vist at den PEGylerte rFVIII har bredere bånd og høyere molmasser enn det naturlige rekombinante proteinet.
- 15 **[0083]** For mer detaljert analyse av PEGylering av rFVIII-preparatet ved SDS-PAGE og immunofargingsteknikker, ble det naturlige og PEGylerte rFVIII fordøyd med 1 nM trombin i 60 minutter ved 60°, som resulterte i spesifikk splitting av FVIII-molekylet med veldefinerte degraderingsprodukter, som beskrevet i Eksempel 5. Fragmentene ble separert ved SDS-PAGE etterfulgt av elektroblotting og visualisert ved ulike anti-FVIII-antistoffer. Som en kan se i FIG. 6,

ble alle domenene PEGylert, om enn i ulik grad. B-domenet ble sterkt PEGylert. Ulike PEGyleringsgrader (mono-, di-, tri-PEGylering) kunne observeres i det lettkjedede A3-domenet. Resultatene indikerer at den PEGylerte rFVIII så ut til å være mer resistent mot trombin.

- [0084]** Raten for aktivering og deaktivering av trombin ble overvåket med en FIXa kofaktoranalyse som beskrevet i Eksempel 6. Pseudo første ordens inaktiveringsrate for FVIII ble bestemt ved å forsyne deklinasjonsdelen av kurvene med en enkelt eksponensielltilpasning.

TABELL 4

Første ordens inaktiveringsrate k' (1/min)			
Trombin	Naturlig FVIII	PEG-FVIII	Relativ k' PEG/naturlig
0,5 nM	0,13	0,09	0,67
1 nM	0,21	0,15	0,71

- [0085]** Som vist i FIG. 7 og Tabell 4, viste den PEGylerte rFVIII en langsommere inaktiveringsrate ved begge de anvendte trombinkonsentrasjonene.

Eksempel 9

PEGylering av rFVIII via karbohydratrest

- [0086]** For framstilling av et PEG-rFVIII-konjugat via karbohydratrester, framstilles en løsning av rFVIII (sluttkonsentrasjon: 1,2 mg/ml) i 25 mM fosfatbuffer, pH 6,7. NaIO₄ tilsettes (sluttkonsentrasjon 0,3 mM) for oksidasjonen av karbohydratrester (Roberts et al.; Advanced Drug Del Rev.; 54:459-76 (2002); Meir og Wilchek; Meth Enzymol;138: 429-42(1987)). Reaksjonen ble terminert ved tilsatt av glyserol i en sluttkonsentrasjon på 10 %, og de overskytende reagensene ble separert ved gjentatt sentrifugering ved bruk av Amicon Micron-10-enheter (Amicon, Billerica, MA). PEG-hydrazid (MW 3300 Da / Nektar, Huntsville, Alabama) ble tilsatt til å gi en sluttkonsentrasjon på 1,5 mM reagens. PEGyleringen ble deretter utført i 2 timer ved romtemperatur. Deretter ble det oppnådde konjugatet og det overskytende reagenset separert ved gjentatt sentrifugering på Amicon Micro-10-enheter ved bruk av 25 mM fosfatbuffer, pH 6,7.

Eksempel 10**Polysialylering av rFVIII med PSA-hydrazin**

[0087] For framstilling av et PSA-rFVIII-konjugat via karbohydratrester, framstilles en løsning av rFVIII (sluttkonsentrasjon: 1 mg/ml) i 20 mM natriumacetatbuffer, pH 6,0. NaIO₄ tilsettes (sluttkonsentrasjon 0,25 mM) for oksidasjonen av karbohydratrester. Oksidasjonen utføres i 60 min ved 4 °C i mørke. Natriumbisulfitt (sluttkonsentrasjon 25 mM) tilsettes for å stoppe reaksjonen. Det overskytende natriumperiodat separeres ved gelfiltrering på DG-10-kolonner (Bio-Rad). Deretter tilsettes PSA-hydrazin med en kjedelengde på 20 kD (framstilt i henhold til WO2006/016168) (sluttkonsentrasjon 10 mM). Polysialyleringsprosedyren utføres i 2 timer ved romtemperatur. Den polysialylerte rFVIII renses ved HIC på Butyl-Sefarose (GE-Healthcare). En 5 M NaCl-løsning tilsettes til blandingen for å gi en sluttkonsentrasjon på 3M NaCl. Denne blandingen påføres kolonna fylt med Butyl-Sefarose (GE-Healthcare) og elueringen av rFVIII-PSA-konjugat utføres med 50 mM Hepes-buffer, pH 7,4, inneholdende 6,7 mM CaCl₂. Etter eluering av konjugatet, blir pH justert til pH 6,9.

Eksempel 11**Rensing og derivatisering av Polysialsyre**

[0088] Polysialsyre ble rensed ved anionebytterkromatografi på Q-Sefarose FF som beskrevet i WO06016161A1. Fem gram PSA ble oppløst i 50 ml 10 mM Triethanolaminbuffer, pH 7,4 inneholdende 25 mM NaCl (= startbuffer). Denne løsningen ble påført på en Pharmacia XK50-kolonne fylt med Q-Sefarose FF (GE Healthcare, Munich, Germany), som var brakt til likevekt med startbuffer. Kolonna ble deretter vasket med 8 kolonnevolum (CV) startbuffer og det bundede PSA ble eluert trinnvis med 3CV 200 mM NaCl, 350 mM NaCl og 500 mM NaCl i startbuffer. Fraksjonen eluert med 350 mM NaCl viste en molvekt på 20 kDa som indikert ved SDS gel-elektroforese. Denne fraksjonen ble konsentrert ved ultrafiltrering ved bruk av en 5 kD membran laget av regenerert cellulose (Millipore, Billerica, MA) og deretter diafiltrert mot 50 mM fosfatbuffer, pH 7,2. PSA ble oksidert med NaIO₄ og en terminal primær aminogruppe ble introdusert ved reduserende aminering som beskrevet i WO05016973A1. For reduserende aminering, ble 11 ml av en 2 M NH₄Cl-løsning tilsatt til 20 ml av en løsning inneholdende 58 mg oksidert PSA / ml i 50 mM fosfatbuffer, pH 7,2. En løsning av 5M NaCNBH₃ i 1M NaOH ble deretter tilsatt til å gi en sluttkonsentrasjon på 75 mM. Reaksjonen ble utført i 5d ved romtemperatur ved pH 8,0.

[0089] Blandingen ble deretter dialysert mot en $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ -løsning (50 mg/l) inneholdende 10 mM NaCl og deretter mot 50 mM fosfatbuffer, pH 8,0, inneholdende 5 mM EDTA. En sulfhydrylgruppe ble deretter introdusert ved reaksjon av den terminale primære aminogruppen med 2-iminothiolan (Traut's reagens / Pierce, Rockford, IL). Reaksjonen ble utført i 50 mM fosfatbuffer, pH 8,0, inneholdende 5 mM EDTA med 20 ganger molart overskudd av reagens i 1 time ved romtemperatur. Til slutt ble PSEn-løsningen inneholdende en terminal fri SH-gruppe underlagt ultrafiltrering/diafiltreringsblanding ved bruk av en membran med en avkutting på 5 kD og laget av regenerert cellulose (Millipore, Billerica, MA).

Eksempel 12

10 Polysialylering av rFVIII ved bruk av en heterobifunksjonell kryssbinder

[0090] For kopling av PSA-SH til rFVIII, ble den heterobifunksjonelle kryssbinderen MBPH (4-[4-N-Maleimidofenyl]butansyrehydrazid-HCl/Pierce, Rockford, IL) brukt inneholdende en karbohydrat-selektiv hydrazid- og en sulfhydryl-reaktiv maleimid-gruppe (Chamow et al., J Biol Chem; 267:15916-22(1992)). PSA-SH inneholdende en aktiv sulfhydrylgruppe ble framstilt i henhold til Eksempel 11.

[0091] To ml rFVIII (638 mg, 3,856 mg/ml protein konsentrasjon) ble overført til oksidasjonsbuffer (50 mM natriumacetat, pH 6) ved bruk av avsaltingskolonner (Bio-Rad Econopac 10 DG) i henhold til instruksjonene fra produsenten. Proteinet ble deretter oksidert med 0,25mM NaIO_4 (Merck) (1t ved 4 °C i mørke). Oksidasjonsreaksjonen ble terminert med glyserol i en sluttkonsentrasjon på 10 %. Glyserol og NaIO_4 ble fjernet og proteinet ble overført til en reaksjonsbuffer (50 mM natriumfosfat pH 6,5) ved bruk av avsaltingskolonner (Bio-Rad Econopac 10 DG) i henhold til produsentens retningslinjer. En blanding inneholdende 1 mg MBPH/mg protein og PSA-SH (200 ganger molart overskudd mot protein) ble deretter inkubert i 2t ved RT ved pH 6,5. Overskuddet av lenker ble fjernet ved bruk av avsaltingskolonner (Bio-Rad Econopac 10 DG) i henhold til instruksjonene fra produsenten og lenker-PSA-konjugat ble overført til reaksjonsbuffer.

[0092] MPBH-PSA-konjugatet ble tilsatt til den oksiderte rFVIII (0,105 mg/ml protein) og reaksjonsblandingen ble inkubert i 2t ved RT under forsiktig risting rFVIII-PSA-konjugatet ble rensset ved HIC ved bruk av en forhåndspakket Butyl Sefarose-kolonne (GE Healthcare, Butyl HiTrap FF 5 ml). For å tillate hydrofobe interaksjoner mellom konjugatet og Butyl Sefarose, ble prøven avkjølt til 2-8 °C og ionestyrken i reaksjonsblandingen ble økt til en konduktivitet på om lag 185 mS/cm ved å tilsette en bufferløsning inneholdende 5 M NaCl (50 mM Hepes, 5 M NaCl, 6,7 mM CaCl_2 , 0,01 % Tween, pH 6,9). Reaksjonsblandingen ble lastet på kolonna som var brakt til likevekt med

likevektsbuffer pH 6,9 (inneholdende 50 mM Hepes, 3 M NaCl, 6,7 mM CaCl₂, 0,01 % Tween 80) med en strømningsrate på 1,2 cm/min. Ubundet prøve ble vasket ut med 10 kolonnevolum (CV) likevektsbuffer. Konjugatet ble eluert med en buffer med lav ionestyrke, pH 7,4 (50 mM Hepes, 6,7 mM CaCl₂) med en strømningsrate på 1,2 cm /min. Under kromatografiprosessen, ble prøver og
5 buffere avkjølt ved bruk av et isbad. Til slutt ble pH i eluatet justert til 6,9.

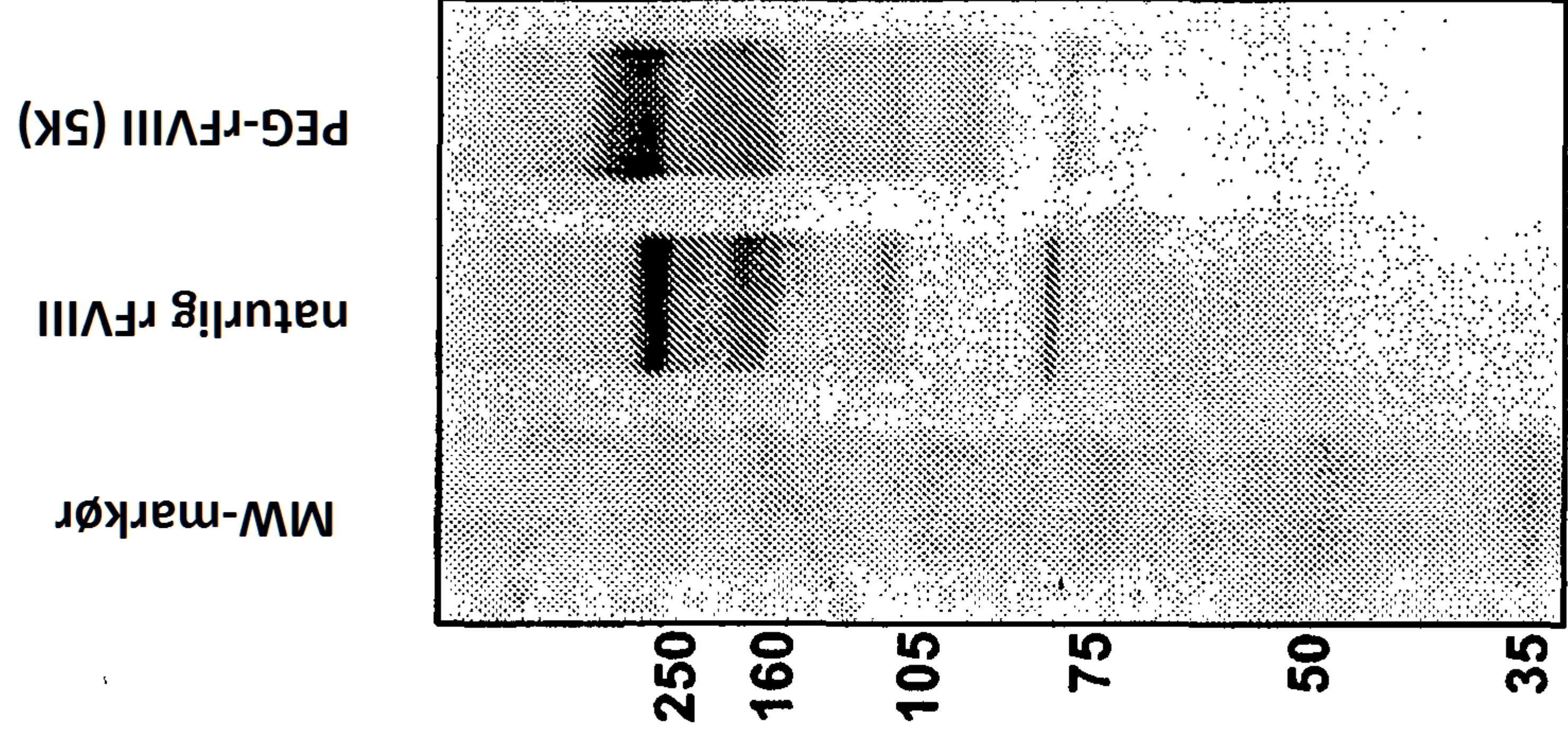
Referanseeksempel 13

Konjugering av rFVIII med Dekstran

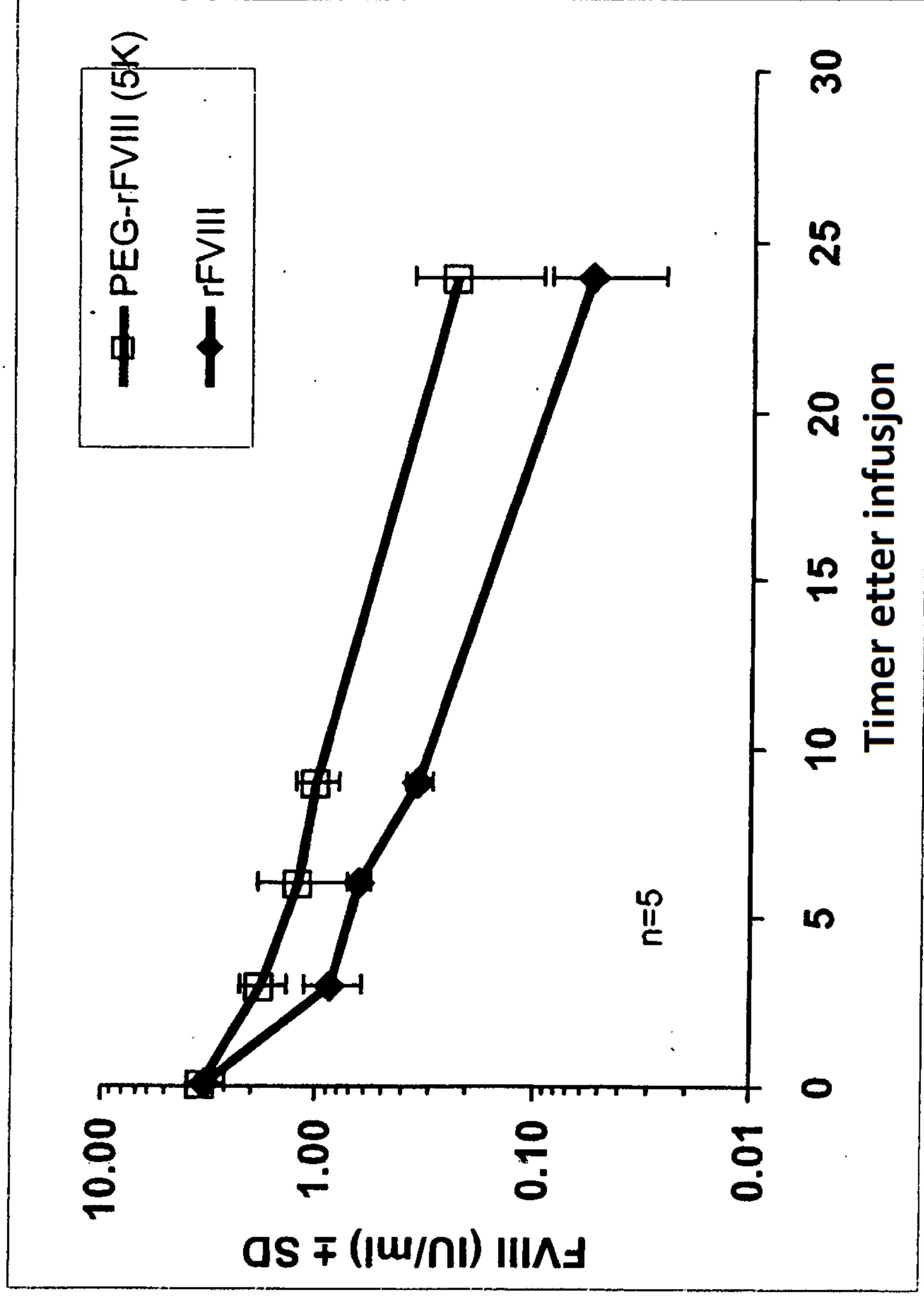
- [0093]** For konjugering av rFVIII med dekstran, ble 2 ml rFVIII (638 mg, 3,4 mg/ml protein) overført til oksidasjonsbuffer (50 mM natriumacetat, pH 6) ved bruk av avsaltingskolonner (Bio-Rad Econopac 10 DG) i henhold til produsentens retningslinjer. Proteinet ble deretter oksidert med
10 0,25 mM NaIO₄ (1t ved 4 °C i mørke). Det oksiderte proteinet ble først konsentrert ved bruk av vivaspin ultrafiltrering spinn-kolonner (Sartorius Stedim Biotech GmbH) med en MWCO på 30 kDa i henhold til produsentens retningslinjer. Prøven ble deretter dialysert mot reaksjonsbuffer (50 mM natriumfosfat pH 7) over natta ved 4 °C.
- [0094]** Etter dialyse ble 26,58 mg adipinsyredihydrazid (ADH) (Sigma) tilsatt (500 ganger molart overskudd) og reaksjonsblandingen ble inkubert 2 timer ved RT ved pH 7 under forsiktig risting. ADH ble fjernet ved bruk av avsaltingskolonner (Bio-Rad Econopac 10 DG) i henhold til instruksene fra produsenten. Ti mg aldehydaktivert dekstran (Pierce) ble tilsatt (17 ganger molart overskudd mot protein) og blandingen ble inkubert i 2 t ved RT, pH 7.
- [0095]** Konjugatet ble rensert ved IEX-kromatografi på Q-Sefarose HP (GE-Healthcare). Prøven ble lastet på en kolonne (6,4 mm x 3 cm, V = 1ml) som var brakt til likevekt med buffer A (50 mM natriumfosfat pH 6,8) med en strømningsrate på 0,5 ml/min. Ubundet prøve ble vasket ut med 5 CV buffer A. Til slutt ble konjugatet eluert med en lineær saltgradient (0-100 % buffer B [50 mM natriumfosfat pH 6,8 + 1M NaCl] i 10 CV) med en strømningsrate på 0,5 ml/min.

Patentkrav

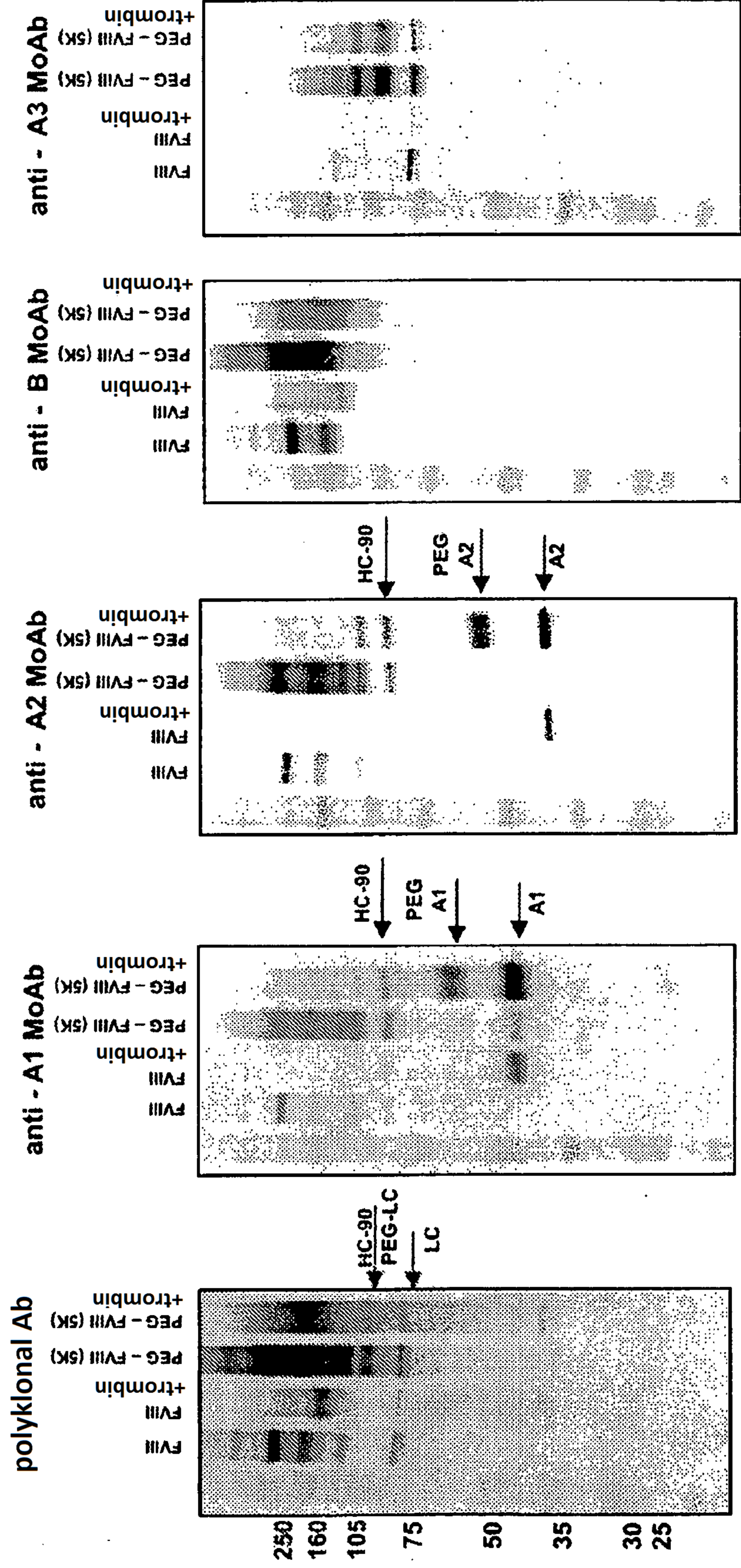
1. Framgangsmåte for konjugering av PEG, polysialsyre (PSA) eller dekstran til en oksidert karbohydratrest i Faktor VIII omfattende å kontakte den oksiderte karbohydratresten med aktivert PEG, PSA og dekstran under betingelser som tillater konjugering; hvorved nevnte FVIII som har
- 5 blitt konjugert til PEG, PSA eller dekstran beholder minst 50 % av naturlig FVIII biologisk aktivitet.
2. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved det aktiverte PEG, PSA og dekstran er valgt fra gruppen bestående av PEG-hydrazid, PSA-hydrazin eller aldehydaktivert dekstran.
3. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved karbohydratresten oksideres ved inkubering i en buffer omfattende NaIO_4 .
- 10 4. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved den oksiderte karbohydratresten i FVIII er lokalisert i B-domenet av Faktor VIII.
5. Modifisert Faktor VIII framstilt av framgangsmåten ifølge ett av kravene 1 til 4.
6. Proteinholdig molekyl omfattende:
 - (a) et Faktor VIII-molekyl; og
 - 15 (b) minst en av PSA, PEG eller dekstran bundet til nevnte Faktor VIII-molekyl, hvorved nevnte PSA, PEG eller dekstran er festet til Faktor VIII via en eller flere karbohydratrester lokalisert i B-domenet av Faktor VIII, hvorved molekylet beholder minst 50 % av naturlig FVIII biologisk aktivitet.
7. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved nevnte FVIII som har blitt konjugert til den vannløselige polymeren beholder minst 80 % av den naturlige FVIII biologiske aktivitet.
- 20 8. Molekyl ifølge krav 6, hvorved molekylet beholder minst 80 % av den naturlige FVIII biologiske aktivitet.



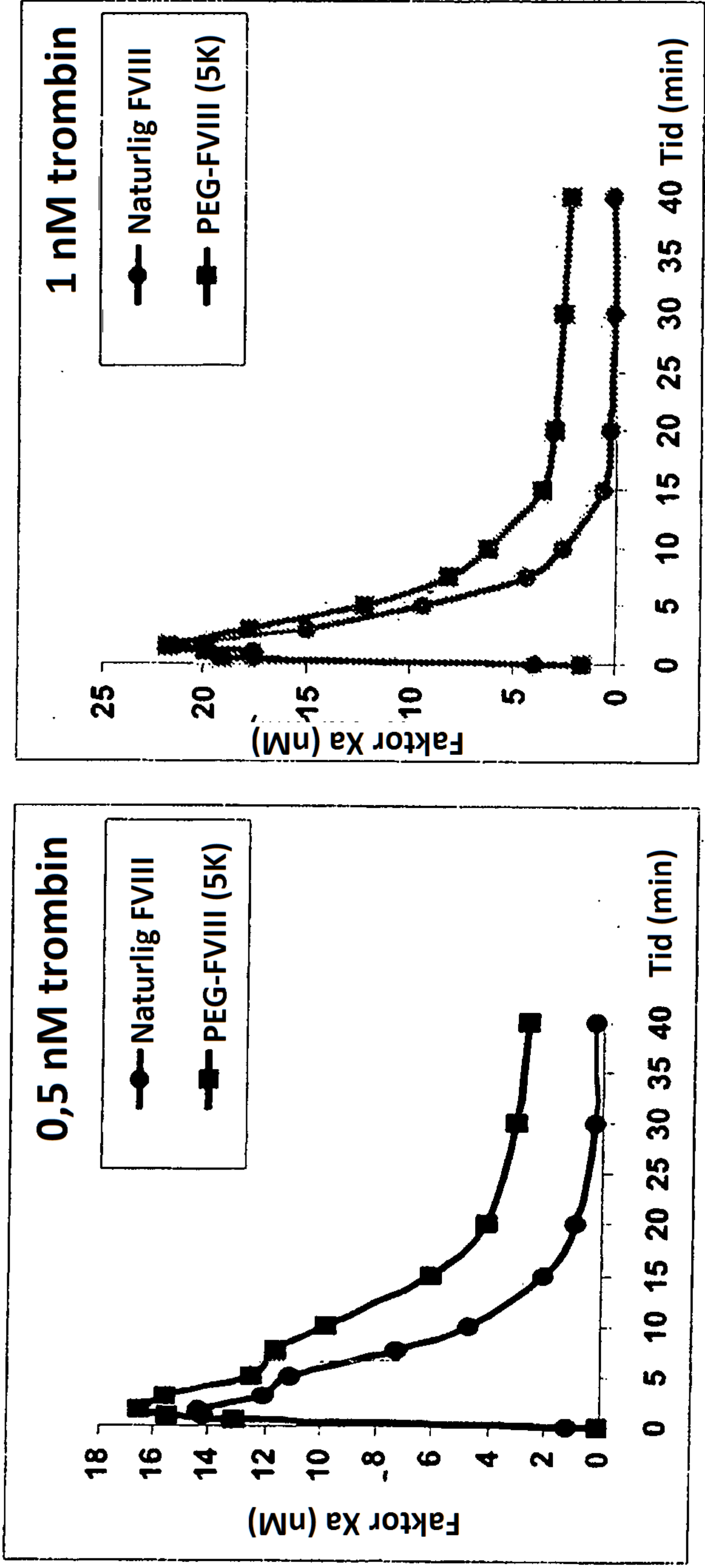
Figur 1



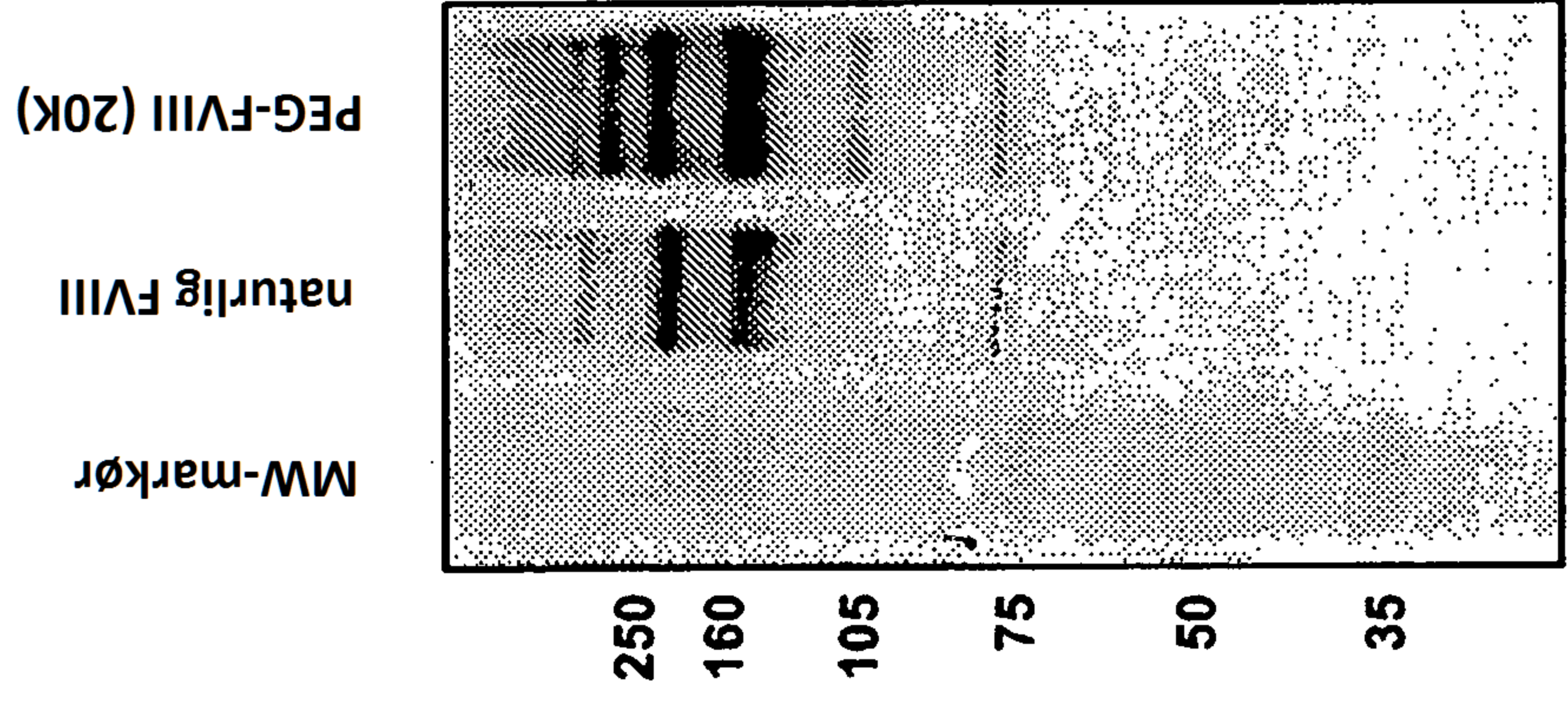
Figur 2



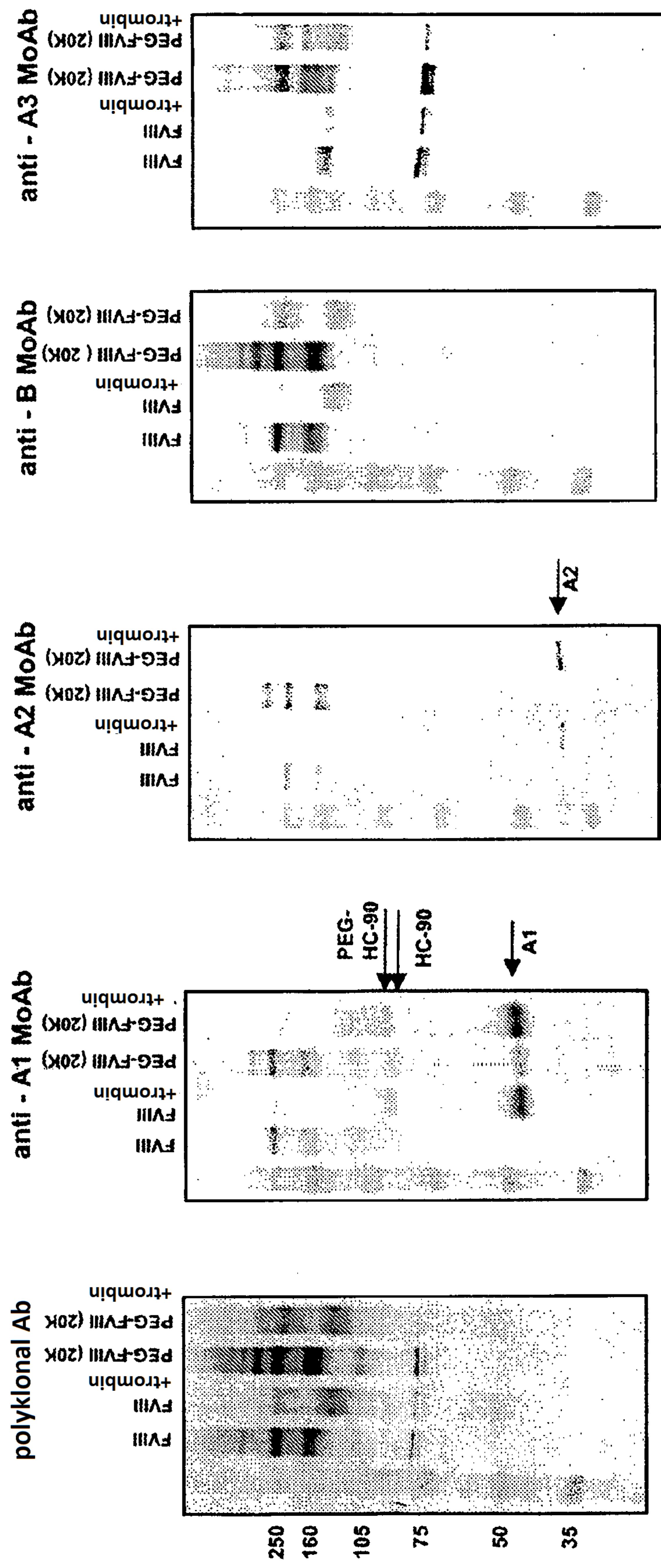
Figur 3



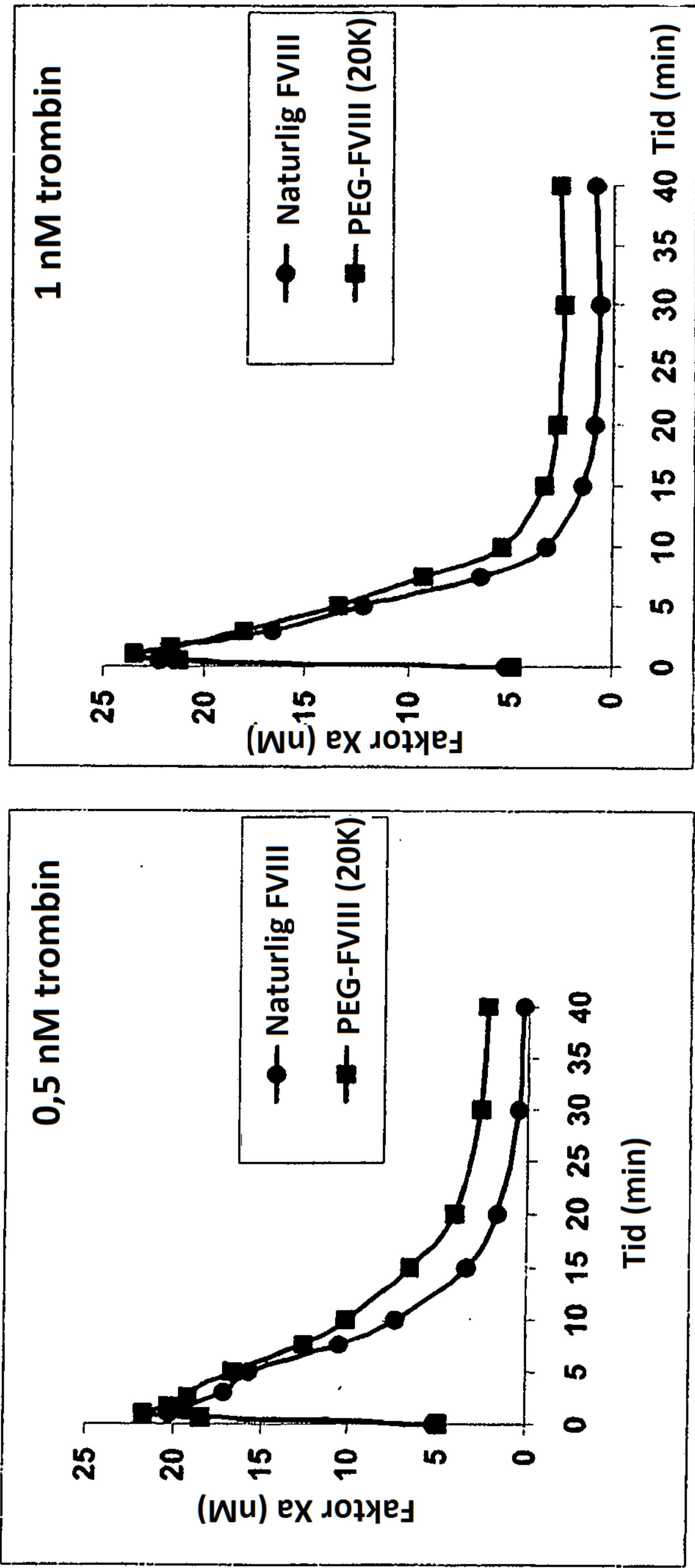
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7