



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2349341 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
A61K 47/48 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.03.03
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.10.09
(86)	Europeisk søknadsnr	09748174.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.14
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.08.03
(30)	Prioritet	2008.10.15, US, 105548 P
(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 Healthcare SA, Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), CH-Sveits Baxter International Inc, One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015, US-USA
(72)	Oppfinner	MITTERER, Artur, Schwarzeckerweg 10, A-2304 Orth/donau, AT-Østerrike GRANINGER, Michael, Gernotgasse 3/11, A-1150 Vienna, AT-Østerrike HASSLACHER, Meinhard, Vortgartenstrasse 221/1/7, A-1020 Vienna, AT-Østerrike
(74)	Fullmektig	Curo AS, Industriveien 53, 7080 HEIMDAL, Norge

(54)	Benevnelse	Pegylering av rekombinante blodkoaguleringsfaktorer i nærhet av bundede antistoffer
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-94/13322 WO-A1-97/11957 WO-A1-98/40409

Beskrivelse

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen er relatert til en framgangsmåte for konjugering av blodkoaguleringsfaktor VIII (FVIII) til en vannløselig polymer, inkludert et poly(alkylenoksid) slik som polyetylenglykol (PEG) i nærvær av bundede antistoffer. Også beskrevet her, er

5 framgangsmåter for å forlenge halveringstiden *in vivo* av FVIII i blodet hos et pattedyr med en blødningslidelse forbundet med funksjonelle defekter eller svekkelser av FVIII.

Oppfinnelsens bakgrunn

[0002] Koaguleringsfaktor VIII (FVIII) sirkulerer i plasma ved en svært lav konsentrasjon og er bundet ikke-kovalent til von Willebrandfaktor (VWF). Under hemostase, separeres FVIII fra VWF og

10 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 syntesiseres som en enkeltkjedet forløper på om lag 270-330 kD med domenestrukturen A1-A2-B-A3-C1-C2. Når renses fra plasma (for eksempel "plasmaavledet" eller "plasmatisk"), er FVIII satt sammen av en tung kjede (A1-A2-B) og en lett kjede (A3-C1-C2).

15 Molmassen for den lette kjeden er 80 kD mens den tunge kjeden er i området 90-220 kD på grunn av proteolyse i B-domenet.

[0004] FVIII er også syntetisert som et rekombinant protein for terapeutisk bruk i blødningslidelser. Ulike analyser *in vitro* har blitt utledet for å bestemme den potensielle effekt av rekombinant FVIII (rFVIII) som en terapeutisk medisin. Disse analyser etterlikner effektene *in vivo*

20 av endogen FVIII. *In vitro* trombinbehandling med FVIII resulterer i en rask økning og påfølgende reduksjon av sin prokoagulante aktivitet, målt med analyse *in vitro*. Denne aktivering og inaktivering sammenfaller med spesifikk begrenset proteolyse både i de tunge og lette kjedene, som endrer tilgjengeligheten av ulike bindingsepitoper i FVIII, som for eksempel tillater FVIII å dissosiere fra VWF og bindes til en fosfolipidoverflate eller endre bindingsevnen til visse

25 monoklonale antistoffer.

[0005] Mangelen eller feilfunksjonen av FVIII er forbundet med de mest hyppige blødningslidelsene, hemofili A. Den aktuelle behandling for håndtering av hemofili A er erstatningsterapi med plasmaavledet eller rFVIII-konsentrat. Pasienter med alvorlig hemofili A med FVIII-nivå under 1 %, er generelt på profylaktisk terapi med det formål å holde FVIII over 1 %

30 mellom doseringer. Tatt i betraktning de midlere halveringstider for de ulike FVIII-produkter i sirkulasjon, kan dette vanligvis oppnås ved å gi FVIII to til tre ganger i uka.

[0006] Det finnes mange konsentrat på markedet for behandling av hemofili A. Ett av disse konsentratene er det rekombinante produktet Advate®, som produseres i CHO-celler og framstilles av Baxter Healthcare Corporation. Det tilsettes ingen menneske- eller dyreplasma proteiner eller albumin i cellekultiveringsprosessen, rensingen eller i den endelige formulering av dette produktet.

[0007] Målet for mange produsenter av FVIII-konsentrat og terapeutiske polypeptidmedikamenter er å utvikle et neste generasjons produkt med forbedrede farmakodynamiske og farmakokinetiske egenskaper, mens det samtidig beholder alle andre produktkarakteristika.

[0008] Terapeutiske polypeptidmedikamenter blir ofte raskt degradert av proteolytiske enzymer og nøytralisert av antistoffer. Dette reduserer deres halveringstid og sirkulasjonstid, for derved å begrense deres terapeutiske effektivitet. Tilsatsen av en løselig polymer eller et karbohydrat til et polypeptid, har imidlertid vist seg å hindre degradering og øke 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 immunogenitet, økt fysisk 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 forbedre egenskapene for et FVIII-produkt. Teknikkens stand er dokumentert i ulike patenter og patentsøknader:

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

[0011] EP 1 258 497 B1 beskriver en framgangsmåte for framstilling av konjugater av FVIII og en biokompatibel polymer. Dette patentet ble supplementert av en publikasjon av Röstin et al. (Bioconj Chem 2000;11:387-96). Konjugatene omfatter et B-domene-slettet rekombinant FVIII modifisert med monometoksy-polyetylenglykol. Konjugatet hadde redusert FVIII-funksjon og den koagulerende effekt avtok raskt med modifiseringsgraden.

[0012] WO 04 075923 A3 beskriver polymer-FVIII molekulære konjugat som omfatter en rekke konjugater der hvert konjugat har en til tre vannløselige polymerer festet kovalent til et FVIII-molekyl. FVIII-molekylet er B-domene-slettet.

[0013] US patentskrift 4,970,300 beskriver en modifisert FVIII, der et usmeltbart konjugat som omfatter et protein med FVIII-aktivitet ble kovalent bundet til en ikke-antigenisk ligand.

[0014] US patentskrift 6,048,720 beskriver konjugater av et polypeptid og en biokompatibel polymer.

[0015] WO 94/15625 beskriver FVIII bundet til polyetylenglykol med en foretrukket molvekt på maksimalt 5,000 Dalton.

[0016] Ikke desto mindre foreligger det fremdeles et behov for forbedret FVIII med en tilkoblet løselig polymer for å forlenge halveringstiden av FVIII *in vivo*, som opprettholder funksjonell aktivitet og samtidig framskaffer en forlenget halveringstid *in vivo* sammenliknet med umodifisert FVIII og andre modifiserte FVIII terapeutika som er kjent på fagområdet.

Sammendrag av oppfinnelsen

[0017] Ifølge den foreliggende oppfinnelsen er det framskaffet en framgangsmåte for konjugering av en vannløselig polymer (WSP) til Faktor VIII (FVIII) ifølge krav 1.

[0018] Framgangsmåten for konjugering av en vannløselig polymer (WSP) til et Faktor VIII (FVIII) -molekyl omfatter (a) inkubering FVIII med FVIII-spesifikt antistoff under betingelser som tillater binding av antistoffet til dette FVIII for å danne et antistoff:FVIII-kompleks; (b) inkubering av antistoffet:FVIII-komplekset med nevnte WSP under betingelser som tillater konjugering av WSP til antistoffet:FVIII-komplekset; og (c) frigjøring av WSP-konjugatet FVIII fra antistoffet.

[0019] Også beskrevet her er en proteinaktig konstruksjon som omfatter, (a) et Faktor VIII (FVIII) -molekyl; og (b) i det minste et vannløselig polymer-(WSP)-molekyl bundet til faktor VIII-molekylet; der WSP er konjugert til FVIII-molekylet i nærvær av et antistoff som spesifikt binder FVIII. I en relatert utførelsesform, er faktor VIII-molekylet en rekombinant Faktor VIII. I nok en annen utførelsesform, er faktor VIII-molekylet fullengde Faktor VIII.

[0020] I nok en annen utførelsesform av oppfinnelsen, er WSP-molekylet et PEG-molekyl. I en relatert utførelsesform, har WSP-molekylet en molvekt på om lag 2,000 til om lag 150,000 Da, eller om lag 10,000 til om lag 50,000 Da. I en annen utførelsesform, har WSP-molekylet en molvekt på

om lag 20,000 Da. I nok en annen utførelsesform av oppfinnelsen, har WSP-molekylet has en lineær eller forgrenet struktur.

[0021] I nok en annen utførelsesform av oppfinnelsen, er det forannevnte antistoffet immobilisert på en harpiks.

- 5 **[0022]** Framgangsmåter for konjugering av WSP ifølge oppfinnelsen omfattes av den foreliggende oppfinnelsen. Framgangsmåten for konjugering en vannløselig polymer (WSP) til Faktor VIII (FVIII) omfatter (a) inkubering av FVIII med FVIII-spesifikt antistoff under betingelser som tillater binding av antistoffet til FVIII for å danne et antistoff: FVIII-kompleks; (b) inkubering av antistoffet: FVIII-kompleks med nevnte WSP under betingelser som tillater konjugering av WSP til antistoffet: FVIII-
- 10 kompleks; og (c) frigjøring av WSP-konjugatet FVIII fra antistoffet, der WSP velges fra gruppen bestående av polyetylglykol (PEG), forgrenede PEG, polysialinsyre (PSA), karbohydrat, polysakkarider, pullulan, chitosan, hyaluronsyre, chondroitinsulfat, dermatansulfat, stivelse, dekstran, karboksymetyl-dekstran, polyalkylenoksid (PAO), polyalkylenglykol (PAG), polypropylenglykol (PPG) polyoksazolin, polyakryloylmorfolin, polyvinylalkohol (PVA),
- 15 polykarboksylat, polyvinylpyrrolidon, polyfosfazen, polyoksazolin, polyetylen-ko-maleinsyreanhydrid, polystyren-ko-maleinsyreanhydrid, poly(1-hydroksymetyletylen-hydroksymetylformal) (PHF), og/eller 2-metakryloyloksy-2'-etyltrimetylammoniumfosfat (MPC).

[0023] I nok en annen utførelsesform er FVIII fullengde FVIII.

- [0024]** I nok en annen utførelsesform av oppfinnelsen, er det framskaffet en framgangsmåte
- 20 beskrevet foran der WSP har en molvekt på om lag 2,000 til om lag 150,000 Da. I en annen utførelsesform har WSP en lineær eller forgrenet struktur. I en utførelsesform er WSP representert ved PEG. I en annen utførelsesform er WSP representert ved PSA. I nok en annen utførelsesform av oppfinnelsen, er det framskaffet en framgangsmåte beskrevet foran der antistoffet er immobilisert på en harpiks.

- 25 **[0025]** I tillegg til de forannevnte framgangsmåtene, er det også her beskrevet proteinaktige konstruksjoner. I ett eksempel er det framskaffet en proteinaktig konstruksjon som omfatter (a) en blodkoaguleringsfaktor; og (b) i det minste et vannløselig polymer-(WSP)-molekyl bundet til blodkoaguleringsfaktoren; der WSP er konjugert til blodkoaguleringsfaktoren i nærvær av et antistoff som spesifikt binder blodkoaguleringsfaktoren, der blodkoaguleringsfaktoren velges fra
- 30 gruppen bestående av Faktor IX (FIX), Faktor VIII (FVIII), Faktor VIIa (FVIIa), Von Willebrands Faktor (VWF), Faktor FV (FV), Faktor X (FX), Faktor XI, Faktor XII (FXII), thrombin (FII), protein C, protein S, tPA, PAI-1, vevsfaktor (TF) og ADAMTS 13 protease, og der WSP velges fra gruppen bestående av

polyetylglykol (PEG), forgrenede PEG, polysialinsyre (PSA), karbohydrat, polysakkarider, pullulan, chitosan, hyaluronsyre, chondroitinsulfat, dermatansulfat, stivelse, dekstran, karboksymetyl-dekstran, polyalkylenoksid (PAO), polyalkylenglykol (PAG), polypropylenglykol (PPG) polyoksazolin, polyakryloylmorfolin, polyvinylalkohol (PVA), polykarboksylat, 5 polyvinylpyrrolidon, polyfosfazen, polyoksazolin, polyetylen-ko-maleinsyreanhydrid, polystyren-ko-maleinsyreanhydrid, poly(1-hydroksymetyletylen-hydroksymetylformal) (PHF) og/eller 2-metakryloyloksy-2'-etyltrimetylammoniumfosfat (MPC).

[0026] I nok et annet eksempel er den forannevnte proteinaktige konstruksjonen framskaffet der blodkoaguleringsfaktoren er FVIII. I et annet eksempel er FVIII fullengde FVIII.

10 [0027] I nok et annet eksempel, er det framskaffet en forannevnt proteinaktig konstruksjon der WSP har en molvekt på om lag 2,000 til om lag 150,000 Da. I et annet eksempel har WSP en lineær eller forgrenet struktur. I ett eksempel er WSP representert ved PEG. I et annet eksempel er WSP representert ved PSA. I nok et annet eksempel, er det framskaffet en forannevnt proteinaktig konstruksjon der antistoffet er immobilisert på en harpiks.

15 **Figurer**

[0028] Figur 1 viser tapet av FVIII-potensiale ved pegylering.

Detaljert beskrivelse av oppfinnelsen

[0029] De farmakologiske og immunologiske egenskaper ved terapeutiske proteiner kan forbedres ved kjemisk modifisering og konjugering med polymere forbindelser. Egenskapene ved de 20 resulterende konjugatene er generelt sterkt avhengig av strukturen og størrelsen av polymeren. PEGylering av blodkoaguleringsfaktorer, for eksempel FVIII, med for eksempel lysin-reaktive pegyleringskjemikalier er gjennomførbart men det kan observeres et ledsagende tap av potensiale. I en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen, blir følgelig FVIII modifisert under betingelser der deler av proteinoverflata er skjermet av bundede monoklonale antistoffer 25 som gjør FVIII-overflateområdet utilgjengelig for modifiseringene, for derved å redusere tapet av FVIII-potensial forårsaket av den ikke-posisjonsspesifikke reaksjonen.

[0030] Også beskrevet her er en proteinaktig konstruksjon som omfatter et FVIII-molekyl der i det minste en del av B-domenet er intakt, bundet til en vannløselig polymer som inkluderer, et polyalkylenoksid, polyvinylpyrrolidon, polyvinylalkohol, polyoksazolin, et poly-akryloylmorfolin, en 30 stivelse, eller et karbohydrat, slik som polysialinsyre (PSA) eller dekstran. I ett eksempel har den

vannløselige polymeren har en molvekt på mer enn 10,000 Dalton. I et annet eksempel har den vannløselige polymeren en molvekt på mer enn 10,000 Da til om lag 125,000 Da, om lag 15,000 Da til 35,000 Da, eller om lag 18,000 Da til om lag 25,000 Da. I et annet eksempel har den vannløselige polymeren en molvekt på 20,000 Da eller mer. I ett eksempel opprettholder konstruksjonen den

5 fulle funksjonelle aktivitet ved umodifiserte (naturlige) terapeutiske FVIII-produkter og framskaffer en forlenget halveringstid *in vivo* sammenliknet med umodifiserte terapeutiske FVIII-produkter. I et annet eksempel opprettholder konstruksjonen i det minste 10, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 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,

10 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 110, 120, 130, 140, eller 150 prosent (%) biologisk aktivitet i forhold til naturlig Faktor VIII. I et relatert aspekt, bestemmes de biologiske aktiviteter av den modifiserte og naturlige Faktor VIII av forholdene mellom kromogen aktivitet og FVIII antigenverdi (FVIII:Chr:FVIII:Ag). I nok et annet eksempel blir halveringstiden for modifisert FVIII redusert eller økt 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;

15 9; eller 10 ganger sammenliknet med halveringstiden for naturlig Faktor VIII *in vivo*.

Polypeptider

[0031] Som beskrevet her, inkluderer "blodkoaguleringsproteiner" eller "blodkoaguleringsfaktorer" Faktor IX (FIX), Faktor VIII (FVIII), Faktor VIIa (FVIIa), Von Willebrands Faktor (VWF), Faktor FV (FV), Faktor X (FX), Faktor XI, Faktor XII (FXII), thrombin (FII), protein C,

20 protein S, tPA, PAI-1, vevsfaktor (TF) og ADAMTS 13 protease. Som brukt her, viser betegnelsen "blodkoaguleringsprotein" eller "blodkoaguleringsfaktor" til enhver Faktor IX (FIX), Faktor VIII (FVIII), Faktor VIIa (FVIIa), Von Willebrands Faktor (VWF), Faktor FV (FV), Faktor X (FX), Faktor XII (FXII), thrombin (FII), protein C, protein S, tPA, PAI-1, vevsfaktor (TF) og ADAMTS 13 protease eller annen blodkoaguleringsfaktor, som oppviser biologisk aktivitet som er forbundet med det

25 spesifikke naturlige blodkoaguleringsproteinet.

[0032] I en utførelsesform av oppfinnelsen, er utgangsmaterialet av den foreliggende oppfinnelsen FVIII, som i ulike aspekter er avledet fra humant plasma eller produsert med 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. Her viser

30 betegnelsen "Faktor VIII" eller "FVIII" til ethvert FVIII-molekyl som oppviser biologisk aktivitet som er forbundet med naturlig FVIII. I en utførelsesform av oppfinnelsen, er FVIII-molekylet fullengde Faktor VIII. FVIII-molekylet er et protein som er kodet for av DNA-sekvenser med evne til å hybridisere til DNA-kodende Faktor VIII:C. Et slikt protein inneholder aminosyreslettinger ved ulike

posisjoner mellom eller inne i domenene A1-A2-B-A3-C1-C2 (US patentskrift 4,868,112). I andre aspekter er FVIII-molekylet en analog av naturlig FVIII der en eller flere aminosyrerester har blitt erstattet ved posisjonsrettet mutagenese.

[0033] Blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, -molekyler inkluderer et fullengdeprotein, 5 forløpere for et fullengdeprotein, biologisk aktive underenheter eller fragmenter av et fullengdeprotein, samt biologisk aktive derivater og varianter enhver av disse formene av et FVIII-protein. En henvisning til FVIII inkluderer derfor alle potensielle former av slike proteiner. Følgelig inkluderer FVIII-protein de som (1) har en aminosyresekvens som er større enn om lag 60 %, om lag 65 %, om lag 70 %, om lag 75 %, om lag 80 %, om lag 85 %, om lag 90 %, om lag 91 %, om lag 92 10 %, 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-likhet, over et område på i det minste om lag 25, om lag 50, om lag 100, om lag 200, om lag 300, om lag 400, eller flere aminosyrer (opp til fullengde sekvensen på 406 aminosyrer for de modne naturlige proteinet), til et polypeptid kodet av en referert nukleinsyre eller en aminosyresekvens beskrevet her; og/eller (2) spesifikt bundet til antistoffer, 15 for eksempel polyklonale eller monoklonale antistoffer, generert mot et immunogen som omfatter en referert aminosyresekvens som beskrevet her, et immunogenisk fragment av samme og/eller en konservativt modifisert variant av samme.

[0034] Betegnelsen "rekombinant blodkoaguleringsfaktor" for eksempel "rekombinant Faktor VIII" (rFVIII), "rekombinant FVII" (rFVII), som inkluderer rFVIIa og "rekombinant Faktor IX" (rFIX) 20 inkluderer enhver rekombinant blodkoaguleringsfaktor, for eksempel rFVIII, rFVII og rFIX, eller andre blodkoaguleringsfaktor heterologe eller naturlig forekommende, framskaffet via rekombinant DNA-teknologi. I visse utførelsesformer, omfatter betegnelsen proteiner som beskrevet foran.

[0035] Som brukt her, inkluderer "endogen blodkoaguleringsfaktor" for eksempel "endogen FVIII," 25 "endogen-avledet FVII," eller "endogen-avledet FIX" eller andre endogen-avlede blodkoaguleringsfaktorer FVIII, FVII, FIX eller annen blodkoaguleringsfaktor, som stammer fra pattedyret som skal motta behandling. Betegnelsen inkluderer også FVIII, FVII, FIX eller annen blodkoaguleringsfaktor transkribert fra et transgen eller ethvert annet fremmed DNA til stede i dette pattedyret. Som brukt her, inkluderer "eksogen blodkoaguleringsfaktor" for eksempel 30 "eksogen FVIII," FVIII som ikke har opphav fra dette pattedyret.

[0036] Som brukt her, inkluderer "plasmaavledet blodkoaguleringsprotein," for eksempel "plasmaavledet FVIII," "plasmaavledet FVII," eller "plasmaavledet FIX" eller annen plasmaavledet blodkoaguleringsfaktor eller "plasmatisk" alle former av proteinet funnet i blod framskaffet fra et pattedyr med den egenskapen at det aktiverer koaguleringsbanen.

- 5 **[0037]** 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 ved dette molekylet, slik som bindingsegenskaper og/eller den samme strukturelle basis, slik som en peptidstamme eller en basisk polymerenhet.

- [0038]** Variant- eller analoge polypeptider inkluderer innsettingsvarianter, der en eller flere aminosyrerester er addert til en blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, eller FIX, aminosyresekvens av oppfinnelsen. Innsettinger kan være lokalisert ved den ene eller begge endene av proteinet og/eller kan være posisjonert inne i indre områder av FVIII-aminosyresekvensen. Innsettingsvarianter, med ekstra rester ved den ene eller begge endene, inkluderer for eksempel fusjonsproteiner og proteiner som inkluderer aminosyremarkører eller
10 andre aminosyremarkører. I ett aspekt inneholder FVIII-molekylet valgfritt en N-terminal Met, særlig når molekylet uttrykkes rekombinant i en bakteriecelle, slik som E. coli.

- [0039]** I slettevarianter, er en eller flere aminosyrerester i en blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, eller FIX eller annen blodkoaguleringsfaktor-polypeptid som beskrevet her, fjernet. Slettinger kan utføres ved den ene eller begge endene av FVIII-polypeptidet og/eller med fjerning
20 av en eller flere rester inne i FVIII-aminosyresekvensen. Slettevarianter inkluderer derfor fragmenter av en FVIII polypeptidsekvens.

- [0040]** I subsitusjonsvarianter, er en eller flere aminosyrerester av en blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, eller FIX eller annet blodkoaguleringsfaktor-polypeptid, fjernet og erstattet med alternative rester. I ett aspekt er substitusjonene konservative i natur og konservative
25 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 (1975), s 71-77] og framsatt umiddelbart nedenfor.

Konservative substitusjoner

- 30 **[0041]**

Sidekjedekarakteristikker Aminosyre

Ikke-polar (hydrofob):

	A. Alifatisk	ALIVP
	B. Aromatisk	FW
5	C. Svovelholdig	M
	D. Grense	G

Uladet-polar:

	A. Hydroksyl	STY
	B. Amider	NQ
10	C. Sulfhydryl	C
	D. Grense	G

Positivt ladet (basisk) KRH

Negativt ladet (syreholdig) DE

[0042] Eksempler på alternative konservative substitusjoner er beskrevet umiddelbart nedenfor.15 KONSERVATIVE SUBSTITUSJONER II**[0043]****Original rest****Eksempelsubstitusjon**

Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu

10

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
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

VANNLØSELIGE POLYMERER

[0044] I ett aspekt, er en blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, eller FIX eller et annet blodkoaguleringsfaktor-derivatmolekyl som er framskaffet, bundet til en vannløselig polymer som inkluderer, egnede klinisk akseptable, vannløselige polymerer, slik som PEG, polyetylenglykol propionaldehyd, kopolymerer av etylenglykol/propylenglykol, polyoksazolin, et polyakryloylmorfolin, monometoksy-polyetylenglykol, karboksymetylcellulose, polyacetaler, polyvinylalkohol (PVA), polyvinylpyrrolidon, poly-1,3-dioksolan, poly-1,3,6-trioksan, etylen/maleinsyreanhydrid-kopolymer, poly(β -aminosyrer) (enten homopolymerer eller tilfeldige kopolymerer), poly(n-vinyl-pyrrolidon)polyetylenglykol, propropylenglykol homopolymerer (PPG) og andre polyakyleneoksider, polypropylenoksid/etylenoksid kopolymerer, polyoksyetylerter

polyoler (POG) (for eksempel glyserol) og andre polyoksyetylerter polyoler, polyoksyetylert sorbitol eller polyoksyetylert glukose, kolonsyrer eller andre karbohydratpolymerer, Ficoll eller dekstran og blandinger av samme.

[0045] Polysakkaridpolymerer er en annen type vannløselig polymer som bak brukes til modifisering av protein eller peptid. Modifisering av proteiner eller peptider ved tilsats av polysakkarid(er), for eksempel glykosylering, kan øke halveringstid, redusere antigenitet, øke stabilitet og redusere proteolyse. Dekstraner er polysakkaridpolymerer som omfatter individuelle underenheter av glukose hovedsakelig bundet via α 1-6-bindinger. Dekstranet i seg selv er tilgjengelig i mange molvektområder og er lett tilgjengelig i molvekter fra om lag 1 kD til om lag 70 kD. Dekstran er en egnet vannløselig polymer for bruk i den foreliggende oppfinnelsen som en bærer i seg selv eller i kombinasjon med en annen bærer (for eksempel Fc). Se for eksempel WO 96/11953 og WO 96/05309. Bruken av dekstran konjugert til terapeutiske eller diagnostiske immunoglobuliner har blitt rapportert; se for eksempel EP patentpublikasjon 0 315 456. Dekstran på om lag 1 kD til om lag 20 kD er foretrukket når dekstran brukes som en bærer i henhold til den foreliggende oppfinnelsen.

[0046] I en utførelsesform av oppfinnelsen, inkluderer en vannløselig polymer polyetylen glykol (PEG), forgrenede PEG, polysialinsyre (PSA), karbohydrat, polysakkarider, pullulan, chitosan, hyaluronsyre, chondroitinsulfat, dermatan sulfat, stivelse, dekstran, karboksymetyl-dekstran, polyalkylenoksid (PAO), polyalkylenglykol (PAG), polypropylenglykol (PPG) polyoksazolin, polyakryloylmorfolin, polyvinylalkohol (PVA), polykarboksylat, polyvinylpyrrolidon, polyfosfazen, polyoksazolin, polyetylen-ko-maleinsyreanhydrid, polystyren-ko-maleinsyreanhydrid, poly(1-hydroksymetyletylen hydroksymetylformal) (PHF) og/eller 2-metakryloyloksy-2'-etyltrimetylammoniumfosfat (MPC).

[0047] Den vannløselige polymeren kan være et sialinsyremolekyl. I ett eksempel opprettholder konstruksjonen den fulle funksjonelle aktivitet som standard terapeutisk blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, eller FIX eller andre blodkoaguleringsfaktor-produkter og framskaffer en forlenget halveringstid *in vivo* sammenliknet med naturlige terapeutiske FVIII-produkter. Den modifiserte FVIII, FVII, eller FIX eller en annen blodkoaguleringsfaktor opprettholder i det minste 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, eller 150 prosent (%) biologisk aktivitet sammenliknet med naturlig Faktor VIII, FVII, eller FIX eller annen blodkoaguleringsfaktor. I et relatert aspekt bestemmes de biologiske aktiviteter av den modifiserte og naturlige Faktor VIII av forholdene mellom kromogen aktivitet og FVIII

antigenverdi (FVIII:Chr:FVIII:Ag). Halveringstiden for den modifiserte FVIII reduseres eller økes 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 ganger i forhold til halveringstiden *in vivo* for naturlig Faktor VIII.

POLYNUKLEOTIDER

- 5 **[0048]** Nukleinsyrer som koder for en rekombinant blodkoaguleringsfaktor, for eksempel rFVIII, i den foreliggende beskrivelsen, inkluderer for eksempel, gener, pre-mRNA, mRNA, polymorfe varianter, alleler, syntetiske og naturlig forekommende mutanter. Proteiner som omfavnes av betegnelsen rFVIII inkluderer for eksempel de proteiner og polypeptider som er beskrevet foran, proteiner kodet av en nukleinsyre beskrevet foran, homologer fra flere arter og andre
- 10 polypeptider som:

- [0049]** Polynukleotider som koder for en blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, eller FIX eller en annen blodkoaguleringsfaktor ifølge beskrivelsen inkluderer også de som (1) spesifikt 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
- 15 nukleinsyresekvens som er større enn om lag 95 %, om lag 96 %, om lag 97 %, om lag 98 %, om lag 99 %, eller høyere nukleotidsekvens-likhet over et område på i det minste 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 til fullengdesekvensen på 1218 nukleotider i det modne proteinet), til en referanse-nukleinsyresekvens som beskrevet her.

- 20 **[0050]** 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 proteinene i den foreliggende beskrivelsen kan være rekombinante molekyler (for eksempel heterologe og koder for den ville sekvenstypen eller en variant av samme, eller ikke-naturlig forekommende).

- 25 **[0051]** Referanse polynukleotid- og polypeptidsekvenser inkluderer, for eksempel UniProtKB/Swiss-Prot P00451 (FA8_HUMAN); Gitschier J et al., Characterization of the human Factor VIII gene, *Nature*, 312(5992): 326-30 (1984); Vehar GH et al., Structure of human Factor VIII, *Nature*, 312(5992):337-42 (1984); og Thompson AR. Structure og Function of factor VIII gene and protein, *Semin Thromb Hemost*, 2003;29; 11-29 (2002), Faktor VII: GenBank aksessnummer
- 30 J02933 for genomsekvensen M13232 for cDNA (Hagen et al. *PNAS* 1986; 83: 2412-6), og P08709 for polypeptidsekvensen. En rekke polymorfismer av FVII har blitt beskrevet, se for eksempel Sabater-Lleal et al. (*Hum Genet.* 2006; 118:741-51); Faktor IX: UniProtKB/Swiss-Prot

aksessnummer P00740, US patentskrift 6,531,298; og VWF: GenBank aksessnummer NM_000552 og NP_000543.

FRAMSTILLING AV BLODKOAGULERINGSFAKTOR

[0052] Framstilling av blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, FIX, eller en annen blodkoaguleringsfaktor inkluderer enhver framgangsmåte som er kjent på fagområdet i (i) framstilling av rekombinant DNA ved genetisk konstruksjon, (ii) introdusering av rekombinant DNA i prokaryote eller eukaryote celler ved for eksempel transfeksjon, elektroporering eller mikroinjeksjon, (iii) kultivering av de transformerte cellene, (iv) uttrykke FVIII, for eksempel konstitutivt eller ved indusering, og (v) isolering av nevnte FVIII, som for eksempel fra kultiveringsmediet eller ved høsting av de transformerte cellene, for å (vi) oppnå rensset rFVIII.

[0053] I andre aspekter framstilles FVIII, FVII, FIX eller en annen blodkoaguleringsfaktor ved ekspresjon i et egnet prokaryot eller eukaryot vertssystem som produserer et farmakologisk akseptabelt rFVIII-molekyl. Eksempler på eukaryote celler er pattedyrceller, slik som CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, og HepG2.

[0054] Et bredt spekter vektorer brukes i framstilling av rFVIII, FVII, FIX eller en annen blodkoaguleringsfaktor og er valgt fra eukaryote og prokaryote ekspresjonsvektorer. Eksempler på vektorer for prokaryot ekspresjon inkluderer plasmider, slik som, og uten begrensning, pRSET, pET, og pBAD, der promoterene som brukes i prokaryote ekspresjonsvektorer inkluderer en eller flere av, lac, trc, trp, recA eller araBAD. Eksempler på vektorer for eukaryotisk ekspresjon inkluderer: (i) for ekspresjon i gjær, vektorer slik som, pAO, pPIC, pYES eller pMET, ved bruk av promotorer, slik som AOX1, GAP, GAL1 eller AUG1; (ii) for ekspresjon i insektsceller, vektorer slik som pMT, pAc5, pIB, pMIB, eller pBAC, ved bruk av promotorer slik som PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, eller polh, og (iii) for ekspresjon i pattedyrceller, vektorer slik som pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, eller pBPV, og vektorer avledet fra, i ett aspekt, virale systemer slik som vacciniavirus, adeno-assosierte virus, herpesvirus eller retrovirus, ved bruk av promotorer slik som CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, og β -actin.

PEGYLERING

[0055] I visse aspekter blir blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, FVII, FIX, eller andre blodkoaguleringsfaktormolekyler, konjugert til en vannløselig polymer med enhver av en rekke kjemiske metoder (Roberts JM et al., Advan Drug Delivery Rev 2002;54:459-76). For eksempel i en utførelsesform blir FVIII modifisert ved konjugering av PEG til frie aminogrupper i proteinet ved

bruk av N-hydroksybutansyreimid (NHS) -estere. I en annen utførelsesform kobles den vannløselige polymeren, for eksempel PEG, til frie SH-grupper ved bruk av maleimidkjemi eller koplingen av PEG-hydrazider eller PEG-aminer til karbohydrat-grupper i FVIII etter forutgående oksidasjon.

- 5 **[0056]** Konjugeringen utføres i ett aspekt ved direkte kobling (eller kobling via linkersystemer) av den vannløselige polymeren til blodkoaguleringsfaktor, for eksempel FVIII, under dannelse av stabile bindinger. I tillegg brukes degraderbare, frigjørbare eller hydrolyserbare linkersystemer i visse aspekter av 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 / WO
10 2006/138572 A2 / US 7,259,224B2 / US 7,060,259 B2).

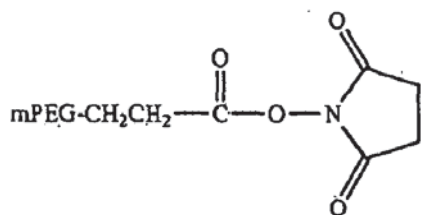
- [0057]** I en utførelsesform av oppfinnelsen, er FVIII modifisert via lysinrester ved bruk av polyetylenglykolderivater som inneholder en aktiv N-hydroksybutansyreimidester (NHS) slik som butansyreimidylbutansyre, butansyreimidylglutarat eller butansyreimidylpropionat. Disse derivatene reagerer med lysinrestene i FVIII under milde betingelser og danner en stabil
15 amidbinding. I en utførelsesform av oppfinnelsen, er kjedelengden av PEG-derivatet 5,000 Da. Andre PEG-derivater med kjedelengder på 500 til 2,000 Da, 2,000 til 5,000 Da, større enn 5,000 opp til 10,000 Da eller større enn 10,000 opp til 20,000 Da, eller større enn 20,000 opp til 150,000 Da er brukt i ulike utførelsesformer, inkludert lineære og forgrenede strukturer.

- [0058]** Alternative framgangsmåter for PEGyleringen av aminogrupper er den kjemiske
20 konjugering med PEG-karbonater ved dannelse av uretanbindinger, eller reaksjonen med aldehyder eller ketoner ved reduktiv animering som danner sekundære amidbindinger.

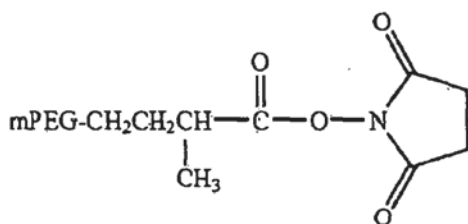
- [0059]** I en utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen blir FVIII-molekyl kjemisk modifisert ved bruk av PEG-derivater som er kommersielt tilgjengelig. Disse PEG-derivatene har i alternative aspekter lineære eller forgrenede strukturer. Eksempler på PEG-derivater som inneholder NHS-
25 grupper er opplistet nedenfor.

[0060] De følgende PEG-derivatene 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):

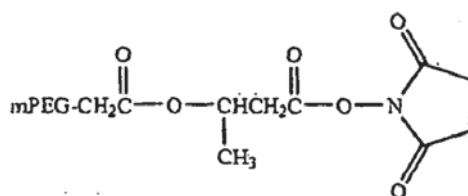
mPEG-Ravsyreimidylpropionat (mPEG-SPA)



mPEG-Ravsyreimidyl α -metylbutanoat (mPEG-SMB)



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

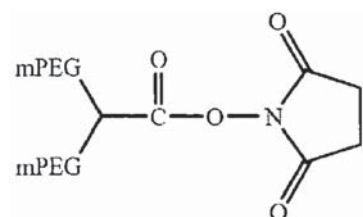


5

Struktur av forgrenede PEG-derivat (Nektar Therapeutics):

Forgrenet PEG N-Hydroksybutansyreimid (mPEG2-NHS)

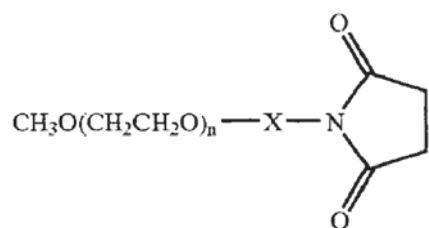
[0061]



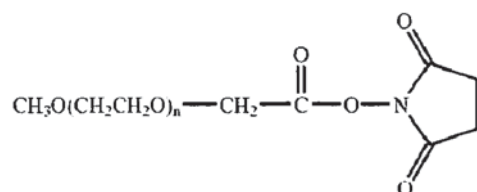
- 10 **[0062]** Disse reagensene med forgrenet struktur er beskrevet i nærmere detalj av Kozlowski et al. (BioMedicaments 2001;5:419-29).

[0063] Andre eksempler på PEG-derivater er kommersielt tilgjengelig fra NOF Corporation (Tokyo, Japan; se www.nof.co.jp/english: Catalogue 2005)

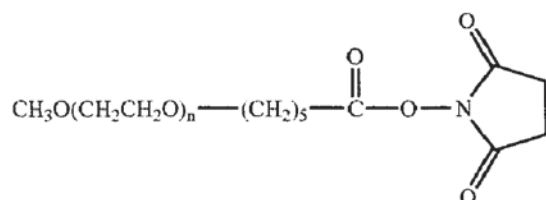
Generell struktur av lineære PEG-derivater (NOF Corp.):



X=karboksymetyl

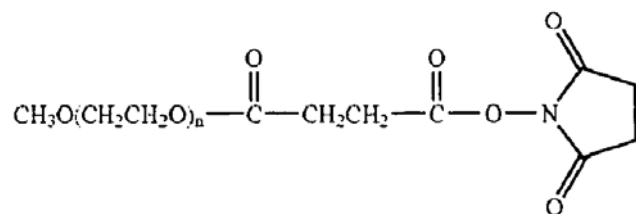


X=karboksypentyl



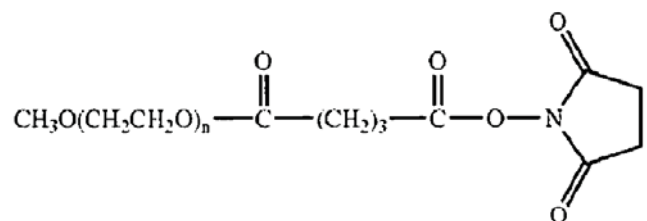
5

x=suksinat



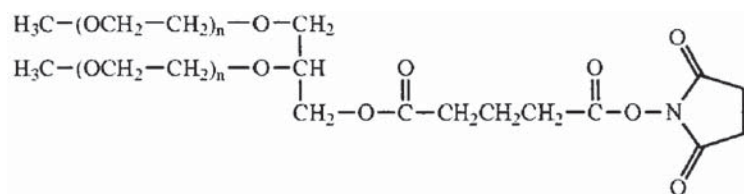
mPEG Ravsyreinimidylsuksinat

x=glutarat

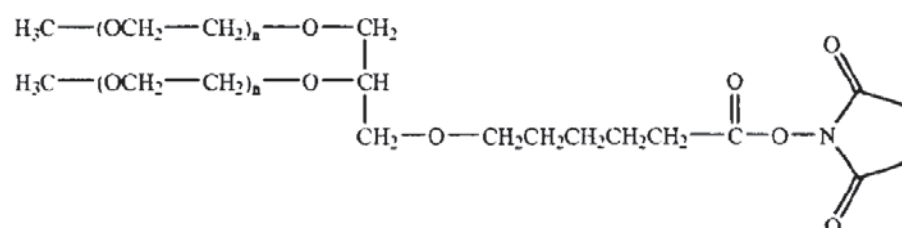


mPEG Ravsyreinimidylglutarat

- 10 **[0064]** Strukturer for forgrenede PEG-derivater (NOF Corp.): 2,3-Bis(metylpolyoksyetylen-oksy)-1-(1,5-diookso-5-butansyreimidyloksi, pentyloksy)propan



2,3-Bis(metylpolyoxyetylen-oksy)-1-(butansyreimidyl-karboksyentyloksy)propan



[0065] Disse propanderivatene oppviser en glyserolstamme med et 1,2 substitusjonsmønster. I den foreliggende oppfinnelsen er også forgrenede PEG-derivater basert på glyserolstrukturer med 1,3- substitusjon eller andre forgrenede strukturer beskrevet i US 2003/0143596A1 tatt i betraktning.

[0066] PEG-derivater med degraderbar (for eksempel hydrolyserbare lenkere) som beskrevet av Tsubery et al. (J Biol Chem 2004;279:38118-24) og Shechter et al. (WO04089280A3) er også tatt i betraktning.

[0067] Overraskende nok oppviser den PEGylerte FVIII-Faktor ifølge den foreliggende oppfinnelsen funksjonell aktivitet, kombinert med en forlenget FVIII halveringstid *in vivo*. I tillegg ser det ut til at PEGylert rFVIII ser ut til å være mer resistent mot trombin-inaktivering.

SIALINSYRE

- [0068]** Som brukt her, inkluderer "sialinsyregrupper" sialinsyremonomerer eller polymerer ("polysakkarider") som er løselig i en vannbasert løsning eller suspensjon og har lite eller ingen negativ effekt, slik som bivirkninger, på pattedyr ved administrering av PSA-FVIII-konjugatet i en farmasøytisk effektiv mengde. Polymerene er i ett aspekt kjennetegnet ved å ha fra 1 til 4 enheter. I visse aspekter er ulike sialinsyreenheter kombinert i en kjede.
- [0069]** I ulike aspekter av oppfinnelsen er sialinsyregrupper bundet til blodkoaguleringsfaktor FVIII, for eksempel med framgangsmåten beskrevet i US patentskrift 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 sialinsyrerester.

[0070] Andre teknikker for kobling av PSA til polypeptider er også kjent. For eksempel beskriver US publikasjon 2007/0282096 konjugering av et amin- eller hydrazidderivat av, for eksempel PSA, til proteiner. I tillegg beskriver US publikasjon 2007/0191597 PSA-derivater som inneholder en aldehydgruppe for reaksjon med substrater (for eksempel proteiner) ved den reduserende terminale enden.

[0071] I en utførelsesform av oppfinnelsen er polysialinsyredelen av polysakkaridforbindelsen svært hydrofil, og i en annen utførelsesform er hele forbindelsen svært hydrofil. Hydrofilitet er primært tildelt av de vedhengende karboksylgrupper i sialinsyreenhetene samt hydroksylgruppene. Sakkaridenheten inneholder i ulike aspekter, (andre funksjonelle) grupper, slik som amin-, hydroksyl- eller sulfatgrupper, eller kombinasjoner av samme. Disse gruppene er til stede på naturlig forekommende sakkaridforbindelser eller introdusert i derivat-polysakkaridforbindelser.

[0072] Polysakkaridforbindelser av særlig nytte for oppfinnelsen er i ett aspekt de som produseres av bakterier. Noen av disse naturlig forekommende polysakkaridene er kjent som glykolipider. I en utførelsesform er polysakkaridforbindelsene hovedsakelig uten terminale galaktoseenheter.

BLODKOAGULERINGSFAKTOR ANTISTOFFER

[0073] Som brukt her, viser betegnelsen "antistoff" til monoklonale og polyklonale antistoffer, enkeltkjedede antistoffer, kimere antistoffer, bifunksjonale/bispesifikke antistoffer, humaniserte antistoffer, humane antistoffer og komplementært bestemmende område (CDR)-podede antistoffer, som er spesifikk for målproteinene eller fragmenter av samme. Betegnelsen "antistoff" inkluderer videre *in vivo* terapeutisk antistoff genoverføring. Antistofffragmenter, inkludert Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, og Fv er også framskaffet av oppfinnelsen. Antistoffer kan i noen foretrukne utførelsesformer være monoklonale, humaniserte, primatiserte, enkeltkjedede eller kimere antistoffer.

[0074] Som brukt her, viser betegnelsen "epitop" til en antigenisk determinant i et polypeptid. I noen utførelsesformer kan en epitop omfatte 3 eller flere aminosyrer i romlig konfigurasjon som er unik for epitopen. I noen utførelsesformer er epitoper lineære eller formede epitoper. Generelt består en epitop av i det minste 4 slike aminosyrer og består mer vanlig av i det minste 8-10 slike aminosyrer. Framgangsmåter for bestemmelse av den romlige konfigurasjon av aminosyrer er kjent på fagområdet og inkluderer for eksempel røntgenkrystallografi og 2-dimensjonal kjernemagnetisk resonans.

- [0075]** I noen utførelsesformer velges antistoffet fra gruppen bestående av et monoklonalt antistoff, et humanisert antistoff, et kimert antistoff, et primatisert antistoff, et fag-vist antistoff, et enkeltkjede antistoff eller et fragment av ethvert av de forannevnte. I noen foretrukne utførelsesformer er antistoffet et humanisert antistoff. Humaniserte antistoff kan framskaffes med
- 5 en rekke metoder inkludert for eksempel: (1) poding av de ikke-humane komplementære bestemmende områdene (CDRs) på et humant rammeverk og konstant område (en prosess som i faget betegnes som "humanisering") eller alternativt (2) transplantering av hele de ikke-humane variable domenene, men "tildekking" med en menneskeliknende overflate ved å erstatte overflaterester (en prosess som i faget betegnes som "belegging"). I den foreliggende oppfinnelsen
- 10 vil humaniserte antistoffer inkludere både "humaniserte" og "belagte" antistoffer. Tilsvarende kan humane antistoffer være framstilt ved å introdusere humane immunglobulinloci i transgene dyr, for eksempel mus der de endogene immunoglobulingenene har blitt helt eller delvis inaktivert. Ved utfordring, er det observert framstilling av humant antistoff som ligger nær opptil det som observeres i mennesker i alle henseender, inkludert gen-omorganisering, sammensetning og
- 15 antistoffrepertoar. Denne tilnærmingen er beskrevet i for eksempel US patentskrift 5,545,807; 5,545,806; 5,569,825; 5,625,126; 5,633,425; 5,661,016 og i de følgende vitenskapelige publikasjonene: Marks et al., Bio/Technology 10, 779 783 (1992); Lonberg et al., Nature 368 856 859 (1994); Morrison, Nature 368, 812 13 (1994); Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845 51 (1996); Neuberger, Nature Biotechnology 14, 826 (1996); Lonberg og Huszar, Intern. Rev.
- 20 Immunol. 13 65 93 (1995); Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:6851-6855 (1984); Morrison og Oi, Adv. Immunol., 44:65-92 (1988); Verhoeyer et al., Science 239:1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun. 28:489-498 (1991); Padlan, Molec. Immunol. 31(3):169-217 (1994); og Kettleborough, C.A. et al., Protein Eng. 4(7):773-83 (1991).
- 25 **[0076]** Antistoffer ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også være festet til faste bærere, som er særlig egnet til immunoanalyser eller rensing av PEGylert blodkoaguleringsfaktor, rFVIII. Slike faste bærere inkluderer glass, cellulose, polyakrylamid, nylon, polystyren, polyvinylklorid eller polypropylen.
- [0077]** Monoklonale antistoffer kan framstilles ved bruk av framgangsmåten til Kohler et al. (1975)
- 30 Nature 256:495-496, eller en modifikasjon av samme. Ei mus blir typisk immunisert med en løsning som inneholder et antigen. Immunisering kan utføres ved blanding eller emulgering av den antigen-holdige løsningen i saltløsning, fortrinnsvis i et adjuvans slik som Freund's komplette adjuvans, og injisering av blandingen eller emulsjonen parenteralt. Enhver framgangsmåte for

immunisering som er kjent på fagområdet, kan brukes til å oppnå de monoklonale antistoffene ifølge oppfinnelsen. Etter immunisering av dyret, blir milten (og valgfritt, flere store lymfeknuter) fjernet og dissosiert i enkeltceller. Miltcellene kan screenes ved å påføre en celsuspensjon på ei plate eller en brønn belagt med det aktuelle antigenet. B-cellene som uttrykker membranbundet

5 immunglobulin spesifikt for antigenet, bindes til plata og blir ikke rensset vekk. Resulterende B-celler, eller alle dissosierte miltceller, induseres deretter til å forenes med myelomceller for å danne hybridoma, og kultiveres i et selektivt medium. De resulterende cellene platteres ved seriell eller begrenset fortykning og analyseres for framstillingen av antistoffer som spesifikt binder det aktuelle antigenet (og som ikke bindes til urelaterte antigener). Det valgte monoklonale antistoff

10 (mAb)-utskillende hybridoma blir deretter kultivert enten *in vitro* (for eksempel i flasker med vevskultur eller hulfiberreaktorer), eller *in vivo* (som ascites i mus).

[0078] Som et alternativ til bruken av hybridoma for ekspresjon, kan antistoffer produseres i en cellelinje slik som CHO- eller myelomacellelinjer, som beskrevet i US patentskrift 5,545,403; 5,545,405; og 5,998,144. I korte trekk blir cellelinjen underlagt transfeksjon med vektorer med

15 evne til å uttrykke henholdsvis en lett kjede og en tung kjede. Ved transfeksjon av de to proteinene på separate vektorer, kan det produseres kimere antistoffer. Immunol. 147:8; Banchereau et al. (1991) Clin. Immunol. Spectrum 3:8; og Banchereau et al. (1991) Science 251:70.

ADMINISTRERING

[0079] For å administrere blandinger som omfatter en proteinaktig konstruksjon ifølge den foreliggende beskrivelsen til mennesker eller forsøksdyr, omfatter i ett aspekt blandingen en eller flere farmasøytisk akseptable bærere. Betegnelsene "farmasøytisk" eller "farmakologisk akseptabel" viser til molekyllære entiteter og blandinger som er stabile, hindrer proteindegradering slik som produkter fra aggregering og splitting, og som i tillegg ikke produserer allergiske eller andre negative reaksjoner når administrert ved bruk av ruter som er velkjent på fagområdet, som

25 beskrevet nedenfor. "Farmasøytisk akseptable bærere" inkluderer ethvert og alle klinisk nyttige løsningsmidler, dispergerende medier, belegg, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske midler og absorpsjonsforsinkende midler, inkludert midlene beskrevet foran.

[0080] Blandingene administreres oralt, lokalt, transdermalt, parenteralt, ved inhalering av spray, vaginalt, rektalt, eller ved intrakranial injeksjon. Betegnelsen parenteral som brukt her, inkluderer

30 subkutane injeksjoner, intravenøs, intramuskulær, intracisternal injeksjon eller infusjonsteknikker. Administrering ved intravenøs, intradermal, intramuskulær, intramammarial, intraperitoneal, intratekal, retrobulbar, intrapulmonær injeksjon og eller kirurgisk implantasjon i en spesifikk

posisjon er også beskrevet. Generelt er blandinger hovedsakelig uten pyrogener, samt andre urenheter som kan være skadelig for mottakeren.

[0081] Enkle eller multiple administreringer av blandingen beskrevet med dosenivået og mønsteret velges av den behandelende lege. For forebygging eller behandling av en sykdom, vil den passende dose avhenge av typen sykdom som skal behandles, som beskrevet nedenfor, alvorlighetsgrad og forløp for sykdommen, hvorvidt medikamentet administreres for preventive eller terapeutiske formål, tidligere terapi, pasientens kliniske historie og respons overfor medikamentet, samt legens påpasselighet. Som brukt her, inkluderer "effektiv mengde" en dose som er egnet til å behandle et pattedyr med en blødningslidelse som skissert foran.

[0082] Også beskrevet her er en farmasøytisk blanding som omfatter en effektiv mengde av en proteinaktig konstruksjon som definert foran. Den farmasøytiske blandingen omfatter videre i ulike aspekter en farmasøytisk akseptabel bærer, tynner, salt, buffer eller bindemiddel. Den farmasøytiske blandingen ifølge beskrivelsen inkluderer løsninger eller lyofiliserte produkter. Løsninger av den farmasøytiske blandingen blir valgfritt underlagt enhver egnet lyofiliseringsprosess.

[0083] Også beskrevet her er sett som omfatter blandinger beskrevet her pakket på en måte som fremmer deres bruk i administrering til subjekter. Et slikt sett inkluderer en forbindelse eller blanding beskrevet her (for eksempel en blanding som omfatter en proteinaktig konstruksjon), pakket i en beholder slik som en forseglet flaske eller beholder, med en etikett festet til beholderen eller inkludert i pakken som beskriver bruken av forbindelsen eller blandingen i utføring av framgangsmåten. Settet kan inneholde en første beholder med en blanding som omfatter en proteinaktig konstruksjon og en andre beholder med en fysiologisk akseptabel rekonstituerende løsning for blandingen i den første beholderen. I ett aspekt er forbindelsen eller blandingen pakket i en enhets-doseringsform. Settet kan i tillegg inkludere en anordning egnet til administrering av blandingen i henhold til en spesifikk administreringsvei. Settet inneholder fortrinnsvis en etikett som beskriver bruken av det terapeutiske proteinet eller peptidblanding.

EKSEMPLER

Eksempel 1

PEGylering av Lysinrester i rFVIII

30 A. Immobilisering av FVIII

[0084] rFVIII-prøve ble inkubert med en anti-FVIII Immunaффinitetsharpiks ved likevekt under betingelser for å oppnå fullstendig metning av anti-FVIII mAb immobilisert på harpiksen (> 3 mg FVIII/g harpiks). I en utførelsesform bindes en anti-FVIII mAb til en epitop på rFVIII-molekylet som er forbundet med aktivitet av en rFVIII, blokkerer denne epitopen fra konjugering til en vannløselig polymer. Inkuberingen ble utført i en rulleanordning ved 2-8 °C over natta. Harpiksen med det bundede FVIII ble samlet ved filtrering med en glassfritte og vasket to ganger med buffer AQ2 (20 mM Hepes, 20 mM CaCl₂, 0,5 M NaCl, 0,1 % (v/v) Polysorbat 80 i WFI; pH 6,8 ± 0,2 ved RT).

B. PEGylering

[0085] PEGyleringen av det immobiliserte FVIII ble utført i henhold til en prosedyre anvendt i framstilling av det pegylerte FVIII i pilotskala ved bruk av et pegyleringsreagens levert av selskapet NEKTAR (San Carlos, California). Reagenset ble en 20 kDa PEG med en kjemi som fører til stabile FVIII-PEG-konjugater. Pegyleringsraten ble kontrollert med det molare overskudd av pegyleringsreagens til FVIII-protein. Etter reaksjonen, ble overskytende ureagert pegyleringsreagens inaktivert ved tilsats av en glysinløsning.

15 C. Gjenvinning av det PEGylerte FVIII

[0086] Anti-FVIII-harpiksen med det PEGylerte FVIII bundet, ble pakket inn i en kolonne og vasket med buffere AQ2 og AM3 (20 mM MES, 20 mM CaCl₂, 0,5 M NaCl, 0,1 % (v/v) Polysorbat 80 i WFI; pH 5,9 ± 0,2 ved RT). Desorpsjonen av FVIII ble utført ved pumping av buffere AH2 (20 mM Hepes, 20 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 0,1 % (v/v) Polysorbat 80 i WFI; pH 6,8 ± 0,2 ved RT) gjennom kolonnen etterfulgt av buffer AE1 (50 % (v/v) etylenglykol, 20 mM L-Histidin, 20 mM CaCl₂, 250 mM NaCl, 0,01 % (v/v) Polysorbat 80 i WFI; pH 6,8 ± 0,2 ved RT), som inneholdt 50 % etylenglykol. Det PEGylerte FVIII ble samlet i fraksjoner og gruppert i henhold til UV280-signalet.

D. Analyser

[0087] Totalt protein ble bestemt ved UV280-absorpsjon ved bruk av en eksperimentelt bestemt omregningsfaktor på 1,315 (1 mg/ml protein = 1,315 UV280 absorpsjon). Faktoren ble avledet fra en total proteinbestemmelse i henhold til Bradford-metoden (DF 1013/024).

[0088] Pegyleringsgraden for FVIII ble bestemt med en HPLC-metode ved bruk av en ELSD-detektor (fordampingsindusert lysspredningsdetektor). Prøven splittes av Pronase og de resulterende peptidene ble separert på en monolittisk C 18-kolonne og PEG-holdige peptider overvåkes av ELSD-overvåkeren.

E. Resultater

[0089] FVIII pegyleringsforsøk ble utført med lineære 20K polyetylenglykolmolekyler på et kompleks av rFVIII med det monoklonale antistoff F8.1 som bindes til en epitop lokalisert i A2-regionen av FVIII.

5 **[0090]** Komplekset ble dannet ved inkubering av en overskytende mengde av rFVIII (Advate BDS) med det monoklonale antistoff som ble immobilisert på en Sepharose CL 4B. Ubundet rFVIII ble fjernet ved vasking av mAB-harpiksen med ulike buffere i en glasskolonne, og komplekset immobilisert på Sepharose CL 4B ble helt over i en glassbeholder.

[0091] Deretter ble pegyleringsreaksjonen startet ved å tilsette pegyleringsreagenset som hadde en N-hydroksy-butansyreimid-reaktiv gruppe som fortrinnsvis reagerte med primære aminer i FVIII-polypeptidet (lysiner, N-terminus) under de anvendte betingelsene. Pegyleringsgraden ble kontrollert av overskuddet av PEG-reagens brukt i pegyleringsreaksjonen, som varierte fra 25 til 250 ganger molart overskudd overfor FVIII-proteinet i reaksjonen. Etter 6-10 timer kjemisk reaksjon ved romtemperatur, ble forsøket avsluttet ved å tilsette en råløsning av 100 mM glysin. Sepharose CL 4B ble på nytt pakket inn i en kolonne og overskytende PEG-reagens ble fjernet med ulike vasketrinn med 2 - 10 CV med AM3 og AQ2 buffere.

[0092] De resulterende stabile FVIII-PEG-konjugater ble separert fra mAb ved pumping av elusjonsbuffer AE1 gjennom kolonna og de samlede produktene ble testet for FVIII-aktivitet og pegyleringsgrad som beskrevet i eksempel 2 nedenfor.

20 Eksempel 2

Biokjemisk karakterisering av PEGylert rFVIII *in vitro*

[0093] Resultatene fra den biokjemiske karakteriseringen av PEGylert rFVIII er oppsummert i tabell 1 og 2 nedenfor.

Tabell 1

					FVIII spesifikk aktivitet		
Forsøk	FVIII	Over- skyttende PEG-	Utbytte	PEGyleringsgrad	Utgangsmatr.	PEGylert materiale	Reduksjon i aktivitet

		reagens						
	Enheter	Mol PEG/mol FVIII	% protein	% krom. akt.	Mol PEG/mol FVIII	Enheter/mg protein		%
1	13244	25	24	40	0,6	4836	3671	24
2	22156	25	50	48	0,5	4836	3672	28
3	23082	250	44	24	3,35	3904	1944	50
4	41325	75	32	21	2,3	5018	2965	40

Tabell 2

						FVIII spesifikk aktivitet		
Forsøk	FVIII	Over- skyttende PEG- reagens	Utbytte		PEGyleringsgrad	Utgangsmatr.	PEGylert materiale	Reduksjon i aktivitet
	Mio- enheter	Mol PEG/mol FVIII	% protein	% krom. akt.	Mol PEG/mol FVIII	Enheter/mg protein		%
1	5,11	50	77,6	5,6	4,4	9718	496	92,8
2	7,19	50	65,5	14,5	2,9	9718	2147	78
3	4,39	50	78,4	14,9	4,1	9718	1608	84
4	3,48	50	62,8	16,4	5,4	4145	974	76,5

[0094] Tabell 1 viser at det under de anvendte betingelsene ble oppnådd en pegyleringsgrad på 0,6 - 3,4 mol PEG/mol FVIII med en reduksjon av den FVIII-spesifikke aktivitet i området 24 - 50 %. Pegyleringseksperimenter ble også utført i pilotskala uten å kontakte FVIII med mAb før

pegyleringsreaksjonen. Resultater for 4 satser vist i tabell 2 indikerer at tapet av FVIII-effekt (spesifikk aktivitet) under ikke-beskyttende betingelser var vesentlig høyere sammenliknet med pegyleringseksperimentene utført i nærvær av mAb. I tillegg, når resultatene skisseres grafisk, kan det vises at tapet av FVIII-spesifikk aktivitet er i det minste delvis en funksjon av pegyleringsgraden (se figur 1).

[0095] I en oppsummering av disse resultatene, fører PEGylering av FVIII/mAB-kompleks til et PEGylert FVIII-molekyl som beholder en høyere spesifikk aktivitet sammenliknet med PEGyleringsreaksjoner med FVIII alene. Tapet av FVIII-spesifikk aktivitet er også en funksjon av pegyleringsgraden, som reguleres med forholdet mellom pegyleringsreagens og FVIII-protein.

10 Referanseeksempel 3

PEGylering av Lysinrester i Blodkoaguleringsfaktorer

[0096] PEGylering av blodkoaguleringsproteiner i henhold til eksempel 1 foran, er vurdert i den foreliggende oppfinnelsen. Eksempel 1 blir følgelig gjentatt ved bruk av en vilkårlig av følgende: Faktor IX (FIX), Faktor VIIa (FVIIa), Von Willebrands Faktor (VWF), Faktor FV (FV), Faktor X (FX), Faktor XI, Faktor XII (FXII), trombin (FII), protein C, protein S, tPA, PAI-1, vevsfaktor (TF) og ADAMTS 13 protease. For hver blodkoaguleringsfaktor identifisert, kan det brukes et antistoff, men er ikke påkrevet å ha en bindingsaffinitet for en epitop på en blodkoaguleringsfaktor forbundet med aktivitet av blodkoaguleringsfaktoren.

Patentkrav

1. Framgangsmåte for konjugering av en vannløselig polymer (WSP) til Faktor VIII (FVIII) omfatter:

(a) inkubering av FVIII med FVIII-spesifikt antistoff under betingelser som tillater binding antistoffet til nevnte FVIII for å danne et antistoff: FVIII-kompleks;

5 (b) inkubering av antistoffet: FVIII-kompleks med nevnte WSP under betingelser som tillater konjugering av WSP til antistoffet: FVIII-kompleks; og

(c) frigjøring av det WSP-konjugerte FVIII fra antistoffet, og

hvorved WSP velges fra gruppen bestående av polyetylglykol (PEG), forgrenet PEG, polysialinsyre (PSA), karbohydrat, polysakkarider, pullulan, kitosan, hyaluronsyre, chondroitinsulfat, dermatansulfat, stivelse, dekstran, karboksymetyl-dekstran, polyalkylenoksid
 10 (PAO), polyalkylenglykol (PAG), polypropylenglykol (PPG) polyoksazolin, polyakryloylmorfolin, polyvinylalkohol (PVA), polykarboksylat, polyvinylpyrrolidon, polyfosfazen, polyoksazolin, polyetylen-ko-maleinsyreanhydrid, polystyren-ko-maleinsyreanhydrid, poly(1-hydroksymetyletylen-hydroksymetylformal) (PHF), og/eller 2-metakryloyloksy-2'-
 15 etyltrimetylammoniumfosfat (MPC).

2. Framgangsmåte ifølge krav 1, der nevnte FVIII er fullengde FVIII.

3. Framgangsmåte ifølge krav 1, der nevnte WSP har en molvekt på om lag 2,000 til om lag 150,000 Da.

4. Framgangsmåte ifølge krav 3, der nevnte WSP har en lineær eller forgrenet struktur.

20 5. Framgangsmåte ifølge krav 4, der nevnte WSP er PEG.

6. Framgangsmåte ifølge krav 4, der nevnte WSP er PSA.

7. Framgangsmåte ifølge krav 1, der antistoffet er immobilisert på en harpiks.

Figur 1