



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2356467 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/86 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)
G01N 33/487 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2013.12.02
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.07.10
(86)	Europeisk søknadsnr	09768592.9
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.12.11
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.08.17
(30)	Prioritet	2008.12.11, US, 121788 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 International Inc., One Baxter Parkway, Deerfield, IL 60015, USA Baxter Healthcare SA, Thurgauerstrasse 130, 8152 Glattpark (Opfikon), Sveits
(72)	Oppfinner	WEBER, Alfred, Skraupstrasse 24/42/8, A-1210 Vienna, Østerrike HOEFINGHOFF, Joris, Guglgasse 8/2/38, A-1110 Vienna, Østerrike SIEKMANN, Juergen, Gerasdorfer Strasse 153/209, A-1210 Vienna, Østerrike TURECEK, Peter, Weidling Hauptstrasse 59g, A-3400 Klosterneuburg, Østerrike
(74)	Fullmektig	Curo AS, Industriveien 53, 7080 HEIMDAL, Norge

(54)	Benevnelse	Detektering av fysiologisk akseptable polymermolekyler ved bruk av nær infrarød spektroskopi
(56)	Anførte publikasjoner	A Dictionary of Chemistry, Oxford University Press, 6th ed, John Dainwith, definition of "polymer". CHRISTINE H PETTER ET AL: "Near infrared spectroscopy compared to liquid chromatography coupled to mass spectrometry and capillary electrophoresis as a detection tool for peptide reaction monitoring" AMINO ACIDS ; THE FORUM FOR AMINO ACID AND PROTEIN RESEARCH, SPRINGER-VERLAG, VI, vol. 34, no. 4, 20 December 2007 (2007-12-20), pages 605-616, XP019634448 ISSN: 1438-2199 DUAN WUBIAO ET AL: "Near IR emitting isothiocyanato-substituted fluorophores: their synthesis and bioconjugation to monoclonal antibodies." ORGANIC & BIOMOLECULAR CHEMISTRY 7 JUL 2005, vol. 3, no. 13, 7 July 2005 (2005-07-07), pages 2384-2386, XP002571161 ISSN: 1477-0520 Dictionary of Chemistry, McGraw-Hill, 2nd ed, definition of "polymer". JARVIS ROGER M ET AL: "Quantification of casein phosphorylation with conformational interpretation using Raman spectroscopy." THE ANALYST OCT 2007, vol. 132, no. 10, October 2007 (2007-10), pages 1053-1060, XP002571162 ISSN: 0003-2654 MENG FANTAO ET AL: "PEGylation of human serum albumin: Reaction of PEG-phenyl-isothiocyanate with protein" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 19, no. 7, July 2008 (2008-07), pages 1352-1360, XP002571163 ISSN: 1043-1802 PHILIP MOLYNEUX: 'Water-Soluble Synthetic Polymers: Properties and Behaviours', vol. 1, part CHAPTERS 3, 4 CRC PRESS page 75, 119 RODRIGUEZ-MARTINEZ JOSE A ET AL: "Stabilization of alpha-Chymotrypsin Upon PEGylation

Correlates With Reduced Structural Dynamics" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, vol. 101, no. 6, 11 June 2008 (2008-06-11) , pages 1142-1149, XP002571164 ISSN: 0006-3592

RONALD J BERNARDI ET AL: "Immunonanoshells for targeted photothermal ablation in medulloblastoma and glioma: an in vitro evaluation using human cell lines" JOURNAL OF NEURO-ONCOLOGY, KLUWER ACADEMIC PUBLISHERS, BO, vol. 86, no. 2, 6 September 2007 (2007-09-06), pages 165-172, XP019555486 ISSN: 1573-7373

SENGONUL MERIH ET AL: "Surface modification of protein nanocontainers and their self-directing character in polymer blends." POLYMER, vol. 48, no. 13, 2007, pages 3632-3640, XP002571165 ISSN: 0032-3861

TUNG C H ET AL: "NOVEL FACTOR XIII PROBES FOR BLOOD COAGULATION IMAGING" CHEMBIOCHEM - A EUROPEAN JOURNAL OF CHEMICAL BIOLOGY, WILEY VCH, WEINHEIM, DE, vol. 4, 1 January 2003 (2003-01-01), pages 897-899, XP008058462 ISSN: 1439-4227

Beskrivelse

Oppfinnelsens område

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen er generelt relatert til en framgangsmåte for å bestemme mengden av et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl bundet til et protein.

5 Oppfinnelsens bakgrunn

- [0002] Funksjonen *in vivo* av et protein kan forbedres ved å binde det til et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl, for eksempel polyetylglykol. Særlig kan binding av et fysiologisk aktivt protein til et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl vesentlig forlenge dets halveringstid *in vivo*. For eksempel US patentskrift 4,970,300 beskriver at konjugeringen av et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl til Faktor VIII resulterer i et Faktor VIII protein som kan aktiveres av trombin, og med en vesentlig redusert antigenitet og immunreaktivitet og en vesentlig økt forsvinningsstid *in vivo* i blodstrømmen hos et pattedyr. Internasjonal patentsøknad WO 94/15625 beskriver at konjugering av Faktor VIII til et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl forbedrer funksjonen *in vivo* av Faktor VIII (i) ved å øke dets motstand mot hydrolyse *in vivo* og følgelig forlenge dets aktivitet etter administrering, (ii) ved å forlenge dets sirkulasjonstid vesentlig *in vivo* over umodifisert protein, og (iii) ved å øke dets absorpsjonstid inn i blodstrømmen. Ytterligere forbedring av *in vivo* Faktor IX ved å binde den til fysiologisk akseptable polymermolekyler, særlig poly(etylglykol) ("PEG"), har blitt beskrevet i internasjonal patentsøknad WO 94/29370.
- [0003] For tiden foreligger det imidlertid ingen pålitelig metode for kvantitativ bestemmelse av fysiologisk akseptable polymermolekyler eller nanopartikler. Kolorimetriske metoder (Nag et al., Anal Biochem 250:35-43, 1997) er ufølsomme og tillater bare en estimering av innholdet av polymermolekyler og oppviser en deteksjonsgrense på omlag 1-5 µg PEG. Høytytelses væskekromatografi kan detektere PEG med en deteksjonsgrense på omlag 1-5 µg/ml (Kinahan et al., J Chromatogr 565:297-307, 1991); Ryan et al., J Pharm Sci 81:350-352, 1992); Ruddy et al. J Chromatogr B Biomed Appl 657:83-92, 1994). Faseinndeling kan brukes til å måle PEG men analysens sensitivitet er omlag 1 µg PEG (Guermant et al., Anal Biochem 230:254-258, 1995). Også monoklonale antistoffer for bestemmelse av PEG-konsentrasjoner har blitt beskrevet (US patentskrift 6,617,118), men så langt finnes det ingen system tilgjengelig for å gi en pålitelig bestemmelse av mengden fysiologisk akseptabel polymermolekyl som er bundet til et protein. Meng et al 2008 Bioconjugate Chem 19: 1352-1360 beskriver PEGylert humant serumalbumin og en framgangsmåte for å detektere termineringen av iboende tryptofanfluorescens med PEG i konjugatene etter eksitasjon ved 295 nm.
- [0004] Nær Infrarød Spektroskopi (NIRVIS) er målingen av bølgelengden av intensiteten av absorpsjonen av nært infrarødt lys i en prøve. NIRVIS måler oscillasjonen av kjemiske bindinger i det nær infrarøde lyset og gir verdifull informasjon om strukturen av molekylerne (Landau et al., J Agric Food Chem 50:1374-8, 2002). Nær infrarødt lys spenner over et bølgelengdeområde på omlag 680-2500 nm (NIR-bølgelengdetall: omlag 15 000-4 000 cm⁻¹) og er tilstrekkelig energirik til å eksitere overtoner og kombinasjoner av molekylvibrasjoner til høyere energinivå. Det nær-IR-området er ofte inndelt i de korte (680-1100 nm) og lange (1100-2500 nm) nær-IR-bølgelengdene, basert på teknologien som kreves for å analysere lys i disse bølgelengdeområdene (US patentskrift 7,280,866).

Lang bølgelengde nær-IR-absorpsjoner oppstår fra overtoner og kombinasjonsbånd av molekylvibrasjoner av C-H, N-H og O-H-grupper. NIRVIS brukes typisk til kvantitativ måling av organiske funksjonelle grupper, særlig O-H, N-H og C=O. Deteksjonsgrenser er typisk 0,1 % og anvendelse inkluderer farmasi, landbruk, polymer og klinisk analyse. Den lettvinde instrumenteringen av nær-infrarød spektroskopi sammenliknet med infrarød spektroskopi gjør det langt mer egnet for online overvåking og prosesskontroll. Duan et al (Org. Biomol. Chem., 2005, 3, 2384-2386) beskriver bruk av NIRVIS for å bestemme graden av merking av et antistoff.

[0005] Det foreligger følgelig et behov i faget for å framskaffe et nytt system for kvantitativ bestemmelse av mengden av et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl bundet til et protein.

Sammendrag av oppfinnelsen

[0006] Den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot oppdagelsen av at nær infrarød spektroskopi er nyttig i måling av polymerkonjugat på et proteinmolekyl og bestemmelse av uniformiteten av proteinpolymerkonjugatet som resulterer fra en konjugasjonsreaksjon.

[0007] I ett aspekt framskaffer oppfinnelsen en framgangsmåte for å bestemme antall vannløselige polymergrupper konjugert til et protein eller proteinkompleks i en prøve, og omfatter kontakt av prøven med en lyskilde i det nær infrarøde spektrum og måle relativ absorbansnivå over et område av de nær-infrarøde bølgelengdene, bestemme antall polymermolekyler konjugert til proteinet eller proteinkomplekset basert på bølgelengdespekter, hvorved bølgelengdespektra av prøven sammenlignes med tidligere beregnet standard med en kjent mengde polymermolekyler konjugert til et protein eller proteinkompleks. Det er tatt i betraktning at NIR-spektra også uttrykkes i bølgetall.

[0008] I en utførelsesform omfatter kontakten måling av reflektert stråling fra prøven som et flertall av tidsavhengige absorbansspekter.

[0009] I en relatert utførelsesform omfatter sammenlikningen konstruksjon av en kalibreringsdatamatrix fra et flertall nær-infrarøde absorpsjonsspektra av kjente prøver og sammenlikning av den målte spektroskopi av prøven som omfatter polymer-proteinkonjugatet.

[0010] De nær infrarøde bølgelengdene er i området 680-2500 nm. I en annen utførelsesform er bølgelengdene fra 680 til 1100 nm. I nok en utførelsesform er bølgelengdene fra 1100 til 2500 nm. I nok en annen utførelsesform uttrykkes de nær infrarøde spektra i bølgetall og bølgetallet er fra 4008cm^{-1} til 9996cm^{-1} (omlag 2500 til 1000 nm).

[0011] I en annen utførelsesform er den fysiologisk akseptable polymeren polyetylglykol (PEG). Det er tatt i betraktning at PEG er i et område fra 3 til 100 kDa, 5 til 60 kDa, 5 til 40 kDa, 5 til 25 kDa, 5 til 15 kDa eller i et område fra 5 til 10 kDa.

[0012] I nok en utførelsesform anviser oppfinnelsen at proteinet eller proteinkomplekset er et terapeutisk koaguleringsfaktor (blodfaktor)-protein eller terapeutisk koaguleringsfaktorproteinkompleks. I en utførelsesform omfatter proteinet eller

proteinkomplekset en blodfaktor valgt fra gruppen bestående av Faktor II, Faktor III, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, von Willebrand-faktor og fibrinogen.

5 [0013] I en relatert utførelsesform er proteinet von Willebrand-faktor. I en ekstra utførelsesform omfatter proteinkomplekset von Willebrand-faktor og Faktor VIII.

10 [0014] I et annet aspekt betrakter oppfinnelsen en framgangsmåte for fremstilling av en blanding med et jevnt antall vannløselige polymermolekyler i et protein eller proteinkompleks som omfatter konjugering av proteinet til et vannløselig molekyl for å framstille en prøve av et polymer-proteinkompleks; gjennomføre framgangsmåten beskrevet foran på polymer-proteinkomplekset; og isolere forbindelsene inne i prøven med det samme antall polymermolekyler basert på det nær infrarøde absorbansspekter.

Kort beskrivelse av figurene

[0015] Figur 1 viser en kalibreringsmodell for å bestemme PEGyleringsreaksjonsforløpet over tid ved bruk av en multiplikativ spredningskorreksjon (MSC) og en PLS-algoritme.

15 [0016] Figur 2 viser en kalibreringsmodell for å bestemme mengden av et polymermolekyl på et protein ved bruk av en kjemometrisk tilnærming.

Detaljert beskrivelse

20 [0017] Den foreliggende oppfinnelsen er rettet mot framgangsmåter for følsom kvantifisering av en mengde av et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl bundet til et protein.

[0018] Betegnelsen “prøve” som er brukt her, viser til enhver prøve som inneholder i det minste ett protein bundet til i det minste ett fysiologisk akseptabelt polymermolekyl, slik som ethvert fluid eller løsning med opphav fra en prosess for fremstilling av farmasøytiske produkter.

25 [0019] Betegnelsen “protein” som er brukt her viser til ethvert protein, proteinkompleks eller polypeptid, inkludert rekombinante proteiner, proteinkomplekser og polypeptider sammensatt av aminosyrerester lenket via peptidbindinger. Proteiner kan være framskaffet ved isolering av et protein fra *in vivo*, med syntetiske metoder eller framskaffet via rekombinant DNA-teknologi. syntetiske polypeptider kan være syntetisert for eksempel ved bruk av en automatisert polypeptid-syntetiseringsmaskin. Et rekombinant protein brukt i henhold til den foreliggende oppfinnelsen kan være produsert med enhver kjent framgangsmåte i faget som beskrevet her nedenfor. I en utførelsesform er proteinet et fysiologisk aktivt protein, inkludert et terapeutisk protein eller et biologisk aktivt derivat av samme. Betegnelsen “biologisk aktivt derivat” viser til en modifikasjon av et protein med hovedsakelig de samme funksjonelle og/eller biologiske egenskaper som forløperprotein. Betegnelsen “protein” viser typisk til store polypeptider. Betegnelsen “peptid” viser typisk til korte polypeptider. Som brukt her, brukes protein og peptid om hverandre. Et “proteinkompleks” viser til et molekyl som er satt sammen av i det minste ett protein bundet til i det minste ett andre protein. Eksempler på proteinkomplekser 30 inkluderer men er ikke begrenset til et protein bundet til en kofaktor eller 40

chaperonprotein, ligandreseptorkomplekser og multisubenhetsproteiner, slik som integriner og andre celleoverflatereseptorer som omfatter multiple protein-underenheter.

[0020] Som brukt her, viser et "fragment" av et polypeptid til enhver del av polypeptidet som er mindre enn det fullengde polypeptidet eller proteinekspresjonsproduktet.

5 Fragmenter er typisk sletteanaloger av det fullengde polypeptidet der en eller flere aminosyrerester har blitt fjernet fra amino-terminus og/eller karboksy terminus av det fullengde polypeptidet. Følgelig er "fragmenter" et subset eller undergruppe av sletteanaloger beskrevet nedenfor.

[0021] Som brukt her viser en "analog" eller "derivat" (som kan brukes om hverandre) til et polypeptid som er hovedsakelig lik i struktur og med samme biologisk aktivitet, selv om det i visse tilfeller er i en avvikende grad, til et naturlig forekommende molekyl. Analoger avviker i sammensetning av deres aminosyresekvenser sammenliknet med det naturlig forekommende polypeptidet som analogen er avledet fra, basert på en eller flere mutasjoner som involverer (i) sletting av en eller flere aminosyrerester ved en eller flere termini av polypeptidet og/eller en eller flere indre regioner av den naturlig forekommende polypeptidsekvensen, (ii) innføring eller addering av en eller flere aminosyrerester ved en eller flere termini (typisk en "addisjons"-analog) av polypeptidet og (eller en eller flere indre regioner (typisk en "innsettings"-analog) av den naturlig forekommende polypeptidsekvensen eller (iii) substitusjon av en eller flere aminosyrer med andre aminosyrer i den naturlig forekommende polypeptidsekvensen. Substitusjoner kan være konservative eller ikke-konservative basert på de fysiokjemiske eller funksjonelle relasjoner med aminosyren som erstattes og aminosyren som erstatter den.

10
15
20

[0022] I ett aspekt oppviser en analog omlag 70 % sekvenslikhet men mindre enn 100 % sekvenslikhet med en gitt forbindelse, slik som et peptid. Slike analoger eller derivater er i ett aspekt satt sammen av ikke naturlig forekommende aminosyrerester, inkludert for eksempel og uten begrensning homoarginin, ornithin, penicilamin og norvalin, samt naturlig forekommende aminosyrerester. Slike analoger eller derivater er i et annet aspekt sammensatt av en eller flere D-aminosyrerester, eller inneholder ikke-peptid-bindinger mellom to eller flere aminosyrerester. Betegnelsen "avledet fra" som er brukt her, viser til et polypeptid eller peptidsekvens som er en modifikasjon (inkludert aminosyresubstitusjon eller sletting) av en vill type eller naturlig forekommende polypeptid eller peptidsekvens og har en eller flere aminosyresubstitusjoner, addisjoner eller slettinger, slik at derivatsekvensen deler omlag 70 % men mindre 100 % sekvenslikhet med den ville typen eller naturlig forekommende sekvensen. I en utførelsesform kan derivatet være et fragment av et polypeptid, der fragmentet er hovedsakelig homologt (det vil si minst 70 %, minst 75 %, minst 80 %, minst 85 %, minst 90 %, eller minst 95 % homologt) over en lengde på minst 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 eller 50 aminosyrer av den ville typen polypeptid.

25
30
35

[0023] For sekvenssammenlikning, tjener typisk en sekvens som en referansesekvens som testsekvensene sammenliknes med. Ved bruk av en sekvenssammenlikningsalgoritme mates test- og referansesekvenser inn i en datamaskin, subsekvenskoordinater tildeles etter behov, og programparametre for sekvensalgoritmen blir tilordnet. Sekvenssammenlikningsalgoritmen beregner deretter prosent sekvensidentitet for testsekvensen(e) i forhold til referansesekvensen basert på de tildelte programparametrene.

40
45

[0024] Optimal innretting av sekvenser for sammenlikning kan utføres ved for eksempel den lokale homologialgoritmen Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), med homologiinnrettingsalgoritmen av Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), med søket etter likhetsmetoden av Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), med data-assisterte implementasjoner av disse algoritmene (GAP, BESTFIT, FASTA, og TFASTA i Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), eller ved visuell inspeksjon. Ett eksempel på en egnet algoritme er PILEUP, som bruker en forenkling av den progressive innrettingsmetoden av Feng & Doolittle, J. Mol. Evol. 35:351-360 (1987) og er lik metoden beskrevet av Higgins & Sharp, CABIOS 5:151-153 (1989). En annen algoritme som er nyttig til å danne multiple innrettinger av sekvenser er Clustal W (Thompson et al., Nucleic Acids Research 22: 4673-4680 (1994)). Et eksempel på algoritme som er egnet til å bestemme prosent sekvensidentitet og sekvensliket er BLAST-algoritmen (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Henikoff & Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989); Karlin & Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5787 (1993)). Programvare for å gjennomføre BLAST-analyser er allment tilgjengelig gjennom National Center for Biotechnology Information.

[0025] Substitusjoner er konservative eller ikke-konservative basert på den fysiokjemiske eller funksjonelle relasjon i aminosyren som skiftes og aminosyren som erstatter den. Substitusjoner av denne typen er velkjent i faget. Alternativt omfatter oppfinnelsen substitusjoner som også er ikke-konservative. Eksempler på konservative substitusjoner er beskrevet i Lehninger, [Biochemistry, 2nd Edition; Worth Publishers, Inc., New York (1975), pp.71-77] og er vist nedenfor.

Konservative substitusjoner

25 [0026]

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

Positivt ladet (basisk)	K R H
Negativt ladet (sur)	D E

[0027] Alternativt er eksempler på konservative substitusjoner vist like nedenfor.

Konservative substitusjoner II

[0028]

Original rest	Eksempelsubstitusjon
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
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

5

[0029] Som brukt her viser en "variant" til et protein eller en analog av samme som er modifisert til å omfatte ekstra kjemiske grupper som normalt ikke er en del av molekylet. Slike grupper kan forbedre molekylets løselighet, absorpsjon, biologisk halveringstid osv. Gruppene kan alternativt redusere molekylets giftighet og eliminere eller svekke eventuelle bieffekter av molekylet, og så videre. Grupper med evne til å mediere slike effekter er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). Prosedyrer for å kople slike grupper til et molekyl er velkjent i faget. For eksempel kan varianten være en blodkoaguleringsfaktor med en kjemisk modifikasjon som tildeler en lengre halveringstid

10

in vivo til proteinet. I visse aspekter er varianter polypeptider som er modifisert ved glykosylering, PEGylering eller polysilylering.

[0030] Som brukt her viser “naturlig forekommende”, anvendt på et protein eller polypeptid, til det faktum at proteinet kan finnes i naturen. For eksempel er et polypeptid eller polynukleotidsekvens som er til stede i en organisme (inkludert virus) som kan isoleres fra en kilde i naturen og som ikke har blitt tilsiktet modifisert av mennesker i laboratoriet naturlig forekommende. Betegnelsene “naturlig forekommende” og “vill type” brukes om hverandre.

[0031] Som brukt her, viser “plasmaavledet” som er anvendt på et protein eller polypeptid, til et naturlig forekommende polypeptid eller fragment av samme som er funnet i blodplasma eller serum hos et subjekt. Et plasmaavledet protein kan også være et naturlig forekommende protein og et protein av vill type.

[0032] Betegnelsen “fysiologisk akseptabelt molekyl” eller “fysiologisk akseptabel polymer” som brukt her, viser til polymermolekyler som er hovedsakelig løselig i vannbasert løsning eller kan være til stede i form av en suspensjon og har hovedsakelig ingen negativ innvirkning på pattedyr ved administrering av et polymerproteinkonjugat i en farmasøytisk effektiv mengde og kan anses som biokompatibel. I en utførelsesform omfatter fysiologisk akseptable molekyler fra omlag 2 til omlag 2000 repeterende enheter. Eksempler på fysiologisk akseptable polymerer inkluderer, men er ikke begrenset til, poly(alkylenglykoler), poly(olefinisk alkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(hydroksyalkylmetakrylamid), poly(hydroksyalkylmetakrylat), poly(sakkarider), poly(α -hydroksysyre), poly(vinylalkohol), polyfosfasfazen, polyoksazolin, poly(N-akryloylmorfolin), poly(alkylenoksid)polymerer, poly(maleinsyre), poly(DL-alanin), polysakkarider, slik som karboksymetylcellulose, dekstran, hyaluronsyre og chitin, poly(met)akrylater, og kombinasjoner av enhver av de forannevnte.

[0033] Det fysiologisk akseptable polymermolekylet er ikke begrenset til en spesiell struktur og kan være lineært (for eksempel alkoksy-OEG eller bifunksjonelt PEG), forgrenet eller multi-forgrenet (for eksempel forgrenet PEG eller PEG festet til en polyolkjerne), dendrittisk eller med degraderbare bindinger. Den indre strukturen av polymermolekylet kan dessuten være organisert i ethvert antall ulike mønstre og kan være valgt fra gruppen bestående av homopolymer, alternerende kopolymer, tilfeldig kopolymer, blokk-kopolymer, alternerende tripolymer, tilfeldig tripolymer og blokk-tripolymer.

[0034] Betegnelsen “PEGylert” som er brukt her, viser til et protein, proteinkompleks eller polypeptid bundet til en eller flere PEG-grupper. Betegnelsen “PEGylering” som er brukt her, viser til prosessen med å binde en eller flere PEG til et protein. I en utførelsesform er molvekten for nevnte PEG i området fra 3 til 100 kDa, fra 5 til 60 kDa, fra 5 til 40 kDa, fra 5 til 25 kDa, fra 5 til 15 kDa eller fra 5 til 10 kDa.

[0035] “Farmasøytisk blanding” viser til en blanding som er egnet til farmasøytisk bruk i dyr, inkludert mennesker og pattedyr. En farmasøytisk blanding omfatter en farmakologisk effektiv mengde av et polymer-polypeptid-konjugat og omfatter også en farmasøytisk akseptabel bærer. En farmasøytisk blanding omfatter en blanding som omfatter den eller de aktive bestanddeler og de inerte bestanddeler som utgjør bæreren, samt ethvert produkt som direkte eller indirekte resulterer fra kombinasjonen,

kompleksdannelsen eller aggregeringen av enhver av to eller flere av bestanddelene, eller fra dissosiering av en eller flere av bestanddelene, eller fra andre typer reaksjoner eller interaksjoner av en eller flere av bestanddelene. Følgelig omfatter de farmasøytiske blandinger ifølge den foreliggende oppfinnelsen enhver blanding laget ved å blande en forbindelse eller konjugat av den foreliggende oppfinnelsen og en farmasøytisk akseptabel bærer.

[0036] "Farmasøytisk akseptabel bærer" viser til enhver standard farmasøytisk bærer, buffer og tilsetningsstoffer, slik som en fosfatbufret saltløsning, 5 % vannbasert løsning av dekstrose, og emulsjoner, slik som en olje/vann- eller vann/olje-emulsjon, og ulike typer fuktemidler og/eller hjelpestoffer. Egnede farmasøytiske bærere og formuleringer er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Foretrukne farmasøytiske bærere avhenger av den tiltenkte administreringsmåte for det aktive middel. Typiske administreringsmåter inkluderer enteral (for eksempel oral) eller parenteral (for eksempel subkutan, intramuskulær, intravenøs eller intraperitoneal injeksjon; eller lokal, transdermal eller transmukosal administrering). Et "farmasøytisk akseptabelt salt" er et salt som kan formuleres inn i en blanding eller konjugat for farmasøytisk bruk inkludert for eksempel metallsalter (natrium, kalium, magnesium, kalsium osv.) og salter av ammoniakk eller organiske aminer.

[0037] "Farmasøytisk akseptabel" viser til et materiale som ikke er biologisk eller på annet vis uønsket, det vil si at materialet kan administreres til et individ uten å forårsake noen uønskede biologiske effekter eller samvirke i på en skadelig måte med noen av de andre bestanddelene av blandingen som den er opptatt i.

Nær infrarød (NIR)

[0038] Nær infrarødt lys spanner over et bølgelengdeområde på 700-2500 nm (NIR-bølgetall: omlag $14\,000\text{--}3\,500\text{ cm}^{-1}$) og omfatter tilstrekkelig energi til å eksitere overtoner og kombinasjoner av molekylvibrasjoner til høyere energinivå. Nær infrarøde (NIR) absorpsjoner har opphav i molekylære vibrasjoner, slik som fundamentale absorpsjoner som finnes i NIR-bånd (NIR) -spektroskopi. Nær-IR-absorpsjoner med lang bølgelengde oppstår fra overtoner og kombinasjonsbånd av molekylvibrasjonene av C-H-, N-H- og O-H-grupper. Nær infrarød spektroskopi (NIRVIS) brukes typisk til kvantitativ måling av organiske funksjonelle grupper, særlig O-H, N-H og C=O.

[0039] Nær-IR-området er ofte delt inn i de korte (680-1100 nm) og lange (1100-2500 nm) nær IR-bølgelengdene, basert på teknologien som kreves for å analysere lys i disse bølgelengdeområdene (US patentskrift 7,280,866). NIR-spektroskopi kan også deles inn i transmisjonsspektroskopi av væsker, omlag 750 til 1100 nm, og refleksjonsspektroskopi av pulverformig materiale, omlag 1100 til 2500 nm.

[0040] For å detektere ulike strukturer i en prøve, blir NIR-spektret tatt ved intervaller med lengde på 10 nm eller mindre for å detektere alle de ulike strukturene i spektret, for derved å resultere i et multivariert datasett. Derfor anvendes det en kombinasjon av mange spekterfrekvenser for å estimere konsentrasjonene av produktbestanddelene, som løses opp i nyttige datapunkter ved bruk av kjemometriske (statistiske) metoder.

[0041] Komponentene og utformingen av NIRVIS-instrumenteringen er lik den for UV absorpsjonsspektrometre. Lyskilden er vanligvis en wolframlampe og detektoren er

vanligvis en PbS fast fase detektor. Prøveholdere kan være glass eller kvarts og typiske løsningsmidler er CCl_4 og CS_2 . Lyskilde er framskaffet fra flere kilder med enkel bølgelengde, slik som lavkoherente superluminescente dioder (SLED) ved bølgelengder i det røde/nær infrarøde område (RNIR). Alternativt kan lyskilden være framskaffet fra en enkelt bredbåndskilde som er passende spaltefiltrert. Begge bølgelengdene for lys er med fordel rettet i en enkelt stråle.

[0042] I framgangsmåten ifølge den foreliggende oppfinnelsen måles det nær infrarøde absorpsjonsspekter ved bruk av en bølgelengde på omlag 680 til omlag 2500, i et annet eksempel ved en bølgelengde på omlag 680 til omlag 1100, i nok et eksempel ved bruk av en bølgelengde på omlag 1000 til omlag 2500 nm og nok et eksempel fra 1100 til omlag 2500 nm.

[0043] I en relatert utførelsesform måles NIR-absorpsjonen i henhold til bølgetall. NIR måles fra omlag 15000 cm^{-1} til 4000 cm^{-1} , fra omlag 15000 til 9000 cm^{-1} , eller fra omlag 9000 cm^{-1} til omlag 4000 cm^{-1} . I en utførelsesform måles NIR fra omlag 10000 til omlag 4000 cm^{-1} .

[0044] Etter nær infrarød spektroskopi bestemmes mengden polymer per proteinmolekyl ved bruk av teknikker kjent i faget. For eksempel er kjemometrisk spektroskopi betegnelsen som brukes til å beskrive den direkte kombinasjon av en spektroskopisk måling med en kjemometrisk dataevalueringsprosedyre, som typisk er en multivariabel statistisk metode som gir en deduksjon av de kvalitative og kvantitative egenskapene ved en prøve fra dets spekter (Næs et al., Multivariate Calibration and Classification, NIR Publications, Chichester, 2002). Kjemometriske analysemetoder er beskrevet i Roggo et al., (J Pharm Biomed Anal 44:683-700, 2007). I en utførelsesform brukes en multilineær regresjon (MLR) eller partielle minste kvadrat (PLS)-regresjon for den kvantitative bestemmelse av individuelle eller kombinerte parametere. Andre metoder for kjemometrisk analyse inkluderer, men er ikke begrenset til, prinsipiell komponentanalyse (PCA), lineær diskriminant analyse (LDA), myk uavhengig modellering av klasseanalogi (SIMCA), og diskriminante partielle minste kvadrat (PLS1 og PLS2) -regresjon.

[0045] Bestemmelser av mengden av et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl som er bundet til et protein i en prøve utføres ved korrelasjon av det nær infrarøde absorpsjonsspekteret av prøven med det nær infrarøde absorpsjonsspekteret av en prøve som inneholder proteinet bundet til en definert mengde av det fysiologisk akseptable polymermolekylet. I en utførelsesform inkluderer korrelasjonen trinnet med å framskaffe en kalibreringskurve framskaffet ved måling av det nær infrarøde absorpsjonsspekteret av prøver som inneholder proteiner bundet til ulike definerte mengder av de fysiologisk akseptable polymermolekylene

Proteiner og proteinkomplekser

[0046] Proteiner som overveies for bruk i blandingene inkluderer fysiologisk aktivt protein egnet til administrering til et subjekt. I en utførelsesform er det fysiologisk aktive protein et terapeutisk aktivt protein. Det fysiologisk aktive protein er i ett aspekt et protein eller ethvert fragment av slikt som fremdeles innehar noe, hovedsakelig all, eller all terapeutisk eller biologisk aktivitet av proteinet. I noen utførelsesformer er proteinet et som, dersom det ikke er uttrykt eller produsert eller dersom vesentlig redusert i ekspresjon eller

produksjon, ville føre til en sykdom. Fortrinnsvis er proteinet avledet eller framskaffet fra et menneske.

[0047] I ulike utførelsesformer av oppfinnelsen, når det fysiologisk aktive protein konjugert til en fysiologisk akseptabel polymer er et protein eller fragment av samme innehar en biologisk aktivitet av proteinet, har det fysiologisk aktive proteinet en aminosyresekvens som er identisk med aminosyresekvensen for den korresponderende del av det ukonjugerte menneske- eller dyreproteinet. I andre utførelsesformer er det fysiologisk aktive proteinet av konjugatet et protein som er naturlig for artene av menneske eller dyr. I andre utførelsesformer er proteinet eller fragmentet av samme hovedsakelig homologt (det vil si i det minste 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, eller 99 % identisk i aminosyresekvens over en lengde på i det minste 10, 25, 50, 100, 150, eller 200 aminosyrer).

[0048] Framgangsmåter for fremstilling av rekombinante proteiner er velkjent i faget. Framgangsmåter for produksjon av celler, inkludert pattedyrceller, som uttrykker DNA eller RNA som koder for et rekombinant protein er beskrevet i US patentskrift 6,048,729, 5,994,129 og 6,063,630.

[0049] I en utførelsesform brukes et nukleinsyrekonstrukt til å uttrykke et polypeptid eller fragment, eller analog av samme hvorav en er overuttrykt ekstrakromosomt (episomt) i den transfekterte pattedyrcellen eller en som integrerer, enten tilfeldig eller ved et forhåndsvalgt sted gjennom en homolog rekombinasjon, inn i mottakerens cellegenom. Et konstrukt som uttrykkes ekstrakromosomt omfatter, i tillegg til polypeptid-kodende sekvenser, sekvenser som er tilstrekkelig til ekspresjon av proteinet i cellene og valgfritt for replikering av konstruktet. Det inkluderer typisk en promotor, en polypeptid-kodende DNA-sekvens og et polyadenyleringssted. DNA som koder for proteinet er posisjonert i konstruktet på en slik måte at dets ekspresjon er under kontroll av promotoren. Valgfritt kan konstruktet inneholde andre komponenter, slik som en eller flere av følgende: et spleisested, en forsterkningssekvens, et selekterbart markørgen under kontroll av en egnet promotor og et forsterkbart markørgen under kontroll av en egnet promotor.

[0050] I de utførelsesformene der DNA-konstruktet integreres inn i cellens genomen, inkluderer det de polypeptid-kodende nukleinsyresekvensene. Det kan valgfritt inkludere en promotor og en forsterkningssekvens, ett eller flere polyadenyleringssteder, en eller flere spleiseposisjoner, nukleinsyresekvenser som koder for en forsterkbar markør og/eller DNA homologt med genomisk DNA i mottakercellen for målrettet integrasjon av DNA til en valgt posisjon i genomet (målretting av DNA eller DNA-sekvenser).

[0051] Vertsceller som brukes til å produsere rekombinante proteiner er bakterie-, gjær-, insekts-, virveldyr forskjellig fra pattedyr, eller pattedyrceller; pattedyrcellene inkluderer, men er ikke begrenset til celler fra hamster, ape, sjimpanse, hund, katt, hornkveg, svin, mus, rotte, kanin, sau og menneske. Vertscellene inkluderer forevige celler (en cellelinje) eller ikke-forevige (primære eller sekundære) celler og inkluderer enhver av en rekke celletyper, slik som, men ikke begrenset til, fibroblast, keratinocytter, epiteliale celler (for eksempel epiteliale celler fra pattedyr, epiteliale innvollsceller), eggstokkceller, formede elementer i blodet (for eksempel lymfocytter, benmargceller), muskelceller, hepatocytter og forløpere til disse somatiske celletypene.

[0052] Vanlig brukte vertsceller inkluderer polykaryotiske celler slik som gram negative eller gram positive bakterier, det vil si enhver stamme av *E. coli*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Saccharomyces*, *Salmonella* og tilsvarende; eukaryotiske celler slik som CHO (eggstokk fra kinesisk hamster) -celler; babyhamsternyre (BHK) -celler; humane nyre 293 -celler; COS-7 -celler; insektsceller slik som D. Mel-2, Sf4, Sf5, Sf9, og Sf21 og High 5; planteceller og ulike gjærceller slik som *Saccharomyces* og *Pichia*.

[0053] Vertsceller som inneholder det polypeptid-kodende DNA eller RNA kultiveres under betingelser egnet for vekst av cellene og ekspresjon av nevnte DNA eller RNA. De cellene som uttrykker polypeptidet kan identifiseres ved bruk av kjente metoder, og det rekombinante proteinet isolert og renses, ved bruk av kjente metoder; enten med eller uten forsterkning av polypeptidproduksjonen. Identifisering kan for eksempel utføres gjennom screening av genetisk modifiserte pattedyrceller som viser en fenotype som indikasjon på nærvær av DNA eller RNA som koder for proteinet, slik som PCR-screening, screening med Southern blotanalyse, eller screening for ekspresjonen av proteinet. Seleksjon av celler med iboende proteinkodende DNA kan utføres ved å inkludere en egnet markør i DNA-konstruktet og kultivering av transfekterte eller infiserte celler som inneholder et selekterbart markørgen under betingelser egnet til overlevelse av bare de cellene som uttrykker det selekterbare markørgenet. Ytterligere forsterkning av det introduserte DNA-konstruktet kan påvirkes ved kultivering av genetisk modifiserte celler under betingelser egnet til forsterkning (for eksempel kultivering av genetisk modifiserte celler som inneholder et forsterkbart markørgen i nærvær av en konsentrasjon av et medikament ved hvilket bare celler som inneholder multiple kopier av det forsterkbare markørgenet kan overleve).

[0054] Rekombinante proteiner som er fysiologisk aktive proteiner eller terapeutiske proteiner inkluderer, men er ikke begrenset til, cytokiner, vekstfaktorer, terapeutiske koaguleringsproteiner eller blodkoaguleringsfaktorer, enzymer, kjemokiner, løselige celleoverflatereseptorer, celleadhesjonsmolekyler, antistoffer, hormoner, cytoskjelettproteiner, matriseproteiner, chaperonproteiner, strukturelle proteiner, metabolske proteiner og andre terapeutiske proteiner som brukes som terapeutika inkludert, men ikke begrenset til, Faktor VIII, Faktor VII, Faktor IX og von Willebrand faktor, erythropoietin, interferoner, insulin, CTLA4-Ig, alfa-glukocerebrosidase, alfa-glucosidase, follikkelstimulerende hormon, anti-CD20 antistoff, anti-HER2 antistoff, anti-CD52 antistoff, TNF-reseptor og andre som er kjent på fagområdet. Se for eksempel Physicians Desk Reference, 62. utgave, 2008, Thomson Healthcare, Montvale, NJ.

[0055] I en utførelsesform er proteinet en terapeutisk koaguleringsfaktor eller blod(propp)faktor, inkludert men ikke begrenset til, Faktor II, Faktor III, Faktor V, Faktor VIII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, von Willebrand Faktor og fibrinogen.

[0056] I en utførelsesform er proteinet plasmaavledet og/eller rekombinant von Willebrand faktor (VWF) eller et biologisk aktivt fragment eller analog av samme. Betegnelsen "plasmaavledet VWF (pVWF)" inkluderer modent VWF framskaffet fra et pattedyr. Et biologisk aktivt fragment eller analog av dette pVWF er pro-VWF som inneholder pro-peptidet. I et eksempel av den foreliggende oppfinnelsen er proteinet valgt fra gruppen bestående av umodent VWF inkludert forløper- VWF-molekylet (pre-pro-VWF) syntetisert av endoteliale celler og megakaryocytter, VWF-propeptidet (pro-VWF) og modent plasmatisk VWF skaffet ved splitting av henholdsvis signalpeptidet og

pro-peptidet, av forløpermolekylet. Andre eksempler på biologisk aktive derivater av plasmaavledet VWF inkluderer prodrug som er prosessert eller omdannet til den biologisk aktive formen, eller er biologisk aktiv som sådan, trunkerte former, former med slettinger, former med substitusjoner, former med addisjoner forskjellig fra pro-former, fragmenter av den modne form, kimere former og former med pos-translasjons-modifikasjoner sammenliknet med den naturlige form. Betegnelsen "rekombinant VWF (rVWF)" inkluderer VWF skaffet via rekombinant DNA-teknologi med valgfritt et glykosyleringsmønster som er farmakologisk akseptabelt. Spesifikke eksempler på slike inkluderer VWF uten A2-domenet og følgelig resistent mot proteolyse (Lankhof et al., Thromb Haemost.;77:1008-1013,1997) og VWF-fragmentet fra Val 449 til Asn 730 inkludert glykoproteinet Ib-bindende domene og bindings seter for kollagen og heparin (Pietu et al., Biochem Biophys Res Commun.; 164:1339-1347, 1989).

[0057] I en relatert utførelsesform er proteinet Faktor VIII. Tidligere forsøk viste at konjugering av et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl til Faktor VIII resulterer i et Faktor VIII-protein som kan aktiveres av trombin og har en hovedsakelig redusert antigenitet og immunreaktivitet, og en vesentlig økt klarningsrate *in vivo* i blodstrømmen hos et pattedyr (US patentskrift 4,970,300). Internasjonal patentsøknad WO 94/15625 beskriver at konjugering av Faktor VII til et fysiologisk akseptabelt polymermolekyl forbedrer funksjonen *in vivo* av Faktor VIII (i) ved å øke dens motstand mot hydrolyse *in vivo* og på denne måten forlenge dens aktivitet etter administrering, (ii) ved å gi en vesentlig forlengelse av dets sirkulasjonsliv *in vivo* over umodifisert protein, og (iii) ved å øke dens absorpsjonstid inn i blodstrømmen. Ved å forbedre funksjonen *in vivo* av Faktor IX ved å binde den til fysiologisk akseptable polymermolekyler, særlig poly(etylenglykol) ("PEG"), har dessuten blitt beskrevet i internasjonal patentsøknad WO 94/29370 A1. Ingen av disse dokumentene beskriver imidlertid antall polymermolekyler lenket til Faktor VIII-proteinet.

Polypeptidvarianter og analoger

[0058] Framgangsmåter ifølge oppfinnelsen er egnet til å gi en rask detektering av rekombinante proteiner i en prøve, samt fragmenter, analoger eller varianter av det rekombinante proteinet, og kan dessuten være nyttig til å foreta detektering av naturlig forekommende protein som kan eksistere som fragmenter eller alleliske varianter *in vivo* hvorved glykosyleringsforskjeller kan detekteres.

[0059] Framgangsmåter for fremstilling av polypeptidfragmenter, analoger eller varianter er velkjent i faget. Fragmenter av et polypeptid fremstilles ved bruk av kjente metoder som er velkjent på fagområdet, inkludert enzymatisk splitting (for eksempel trypsin, chymotrypsin) og dessuten ved bruk av rekombinante midler for å generere et polypeptidfragment med en spesifikk aminosyresekvens. Fragmenter kan genereres til å omfatte et ligand-bindende domene, et reseptor-bindende domene, et dimeriserings- eller multimeriseringsdomene eller ethvert annet identifiserbart domene kjent på fagområdet.

[0060] Framgangsmåter for framstilling av polypeptidanaloger er også velkjent. Analoger kan være hovedsakelig homologe eller hovedsakelig identisk med det naturlig forekommende polypeptidet hvorfra analogen er avledet, og analoger tatt i betraktning av

oppfinnelsen er de som beholder i det minste noe av den biologiske aktivitet av det naturlig forekommende polypeptidet.

[0061] Substitusjonsanaloger skifter typisk ut en aminosyre av vill type med en annen ved en eller flere posisjoner i proteinet, og kan være utformet til å modulere en eller flere egenskaper ved polypeptidet, slik som stabilitet mot proteolytisk splitting, uten tapet av andre funksjoner eller egenskaper. Substitusjoner av denne typen er generelt konservative. Med "konservativ aminosyresubstitusjon" menes substitusjon av en aminosyre med en aminosyre som har en sidekjede med en tilsvarende kjemisk karakter. Tilsvarende aminosyrer for å utføre konservative substitusjoner inkluderer de som har en sur sidekjede (glutaminsyre, asparaginsyre); en basisk sidekjede (arginin, lysin, histidin); en polar amidsidekjede (glutamin, asparagin); en hydrofob, alifatisk sidekjede (leucin, isoleucin, valin, alanin, glycin); en aromatisk sidekjede (fenylalanin, tryptofan, tyrosin); en liten sidekjede (glycin, alanin, serin, threonin, methionin); eller en alifatisk hydroksylsidekjede (serin, threonin).

[0062] Polynukleotidanaloger og fragmenter kan lett skapes av en arbeider med fagkunnskap for å kode biologisk aktive fragmenter, varianter eller mutanter av det naturlig forekommende molekylet som innehar samme eller tilsvarende biologisk aktivitet som det naturlig forekommende molekylet. Rutinemessig utførte metoder inkluderer PCR-teknikker, enzymatisk fordøyning av DNA som koder for proteinmolekylet og ombinding til heterologe polynukleotidsekvenser og tilsvarende. For eksempel kan det anvendes punktmutagenese ved bruk av PCR og andre teknikker som er velkjent på fagområdet, for å identifisere spesifikt hvilke aminosyrerester som er viktige i spesifikke aktiviteter forbundet med proteinaktivitet. Følgelig vil en fagperson være i stand til å generere enkle baseendringer i DNA-tråden for å resultere i et endret kodon og en mutasjonsfeil.

[0063] Det er videre tatt i betraktning at proteinet eller polypeptidet kan modifiseres for å framskaffe en analog som er et fusjonsprotein som omfatter et andre middel som er et polypeptid. I en utførelsesform er det andre midlet som er et polypeptid, et enzym, en vekstfaktor, et cytokin, et kjemokin, en celleoverflatereseptor, det ekstracellulære domene av en celleoverflatereseptor, et celledhesjonsmolekyl eller fragment eller aktivt domene av et protein beskrevet foran eller av enhver annen type protein kjent i faget. I en relatert utførelsesform er det andre midlet en blodkoaguleringsfaktor slik som Faktor VIII, Faktor VII, Faktor IX og von Willebrand faktor. Fusjonsproteinet som er tatt i betraktning framstilles ved kjemiske eller rekombinante teknikker som er velkjent i faget.

[0064] Proteinvarianter som er tatt i betraktning inkluderer polypeptider som er kjemisk modifisert med slike teknikker som ubikvitering, glykosylering, konjugering til terapeutiske eller diagnostiske midler, merking (for eksempel med radionukleotider eller ulike enzymer), kovalent polymerfesting slik som PEGylering (derivatisering med polyetylen glykol), introdusering av ikke-hydrolyserbare bindinger og innføring eller substitusjon med kjemisk syntese av aminosyrer slik som amithin, som normalt ikke opptrer i humane proteiner. Varianter beholder bindingsegenskapene for ikke-modifiserte molekyler ifølge oppfinnelsen.

[0065] Andre polypeptidvarianter som er egnet i framgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer polypeptider som omfatter polysialylat (PSA) -

grupper. Framgangsmåter for fremstilling av polysialylert polypeptid er beskrevet i US patentpublikasjon 20060160948 og Saenko et al., Haemophilia 12:42-51, 2006.

Polymerer

5 **[0066]** I en utførelsesform betrakter oppfinnelsen kjemisk modifiserte proteiner eller polypeptider, som har blitt lenket til en kjemisk gruppe som tildeler fordelaktige effekter til produksjon, levedyktighet av proteinet eller polypeptidet. For eksempel er uspesifikk eller posisjonsspesifikk konjugering av vannløselige polymerer til polypeptider kjent i faget for å forbedre halveringstiden ved potensiell reduksjon av immunogenitet, nyrerensing og/eller forbedre proteasemotstand.

10 **[0067]** Vannløselige polymerer, inkludert men ikke begrenset til, poly(etylenglykol) (PEG), poly(etylenoksid) (PEO), polyoksyetylen (POE), polyvinylalkoholer, hydroksyetylcelluloser eller dekstran, blir ofte konjugert til proteiner eller proteiner for å øke stabiliteten eller størrelsen av eksempelvis et protein eller peptid.

15 **[0068]** PEG, PEO eller POE viser til en oligomer eller polymer av etylenoksid. PEG og PEO inkluderer molekyler med en fordeling av molvekt, det vil si polydisperse. Størrelsesfordelingen kan være kjennetegnet statistisk ved dets midlere vektbaserte molvekt (M_w) og det midlere antallsbaserte molvekt (M_n), hvis forhold kalles polydispersitetsindeks (M_w/M_n). M_w og M_n kan måles med massespektroskopi. Det meste av PEG-konjugatene, særlig de som er konjugert til PEG større enn 1 kDa, oppviser et
20 intervall med molvekter grunnet en polydispers natur av forløper-PEG-molekylet. For eksempel i tilfellet med mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF), er faktiske molmasser fordelt over et intervall på 1,5 til omlag 1,0 kDa med en polydispersitetsindeks på 1,036. Unntak er proteiner konjugert til MS(PEG) $_n$ ($N=4, 8, 12$ eller 24 , for eksempel PEO $_4$, PEO $_{12}$)-baserte reagenser (Pierce), som særlig fremstilles som monodisperse blandinger
25 med diskret kjedelengde og definert molvekt.

[0069] Oppfinnelsen overveier bruk av vannløselige polymerer som varierer i type, konjugering, sammenbinding og lengde. For eksempel inkluderer PEG-protein men er ikke begrenset til, lineære eller forgrenede konjugater, polymerer:proteiner konjugert ved NHS (N-hydroksysuccimid)- eller aldehyd-basert kjemi, varianter med en annen kjemisk binding
30 mellom PEG-kjeden og konjugeringsstedet og varianter med varierende lengde. Den midlere molvekt av PEG vil variere fra omlag 3 kiloDalton ("kDa") til omlag 100 kDa, fra omlag 5 kDa til omlag 25 kDa, fra omlag 5 kDa til omlag 15 kDa, eller fra omlag 5 kDa til omlag 10 kDa.

[0070] Oppfinnelsen overveier PEG-proteinkonjugat valgt fra gruppen bestående av
35 lineære PEG-proteinkonjugat som er NHS-konjugert og varierer i lengde fra $-(CH_2-CH_2-O)_n-$, der $n = 1$ til 2000, lineære PEG-proteinkonjugat som er aldehyd-konjugert varierer i lengde fra $-(CH_2-CH_2-O)_n-$, der $n = 1$ til 2000, to-arm-forgrenede PEG-proteinkonjugat som er NHS-konjugert og varierer i lengde fra 3 til 100 kDa i masse, og tre-armforgrenet PEG-proteinkonjugat som er NHS-konjugert. Oppfinnelsen overveier også PEG-proteinkonjugat
40 som inneholder ulike kjemiske bindinger $-(CO(CH_2)_n-$, og $-(CH_2)_n-$ der $n = 1$ til 5) mellom dets konjugeringssete og PEG-kjeden. Oppfinnelsen overveier videre ladede anioniske PEG-proteinkonjugat for å redusere nyrespalting, inkludert men ikke begrenset til karboksylerte, sulfaterte og fosforylerte forbindelser (anioniske) (Caliceti & Veronese, Adv

Drug Deliv Rev 2003 55(10):1261-77; Perlman et al., J Clin Endo Metab 2003 88(7):3227-35; Pitkin et al., Antimicrob Agents Chemother 1986 29(3): 440-44; Vehaskari et al., Kidney Intl 1982 22 127-135). I en annen utførelsesform er peptidet valgfritt konjugert til en gruppe som inkluderer et bisfosfonat, en vannløselig polymer slik som PEG eller PEO, karbohydrater, fettsyrer eller andre aminosyrer.

[0071] Makromolekyl-kjemisk modifisering kan utføres på en uspesifikk måte (som fører til blandinger av modifiserte varianter) eller på en posisjons-spesifikk måte (basert på vill type makromolekyl-reaktivitet-rettet modifisering og/eller posisjonsselektiv modifisering ved bruk av en kombinasjon av en posisjonsrettet mutagenese og kjemisk modifisering) eller alternativt, ved bruk av uttrykte proteinbindingsmetoder (Curr Opin Biotechnol. 13(4):297-303 (2002)).

[0072] For å oppdage hvorvidt den terapeutiske halveringstid *in vivo* av et peptid vil dra fordel av PEGylering, blir det syntetisert et utvalg av ulike PEG-proteinkonjugat, karakterisert *in vitro* og *in-vivo* for farmakokinetikk. For å både optimalisere de potensielle effektene av PEGylering, blir det brukt en designstrategi der polymerlengde, konformasjon og ladning av PEG varieres.

[0073] Framgangsmåter for fremstilling av PEGylert protein ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter generelt trinnene med å (a) reagere det aktuelle proteinet med polyetylenglykol under betingelser hvorved PEG blir festet til N-terminus/C-terminus av proteinet, og (b) framskaffe reaksjonsproduktet/reaksjonsproduktene. Fordi PEGylering av et protein kan tenkes å gi en vesentlig endring av den iboende aktivitet av proteinet, blir det utforsket ulike typer PEG. Kjemien som kan brukes for PEGylering av protein inkluderer acyleringen av de primære aminer av proteinet ved bruk av NHS-ester av metoksy-PEG (O-[(N-Succinimidyloksykarbonyl)-metyl]-O'-metylpolyetylenglykol). Acylering med metoksy-PEG-NHS eller metoksy-PEG-SPA resulterer i en amidbinding som eliminerer ladningen fra det opprinnelige primæraminet (også Boc-PEG for C-terminus). Til forskjell fra ribosomproteinsyntese, fortsetter syntetisk peptidsyntese fra C-terminus til N-terminus. Derfor er Boc-PEG en metode (det vil si ved bruk av tert-(B)utyl (o)ksy (k)arbonyl (Boc, t-Boc) syntese) for å feste PEG til C-terminus av peptidet (R. B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. 1. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am. Chem. Soc. 85 (14): 2149-2154). (F)luorenyl-(m)et(o)ksy-(k)arbonyl (Fmoc) -kjemi (Atherton, E.; Sheppard, R.C. (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press.) er favorisert fordi den ikke krever den farlige bruken av fluorsyre for å fjerne sidekjede-beskyttende grupper. De foreliggende framgangsmåtene framskaffer en hovedsakelig homogen blanding av polymer:protein-konjugat. "Hovedsakelig homogen" som brukt her, viser til at bare polymer:protein-konjugatmolekyler er observert. Polymer:protein-konjugatet har biologisk aktivitet og de foreliggende "hovedsakelig homogene" PEGylerte proteinpreparatene er de som er tilstrekkelig homogene til å oppvise fordelene med homogene preparater, for eksempel lett vint bruk i kliniske anvendelser med hensyn til forutsigbarhet fra en serie farmakokinetika til en annen.

[0074] I nok en utførelsesform kan polymermolekylene som er betraktet for bruk i PEGylering beskrevet her velges blant vannløselige polymerer eller en blanding av samme. Polymeren kan ha en enkelt reaktiv gruppe, slik som en aktiv ester for acylering eller et aldehyd for alkylering, slik at graden av polymerisering kan reguleres. Den vannløselige polymeren eller blanding av samme om ønskelig, kan være valgt fra gruppen bestående av

eksempelvis PEG, monometoksy-PEG, PEO, dekstran, poly-(N-ninylpyrrolidon), propylenglykol-homopolymerer, fettsyrer, et polypropylenoksid(etylenoksid-kopolymer, polyoksyetylerter polyoler (for eksempel glyserol), HPMA, FLEXIMAR (TM) og polyvinylalkohol, mono-(C1-C10)alkoksy-PEG, aryloksy-PEG, tresyl-monometoksy PEG, PEG propionaldehyd, bis-succinimydyldkarbonat PEG, cellulose, andre karbohydratbaserte polymerer eller blandinger av samme. Polymeren som velges bør være vannløselig slik at proteinet som den er festet til ikke feller ut i et vannbasert miljø, slik som et fysiologisk miljø. Polymeren kan være forgrenet eller uforgrenet. For terapeutisk bruk av et sluttprodukt i form av et preparat, vil fortrinnsvis polymeren være en farmasøytisk akseptabel. Framgangsmåter for danning av peptider som omfatter en PEG-gruppe er velkjent i faget. Se for eksempel US patentskrift 5,824,784.

[0075] I en utførelsesform er det reaktive aldehydet PEG-propionaldehyd, som er vannstabil, eller mono-C1-C10-alkoksy eller -aryloksy-derivater av samme (se US patentskrift 5,252,714). Som brukt her, er PEG ment å omfatte enhver av formene av PEG som har blitt brukt til å derivatisere andre proteiner, slik som mono-(C1-C10)-alkoksy- eller aryloksy-polyetylen-glykol. Polymeren kan være forgrenet eller uforgrenet. For terapeutisk bruk av sluttproduktpreparatet, vil fortrinnsvis polymeren være farmasøytisk akseptabel.

Farmasøytiske blandinger

[0076] Den foreliggende oppfinnelsen overveier farmasøytiske blandinger som omfatter effektive mengder av protein eller derivatprodukter ifølge oppfinnelsen sammen med farmasøytisk akseptable fortynningsmidler, stabilisatorer, konserveringsmidler, løselighetsfremmende midler, emulgatorer, hjelpestoffer og/eller bærere. Slike blandinger inkluderer fortynninger med ulike bufferinnhold (for eksempel tris-HCL, fosfat), pH og ionestyrke; additiver slik som tensider og løselighetsfremmende midler (for eksempel Polysorbat 20, Polysorbat 80), antioksidanter (for eksempel askorbinsyre, natriummetabisulfitt), konserveringsmidler (for eksempel Thimerosol benzylalkohol) og bulkdannende substanser (for eksempel kaltose, mannitol); se Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa.) side 1435:1712. En effektiv mengde aktiv bestanddel er en terapeutisk, profylaktisk eller diagnostisk effektiv mengde, som lett kan bestemmes av en fagkyndig person ved å ta i betraktning slike faktorer som kroppsvekt, alder og terapeutisk mål.

[0077] Polymer-protein-blandingene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også inkludere et buffermiddel for å opprettholde løsningsens pH innenfor et ønsket område. Foretrukne midler inkluderer natriumacetat, natriumfosfat og natriumsitrat. Blandinger av disse buffermidlene kan også brukes. Mengden buffermiddel som er egnet i blandingen avhenger i stor grad av den spesifikke buffer som brukes og løsningsens pH. For eksempel er acetat en mer effektiv buffer ved pH 5 enn pH 6 slik at det kan brukes mindre acetat i en løsning med pH5 enn ved pH 6. Det foretrukne pH-intervallet for blandningene ifølge den foreliggende oppfinnelsen er pH 3,0-7,5.

[0078] Blandingene ifølge oppfinnelsen kan i tillegg inkludere et isotonitets-justerende middel for å gjøre løsningen isotonisk og mer egnet til injeksjon. Det mest foretrukne midlet er natriumklorid med et konsentrasjonsområde på 0-1500 mM.

[0079] Framgangsmåtene beskrevet her bruker farmasøytiske blandinger som omfatter molekylene beskrevet foran, sammen med ett eller flere hjelpestoffer eller bærere, og valgfritt andre terapeutiske og/eller profylaktiske ingredienser. Slike hjelpestoffer inkluderer væsker slik som vann, saltløsning, glyserol, polyetylen glykol, hyaluronsyre, etanol, syklodekstriner, modifiserte syklodekstriner (det vil si sulfobutyleter-syklodekstriner) osv. Egnede hjelpestoffer for ikke væskebaserte formuleringer er også kjent for fagpersonen.

[0080] Farmasøytisk akseptable salter kan brukes i blandingene ifølge den foreliggende oppfinnelsen og inkluderer eksempelvis mineralsyresalter slik som hydroklorider, hydrobromider, fosfater, sulfater og liknende; og saltene av organiske syrer slik som acetater, propionater, malonater, benzoater og liknende. En grundig diskusjon av farmasøytisk akseptable hjelpestoffer og salter er tilgjengelig i Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990).

[0081] Andre hjelpesubstanser, slik som fuktemidler eller emulgatorer, biologiske buffermidler, tensider og tilsvarende, kan være til stede i slike bærere. En biologisk buffer kan være praktisk talt enhver løsning som er farmakologisk akseptabel og som tildeler formuleringen den ønskede pH, det vil si en pH i det fysiologisk akseptable området. Eksempler på bufferløsninger inkluderer saltløsning, fosfatbufret saltløsning, tris-bufret saltløsning, Hanks bufrede saltløsning og liknende.

Sett

[0082] Sett er også tatt i betraktning. Et typisk sett kan omfatte protein-polymerkompleks med et standard antall polymerer festet til samme. I en utførelsesform omfatter settet i tillegg et bindingsmiddel, som spesifikt binder proteinet eller polymeren, der bindingsmidlet er et antistoff, en løselig reseptor, en ligand, en kofaktor eller et annet middel som spesifikt binder proteinet eller polymeren. Settet kan valgfritt inkludere reagenser og buffere for fremstilling av prøvene for detektering av polymer-protein-komplekset.

[0083] Andre aspekter og detaljer ved oppfinnelsen vil framgå fra de etterfølgende eksemplene, som har til hensikt å være illustrative heller enn begrensende.

Eksempler

Eksempel 1 PEGylering av humant serumalbumin

[0084] For å måle graden av vannløselig polymer på et protein ved bruk av NIR, ble et protein med kjent molvekt konjugert til et PEG med kjent størrelse. Humant serumalbumin ble PEGylert via lysinrester ved bruk av lineært PEG Succinimidylsuccinat (PEG/SS/kjedelengde: 5 kDa) (SinBio Inc., Ayang City, Sør-Korea). En løsning av HSA (konsentrasjon: 10 mg/ml) i 25 mM natriumacetatbuffer, pH 6,2 ble framstilt og PEG-SS ble tilsatt til å gi en sluttkonsentrasjon på 120 mg reagens/mg protein. Blandingen ble inkubert i 1 time ved romtemperatur under forsiktig risting. Etter en reaksjonstid på 10 minutter ble pH justert til pH 6,2 ved dråpevis tilsats av 0,5 M NaOH. Deretter ble konjugatet rensert ved anionebytterkromatografi ved bruk av en lineær strømningsrate på 1 cm/min. Et volum på 200 ml av reaksjonsblandingen ble tilført til en Pharmacia XK26-

kolonne (26 mm x 155 mm) fylt med DEAE-Sepharose FF (GE Healthcare, Wauesha, WI) og kolonna ble brakt til likevekt med 10 kolonnevolum (VS) startbuffer (25 mM natriumacetat, pH 6,2). PEG-HSA-konjugatet ble eluert fra kolonna med 25 mM natriumacetatbuffer, pH 4,5 og OD ved 280 nm ble målt for å bestemme
5 proteinkonsentrasjon.

Eksempel 2 Fremstilling av HSA-varianter med ulik PEGyleringsgrad

[0085] For fremstilling av HSA-varianter med ulik PEGyleringsgrad blir humant serumalbumin PEGylert via lysinrester som beskrevet i eksempel 1 ved bruk av lineært PEG Succinimidylsuccinat (kjedelengde: 5 kDa) og ulike mengder reagens. En løsning av
10 HSA (konsentrasjon: 10 mg/ml) i 25 mM natriumacetatbuffer, pH 6,2 ble framstilt og PEG-SS tilsatt til å gi sluttkonsentrasjoner på 30, 60, 90 og 120 mg reagens/mg protein. Deretter ble konjugatene renset ved anionebytterkromatografi på DEAE-Sepharose FF. PEG-HSA-konjugatene ble eluert fra kolonna med 25 mM natruimacetatbuffer, pH 4,5 og OD ved 280 nm ble målt for å bestemme proteinkonsentrasjonen. Til slutt ble
15 PEGyleringsgraden estimert med den kolorimetriske metoden i henhold til Nag et al, (Anal Biochem 250: 35-43, 1997) og uttrykt i mol PEG/mol protein. For de ulike HSA-preparatene blir det bestemt PEGyleringsgrader med 2, 3, 4 og 5 mol PEG/mol protein (mengder reagens: 30, 60, 90, 120 mg/mg protein). Disse resultatene er bekreftet ved måling av PEGyleringsgraden ved bruk av NIRVIS-metoden i henhold til eksempel 3 og 4
20 nedenfor.

Eksempel 3 Prosessregulering av PEGylering

[0086] En styrke med NIR-spektrometri ligger i muligheten for kontroll av festet av polymerkonjugatreaksjonen og bestemmelse av mengden polymer på det konjugerte molekylet. Det etterfølgende eksemplet demonstrerer anvendelsen av NIR for å analysere
25 PEGyleringen av en prøve med humant serumalbumin.

[0087] NIR-spektra ble samlet kontinuerlig i transfleksjonsmodus under hele reaksjonsforløpet på omlag 1 time for PEGylering i vannbasert løsning (som beskrevet foran) med et standard NIR-spektrometer i det spektrale området fra 4008cm^{-1} til 9996cm^{-1} (2500 til 1000 nm). Transfleksjon måler transmisjon av lys gjennom en prøve, hvorved
30 lyset deretter kontakter en reflektor bak prøven for å tillate at det innkommende lyste overføres gjennom prøven to ganger.

[0088] Fra disse spektralsettene, ble det valgt et passende antall spektra før PEG-tilsats (verdi = 0) og ved slutten av reaksjonen (verdi = 1) for å beregne en kalibreringskurve med den kjemometriske programvaren for spektrometeret ved bruk av en multiplikativ spredningskorreksjon (MSC) som forbehandling av data og en partiell minste kvadrat (PLS)-algoritme som er kjent i faget.
35

[0089] Denne kalibreringsmodellen ble brukt til å forutsi det gjenværende spekter samlet under reaksjonen. Som vist i figur 1, er det oppnådd en klar logaritmisk trend etter tilsats av PEG-reagenset.

40 [0090] Disse forsøkene viser at dannelsen av kalibreringsmodeller for å forutsi PEGyleringsprosessen under en PEGyleringsreaksjon er mulig ved bruk av NIR-spektroskopi.

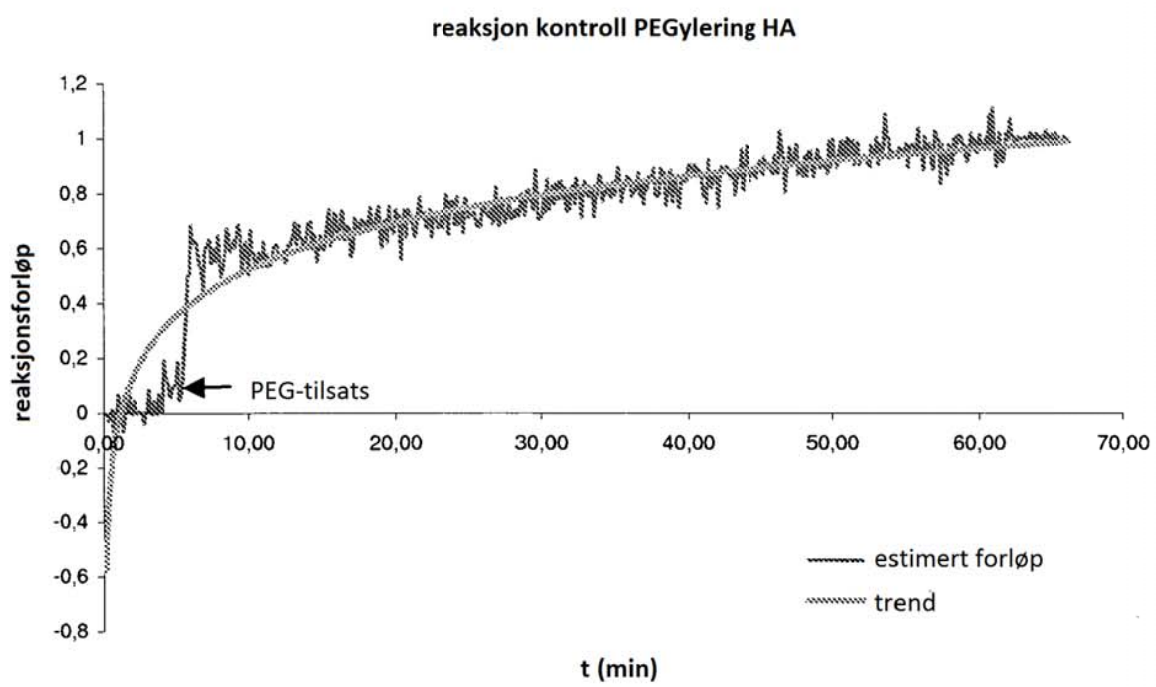
Eksempel 4 Kjemometrisk måling av PEGylering

- [0091]** For å bestemme evnen som NIR-metoden har til å måle proteinbundet PEG, ble det laget en fortynningsserie ved bruk av en PEGylert HSA-løsning framskaffet ved bruk av betingelsene i eksempel 2. Graden av PEGylering ble bestemt i henhold til framgangsmåten for Nag et al. (Anal Biochem 250: 35-43, 1997) og ble bestemt med massespektrometri. Disse fortynningene ble analysert med NIR og et representativt antall nær infrarøde spektra ble samlet med et standard NIR-spektrometer. Spektra ble målt i transfleksjonsmodus i det spektrale området fra 4008 cm^{-1} til 9996 cm^{-1} (2500 nm til 1000 nm).
- [0092]** Fra disse data som ble samlet, ble det beregnet en kalibreringsmodell med den kjemometriske programvaren for spektrometeret ved bruk av det første derivat BCAP som data-forbehandling og en PLS-algoritme. Resultatene fra disse beregningene er vist i figur 2.
- [0093]** Som vist i resultatene, eksisterer den en sterk korrelasjon mellom den "Målte Respons" av PEG bundet og den "Beregnete Respons" av PEG bundet. Pearson-korrelasjonskoeffisienten utgjør 0,996 med en P-verdi på 0,000. I det lavere konsentrasjonsområdet (løsning 1 og 2, se figur 2) ble det oppnådd et midlere avvik på 17 % og 6 % av den beregnede verdi for PEG-molekyler til den sanne verdi for PEG-molekyler. I det høyere konsentrasjonsområdet (løsning 3 og 4, se figur 2) var det midlere avviket fra den sanne verdien lavere, 0,8 % for løsning 3 og 1,4 % for løsning 4.
- [0094]** Disse resultatene viser at de målte responsene framskaffet med NIR-metoden korrelerer godt med nivåene for proteinbundet PEG i prøven. Dette medfører at metoden er i stand til å predikere graden av PEGylering på et proteinmolekyl og er egnet til å bestemme antall og grad av PEGylering og annen polymerkonjugering på et proteinmolekyl.
- [0095]** Ulike modifikasjoner og variasjoner av oppfinnelsen som vist i de illustrative eksemplene foran er forventet å finne sted for fagpersonen. Følgelig bør bare slike begrensninger som opptrer i de vedlagte kravene plasseres på oppfinnelsen.

Patentkrav

1. Framgangsmåte for bestemmelse av antall vannløselige polymergrupper konjugert til et protein eller proteinkompleks i en prøve, som omfatter etablering av kontakt av prøven med en lyskilde i det nær infrarøde spektrum og måling av relative absorbanse nivå over et intervall av de nær infrarøde bølgelengdene, bestemmelse av antall polymermolekyler konjugert til proteinet eller proteinkomplekset basert på en bølgelengde eller bølgelengdespekter, hvorved spektra av prøven sammenliknes med en forhåndsberegnet standard med en kjent mengde polymermolekyler konjugert til et protein eller proteinkompleks, hvorved den nær infrarøde bølgelengden er i området fra 680 nm til 2500 nm.
2. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved kontakten i tillegg omfatter måling av reflektert stråling fra prøven som et flertall tidsavhengige absorbanse spekter.
3. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved sammenlikningen omfatter konstruksjon av en kalibreringsdatamatrix fra et flertall nær infrarød absorpsjonsspektra fra kjente prøver og sammenlikne den målte spektroskopi av prøven som omfatter polymer-proteinkonjugatet.
4. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved de nær infrarøde bølgelengdene er i området fra 680 til 1100 nm, eller fra 1100 til 2500 nm, eller fra 1000 nm til 2500 nm.
5. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved den vannløselige polymeren er polyetylen glykol (PEG).
6. Framgangsmåte ifølge krav 5, hvorved PEG har en molvekt i et område fra 3 kDa til 100 kDa.
7. Framgangsmåte ifølge krav 5, hvorved PEG har en molvekt i et område fra 5 kDa til 60 kDa.
8. Framgangsmåte ifølge krav 5, hvorved PEG har en molvekt i et område fra 5 kDa til 40 kDa.
9. Framgangsmåte ifølge krav 5, hvorved PEG har en molvekt i et område fra 5 kDa til 15 kDa.
10. Framgangsmåte ifølge krav 5, hvorved PEG har en molvekt i et område fra 5 kDa til 10 kDa.
11. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved proteinet eller proteinkomplekset er et terapeutisk koaguleringsprotein eller et terapeutisk koaguleringsproteinkompleks.
12. Framgangsmåte ifølge krav 1, hvorved proteinet eller proteinkomplekset omfatter en blodfaktor valgt fra gruppen bestående av Faktor II, Faktor III, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, von Willebrand Faktor og fibrinogen.
13. Framgangsmåte ifølge krav 12, hvorved proteinet er von Willebrand faktor.
14. Framgangsmåte ifølge krav 12, hvorved proteinkomplekset omfatter von Willebrand Faktor og Faktor VIII.

15. Framgangsmåte for framstilling av en blanding med et jevnt antall vannløselige polymermolekyler på et protein eller proteinkompleks som omfatter: konjugering av proteinet til et vannløselig molekyl for å danne en prøve av et polymer-protein-kompleks; utføre framgangsmåten i krav 1 på polymer-protein-komplekset; og isolere forbindelser i
- 5 prøven med samme antall polymermolekyler basert på de nær infrarøde absorbansspektra.

Figur 1

Figur 2

