



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2431741 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
G01N 33/542 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/86 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.01.13
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.08.21
(86)	Europeisk søknadsnr	11009919.9
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.10.20
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.03.21
(30)	Prioritet	2008.10.21, US, 10725708 P 2009.09.15, US, 24263409 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 Nektar Therapeutics, 455 Mission Bay Boulevard South, Suite 100, San Francisco, CA 94158, USA
(72)	Oppfinner	Varadi, Katalin, Othelloasse 1/6/2, 1230 Vienna, Østerrike Schrenk, Gerald, Flachsberg 12, 1220 Vienna, Østerrike Rottensteiner, Hanspeter, Haidgasse 10/17, 1020 Vienna, Østerrike Turecek, Peter, Weidling Hauptstrasse 59g, 3400 Klosterneuburg, Østerrike Weber, Alfred, Skraupstrasse 24/42/8, 1210 Vienna, Østerrike Anderle, Heinz, Kautekgasse 12/6, 3400 Klosterneuburg, Østerrike Culbertson, Sean M., 587 Esslinger Drive, Gurley AL 35758, USA Fang, Zhihao, 208 Avian Lane, Madison AL 35758, USA Zappe, Harold, 505 Orville Smith Road, Harvest 35749, USA Zhang, Ping, 199 Elder Ave., Millbrae CA 94030, USA Bossard, Mary J., 120 Kelvingrove Drive, Madison AL 35758, USA
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Fremgangsmåter for å bestemme aktive ingredienser i prolegemiddelet av PEG-proteinkonjugater med frisettable PEG-reagenser (in vitro-depegylering)
(56)	Anførte publikasjoner	US-A1- 2006 160 948 US-A1- 2008 234 193 WO-A2-2007/025988 BEDU-ADDO FRANK ET AL: "Preformulation development of recombinant pegylated staphylokinase SY161 using statistical design.", AAPS PHARMSCI 2002, vol. 4, no. 4, 19, 2002, pages 1-13, XP002564062, ISSN: 1522-1059 NESHOR MAOZ ET AL: "Reversible pegylation prolongs the hypotensive effect of atrial natriuretic peptide", BIOCONJUGATE CHEMISTRY, ACS, WASHINGTON, DC, US, vol. 19, no. 1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 342-348, XP002493772, ISSN: 1043-1802 [retrieved on 2007-12-11] SHECHTER Y ET AL: "Reversible pegylation of insulin facilitates its prolonged action in vivo",

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS, ELSEVIER
SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 70, no. 1, 1 September 2008 (2008-09-01), pages 19-28, XP024520585, ISSN: 0939-6411 [retrieved on 2008-04-07]
TSUBERY HAIM ET AL: "Prolonging the Action of Protein and Peptide Drugs by a Novel Approach of Reversible Polyethylene Glycol Modification", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BIRMINGHAM, US, vol. 279, no. 37, 10 September 2004 (2004-09-10), pages 38118-38124, XP002499391, ISSN: 0021-9258 [retrieved on 2004-06-08]

Fremgangsmåter for å bestemme aktive ingredienser i prolegemiddelet av PEG-proteinkonjugater med frisettable PEG-reagenser (in vitro-depeglyering)

5 Oppfinnelsen vedrører generelt utviklingen av *in vitro*-assaysystemer for å tvinge frisettingen av en vannløselig polymer, slik som polyetylen glykol (PEG) og polysialinsyre (PSA), fra proteiner modifisert med en reversibelt bundet vannløselig polymer. Oppfinnelsen inkluderer fremgangsmåter for å analysere frisettingen av den vannløselige polymeren og måle gjenvunnet proteinaktivitet.

10 Oppfinnelsen inkluderer videre fremgangsmåter som egner seg til kvalitetskontroll av proteiner modifisert med frisettable vannløselige polymerer, inkludert polymerer som PEG og PSA.

Mangel på eller dysfunksjon i blodkoaguleringsfaktor VIII (FVIII) er knyttet til

15 blødersykdommen hemofili A. Den foretrukne behandlingen for håndtering av hemofili A er utskiftingsterapi med plasmaavledete eller rekombinante FVIII (rFVIII)-konsentrater. Det er allment akseptert at pasienter med alvorlig hemofili A, dvs. med FVIII-nivåer under 1 %, best behandles med profylaktisk terapi i den hensikt å holde FVIII-nivåene over 1 % mellom dosene. Ved å ta med i

20 betraktningen den gjennomsnittlige halveringstiden til de ulike FVIII-produktene i sirkulasjonen, kan denne sirkulerende konsentrasjonen vanligvis oppnås ved å administrere FVIII to til tre ganger i uken. For gjøre dagens profylaktiske terapi enklere og muliggjøre ukentlig dosering tenker man seg utviklingen av et neste generasjon produkt med forbedrede farmakodynamiske og farmakokinetiske

25 egenskaper, samtidig som alle andre produktkarakteristika beholdes.

Terapeutiske polypeptidlegemidler utsettes ikke bare for proteolytiske enzymer og nøytraliserende antistoffer, men har også en tendens til å bli fjernet fra sirkulasjonen av reseptormediert celleopptak. Disse hendelsene er knyttet til en

30 reduksjon av halveringstiden og sirkuleringstiden til de anvendte proteinene, og begrenser derved deres terapeutiske effektivitet. Modifikasjon av polypeptidlegemidlene med polymerer slik som PEG har vist seg å beskytte dem i vesentlig grad mot enzymatisk nedbryting og clearance, og har på den måten forbedret deres farmakodynamiske og farmakokinetiske profiler. I tillegg kan

35 PEGyleringen føre til redusert immunogenisitet, økt fysisk og termisk stabilitet, økt løselighet, økt vækestabilitet og redusert aggregasjon.

PEGylering oppnås vanligvis ved kovalent binding av én eller flere PEG-kjeder per monomer til et polypeptidlegemiddel. Stabil binding av PEG til proteiner har den ulempen at den reduserer proteinets biologiske funksjon på en irreversibel måte. Dette kan omgås ved å modifisere proteinene med en reversibelt bundet PEG som har potensial til å dissosieres fra proteinet over tid. Denne typen frisettable PEG burde muliggjøre frigjøring av det native proteinet, fulgt av full gjenvinning av det native proteinets aktivitet.

US-A-2008/234193 beskriver von Willebrand faktor-polymerkonjugater og faktor VIII-polymerkonjugater, der hver har en frisettable binding.

F. Bedu-Addo et al., AAPS PharmaSci 2002, 4(4), side 1–3, beskriver preformuleringsutviklingen av rekombinant pegylert stafylokinase SY161 ved å bruke statistiske designmetoder for å forstå virkningene av bufferstyrke, NaCl-konsentrasjon og pH på konformasjon og stabilitet for protein.

US-A-2006/160948 beskriver en proteinholdig konstruksjon (også betegnet som polymer-VWF-konjugat) omfattende plasmatiske og/eller rekombinante von Willebrand-faktor (VWF), nevnte VWF er da bundet til minst ett fysiologisk akseptabelt polymermolekyl, samt til et kompleks mellom nevnte proteinholdige konstruksjon og minst ett faktor VIII (FVIII)-protein. Det fysiologisk akseptable polymermolekylet kan for eksempel være polyetylenglykol (PEG) eller polysialinsyre (PSA).

Y. Shechter et al., European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics 2008, 70, 19–28, beskriver den reversible pegyleringen av insulin, som letter dens forlengede virkning *in vivo*.

M. Nesher et al., Bioconjugate Chem. 2008, 19, 342–348, beskriver at den reversible pegyleringen forlenger den hypotensive virkningen av atrialt natriuretisk peptid.

H. Tsubery et al., Journal of Biological Chemistry 2004, 279, 38118–38124, beskriver forlengelse av virkningen av protein- og peptidlegemidler gjennom en tilnærming med reversibel polyetylenglykolmodifikasjon.

WO-A-2007/025988 beskriver en farmasøytisk sammensetning omfattende et pegylert veksthormon, hvor nevnte pegylerte veksthormon omfatter veksthormon og en PEG, hvor veksthormonet og PEG-en er bundet med en oksimbinding, og eventuelt via en linker, nevnte formulering har da en pH på 7 eller under.

Oppfinnelsen løser ett eller flere behov innenfor teknikken vedrørende utvikling av *in vitro*-assaysystemer for å tvinge frisetting av en vannløselig polymer, slik som polyetylenglykol (PEG) og polysialinstyre (PSA), fra proteiner modifisert med en reversibelt bundet vannløselig polymer. Oppfinnelsen inkluderer fremgangsmåter for å analysere frisettingen av den vannløselige polymeren og måle gjenvunnet proteinaktivitet. Oppfinnelsen inkluderer videre fremgangsmåter som egner seg til kvalitetskontroll av proteiner modifisert med frisettbare vannløselige polymerer.

I én utførelsesform inkluderer oppfinnelsen fremgangsmåter for frisetting av en reversibelt bundet vannløselig polymer fra et protein modifisert av den vannløselige polymeren. I en annen utførelsesform inkluderer oppfinnelsen fremgangsmåter for å øke aktiviteten til et protein modifisert av en reversibelt bundet vannløselig polymer. Begge fremgangsmåtene omfatter trinnet inkubering av proteinet under én eller flere betingelser som er effektive for å frisetten den vannløselige polymeren. Oppfinnelsen inkluderer dermed en kombinasjon av betingelser som er effektive for å frisetten den vannløselige polymeren. Særlig vedrører den foreliggende oppfinnelsen som definert i de vedlagte kravene en *in vitro*-fremgangsmåte for å frisetten en reversibelt bundet vannløselig polymer fra et protein modifisert av den vannløselige polymeren, eller for å øke aktiviteten i et protein modifisert med en reversibelt bundet vannløselig polymer, omfattende trinnet inkubering av proteinet under betingelser som er effektive for å frisetten den vannløselige polymeren, hvor betingelsene som er effektive for å frisetten den vannløselige polymeren, omfatter økning av konsentrasjonen av frie aminer i en buffer som omfatter proteinet ved å tilsette fritt lysin, histidin eller en kombinasjon derav i en buffer med en konsentrasjon som er effektiv for å frisetten den vannløselige polymeren.

I en foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen omfatter betingelsene videre økning av pH i bufferen som omfatter proteinet, økning av temperaturen i bufferen som omfatter proteinet, eller utvidelse av tidsperioden for inkubasjonstrinnet.

Ifølge en spesielt foretrukket utførelsesform økes pH i bufferen til ca. pH 8,1. Ifølge en annen spesielt foretrukket utførelsesform økes pH i bufferen til ca. pH 9,8. Ifølge en videre spesielt foretrukket utførelsesform økes temperaturen i bufferen fra ca. 4 °C til ca. 37 °C. I en videre spesielt foretrukket utførelsesform utvides tidsperioden for inkubering til ca. 168 timer. I en annen spesielt foretrukket utførelsesform utvides tidsperioden for inkubering til ca. 48 timer.

I en videre foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er proteinet faktor VIII (FVIII). I en annen foretrukket utførelsesform er proteinet von Willebrand-faktor (VWF).

5 Foretrukket er den vannløselige polymeren reversibelt bundet til proteinet med 9H-(f)luoren-9-yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl, dibenzofulven eller et derivat derav. I denne sammenhengen er det spesielt foretrukket at den vannløselige polymeren er bundet med 9H-(f)luoren-9-yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl, eller et derivat derav.

10 I en videre foretrukket utførelsesform av den foreliggende oppfinnelsen er den vannløselige polymeren polyetylenglykol. I en annen foretrukket utførelsesform er den vannløselige polymeren polysialinsyre.

15 Ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter betingelsen som er effektiv for å frisette reversibelt bundet vannløselig polymer fra et protein modifisert av polymeren (dvs. polyetylenglykol), økning av konsentrasjonen av frie aminer i bufferen som omfatter polymerproteinkonjugatet. I ett aspekt er den økte konsentrasjonen av frie aminer i bufferen resultatet av en økning i lysinkonsentrasjonen. I et annet aspekt er den økte konsentrasjonen av frie aminer i bufferen resultatet av en økning i histidinkonsentrasjonen. I et videre aspekt er den økte konsentrasjonen av frie aminer i bufferen resultatet av en økning av en kombinasjon av lysin og histidin.

20 I et videre aspekt omfatter betingelsen som er effektiv for å frisetten den vannløselige polymeren, i tillegg en økning av pH i en buffer som omfatter proteinet, fra ca. pH 6 til ca. pH 10. I et annet aspekt omfatter betingelsen en økning av pH i bufferen fra ca. pH 6,1 til ca. pH 9,8. I et videre aspekt omfatter 25 betingelsen en økning av pH i bufferen fra ca. pH 7,3 til ca. pH 9,8. I enda et annet aspekt omfatter betingelsen en økning av pH i bufferen fra ca. pH 6,5 til ca. pH 8,1.

30 I et videre aspekt omfatter betingelsen som er effektiv for å frisetten reversibelt bundet vannløselig polymer fra et protein modifisert av polymeren (dvs. polyetylenglykol), i tillegg en økning av temperaturen i bufferen som omfatter polymerproteinkonjugatet, fra ca. romtemperatur til ca. 37 °C. I et videre aspekt omfatter betingelsen som er effektiv for å frisetten den reversibelt bundne vannløselige polymeren fra proteinet, i tillegg en økning av temperaturen i 35 bufferen fra ca. 4 °C til ca. 37 °C.

I enda et annet aspekt omfatter betingelsen som er effektiv for å friset-
 reversibelt bundet vannløselig polymer, slik som polyetylglykol, i tillegg en
 utvidelse av tidsperioden for inkubering av polymerproteinkonjugatet fra ca. 5
 minutter til ca. 168 timer. I ulike aspekter utvides inkubasjonstiden fra minutter
 5 til timer til dager og til og med til en uke eller mer. I et annet aspekt strekker
 inkubasjonstiden seg fra ca. 5 minutter til ca. 48 timer.

I en annen utførelsesform (ikke del av oppfinnelsen) tilveiebringes
 fremgangsmåter for analysekvalitetskontroll av proteiner modifisert med
 10 reversibelt bundet frisetbar vannløselig polymer, omfattende trinnene
 inkubering av proteiner fra ca. 0 timer til ca. 6 timer ved 37 °C i en buffer med
 ca. pH 7,3 omfattende ca. 100 mM histidin og ca. 100 mM lysin, og
 fremgangsmåter for å analysere proteinaktivitet i løpet av de 6 første timene.
 Disse fremgangsmåtene tilveiebringer for eksempel et middel til å vise
 15 konsekvens fra batch til batch eller stabilitet etter lagring.

I enda en annen utførelsesform (ikke del av oppfinnelsen) tilveiebringes
 fremgangsmåter for å overvåke en økning eller gjenvinning av aktivitet for et
 protein som er modifisert ved reversibelt bundet vannløselig polymer. Slike
 20 fremgangsmåter omfatter måling av proteinaktivitet før og etter fjerning av
 reversibelt bundet vannløselig polymer fra proteinet.

I enda en annen utførelsesform (ikke del av oppfinnelsen) tilveiebringes
 fremgangsmåter for å måle kinetikk for polymerfrisetting fra et protein som er
 25 modifisert av en reversibelt bundet vannløselig polymer. Slike fremgangsmåter
 omfatter samtidig måling over en tidsperiode i en reaksjonsblanding av en
 mengde fri vannløselig polymer og en mengde reversibelt bundet vannløselig
 polymer konjugert til et protein, der kinetikken bestemmes ut fra endring i
 mengden fri vannløselig polymer og endring i mengden av polymeren som er
 30 konjugert til proteinet. I ett aspekt baseres målingen på et
 fluorescensemisjonsspektrum, og samtidig måling utføres ved å bruke fluorescens
 ved en maks. emisjon på ca. 350–355 nm for polyetylglykol -9H-(f)luoren-9-
 yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl-konjugater og en maks. emisjon på ca. 460–560 nm for
 polyetylglykol-dibenzofulven. I et annet aspekt baseres målingen på
 35 høytytelsesvæskeskromatografi for fritt polyetylglykol -9H-(f)luoren-9-
 yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl og polyetylglykol-dibenzofulven. I et videre aspekt

baseres målingen immunokjemisk på et enzymbundet antistoffassay for polymerkonjugert protein, dvs. PEGylert protein, og for fritt protein.

I ulike aspekter inkluderer den vannløselige polymeren blant annet
 5 poly(alkylenglykoler), slik som polyetylglykol (PEG), poly(propylenglykol) ("PPG"), kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol og lignende, poly(oksyetylert polyol), poly(olefinalkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(hydroksyalkylmetakrylamid), poly(hydroksyalkylmetakrylat), poly(sakkarider), poly(α -hydroksysyre), poly(vinylalkohol), polyfosfasfazen,
 10 polyoksazolin, poly(N-akryloylmorfolin), poly(alkylenoksid) polymerer, poly(eplesyre), poly(DL-alanin), polysakkarider, slik som karboksymetylcellulose, dekstran, hyaluronsyre og kitin, poly(met)akrylater, samt polysialinsyre (PSA), hydroksyetylstivelse og kombinasjoner av hvilke som helst av de foregående. I ett aspekt er den vannløselige polymeren PEG. I et annet aspekt er den
 15 vannløselige polymeren polysialinsyre (PSA).

I ulike aspekter er proteinet faktor VIII (FVIII) eller von Willebrand-faktor (VWF). I et videre aspekt av oppfinnelsen er den vannløselige polymeren bundet til proteinet N-hydroksysukkinimid (NHS) eller aldehydbasert kjemi, varianter
 20 med forskjellig kjemisk binding mellom den vannløselige polymerkjeden og konjugeringssted og varianter med forskjellig lengde. I ett aspekt er den vannløselige polymeren bundet med 9H-(f)luoren-9-yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl, dibenzofulven eller et derivat derav.

Andre trekk og fordeler med oppfinnelsen vil fremkomme av den følgende detaljerte beskrivelsen. Det bør imidlertid være underforstått at den detaljerte beskrivelsen og de spesifikke eksemplene som viser spesifikke utførelsesformer av oppfinnelsen, bare er gitt som illustrasjon, fordi ulike endringer og modifikasjoner innenfor oppfinnelsens ånd og omfang, vil være tydelig for
 30 fagpersoner ut fra denne detaljerte beskrivelsen.

En ytterligere illustrasjon av oppfinnelsen er gitt med referanse til de medfølgende tegningene, som vises nedenfor i figur 1-11.

35 Figur 1 viser hvordan pH-avhengig PEG-frisetting virker inn på multimerstrukturen i PEGylert rVWF.

Figur 2 viser hvordan pH- og aminavhengig PEG-frisetting virker inn på multimerstrukturen i PEGylert rVWF ved anvendelse av et anti-VWF-antistoff.

5 Figur 3 viser hvordan pH- og aminavhengig PEG-frisetting virker inn på multimerstrukturen i PEGylert rVWF ved anvendelse av et anti-VWF-antistoff.

Figur 4 viser en sammenligning mellom *in vivo*-rFVIII-stabiliseringseffekten for nativ og dePEGylert rVWF i en musemodell med FVIII x VWF-mangel.

10 Figur 5 viser en sammenligning av økningen i FVIII-kromogen aktivitet etter inkubering av PEG-rFVIII i buffer inneholdende histidin og/eller lysin i forskjellige konsentrasjoner.

15 Figur 6 viser en sammenligning av økningen i FVIII-kromogen aktivitet etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH 9,8 og en nøytral pH-buffer inneholdende histidin og lysin.

Figur 7 viser hvordan aminbasert bufferavhengig PEG-frisetting virker inn på FVIII-kromogen aktivitet og VWF-bindingsevne for PEG-rFVIII.

20 Figur 8 viser reproduserbarhet for *in vitro*-frisettingsassayet og testen for å kontrollere konsekvensen fra batch til batch.

25 Figur 9 viser fluorescensspektrene som illustrerer genereringen av PEG-dibenzofulven (460–560 nm) og den tilhørende nedgangen i fluorescenssignalet for PEG-FMOC-konjugatet (350–355 nm) etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH = 8,5.

30 Figur 10 viser fluorescensspektrene som illustrerer den svake nedgangen i fluorescenssignalet for PEG-FMOC-konjugatet (350–355 nm) uten dannelse av PEG-dibenzofulvenfluorescens etter inkubering av frisettbart PEGylert FVIII ved pH = 8,5 i nærvær av redusert glutatation.

35 Figur 11 viser fluorescensspektrene som illustrerer stabiliteten i fluorescenssignalet for PEG-FMOC-konjugatet (350–355 nm) etter inkubering av frisettbart-PEGylert FVIII ved pH = 6,0.

Oppfinnelsen vedrører utviklingen av *in vitro*-assaysystemer for å undersøke nivået av aktivitetsgjenvinning for et protein knyttet til frisettingen av en vannløselig polymer, som er kovalent bundet til proteinet via en reversibel binding. Begrepet "aktivitetsgjenvinning" for et protein betyr et økning i proteinaktivitet som blant annet inkluderer slike aktiviteter som biologisk funksjon, reseptorbinding og enzymaktivitet etter at den vannløselige polymeren er frisatt. Denne typen vannløselig polymermodifikasjon av et protein oppnås ved binding av en frisettable vannløselig polymer, dvs. PEG-FMOC-NHS-reagens med eksponerte lysinrester av proteinet av interesse. Begrepet "FMOC" betyr 9H-(f)luoren-9-yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl, som beskriver beskyttelsesgruppen på en peptid- eller polypeptidkjede.

Begrepet "protein" betyr ethvert protein, proteinkompleks eller polypeptid, inkludert rekombinante proteiner, proteinkomplekser og polypeptider bestående av aminosyrerester bundet via peptidbindinger. Proteiner oppnås ved isolasjon fra *in vivo*-kilder (dvs. naturlig forekommende) ved syntetiske fremgangsmåter eller ved rekombinant DNA-teknologi. Syntetiske polypeptider syntetiseres for eksempel ved å bruke en automatisert polypeptidsyntetisator. Et rekombinant protein brukt ifølge oppfinnelsen produseres ved en hvilken som helst fremgangsmåte som er kjent i teknikken, som beskrevet nedenfor. I én utførelsesform er proteinet et fysiologisk aktivt protein, inkludert et terapeutisk protein eller et biologisk aktivt derivat derav. Begrepet "protein" betyr typisk store polypeptider. Begrepet "peptid" betyr typisk korte polypeptider. Uavhengig av distinksjonen, som brukt heri brukes polypeptid, protein og peptid om hverandre.

Et "fragment" av et polypeptid betyr en hvilken som helst del av polypeptidet som er mindre enn polypeptidet av full lengde eller proteinekspresjonsproduktet. Fragmenter er, i ett aspekt, delesjonsanaloger av polypeptidet av full lengde, hvori én eller flere aminosyrerester er fjernet fra aminoterminalen og/eller karboksyterminalen av polypeptidet av full lengde. Følgelig er "fragmenter" en undergruppe av delesjonsanaloger beskrevet nedenfor.

En "analog" eller et "derivat" er en forbindelse som i det vesentlige har samme struktur og samme biologiske aktivitet, riktignok i enkelte tilfeller i forskjellig grad, som et naturlig forekommende molekyl. For eksempel betyr en polypeptidanalogue et polypeptid som i det vesentlige deler den samme strukturen

og har den samme biologiske aktiviteten som et referansepolypeptid. Analoger avviker når det gjelder sammensetningen av deres aminosyresekvenser sammenlignet med det naturlig forekommende polypeptidet som analogen er avledet fra, basert på én eller flere mutasjoner som involverer (i) delesjon av én eller flere aminosyrerester ved én eller flere terminaler av polypeptidet og/eller én eller flere interne regioner av den naturlig forekommende polypeptidsekvensen, (ii) innsetting eller tilsetting av én eller flere aminosyrer ved én eller flere terminaler (typisk en "tilsettings"-analog) av polypeptidet og/eller én eller flere interne regioner (typisk en "innsettings"-analog) av den naturlig forekommende polypeptidsekvensen eller (iii) substitusjon av én eller flere aminosyrer med andre aminosyrer i den naturlig forekommende polypeptidsekvensen.

I én utførelsesform inkluderer oppfinnelsen sammensetninger eller farmasøytiske sammensetninger laget ved å blande en forbindelse eller et konjugat ifølge oppfinnelsen og et farmasøytisk akseptabelt bærestoff. Begrepet "farmasøytisk sammensetning" betyr en sammensetning som er egnet til farmasøytisk bruk på dyr, inkludert mennesker og pattedyr. En farmasøytisk sammensetning omfatter en farmasøytisk effektiv mengde av et polymerpolypeptidkonjugat og omfatter også et farmasøytisk akseptabelt bærestoff. En farmasøytisk sammensetning inkluderer en sammensetning som omfatter de(n) aktive ingrediensen(e) og de(n) inerte ingrediensen(e) som utgjør det farmasøytisk akseptable bærestoffet, og et hvilket som helst produkt som direkte eller indirekte er et resultat av kombinasjon, kompleksering eller aggregering av hvilke som helst av to eller flere av ingrediensene.

Begrepet "farmasøytisk akseptabelt bærestoff" inkluderer et hvilket som helst og alle klinisk nyttige løsemidler, dispergeringsmidler, overtrekk, antibakterielle og antifungale midler, isotoniske stoffer og absorpsjonsforsinkelsesstoffer, buffere og eksipienter, slik som fosfatbufret saltløsning, 5 % vandig løsning av dektrose og emulsjoner, slik som olje/vann- eller vann/olje-emulsjon og ulike typer fuktemidler og/eller adjuvanter. Egnede farmasøytiske bærestoffer og formuleringer er beskrevet i Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th Ed. (Mack Publishing Co., Easton, 1995). Farmasøytiske bærestoffer som er nyttige for sammensetningen, avhenger av den planlagte administreringsmåten for virkestoffet. Typiske administreringsmåter inkluderer blant annet enteral (f.eks. oral) eller parenteral (f.eks. subkutan, intramuskulær, intravenøs eller

intraperitoneal injeksjon; eller topisk, transdermal eller transmukosal administrering). Et "farmasøytisk akseptabelt salt" er et salt som kan formuleres i en forbindelse eller et konjugat til farmasøytisk bruk, inkludert f.eks. metallsalter (natrium, kalium, magnesium, kalsium osv.) og salter av ammoniakk eller organiske aminer.

Begrepet "farmasøytisk akseptabel " eller "farmakologisk akseptabel" betyr et stoff som ikke er biologisk eller på annen måte uønsket, dvs. at stoffet kan administreres til et individ uten å forårsake noen uønskede biologiske virkninger eller interagere på en skadelig måte med noen av komponentene i sammensetningen det er en del av, eller når det administreres ved å bruke veier som er kjent i teknikken, som beskrevet nedenfor.

I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen kjemisk modifiserte proteiner eller polypeptider, som er blitt bundet til en kjemisk enhet som tilveiebringer gunstige virkninger for produksjon, viabilitet for proteinet eller polypeptidet. For eksempel er ikke-spesifikk eller stedsspesifikk (f.eks. N-terminal)-konjugering av vannløselige polymerer til polypeptider kjent i teknikken for å forbedre halveringstiden ved potensialet å redusere immunogenisitet, renal utskillelse og/eller forbedre proteaseresistans. I noen utførelsesformer omfatter polypeptider for bruk i oppfinnelsen vannløselige polymerer reversibelt bundet til peptidet for å øke halveringstiden og/eller stabiliteten til molekylet. I ulike aspekter er de vannløselige polymerene bundet til peptidet eller polypeptidet på et hvilket som helst sted som kan tilpasses en vannløselig polymer. I ett aspekt er den vannløselige polymeren bundet til N-terminalen. I et annet aspekt er den vannløselige polymeren bundet til C-terminalen.

Begrepet "vannløselig polymer" betyr polymermolekyler som i det vesentlige er løselige i vandig løsning eller er til stede i form av en suspensjon, og i det vesentlige ikke har noen negativ innflytelse på pattedyr etter administrering av et protein konjugert til nevnte polymer i en farmasøytisk effektiv mengde, og kan betraktes som biokompatibel. I én utførelsesform omfatter de fysiologisk akseptable molekylerne fra ca. 2 til ca. 300 repeterende enheter. I ulike aspekter inkluderer vannløselige polymerer blant annet poly(alkylenglykoler), slik som polyetylenglykol (PEG), poly(propylenglykol) ("PPG"), kopolymerer av etylenglykol og propylenglykol og lignende, poly(oksyetyleret polyol), poly(olefinalkohol), poly(vinylpyrrolidon), poly(hydroksyalkylmetakrylamid),

poly(hydroksyalkylmetakrylat), poly(sakkarider), poly(α -hydroksysyre), poly(vinylalkohol), polyfosfasfazen, polyoksazolin, poly(N-akryloylmorfolin), poly(alkylenoksid)-polymerer, poly(eplesyre), poly(DL-alanin), polysakkarider, slik som karboksymetylcellulose, dekstran, hyaluronsyre og kitin, 5 poly(met)akrylater, samt polysialinsyre (PSA), hydroksyetylstivelse og kombinasjonene av hvilken som helst av de foregående.

I en utførelsesform omfatter oppfinnelsen anvendelse av vannløselige polymerer som varierer i type, konjugering, binding, geometri og lengde. Det vannløselige 10 polymermolekylet er ikke begrenset til en spesiell struktur, og i enkelte aspekter er det lineært, forgrenet eller flerarmet, dendrittisk eller med nedbrytbare bindinger. Dessuten er den interne strukturen i polymermolekylet i ytterligere andre aspekter organisert i et hvilket som helst antall ulike mønstre og velges fra gruppen bestående, uten begrensning, av homopolymer, alternativ 15 kopolymer, vilkårlig kopolymer, blokkopolymer, alternativ tripolymer, vilkårlig tripolymer og blokktripolymer.

I enkelte utførelsesformer omfatter polymerproteinkonjugatene blant annet polymerproteinkonjugater bundet av NHS (N-hydroksysukkinimid)- eller 20 aldehydbasert kjemi, varianter med forskjellig kjemisk binding mellom vannløselig polymerkjede og konjugeringssted, og varianter med forskjellig lengde.

I ett aspekt er den vannløselige polymeren poly(etylenglykol)(PEG). PEG, også 25 kjent som poly(etylenoksid) (PEO) eller polyoksyetylen (POE), er en type polyeter. PEG, PEO eller POE betyr en oligomer eller polymer av etylenoksid. De tre navnene er kjemisk synonyme, men historisk sett er tendensen at PEG betyr oligomerer og polymerer med en molekylmasse under 20 000 g/mol, PEO betyr polymerer med en molekylmasse over 20 000 g/mol og POE betyr en polymer 30 med en hvilken som helst molekylmasse. Men her brukes begrepene om hverandre.

PEG-er og PEO-er inkluderer molekyler med en fordeling av molekylvekter, dvs. polydisperse. Størrelsesfordelingen kan statistisk kjennetegnes ut fra 35 vektgjennomsnittlig molekylvekt (M_w) og tallgjennomsnittlig molekylvekt (M_n); forholdet mellom disse kalles polydispersitetsindeks (M_w/M_n). M_w og M_n kan måles ved hjelp av massespektroskopi. Mesteparten av PEG-proteinkonjugatene,

særlig de som er konjugert til PEG større en 1 kDa, viser varierte molekylvekter på grunn av mor-PEG-molekylets polydisperse natur. Når det gjelder mPEG2K (Sunbright ME-020HS, NOF), er for eksempel de faktiske molekylmasse spredt over et område på 1,5 ~ 3,0 kDa med en polydispersjonsindeks på 1,036.

5 Unntak er proteiner som er konjugert til MS(PEG)_n (N=4, 8, 12 eller 24, f.eks PEO₄, PEO₁₂)-baserte reagenser (Pierce), som spesialfremstilles som monodisperse blandinger med atskilt kjedelengde og definert molekylvekt.

10 I én utførelsesform, når den vannløselige polymeren er PEG, vil den gjennomsnittlige molekylvekten for PEG være i området fra ca. 3 til 200 kiloDalton ("kDa"), fra ca. 5 kDa til ca. 120 kDa, fra ca. 10 kDa til ca. 100 kDa, fra ca. 20 kDa til ca. 50 kDa, fra ca. 10 kDa til ca. 25 kDa, fra ca. 5 kDa til ca. 50 kDa eller fra ca. 5 kDa til ca. 10 kDa.

15 Begrepet "PEG" skal innbefatte enhver form av PEG som drøftes heri, eller som har vært brukt i teknikken for å derivere proteinet. Oppfinnelsen inkluderer flere forskjellige lineære PEG-polymerlengder, inkludert blant annet 1-100 repeterende enheter (-CH₂-CH₂-O-) eller konjugater av toarmede forgrenede PEG-polymerer. I noen aspekter inkluderer PEG-polymerlengder 10-2000

20 repeterende enheter (-CH₂-CH₂-O-) eller konjugater av de toarmet forgrenede PEG-polymerer. Videre inkludert i oppfinnelsen er NHS- eller aldehydbasert PEG-(CH₂CH₂O)_n, med 12 til 50 enheter. For PEGyleringsreaksjonene som er inkludert heri, er den gjennomsnittlige molekylvekten for den tilsatte PEG-enheten generelt ca. 1 kDa til ca. 50 kDa (begrepet "ca." innebærer da +/-1 kDa). I

25 andre aspekter kan den gjennomsnittlige molekylvekten for PEG-enheten kan være så stor som ca. 60 kDa. I enkelte aspekter er den gjennomsnittlige molekylvekten ca. 0,5–5 kDa.

30 Begrepet "PEGylert" betyr et protein, proteinkompleks eller polypeptid bundet til ett eller flere PEG-enheter. Begrepet "PEGylering" slik det er brukt her, betyr prosessen med å binde ett eller flere PEG-er til et protein.

I en annen utførelsesform inkluderer oppfinnelsen PEG-proteinkonjugater valgt fra gruppen bestående av lineære PEG-proteinkonjugater som er NHS-konjugerte og har en lengde i området fra -(CH₂-CH₂-O)_n-, der n = 1 til 100, lineære PEG-proteinkonjugater som er aldehydkonjugert og har en lengde i

35 området fra -(CH₂-CH₂-O)_n-, der n = 1 til 100, toarmet forgrenede PEG-

proteinkonjugater som er NHS-konjugerte og har variabel lengde, og trearmet forgrenede PEG-proteinkonjugater som er NHS-konjugerte. I andre aspekter er $n = 10$ til 1000 . Oppfinnelsen inkluderer også PEG-proteinkonjugater som inneholder forskjellige kjemiske bindinger $(-\text{CO}(\text{CH}_2)_n-)$, og $-(\text{CH}_2)_n-$ der $n = 1$ til 5) mellom konjugeringsstedet og PEG-kjeden. Oppfinnelsen inkluderer videre ladde, anionske PEG-proteinkonjugater for å redusere renal utskillelse, inkludert blant annet karboksylerte, sulfaterte og fosforylerte forbindelser (anioniske) (Caliceti, Adv. Drug Deliv. Rev. 2003 55(10):1261–77; Perlman, J. Clin. Endo. Metab. 2003 88(7):3227–35; Pitkin, Antimicrob. Ag. Chemo. 1986 29(3): 440–44; Vehaskari, Kidney Intl. 1982 22 127–135). I en videre utførelsesform er peptidet eventuelt konjugert til en enhet omfattende et bisfosfonat, karbohydrater, fettsyrer eller andre aminosyrer.

I én utførelsesform tilveiebringer oppfinnelsen modifiserte proteiner, slik som blodfaktorer som har en lav grad av vannløselig polymer konjugert til proteinet. I ulike aspekter av oppfinnelsen genereres en lavPEGylert form av proteinet ved å bruke et redusert moloverskudd av vannløselig polymer til protein i konjugasjonsreaksjonen. For eksempel bruker typiske fremgangsmåter for å PEGylere et protein et 61,8 M overskudd av PEG til proteinet av interesse. I noen aspekter bruker framgangsmåter for PEGylering av et protein fra 50–100 M overskudd av PEG til protein. I ulike aspekter genereres lavPEGylerte proteiner, som beskrevet heri, ved å anvende et moloverskudd i reaksjonen som er mindre enn det som brukes i standardmetoder.

I tillegg tenker man at det lavPEGylerte proteinet beskrevet heri omfatter minst ca. én og ikke mer enn 10 enheter av vannløselig polymer per blodfaktormolekyl eller per molekyl av blodkoaguleringsprotein. I én utførelsesform omfatter det modifiserte proteinet minst ca. 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 eller 9 enheter vannløselig polymer per proteinmolekyl. I en annen utførelsesform omfatter det modifiserte proteinet mellom ca. 4 og 8 enheter vannløselig polymer per proteinmolekyl. I noen utførelsesformer er det modifiserte proteinet en blodfaktor. I andre aspekter er det modifiserte proteinet et blodkoaguleringsprotein. I tilknyttede utførelsesformer inkluderer oppfinnelsen blant annet en hvilken som helst blodfaktor, slik som faktor II, faktor III, faktor V, faktor VII, faktor VIII, faktor IX, faktor X, faktor XI, faktor XII, von Willebrand-faktor og fibrinogen. I ett aspekt er blodfaktormolekylet faktor VIII. I et annet aspekt er blodfaktormolekylet VWF. I enda et annet aspekt er blodfaktormolekylet humant.

I én utførelsesform omfatter den modifiserte blodfaktoren eller blodkoaguleringsproteinmolekylet minst én og mindre enn 20 PEG-enheter per molekyl. I en beslektet utførelsesform omfatter den modifiserte blodfaktoren minst 4 og mindre enn 10 PEG-enheter per blodfaktormolekyl. I en ytterligere

5 utførelsesform omfatter den modifiserte blodfaktoren 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 eller 20 enheter vannløselig polymer per blodfaktormolekyl. I en tilknyttet utførelsesform omfatter det modifiserte blodfaktormolekylet mellom 1 og 20, mellom 2 og 10 eller mellom 4 og 8 PEG-enheter per blodfaktormolekyl. I ett aspekt er 5 PEG-enheter bundet til

10 rekombinant VWF. I et annet aspekt er 12 PEG-enheter bundet til rekombinant faktor VIII (rFVIII).

For å bestemme om den terapeutiske *in vivo*-halveringstiden for et peptid, polypeptid (protein) ville ha nytte av PEGylering, blir en rekke forskjellige PEG-proteinkonjugater syntetisert, kjennetegnet *in vitro* og *in vivo* for

15 farmakokinetikk.

Fremgangsmåter for fremstilling av PEGylert protein ifølge oppfinnelsen omfatter generelt trinnene å omsette proteinet av interesse med PEG under betingelser der PEG blir bundet reversibelt til N-terminalen, C-terminalen eller en hvilken

20 som helst annen aminosyre i proteinet, og å oppnå reaksjonsprodukt. Ettersom PEGylering av et protein kan endre den iboende aktiviteten til proteinet vesentlig, undersøkes forskjellige typer PEG. Kjemien som kan anvendes til PEGylering av protein, inkluderer acylering av primæraminene i proteinet ved å

25 bruke NHS-ester av metoksy-PEG (O-[(N-sukkinimidyloksykarbonyl)-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-terminal). I motsetning til ribosomproteinsyntese fortsetter syntetisk peptidsyntese fra C-terminalen til N-

30 terminalen. Derfor er Boc-PEG én fremgangsmåte (dvs. å bruke tert-(B)utyl (o)ksy (k)arbonyl (Boc, t-Boc)-syntese) for å binde PEG til peptidets C-terminal (R. B. Merrifield (1963). "Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide". J. Am. Chem. Soc. 85 (14): 2149–2154). Alternativt anvendes (f)luorenyl-(m)et(o)ksy-(k)arbonyl (Fmoc)-kjemi (Atherton, E.; Sheppard, R.C.

35 (1989). Solid Phase peptide synthesis: a practical approach. Oxford, England: IRL Press.) fordi den ikke krever risikabel bruk av hydrogenfluorsyre til å fjerne sidekjedede beskyttelsesgrupper. Fremgangsmåter for å generere peptider

omfattende en PEG-enhet er velkjent i teknikken. Se for eksempel US-patent 5 824 784.

Begrepet "linker" betyr et molekyllfragment som binder den vannløselige polymeren til et biologisk aktivt molekyl. Fragmentet har typisk to funksjonelle grupper som kan bindes til eller aktiveres til å reagere med en annen linker eller direkte med den biologisk aktive nukleofilen. Som eksempel brukes ofte ω -aminoalkansyre slik som lysin. Oppfinnelsen inkluderer frisettbare, nedbrytbare eller hydrolyserbare linkere brukt til konjugering av den vannløselige polymeren til polypeptidet.

I ett aspekt inkluderer oppfinnelsen PEG frisettbart bundet til et protein. Denne typen PEG-modifikasjon oppnås ved binding av en frisettbare PEG-FMOC-NHS-reagens til eksponerte lysinrester av proteinet av interesse. Det dannede konjugatet kjennetegnes ved sin evne til å frisette PEG gjennom en β -elimineringssmekanisme. β -elimineringssnivået katalyseres ved hjelp av baser (f.eks. amingrupper) og akselereres ved hjelp av basisk pH og økt temperatur. Frisettingen av PEG kan derfor tvinges *in vitro* ved høye konsentrasjoner av frie aminer og ved økt pH og temperatur.

I ulike andre aspekter inkluderer oppfinnelsen stabile og hydrolyserbare linkere som kan lette konjugeringen av den vannløselige polymeren til polypeptidet av interesse. Stabile linkere inkluderer blant annet amid, amin, eter, karbamat, tiourea, urea, tiokarbammat, tiokarbonat, tioeter, tioester og ditiokarbammatbindinger, slik som ω,ω -aminoalkan, N-karboksyalkylmaleimid eller aminoalkansyrer, maleimidobenzoyl sulfosuksinimidester, glutaraldehyd eller ravsyreanhydrid, N-karboksymetylmaleimid N,N'-disuksinimidyloksalat og 1,1'-bis[6-(trifluorometyl)benzo-triazolyl]oksalat. I andre aspekter konjugeres den vannløselige polymeren til polypeptidet ved å bruke hydrolyserbare linkere. En hydrolyserbar linker binder en vannløselig polymer til et polypeptid ved en hydrolyserbar eller nedbrytbar binding, som er en relativt svak binding som reagerer med vann (dvs. hydrolyseres) under fysiologiske betingelser. Tendensen hos en binding til å hydrolysere i vann avhenger ikke bare av den generelle typen binding som kobler sammen to sentrale atomer, men også av substituentene som er bundet til disse sentrale atomene. I spesielle aspekter anvendes det hydrolyserbare linkersystemer. I andre aspekter kan andre nedbrytbare eller frisettbare systemer spaltes under spesielle betingelser, f.eks.

ved basekatalyse. Fremgangsmåter for å lage vannløselige polymerer omfattende hydrolyserbare, nedbrytbare eller frisettable linkere, og fremgangsmåter for å lage konjugater omfattende vannløselige polymerer som er hydrolyserbare når de omfatter disse linkerne, er beskrevet i US Patent 7,259,224 (Nektar Therapeutics) og US Patent 7,267,941 (Nektar Therapeutics and National Institutes of Health), US Patent 6,515,100 (Shearwater Corporation), WO 2006/138572 (Nektar Therapeutics), US 2008/0234193 (Nektar Therapeutics and Baxter Healthcare), WO 2004/089280 (Yeda Research and Development Co. LTD), US Patent 7,122,189 (Enzon Inc.) og linkersystemene er videre beskrevet av Greenwald et al. (J. Med. Chem. 42:3657-3667, 1999). For eksempel kan en PEG fremstilles ved å ha esterbindinger i polymerhovedkjeden som utsettes for hydrolyse. Denne hydrolysen resulterer i spalting av polymeren i fragmenter med lavere molekylvekt. Egnede hydrolytisk ustabile eller svake bindinger inkluderer blant annet karboksylatester, fosfatester, anhydrider, acetal, ketaler, acyloksyalkyleter, iminer, ortoestere, peptider og oligonukleotider, tioestere, tiolester og karbonater. Hydrolytisk nedbrytbare bindinger som kan finnes i polymerhovedkjeden, inkluderer karmamat, karbonat, sulfat og acyloksyalkyleterbindinger; iminbindinger, som for eksempel er et resultat av reaksjonen mellom et amin og et aldehyd (se f.eks. Ouchi et al., Polymer Preprints, 38(1):582-3 (1997)); karbamat-, fosfatester-, hydrazon-, acetal-, ketal- eller ortoesterbindinger, inkludert aceton-bis-(N-maleimidoetyl)ketal-linkere (MK). Andre nedbrytbare og frisettable systemer inkludert i oppfinnelsen er basert på Fmoc-kjemi eller er frisettable linkersystemer som er basert på bicinderivater. I andre aspekter bruker andre frisettable systemer 1,4- eller 1,6-benzyl-elimineringssreaksjoner. I noen aspekter tilveiebringer fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen en i det vesentlige homogen blanding av polymer:proteinkonjugat. "I det vesentlige homogent" slik det er brukt her, betyr at bare polymerproteinkonjugatmolekylene observeres. Polymer-proteinkonjugatet har biologisk aktivitet og de "i det vesentlige homogene" PEGylerte proteinpreparatene er de som er homogene nok til å oppvise fordelene med et homogent preparat, f.eks. enkel klinisk anvendelse i forutsigbar farmakokinetikk fra batch til batch.

Det dannede konjugatet kjennetegnes ved sin evne til å frisettable PEG gjennom en β -elimineringssmekanisme. β -elimineringssshastigheten katalyseres av baser (f.eks. amingrupper) og akselereres av basisk pH og økt temperatur. Frisettingen av

PEG kan derfor tvinges *in vitro* gjennom høye konsentrasjoner av frie aminer og ved økt pH og temperatur.

5 Den foreliggende beskrivelsen beskriver forskjellige strategier for å tvinge *in vitro*-frisetting av PEG fra proteiner modifisert av reversibelt bundet PEG, samt utviklingen av egnede *in vitro*-assaysystemer til å overvåke dePEGyleringen. For eksempel anvendes proteinkonjugater, PEGylert rekombinant von Willebrand-faktor (rVWF) og rekombinant faktor VIII (rFVIII).

10 I ulike utførelsesformer anvendes PEGylert rVWF eller PEGylert rFVIII i fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen. PEGylert rVWF og PEGylert rFVIII anvendes i behandlingen av ulike blodkoaguleringslidelser eller blødersykdommer. Begrepet "blodkoaguleringslidelse" eller "blødersykdom" betyr en hvilken som helst av flere nedarvede eller utviklende mangler i
15 blodkoaguleringsfaktorene som medfører at blodet ikke er i stand til effektivt å danne koagler, og påfølgende avvikende blødning hos en person. Blodkoaguleringslidelser inkluderer blant annet hemofili A, hemofili B, von Willebrand-syndromet, faktor X-mangel, faktor VII-mangel, Alexanders sykdom, Rosenthals syndrom (faktor XI-mangel eller hemofili C) og faktor XIII-mangel.
20 Behandling av blodkoaguleringslidelse betyr profylaktisk behandling eller terapeutisk behandling.

Dessuten kan en VWF-mangel forårsake en fenotypisk hemofili A fordi VWF er en vesentlig komponent i funksjonell FVIII. I tillegg viser pasienter som lider av von
25 Willebrand sykdom (VWD) eller VWF-syndromet, ofte en FVIII-mangel. Hos disse pasientene er ikke den reduserte FVIII-aktiviteten konsekvensen av en defekt i X-kromosomgenet, men en indirekte følge av den kvantitative og kvalitative endringen av VWF i plasma. Differensieringen mellom hemofili A og VWD kan normalt gjøres ved å måle VWF-antigenet eller ved å bestemme ristocetinkofaktoraktiviteten. Ristocetinkofaktoraktiviteten måles ved å tilsette ristocetin
30 og et blodplatesubstrat i pasientens plasma. Ristocetin fremmer binding av VWF til blodplateglykoprotein Ib-reseptor, noe som fører til agglutinasjon. Pasientens VWF vil støtte blodplateagglutinasjonen induert av ristocetin som målt ved en endring i lysoverføring. Derfor er dette en *in vitro*-måling av den funksjonelle
35 aktiviteten til pasientens VWF, og er det mest følsomme assayet for å diagnostisere VWD. Både VWF-antigeninnholdet og ristocetinkofaktoraktiviteten senkes hos de fleste VWD-pasienter, mens de er normale hos pasienter med

hemofili A. Oppfinnelsen drøfter fremgangsmåter som involverer reversibelt PEGylert VWF og FVIII, men inkluderer imidlertid alle andre proteiner som kan bindes kovalent til PEG via en reversibel binding. I ulike aspekter inkluderte oppfinnelsen fremgangsmåter for å frisetten PEG fra andre blodkoaguleringsfaktorproteiner, inkludert blant annet faktor II (trombin), faktor III, faktor V, faktor VII (prokonvertin), faktor VIIa, faktor VIII, faktor IX (FIX, Christmas' faktor), faktor XI og faktor XIII underenhet A og underenhet B.

Frisettingen av PEG fra proteiner bestemmes ved å måle en økning i fri PEG, gjenvinning av proteinaktivitet og, når det gjelder rVWF, for eksempel også ved *in vivo*-gjenvinning av dens farmakokinetiske parametre. Muligheter for overvåking av distinkte PEG-arter uten behov for separasjon er gitt basert på spektralegenskapene til den kondenserte ringstrukturen i det substituerte fluorenet (som til stede i PEG-konjugat) og dibenzofulvenet (fri PEG)-kromoforer, som rommer forskjellige UV-absorpsjons- og fluorescenseemisjonsspektre.

En utførelsesform av den foreliggende beskrivelsen er utviklingen av et assaysystem som muliggjør overvåking av *in vitro*-gjenvinningen av biologisk aktivitet i det modifiserte proteinet. Frisetbar vannløselig polymer, slik som PEG, kan frigjøres fra proteinet ved å øke pH, inkludert blant annet å øke pH til verdier på ca. 8,1, ca. 9,5 og ca. 9,8. Denne typen assay for å gjenvinne det native proteinet passer for proteiner som er stabile ved høy pH. I ulike aspekter av den tilveiebrakte fremgangsmåten økes pH fra ca. 6,0 til ca. 8,5, fra ca. 6,5 til ca. 8,1, fra ca. 6,5 til ca. 9,5, fra ca. 7,3 til ca. 9,8 og fra ca. 6,5 til ca. 9,8. I ytterligere aspekter inkluderer oppfinnelsen å øke pH til ca. 10. I atter andre aspekter inkluderer de tilveiebrakte fremgangsmåtene å øke og teste pH-verdier til ca. 6,0, ca. 6,1, ca. 6,2, ca. 6,3, ca. 6,4, ca. 6,5, ca. 6,6, ca. 6,7, ca. 6,8, ca. 6,9, ca. 7,0, ca. 7,1, ca. 7,2, ca. 7,3, ca. 7,4, ca. 7,5, ca. 7,6, ca. 7,7, ca. 7,8, ca. 7,9, ca. 8,0, ca. 8,1, ca. 8,2, ca. 8,3, ca. 8,4, ca. 8,5, ca. 8,6, ca. 8,7, ca. 8,8, ca. 8,9, ca. 9,0, ca. 9,1, ca. 9,2, ca. 9,3, ca. 9,4, ca. 9,5, ca. 9,6, ca. 9,7, ca. 9,8, ca. 9,9, ca. 10,0, ca. 10,1, ca. 10,2, ca. 10,3, ca. 10,4, ca. 10,5, ca. 10,6, ca. 10,7, ca. 10,8, ca. 10,9, ca. 11,0, ca. 11,5 og opp til over ca. pH 12,0.

Ifølge den foreliggende oppfinnelsen anvendes tilsetning av frie aminer som fremgangsmåte for å tvinge frisetting av vannløselig polymer ved nøytral pH, hvori de frie aminene inkluderer histidin, lysin eller en kombinasjon derav.

Denne fremgangsmåten egner seg derfor til pH-følsomme proteiner. En kombinasjon av disse to tilnærmingene er også en del av oppfinnelsen. Disse tilnærmingmåtene er illustrert med PEGylert rVWF og med PEGylert rFVIII (se eksempel 1 til 5).

5

I en annen utførelsesform anvendes også økning av temperaturen i bufferen som ett eller flere tilleggsmidler for å tvinge frisettingen av vannløselig polymer fra proteinet. I ulike aspekter økes temperaturen fra ca. 4 °C til ca. romtemperatur til ca. 37 °C. I atter andre aspekter inkluderer de tilveiebrakte fremgangsmåtene en økning av temperaturen i bufferen fra ca. 4 °C til ca. 5 °C, til ca. 6 °C, til ca. 7 °C, til ca. 8 °C, til ca. 9 °C, til ca. 10 °C, til ca. 11 °C, til ca. 12 °C, til ca. 13 °C, til ca. 14 °C, til ca. 15 °C, til ca. 16 °C, til ca. 17 °C, til ca. 18 °C, til ca. 19 °C, til ca. 20 °C, til ca. 21 °C, til ca. 22 °C, til ca. 23 °C, til ca. 24 °C, til ca. 25 °C, til ca. 26 °C, til ca. 27 °C, til ca. 28 °C, til ca. 29 °C, til ca. 30 °C, til ca. 31 °C, til ca. 32 °C, til ca. 33 °C, til ca. 34 °C, til ca. 35 °C, til ca. 36 °C, til ca. 37 °C, til ca. 38 °C, til ca. 39 °C, til ca. 40 °C, til ca. 41 °C, til ca. 42 °C, til ca. 43 °C, til ca. 44 °C, til ca. 45 °C, til ca. 46 °C, til ca. 47 °C, til ca. 48 °C, til ca. 49 °C, til ca. 50 °C, til ca. 55 °C, til ca. 60 °C, til ca. 65 °C, til ca. 70 °C, til ca. 75 °C, til ca. 80 °C, til ca. 85 °C, til ca. 90 °C, til ca. 95 °C og til ca. 100 °C.

10

15

20

Den vannløselige polymeren kan derfor bindes reversibelt til et polypeptid og frisettes fra polypeptidet ved å øke konsentrasjonen av frie aminer i bufferen, ved å øke pH for bufferen, ved å øke temperaturen i bufferen, eller ved en kombinasjon av hvilket som helst av det ovennevnte. I enda en annen utførelsesform inkluderer dessuten fremgangsmåtene ifølge oppfinnelsen å utvide tidsperioden for inkubering av proteinet i bufferen som ett eller flere midler til å frisetts vannløselig polymer fra proteinet. I ulike aspekter økes inkubasjonstiden fra ca. 5 minutter (min), til ca. 10 min, til ca. 20 min, til ca. 30 min, til ca. 40 min, til ca. 50 min, til ca. 1 time (hr), til ca. 2 hr, til ca. 3 hr, til ca. 4 hr, til ca. 5 hr, til ca. 6 hr, til ca. 7 hr, til ca. 8 hr, til ca. 9 hr, til ca. 10 hr, til ca. 11 hr, til ca. 12 hr, til ca. 13 hr, til ca. 14 hr, til ca. 15 hr, til ca. 16 hr, til ca. 17 hr, til ca. 18 hr, til ca. 19 hr, til ca. 20 hr, til ca. 21 hr, til ca. 22 hr, til ca. 23 hr, til ca. 24 hr, til ca. 36 hr, til ca. 48 hr, til ca. 60 hr, til ca. 72 hr, til ca. 84 hr, til ca. 96 hr, til ca. 108 hr, til ca. 120 hr, til ca. 132 hr, til ca. 144 hr, til ca. 146 hr, til ca. 168 hr, til ca. 180 hr, til ca. 192 hr, til ca. 204 hr, til ca. 228 hr, til ca. 252 hr, til ca. 276 hr og til ca. 300 hr. Følgelig frisetts den vannløselige polymeren i ulike aspekter fra polypeptidet ved å øke inkubasjonstiden, ved å

25

30

35

øke aminkonsentrasjonen eller pH i bufferen, ved å øke buffertemperaturen eller ved en kombinasjon av ett eller flere av disse angitte midlene.

5 I en annen utførelsesform (ikke del av oppfinnelsen) beskriver den foreliggende beskrivelsen utviklingen av et assaysystem som kan brukes til kvalitetskontroll av proteiner modifisert med frisettable PEG eller andre frisettable vannløselige polymerer (se eksempel 6).

10 Den foreliggende beskrivelsen tilveiebringer også et eksempel på en separasjonsbasert fremgangsmåte anvendt som referansefremgangsmåte for måling av frisatt vannløselig polymer ved størrelseseksklusionskromatografi og detektering/måling av fri vannløselig polymer, dvs. PEG (se eksempel 7, 8 og 9). Basert på den typen vannløselig polymerlinker som brukes, kan fraksjonering og kvantifisering av den vannløselige polymeren oppnås ved å måle
15 refraksjonsindeksen, den optiske tettheten og/eller fluorescensen av kolonneproduktet.

Den foreliggende beskrivelsen beskriver videre karakteristikken av kinetikken i vannløselig polymerfrisetting ved å måle mengdene frisatt vannløselig polymer
20 og vannløselige polymerproteinkonjugater i reaksjonsblandingen (se eksempel 7, 8 og 9), dvs. uten at man trenger separere de genererte artene.

I ett aspekt benyttes fluorescensmålinger dersom spektralegenskapene for artene i fluorescensmolekylene som anvendes, er tilstrekkelig ulike. Samtidig
25 måling av både fluorin- eller dibenzofulvenpolymer og fluorin-(Fmoc)-polymerkonjugerte arter eller fri vannløselig polymer (dvs. PEG) og PEG-konjugerte arter er mulig ved hjelp av fluorescensmålinger ved egnet eksitasjonsbølgelengde på grunn av avvikende kondenserte ringsystemer med distinkte emisjonsspektre, slik som maks.emisjon på 350–355 nm for det
30 substituerte fluorenet og emisjonsregionen 460–560 nm for dibenzofulvenet. I tillegg vil omhyggelig valg av eksitasjonsbølgelengde unngå eksitasjon av proteintryptofan og tyrosinfluorescens med en maksimal følsomhet på ca. 280 nm. Til en slik måling foretrekkes en smal spektrometerspalte for å separere eksitasjons- og emisjonssignalene med en Stokes-forskyvning på ca. 20 nm.

35

I et annet aspekt anvendes et spesifikt immunoassay som muliggjør måling av konjugatbundet vannløselig polymer (dvs. PEG). Denne fremgangsmåten, som

beskrevet i USSN 61/009,327, gir mulighet for måling gjennom bruk av en kombinasjon av parede antistoffer som spesifikt binder til PEG og det ukonjugerte proteinet. DePEGylering av PEG-konjugatet blir deretter detektert gjennom en relativ nedgang i reaktivitet i PEG-protein-ELISA uttrykt i forhold til responsen som ble målt i konjugatet før dePEGyleringen (se eksempel 7, 8 og 9). En ELISA av denne typen detekterer ikke fri PEG, men detekterer spesifikt bare PEG bundet til konjugat.

Med utviklingen av disse *in vitro*-assaysystemene er det mulig å øke det β -eliminajondrevne nivået i PEG-frisetting fra reversibelt PEGylerte proteiner på en vesentlig måte og å gjenvinne aktivitet for det umodifiserte proteinet.

EKSEMPLER

Tilleggsaspekter og detaljer ifølge oppfinnelsen fremgår av følgende eksempler, som er tenkt snarere illustrative enn begrensende. Eksempel 1 beskriver *in vitro*-dePEGylering av frisetthbar PEG-rVWF ved økt pH; eksempel 2 beskriver *in vitro*-dePEGylering av frisetthbar PEG-rVWF i nærvær av primæraminer og høy pH; eksempel 3 beskriver *in vitro*-gjenvinning av proteinaktivitet for frisetthbar PEG-RFVIII i nærvær av valgte frie aminer; eksempel 4 beskriver *in vitro*-dePEGylering av frisetthbar PEG-rFVIII i nærvær av en kombinasjon av frie aminer; eksempel 5 beskriver *in vitro*-dePEGylering av frisetthbar PEG-rFVIII i nærvær av Hepes/Tris; eksempel 6 beskriver *in vitro*-gjenvinning av proteinaktivitet for frisetthbar PEG-rFVIII i nærvær av valgte frie aminer; eksempel 7 beskriver detekteringen av PEG-frisetting fra PEG-rFVIII ved fluorescensmåling uten separasjon av arter; eksempel 8 beskriver scavenging av PEG-dibenzofulven med glutation; eksempel 9 viser virkningen av pH på PEG-dibenzofulvengenerering; eksempel 10 drøfter *in vitro*-depolymerisering av frisetthbar PSA-rVWF ved økt pH; eksempel 11 beskriver *in vitro*-depolymerisering av frisetthbar PSA-rVWF i nærvær av primæraminer og høy pH; eksempel 12 beskriver *in vitro*-gjenvinning av proteinaktivitet for frisetthbar PSA-RFVIII i nærvær av valgte frie aminer; eksempel 13 beskriver *in vitro*-depolymerisering av frisetthbar PSA-rFVIII i nærvær av en kombinasjon av frie aminer, og eksempel 14 beskriver *in vitro*-depolymerisering av frisetthbar PSA-rFVIII i nærvær av Hepes/Tris.

EKSEMPEL 1 (komparativt eksempel):

IN VITRO-DEPEGYLERING AV FRISETTBAR PEG-RVWF VED ØKT PH

5 DePEGylering av et frisetbart PEG rVWF-konjugat (konjugert med en 20K-
 forgrenet PEG) ble utført ved å inkubere proteinet ved to forskjellige pH-verdier,
 pH 6,5 og pH 8,1. Renset PEG-rVWF ble løst opp i 0,02 M Na-citrat, 0,15 M NaCl
 med en pH-verdi på 6,5. For alkaliprøven ble den samme bufferen justert til pH
 8,1 ved tilsetning av 0,1 M NaOH. Delprøver ble trukket ut på definerte tidspunkt
 10 og analysert med hensyn til deres innhold av VWF-antigen (VWF:Ag), fri PEG,
 total PEG og VWF-sammensetning av multimerer.

Innholdet av VWF:Ag ble bestemt med en sandwich-ELISA ved å bruke
 kommersielt tilgjengelige antistoffer (Dako, Glostrup, Danmark). Fri PEG og total
 15 PEG ble bestemt ved hjelp av metoden høytytelsesvæskeskromatografi (HPLC)
 tilveiebrakt av Nektar Therapeutics (Huntsville, AL). Begrepene
 "høytytelsesvæskeskromatografi," "høytrykksvæskeskromatografi" og HPLC brukes
 her om hverandre. VWF-multimeranalysen ble utført ved hjelp av horisontal
 høytytthets SDS-agarosegelelektroforese og immunofarging ved å bruke et
 20 polyklonalt anti-humant VWF-antistoff (Dako). Resultatene av disse forsøkene er
 oppsummert i tabell 1 og figur 1.

Dataene i tabell 1 viser resultatene for det bestemte forholdet VWF:Ag til protein
 (IU/mg) og prosentandelen frisatt, fri PEG av det totale PEG-innholdet under
 25 inkuberingene ved henholdsvis pH 6,5 og pH 8,1. Basisverdien gjenspeiler de
 opprinnelige egenskapene til konjugatet, dvs. før tvungen PEG-frisetting ble satt
 i gang. Forholdet VWF:Ag til protein ble redusert merkbart for PEG-rVWF (39
 IU/mg) sammenlignet med 100–160 IU/mg for en nativ, umodifisert rVWF.
 Prosentandelen fri PEG var så lav som 5 %. Etter inkubering ved 37 °C økte
 30 forholdet VWF:Ag til protein gradvis over tid under begge betingelsene, med
 med litt høyere verdier ved pH 8,1. Mengden PEG som ble frisatt fra PEG-rVWF-
 konjugatet, ble vesentlig akselerert ved høyere pH. Etter 1 t ved pH 8,1 var
 prosentandelen frisatt, fri PEG 53 %; mens ved den lavere pH 6,5 var 23 % av
 fri PEG blitt frigjort. Den observerte forskjellen i prosentandel frisatt PEG minket
 35 etter lengre inkubasjonstider og etter 29 dager, da 60 % av PEG var frisatt ved
 pH 6,5 og 68 % av total PEG var frigjort ved pH 8,1.

Tabell 1. Endringer i VWF:Ag-verdier og forekomst av fri PEG etter inkubasjon av reversibelt PEGylert rVWF ved forhøyet pH.

Inkubasjonstid (dager)	PEG-rVWF			
	Forhold VWF:Ag/protein (IU/mg)		Fri PEG (% av total PEG)	
	pH 6,5	pH 8,1	pH 6,5	pH 8,1
Basis	39	39	5	5
5 min	42	56	3	29
1	58	78	23	53
4	64	71	41	58
15	77	86	54	63
29	79	92	60	68

5

Multimeranalyse av disse prøvene (figur 1) viser den typiske forskyvningen av hver VWF-multimer etter PEGylering (ved sammenligning av linjer med betegnelsen 'nativ rVWF' og 'opprinnelig'). Under inkubering både ved pH 6,5 og 8,1 sank molekylvekten for de PEGylerte rVWF-multimerene gradvis, dette kan ses av endringen tilbake til lavere molekylvekter, noe som indikerer frisetting av PEG over tid. Fullstendig gjenoppretting av den opprinnelige strukturen i umodifisert rVWF ble imidlertid ikke oppnådd under de to pH-betingelsene. Dataene viser ikke desto mindre at inkubering både ved pH 6,5 og pH 8,1 ved 37 °C førte til en vesentlig frisetting av PEG fra PEGylert rVWF.

10

15

EKSEMPEL 2:

IN VITRO-DEPEGYLERING AV FRISSETTBAR PEG-RVWF I NÆRVÆR AV PRIMÆRAMINER OG HØY PH

20

Et frisettbart PEG-rVWF-konjugat (20 k-forgrenet PEG) ble fortynnet i en buffer av 0,02 M natriumcitrat, 0,15 M NaCl ved en pH på 9,8, som inneholdt 100 mM lysin, og inkubert ved 37 °C. Delprøver ble trukket ut på definerte tidspunkt og

analysert mht. innhold av VWF-antigen (VWF:Ag), fri PEG, total PEG og multimer sammensetning. Multimer analyse ble utført ved hjelp av horisontal høytetthets SDA-agarosegelelektroforese og immunofarging ved å bruke antistoffer enten rettet direkte mot humant VWF (Dako, Glostrup, Danmark) eller PEG (anti-PEG-antistoff av polyklonal kanin utviklet på huset). Resultatene er oppsummert i tabell 2, figur 2 og figur 3.

Tabell 2. Endringer i VWF:Ag-verdier og forekomst av fri PEG etter inkubering av reversibelt pegylert rVWF ved forhøyet pH og i nærvær av frie aminer.

Inkubasjonstid (timer)	PEG-rVWF pH 9,8 100 mM lysin	
	Forhold VWF:Ag/protein (IU/mg)	Fri PEG (% av total PEG)
Basis	26	3
5 min	33	5
0,5	53	33
4	80	63
10	87	75
20	96	79
48	105	81

Dataene i tabell 2 viser at etter inkubering av PEG-rVWF i nærvær av aminlysin ved pH 9,8, skjedde det en tydelig økning i forholdet VWF:Ag til protein over tid. Videre ble 81 % av total PEG frisatt etter 48 t inkubering i den nevnte bufferen. Den multimeren gelen i figur 2 viser at etter 10-20 t inkubering gikk VWF-multimerene tilbake til lavere molekylvekter, og strukturen ble nesten lik strukturen for en umodifisert rVWF. Lengre inkubasjonstid (48 t) førte til en nedbryting av rVWF-proteinstrukturen. DePEGylering av rVWF ble vist direkte ved å anvende et polyklonalt anti-PEG-antistoff for farging av den multimeren gelen i figur 3. Etter 20 t inkubering forble bare små mengder PEG bundet til de enkle VWF-multimerene. Dataene viser at inkubering i nærvær av lysin ved pH 9,8 resulterte i en tydelig frisetting av PEG i løpet av en kortere tidsperiode sammenlignet med eksempel 1 og gjenopprettet rVWF-struktur.

Fremgangsmåten beskrevet i eksempel 2 egner seg derfor til proteiner som er stabile ved høy pH.

5 Farmakokinetikken for dePEGylert PEG-rVWF ble bestemt i en dobbel VWFxFVIII knock-out-musemodell. Mus fikk en bolusinjeksjon (10 ml/kg) via halevenen av FVIII (200 IU/kg), alene eller sammen med enten 1,6 mg/kg nativ rVWF, frisettable PEG-rVWF (20 K-forgrenet) eller dePEGylert rVWF (inkubert i 10 t ved +37 °C i lysinløsning med pH 9,8).

10 Blodprøver (antikoagulert med natriumcitrat) ble trukket ut ved hjelp av hjertepunktur etter anestesi fra de respektive gruppene etter 5 min, og etter 3 t, 6 t, 9 t og 24 t etter injeksjon. Plasma ble fremstilt ved sentrifugering, og *in vivo*-FVIII-stabiliseringsfunksjonen for VWF ble bestemt ved å måle FVIII-aktivitet med et kromogent assay. Resultatene av dette forsøket er oppsummert i figur 4, og viser at den PEGylerte rVWF beskyttet FVIII i en større grad enn umodifisert rVWF. Det dePEGylerte -rVWF beholdt den samme FVIII-stabiliserende evnen som det umodifiserte rVWF, noe som indikerer at aktiv rVWF ble frigjort under den tvungne *in vitro*-frisettingen.

EKSEMPEL 3:

20

IN VITRO-GJENVINNING AV PROTEINAKTIVITET FOR FRISSETTBAR PEG-RFVIII I NÆRVÆR AV VALGTE FRIE AMINER

25 Et frisettable PEG-rFVIII-konjugat (20 K-forgrenet PEG) ble fortynnet til 5 IU/ml FVIII kromogen aktivitet i en buffer med en pH på 7,3 (10 mM histidin, 90 mM NaCl, 1,7 mM CaCl₂, 10 mM Tris, 0,26 mM glutation, 176 mM mannitol, 23,5 mM trehalose og 0,1 g/l Tween 80); bufferen inneholdt i tillegg lysin, histidin eller en kombinasjon av disse to aminosyrene, og bufferen ble inkubert ved 37 °C for å tvinge *in vitro*-frisetting av PEG fra proteinkonjugatet. Delprøver ble trukket ut på definerte tidspunkt (24 t, 48 t og 72 t) og FVIII-kromogen aktivitet ble bestemt online ved bruk av et FVIII-kromogent assay. Resultatene er oppsummert i figur 5.

35 I en buffer som manglet aminer, økte aktiviteten fra 5,0 til 11,5 IU/ml FVIII:C etter 72 t. Ved tidspunktet 72 t økte nærværet av 100 mM histidin FVIII-

aktiviteten til 17,8 IU/ml, 100 mM lysin til 20,4 IU/ml, 200 mM histidin til 24,9 IU/ml og kombinasjonen av 100 mM histidin og 100 mM lysin til 34,7 IU/ml. Følgelig var den tvungne PEG-frisettingen klart avhengig av aminkonsentrasjonen og muligens av aminsammensetningen. Den beskrevne fremgangsmåten her i dette eksemplet egner seg til *in vitro*-gjenvinning av proteinaktivitet i reversibelt PEGylerte proteiner som er følsomme overfor pH-omgivelsene.

EKSEMPEL 4:

IN VITRO-DEPEGYLERING AV FRISSETTBAR PEG-RFVIII I NÆRVÆR AV EN KOMBINASJON AV FRIE AMINER

Et frisettbart PEG-rFVIII-konjugat (20 k-forgrenet PEG) ble inkubert i en buffer (20 mM Na₃-citrat, 1,7 mM CaCl₂, 176 mM mannitol, 36 mM sukrose og 0,1 g/l Tween 80) med en pH på 7,3; bufferen inneholdt i tillegg 100 mM histidin og 100 mM lysin og ble inkubert ved +37 °C. Delprøver ble trukket ut til definerte tidspunkt inntil 168 t, og den funksjonelle aktiviteten til PEG-rFVIII ble bestemt online ved bruk av det FVIII-kromogene assayet. I tillegg ble frisettingen av PEG bekreftet ved å måle fri PEG og total PEG ved hjelp av en HPLC-metode tilveiebrakt av Nektar Therapeutics (Huntsville, AL) fra frosne delprøver. Resultatene er oppsummert i figur 6 og tabell 3.

Figur 6 viser økningen i FVIII-kromogen aktivitet for PEG-rFVIII under inkubasjonsfasen. Økningen i proteinaktivitet fulgte et tofaset forløp: En hurtig økning i FVIII-aktivitet ble observert i løpet av de 6 første timene, etterfulgt av en fase med langsom aktivitetsøkning, som nådde et maksimum etter 24 t inkubering, med en økning i FVIII-kromogen aktivitet til 21,9 IU/ml sammenlignet med 6,0 IU/ml startaktivitet, noe som tilsvarer en aktivitetsøkning på 366 %. Videre inkubering inntil 144 t førte til en langsom og gradvis reduksjon av FVIII-aktiviteten. Som skissert i eksempel 1 og 2 er inkuberingen av PEGylerte proteiner ved høy pH (f.eks. 9,8) et annet alternativ for å utløse PEG-frisetting *in vitro*. Det samme PEG-rFVIII-konjugatet ble derfor inkubert ved pH 9,8 ved 37 °C, og økningen i aktivitet ble sammenlignet med det som ble oppnådd i nærvær av histidin/lysin ved pH 7,3. Figur 6 viser at ved pH 9,8, ble det gjenvunnet mindre FVIII-kromogen aktivitet, med en økning i FVIII-

kromogen aktivitet til 14,8 IU/ml ved tidspunktet 24 t sammenlignet med 4,4 IU/ml startaktivitet. Dette skyldes sannsynligvis forsterket FVIII-inaktivering ved denne høye pH-verdien. Denne konklusjonen ble støttet av lignende nivåer av PEG-frisetting under begge de to betingelsene (tabell 3). Mengden frisatt PEG ble uttrykt som prosentandel fri PEG i forhold til den totale mengden PEG. Det opprinnelige lave innholdet av fri PEG (8 til 13 % = basisverdier) økte etter inkubering i begge buffere på en tidsavhengig måte, og nådde et maksimum på 64 % av total PEG etter 144 t når det gjaldt histidin-/lysinbufferen og 74 % etter 168 t når det gjaldt alkalibufferen (pH 9,8). Disse dataene bekrefter av begge de to betingelsene egner seg til å utløse frisetting av PEG.

Tabell 3. Endringer i fritt PEG-innhold for PEG-rFVIII i nærvær av frie aminer ved nøytral pH og pH 9,8.

Inkubasjonstid (timer)	PEG-rFVIII	
	Fri PEG (% av total PEG)	
	His/lys pH 7,3	pH 9,8
basis	8	13
5 min	18	<i>Nd</i>
2	24	<i>Nd</i>
10	37	<i>Nd</i>
24	45	37
48	51	<i>Nd</i>
72	55	49
96	59	<i>Nd</i>
120	62	<i>Nd</i>
144	64	<i>Nd</i>
168	<i>Nd</i>	74

Dataene i eksempel 6 tyder også på at for pH-følsomme proteiner skal kombinerte frie aminer ved nøytral pH foretrekkes til den tvungne *in vitro*-PEG-frisettingen ettersom gjenvinning av proteinaktivitet er høyere under slike betingelser enn ved en alkalindrevet frisetting.

EKSEMPEL 5 (komparativt eksempel):**IN VITRO-DEPEGYLERING AV FRISSETTBAR PEG-RFVIII I NÆRVÆR AV HEPES/TRIS**

5

Frisettbar PEG-rFVIII (20 k-forgrenet PEG) ble inkubert ved 37 °C i en
 kombinasjon av typisk aminholdige buffersubstanser ved pH 7,4, nemlig 200 mM
 HEPES og 200 mM Tris. Delprøver ble trukket ut til definerte tidspunkt,
 gjenvinning av FVIII-aktivitet ble overvåket ved hjelp av et kromogent assay, og
 dens evne til å interagere med VWF ble bestemt. VWF-binding, som kritisk
 bestemmer overlevelse av FVIII i sirkulasjonen, ble overvåket ved å bruke
 overflateplasmonresonansteknologi. Ved bruk av Biacore-utstyr ble de ulike PEG-
 rFVIII-prøvene injisert i den mobile fasen og testet for vekselvirkning med
 immobilisert VWF. Mens det bare var lave nivåer av PEG-rFVIII bundet til rVWF,
 økte bindingen av prøven med PEG-frisetting. Figur 7 viser den økende
 kromogene FVIII-aktiviteten med tiden, som ble fulgt av en økning i rFVIII-
 bindingen til VWF, noe som er et signal på dePEGylering. Dataene i eksempel 5
 indikerer at et vidt spekter av aminer kan brukes til å tvinge frisetting av PEG fra
 slike konjugater. Gjenvinningen av både kromogen aktivitet og binding til VWF
 viser videre at det funksjonelle proteinet genereres over tid.

EKSEMPEL 6:**STARTNIVÅ FOR ØKNING AV FVIII-AKTIVITET ETTER INKUBERING AV PEG-RFVIII I NÆRVÆR AV FRIE AMINER**

25

Den raske startfasen for PEG-frisetting fra PEG-rFVIII, som er definert i
 eksempel 4 som tidsintervallet fra 0 til 6 t inkubering ved 37 °C, ble analysert
 med hensyn til egnethet som parameter for å undersøke konsekvens fra batch til
 batch. Figur 8 viser økningen i FVIII-aktivitet etter inkubasjon i en buffer med
 100 mM histidin/100 mM lysin ved pH 7,3 ved 37 °C i løpet av de 6 første
 timene.

30

I venstre felt vises seks repeterte målinger av den samme PEG-rFVIII-batchen, og i høyre felt vises gjennomsnittsaktivitetsverdier for to forskjellige batcher av konjugatet. Økningen i FVIII-aktivitet (IU/ml) per time beregnes ved å tilordne kurvene gjennom lineær regresjon, og uttrykkes som hellingen (k'). Tallverdiene for hellingen i de seks testenhetene og de to batchene er oppsummert i tabell 4. I begge tilfeller ble det oppdaget lignende hellinger, og på den måten viste man at assayssystemet gir reproducerbare resultater. Dessuten muliggjør bestemmelse av startnivået for FVIII-aktivitetsøkningen en sammenligning mellom forskjellige batcher i et frisettbart PEG-konjugat.

Tabell 4. Startnivå for økning av FVIII-kromogen aktivitet i en tvungen-PEG-frisettingsreaksjon.

Testenhet	Helling (k')
1	1.48
2	1.58
3	1,42
4	1.65
5	1.19
6	2.01
Batch	Helling (k')
1	1.43
2	1.31

EKSEMPEL 7:

DETEKTERING AV PEG-FRISETTING FRA PEG-RFVIII VED HJELP AV FLUORESCENSMÅLING UTEN SEPARASJON AV ARTER

Frisettbar PEG, som ble økt i FVIII-kromogen aktivitet til 21,9 IU/ml mot 6,0 IU/ml startaktivitet for rFVIII (20 k-forgrenet PEG), formulert i 20 mM citratbuffer, pH = 6,0, inneholdende 32 g mannitol, 12 g sukrose, 2,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ og 100 mg polysorbat 80 per liter, og frysetørket, ble gjenoppbygd til en løsning

inneholdende 360 mg protein (bicinkoninsyreassay) og 345 mg av total PEG. Denne løsningen ble fortynnet 1:5 i en 100 mM natriumbikarbonatløsning, pH = 8,5, inneholdende 32 g mannitol, 12 g sukrose, 2,5 g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 10 mM EDTA og 100 mg polysorbat 80 per liter (99 % oljesyre, Nippon Oils and Fats), og fluorescensspektrene, som viste PEG-FMOC-forbindelsene med en smal topp mellom 350–355 nm, og det frisatte PEG-dibenzofulvenet (PEG-DBF) med en bred topp mellom 460–560 nm, målt på en Perkin Elmer LS50B-spektrofluorimeter (1,25 ml i en 0,4 (eksitasjon) x 1 (emisjon) cm PTFE-stoppet kvartskyvette, 330 nm eksitasjon/340–600 nm emisjonsbølgelengde, 5/5 nm spaltevidde, 180 nm/min skannehastighet, 800 V fotomultipliseringspenning) etter inkubasjon ved 20–25 °C med definerte tidsintervaller (figur 9).

Tabell 5. Oppsummering av kvantitativ analyse av PEG-FVIII- og PEG-derivater etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH 8,5.

PH 8,5	FMOGPEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC		HPLC		330 nm/E460-560 nm		330 nm/E350-355 nm		ELISA		ELISA	
h	µg/ml	% start	µg/ml	% start	Styrke	% start	S350-355	% start	% ref	% start	U/ml	% start
0,0	15,5	100,0	3,7	100,0	457	100,0	727	100,0	112,1	100,0	28,1	100,0
1,7	20,9	134,8	5,6	151,4	468	102,4	624	85,8	80,2	71,5	47,1	167,6
3,4	24,1	155,5	7,8	210,8	514	112,6	583	80,2	81,1	72,3	53,4	190,0
5,2	25,7	165,8	9,5	256,8	561	122,7	558	76,7	71,9	64,1	59	210,0
7,1	27,3	176,1	11,0	297,3	611	133,8	540	74,2	60,8	54,2	69,3	246,6
22,8	33,1	213,5	16,8	454,1	845	185,0	496	68,2	54,7	48,8	86,9	309,3
31,0	35,9	231,6	20,2	545,9	850	186,1	419	57,7	45,9	40,9	96,1	342,0
47,2	40,1	258,7	24,7	667,6	994	217,5	351	48,3	39,7	35,4	116,8	415,7
53,9	41,8	269,7	27,2	735,1	1039	227,5	325	44,7	37,1	33,1	111,9	398,2
71,3	43,7	281,9	29,6	800,0	1201	262,8	322	44,2	31,4	28,0	131,5	468,0
78,4	45,1	291,0	30,7	829,7	1182	258,6	280	38,5	28,0	25,0	146,9	522,8
94,8	54,5	351,6	38,6	1043,2	1288	281,9	286	39,4	30,1	26,9	150,6	535,9

Prøver trukket ut ved disse angitte intervallene fra et separat beholder, ble analysert ved hjelp av HPLC på en Shodex-protein-5µ-kolonne (KW-803 300A, 300 x 8 mm (Showa Denko America, Inc. (New York, NY))), kjørt med 20 mM natriumfosfat , 50 mM natriumsulfat, ved pH 6,1 for fri FMOC-PEG og dibenzofulven-PEG, og ble analysert immunokjemisk ved hjelp av ELISA for PEG-FVIII og fritt FVIII-antigen. Resultater av PEG-FVIII-ELISA er gitt som den målte bindingen i assayet i forhold til bindingen i et nyoppløst standardpreparat.

Fluorescenssignaler ble integrert fra 350–355 nm og fra 460–560 nm (i trinn på 0,5 nm) for henholdsvis PEG-FMOC-konjugater og PEG-dibenzofulven. Dataene er oppsummert i tabell 5.

- 5 Dataene som er presentert i tabell 5, vist som prosent av de opprinnelig målte konsentrasjonene, viser frisettingen av fri benzofulven-PEG, som vist gjennom økningen i fluorescenssignalet ved 460–560 nm, og fritt FVIII-antigen, som målt ved hjelp av ELISA, og ved den tilsvarende reduksjonen av PEG-FMOC-proteinkonjugat, som vist ved fluorescenssignalet på 350–355 nm og de reduserte nivåene av FVIII-bundet PEG som målt ved hjelp av PEG-FVIII ELISA.

EKSEMPEL 8:

SCAVENGING AV PEG-DIBENZOFULVEN MED GLUTATION

- 15 Til bikarbonatløsningen i eksempel 7 ble det tilsatt 10 mM redusert glutation (GSH), og fortynning, inkubering, måling. prøvetaking og analyse ble gjennomført som beskrevet i eksempel 8. Spektrene er vist i figur 10. Etter ca. 24 t virket det som om glutationet i prøvetakingsbeholderen, men ikke i
- 20 fluorescenskyvetten, var blitt uttømt av oksidering (tabell 6).

Tabell 6. Oppsummering av kvantitativ analyse av PEG-FVIII og PEG-derivater etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH 8,5 i nærvær av glutation.

25

pH 8,5 + GSH	FMOC-PEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC		HPLC		330 nm/0460–560 nm		330 nm/0350–355 nm		ELISA		ELISA	
H	µg/ml	% start	µg/ml	% start	Styrke	% start	Styrke	% start	ng/ml	% start	U/ml	% start
0,0	15,3	100,0	2,3	100,0	423	100,0	702	100,0	108,1	100,0	23,7	100,0
1,7	20,0	130,7	2,8	121,7	436	103,2	649	92,5	110,8	102,5	34,7	146,4
3,4	22,8	149,0	3,1	134,8	440	104,1	602	85,8	84,6	78,3	42,8	180,6
5,2	24,8	162,1	3,1	134,8	458	108,2	594	84,7	73,3	67,8	45,7	192,8
7,1	26,0	169,9	3,1	134,8	465	109,9	578	82,4	69,8	64,6	51,1	215,6
22,8	31,4	205,2	3,6	156,5	495	117,0	614	87,4	58,8	54,4	72,9	307,6
31,0	33,5	219,0	5,7	247,8	430	101,6	543	77,3	54,3	50,2	80,1	338,0
47,2	38,4	251,0	11,4	495,7	431	101,9	519	73,9	43,0	39,8	97,4	411,0
53,9	40,1	262,1	13,6	591,3	433	102,4	504	71,8	42,2	39,0	105,1	443,5

pH 8,5 + GSH	FMOC-PEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC		HPLC		330 nm/0460–560 nm		330 nm/0350–355 nm		ELISA		ELISA	
H	µg/ml	% start	µg/ml	% start	Styrke	% start	Styrke	% start	ng/ml	% start	U/ml	% start
71,3	40,3	263,4	14,8	643,5	527	124,6	538	76,7	38,4	35,5	115,8	488,6
78,4	42,0	274,5	16,0	695,7	516	122,0	474	67,5	33,3	30,8	130,5	550,6
94,8	45,5	297,4	18,2	791,3	618	146,2	509	72,5	33,0	30,5	133,3	562,4

Dataene i tabell 6, vist som prosent av de opprinnelig målte konsentrasjonene, viser scavenging av fri dibenzofulven-PEG ved redusert glutation, som vist ved den moderate økningen i det spesifikke fluorescenssignalet ved 460–560 nm (sammenlignet med eksempel 5), og den tilsvarende moderate reduksjonen av konjugerte PEG-FMOC-forbindelser, som vist ved hjelp av fluorescenssignalet på 350–355 nm. Fritt FVIII-antigen genereres, og nivåene av FVIII-bundet PEG minker med en lignende hastighet som i eksempel 5.

EKSEMPEL 9 (komparativt eksempel):

VISNING AV PH-VIRKNINGEN PÅ GENERERING AV PEG-DIBENZOFULVEN

FVIII-løsningen i eksempel 8 ble fortynnet 1:5 med 20 mM citratbuffer, pH = 6,0, inneholdende 32 g mannitol, 12 g sukrose, 2,5 g CaCl₂•2H₂O og 100 mg polysorbat 80 (99 % oljesyre) per liter. Inkubering, måling, prøvetaking og analyse ble utført som beskrevet i eksempel 7. Spektrene er vist i figur 11. Ved pH 6,0 var frisettingen av PEG-dibenzofulven lavere enn ved pH = 8,5 (sammenlign tabell 7 og tabell 5). Dataene tyder på at β-eliminasmekanismen utføres gjennom et angrep av basiske nukleofiler, slik som hydroksidanionet.

Tabell 7. Oppsummering av kvantitativ analyse av PEG-FVIII- og PEG-derivater etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH 8,5.

pH 6,0	FMOC-PEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC		HPLC		330 nm/0460–560 nm		330 nm/0350–355 nm		ELISA		ELISA	
h	µg/ml	% start	µg/ml	% start	Styrke	% start	Styrke	% start	µg/ml	% start	µg/ml	% start
0,0	6,1	100,0	1,7	100,0	440	100,0	692	100,0	172,8	100,0	13,4	100,0
1,7	6,3	103,3	1,8	105,9	408	92,7	674	97,4	155,1	89,8	12,5	93,3
3,4	6,7	109,8	1,9	111,8	417	94,9	663	95,7	149,0	86,2	12,6	94,0

pH 6,0	FMOC-PEG		DBF-PEG		DBF-PEG		FMOC-PEG		PEG-FVIII		FVIII:Ag	
	HPLC		HPLC		330 nm/0460-560 nm		330 nm/0350-355 nm		ELISA		ELISA	
h	µg/ml	% start	µg/ml	% start	Styrke	% start	Styrke	% start	µg/ml	% start	µg/ml	% start
5,2	6,9	113,1	2,0	117,6	417	94,7	653	94,3	142,9	82,7	13,6	101,5
7,1	7,5	123,0	2,1	123,5	425	96,7	652	94,2	165,0	95,5	12,8	95,5
22,8	9,0	147,5	2,7	158,8	491	111,6	682	98,6	155,8	90,2	15,1	112,7
31,0	10,6	173,8	3,2	188,2	469	106,7	643	92,9	153,6	88,9	14,8	110,4
47,2	12,7	208,2	4,0	235,3	461	104,8	618	89,2	171,2	99,1	15,4	114,9
53,9	13,3	218,0	4,4	258,8	480	109,1	625	90,2	207,5	120,1	14,6	109,0
71,3	14,7	241,0	4,8	282,4	552	125,6	661	95,4	193,3	111,9	15,2	113,4
78,4	15,3	250,8	5,1	300,0	528	120,1	614	88,7	219,1	126,8	14,7	109,7
94,8	18,6	304,9	6,4	376,5	595	135,2	697	100,7	209,0	120,9	17	126,9

EKSEMPEL 10 (komparativt eksempel):

IN VITRO-DEPOLYMERISERING AV FRISSETTBAR PSA-RVWF VED ØKT PH

5

Depolymerisering av et frisetbart vannløselig polymerkonjugat, slik som polysialinsyre-(PSA)-rVWF-konjugat, utføres ved å øke pH for proteinkonjugatet. Depolymerisering måles ved å inkubere proteinkonjugatet ved forskjellige pH-verdier, for eksempel ved pH på ca. 6 og ved pH på ca. 8 eller ca. 10. Renset PSA-rVWF ble løst opp i 0,02 M Na-citrat, 0,15 M NaCl med en pH-verdi på ca. 6. Til alkalinprøven justeres den samme bufferen til pH ca. 8 eller ca. 10 gjennom tilsetning av 0,1 M NaOH. Delprøver trekkes ut på definerte tidspunkt og analyseres med hensyn til deres innhold av VWF-antigen (VWF:Ag), fri PSA, total PSA og VWF-sammensetning av multimerer.

15

Innholdet av VWF:Ag bestemmes ved hjelp av en sandwich-ELISA ved å bruke kommersielt tilgjengelige antistoffer (Dako, Glostrup, Danmark). Fri PSA og total PSA bestemmes ved hjelp av høytytelsesvæskerkromatografi (HPLC). VWF-multimeranalysen utføres ved hjelp av horisontal høytytthets SDA-agarosegelelektroforese og immunofarging ved å bruke et polyklonalt anti-humant VWF-antistoff (Dako). Depolymerisering av PSA-rVWF forventes å øke med økende pH.

20

EKSEMPEL 11:

25

IN VITRO-DEPOLYMERISERING AV FRISSETTBAR PSA-RVWF I NÆRVÆR AV PRIMÆRAMINER OG HØY PH

5 Depolymerisering av et frisetbart vannløselig polymerkonjugat, slik som polysialinsyre-(PSA)-rVWF-konjugat, utføres i et annet aspekt ved å øke aminkonsentrasjonen i proteinkonjugatbufferen. Et frisetbart PSA-rVWF-konjugat fortynnes i en buffer av 0,02 M natriumcitrat, 0,15 M NaCl ved en pH på ca. 9,8, inneholdende 100 mM lysin, og inkubert ved 37 °C. Delprøver trekkes ut på definerte tidspunkt og analyseres mht. deres innhold av VWF-antigen (VWF:Ag), fri PSA, total PSA og multimer sammensetning. Multimeranalyse utføres med horisontal høytetthets SDS-agarosegelelektroforese og immunofarging ved å bruke antistoffer enten rettet mot humant VWF (Dako, Glostrup, Danmark) eller PSA (Millipore, Temecula, CA, USA).

10

15 Etter inkubering av PSA-rVWF i nærvær av aminlysin ved pH 9,8 forventes det over tid en økning i forholdet VWF:Ag til protein. Videre forventes det at mesteparten av total PSA blir frisatt etter inkubering i den nevnte bufferen. Etter inkubering forventes det at bare små mengder PSA skal forbli bundet til de enkle VWF-multimerene.

20

EKSEMPEL 12:

IN VITRO-GJENOPPRETTING AV PROTEINAKTIVITET I FRISSETTBAR PSA-RFVIII. I NÆRVÆR AV UTVALGTE FRIE AMINER

25 Proteinaktivitet i en vannløselig polymer konjugert til et protein forventes å øke i nærvær av frie aminer, noe som indikerer frisetting av polymeren etter hvert som aminkonsentrasjonen øker. I dette forsøket fortynnes et frisetbart PSA-rFVIII-konjugat til 5 IU/ml FVIII kromogen aktivitet i en buffer med en pH på 7,3 (10 mM histidin, 90 mM NaCl, 1,7 mM CaCl₂, 10 mM Tris, 0,26 mM glutation, 176 mM mannitol, 23,5 mM trehalose og 0,1 g/l Tween 80); bufferen inneholder i tillegg lysin, histidin eller en kombinasjon av disse to aminosyrene, og bufferen inkuberes ved 37 °C for å tvinge *in vitro*-frisetting av PSA fra proteinkonjugatet.

30

35 Delprøver trekkes ut på definerte tidspunkt (24 t, 48 t og 72 t), og FVIII-kromogen aktivitet ble bestemt online ved bruk av et FVIII-kromogent assay.

FVIII-aktiviteten forventes å øke over tid i en buffer med økt konsentrasjon av lysin, histidin eller en kombinasjon av disse to aminene.

EKSEMPEL 13:

5 **IN VITRO-DEPOLYMERISERING AV FRISSETTBAR PSA-RFIII I NÆRVÆR AV EN KOMBINASJON AV FRIE AMINER**

10 Et frisetbart PSA-rFVIII-konjugat inkuberes i en buffer (20 mM Na₃-citrat, 1,7 mM CaCl₂, 176 mM mannitol, 36 mM sukrose og 0,1 g/l Tween 80) med en pH på 7,3; bufferen inneholder i tillegg 100 mM histidin og 100 mM lysin og inkuberes ved +37 °C. Alternativt økes bufferen til en høy pH (f.eks. 9,8) uten tilsetning av histidin og lysin. Delprøver trekkes ut på definerte tidspunkt inntil 168 t, og den funksjonelle aktiviteten til PSA-rFVIII bestemmes ved bruk av et

15 FVIII- kromogent assay (som beskrevet tidligere). I tillegg bekreftes frisettingen av PSA ved å måle fri PSA og total PSA ved hjelp av HPLC fra frosne delprøver. Slike betingelser forventes å utløse frisetting av PSA fra rFVIII-proteinet *in vitro*.

EKSEMPEL 14 (komparativt eksempel):

20 **IN VITRO-DEPOLYMERISERING AV FRISSETTBAR PSA-RFVIII I NÆRVÆR AV HEPES/TRIS**

25 Tidligere forsøk tyder på at en økning av aminkonsentrasjonen i en buffer tvinger frisetting av en frisetbar vannløselig polymer fra et proteinkonjugat. I dette forsøket inkuberes frisetbar PSA-rFVIII ved 37 °C i en kombinasjon av typiske aminholdige bufferstoffer, nemlig 200 mM HEPES og 200 mM Tris, ved en pH på ca. 7,4. Delprøver trekkes ut til definerte tidspunkt. Gjenopprettingen av FVIII-aktivitet overvåkes ved hjelp av et kromogent assay, og dens evne til å

30 interagere med VWF bestemmes. VWF-binding, som kritisk bestemmer overlevelse av FVIII i sirkulasjonen, overvåkes ved å bruke overflateplasmonresonansteknologi. Ved å bruke et Biacore-system blir ulike PSA-rFVIII-prøver injisert i den mobile fasen og testet for vekselvirkning med immobilisert VWF. VWF-binding forventes å øke med frisetting av PSA. Derfor

35 bør økning av kromogen FVIII-aktivitet følges av en økning i rFVIII-binding til

VWF, noe som er et signal på depolymerisering (fjerning av PSA). Som beskrevet i de tidligere eksemplene forventes det at et bredt spekter av aminer kan brukes til å tvinge frisetting av PSA fra slike konjugater. Økning i kromogen aktivitet og binding til VWF indikerer at funksjonelt protein genereres over tid.

Patentkrav

1. *In vitro*-fremgangsmåte for å frisetten en reversibelt bundet vannløselig polymer fra et protein modifisert av den vannløselige polymeren, eller for å øke aktiviteten i et protein modifisert med en reversibelt bundet vannløselig polymer, omfattende trinnet med å inkubere proteinet under betingelser som er effektive for å frisetten den vannløselige polymeren, hvori betingelsene som er effektive for å frisetten den vannløselige polymeren, omfatter økning av konsentrasjonen av frie aminer i en buffer omfattende proteinet ved å tilsette fritt lysin, histidin eller en kombinasjon derav i bufferen med en konsentrasjon som er effektiv for å frisetten den vannløselige polymeren.

2. Fremgangsmåten ifølge krav 1, hvori betingelsene videre omfatter økning av pH i bufferen som omfatter proteinet, økning av temperaturen i bufferen som omfatter proteinet, eller utvidelse av tidsrommet for inkuberingstrinnet.

3. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori pH i bufferen økes til ca. pH 8,1.

4. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori pH i bufferen økes til ca. pH 9,8.

5. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori temperaturen i bufferen økes fra 4 °C til ca. 37 °C.

6. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori tidsperioden for inkubering utvides til ca. 168 timer.

7. Fremgangsmåten ifølge krav 2, hvori tidsperioden for inkubering utvides til ca. 48 timer.

8. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori proteinet er faktor VIII (FVIII).

9. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori proteinet er von Willebrand-faktor (VWF).

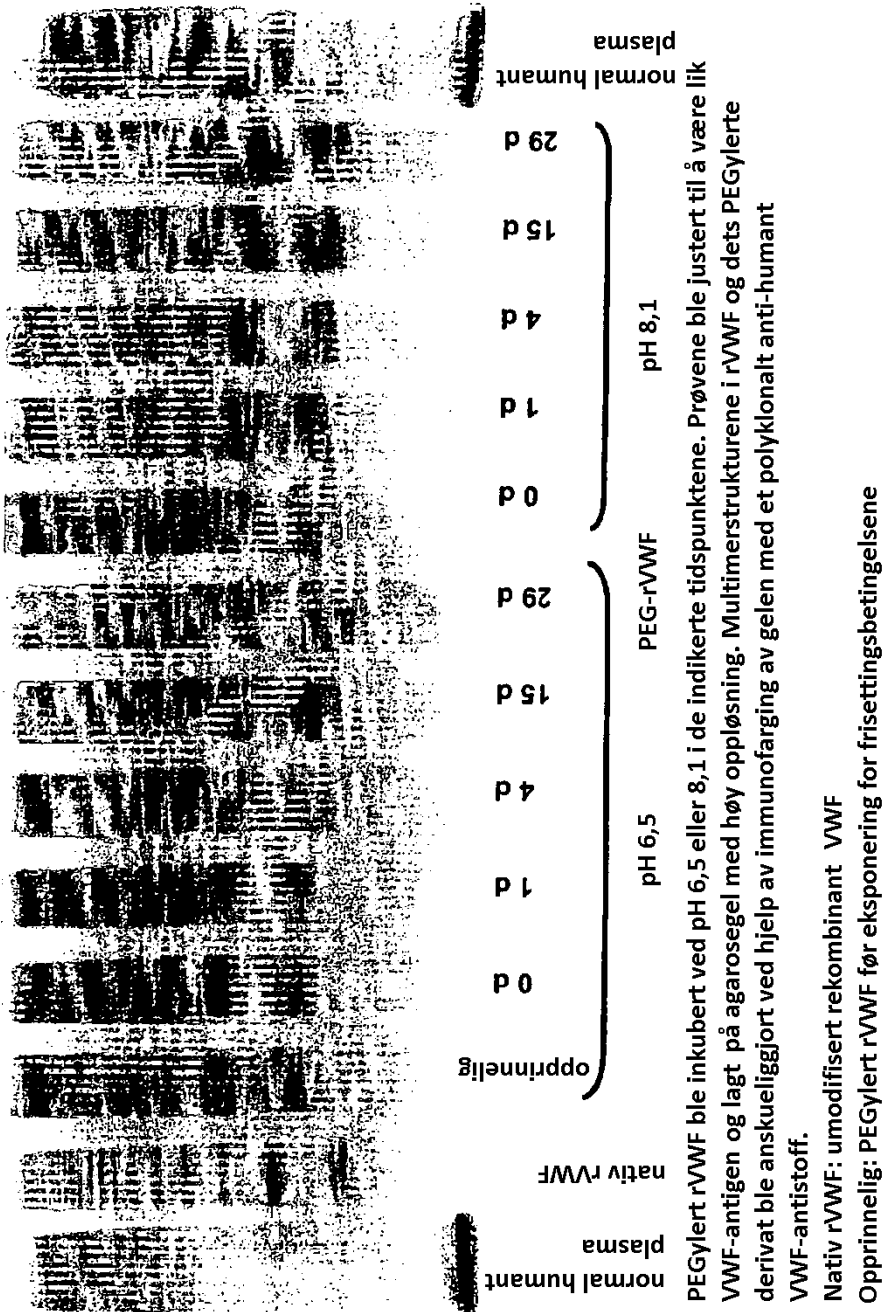
10. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori den vannløselige polymeren er reversibelt bundet til proteinet med 9H-(f)luoren-9-yl(m)et(o)oksy(k)arbonyl, dibenzofulven eller et derivat derav.

11. Fremgangsmåten ifølge krav 10, hvori den vannløselige polymeren er bundet til 9H-(f)luoren-9-yl(m)et(o)ksy(k)arbonyl eller et derivat derav.

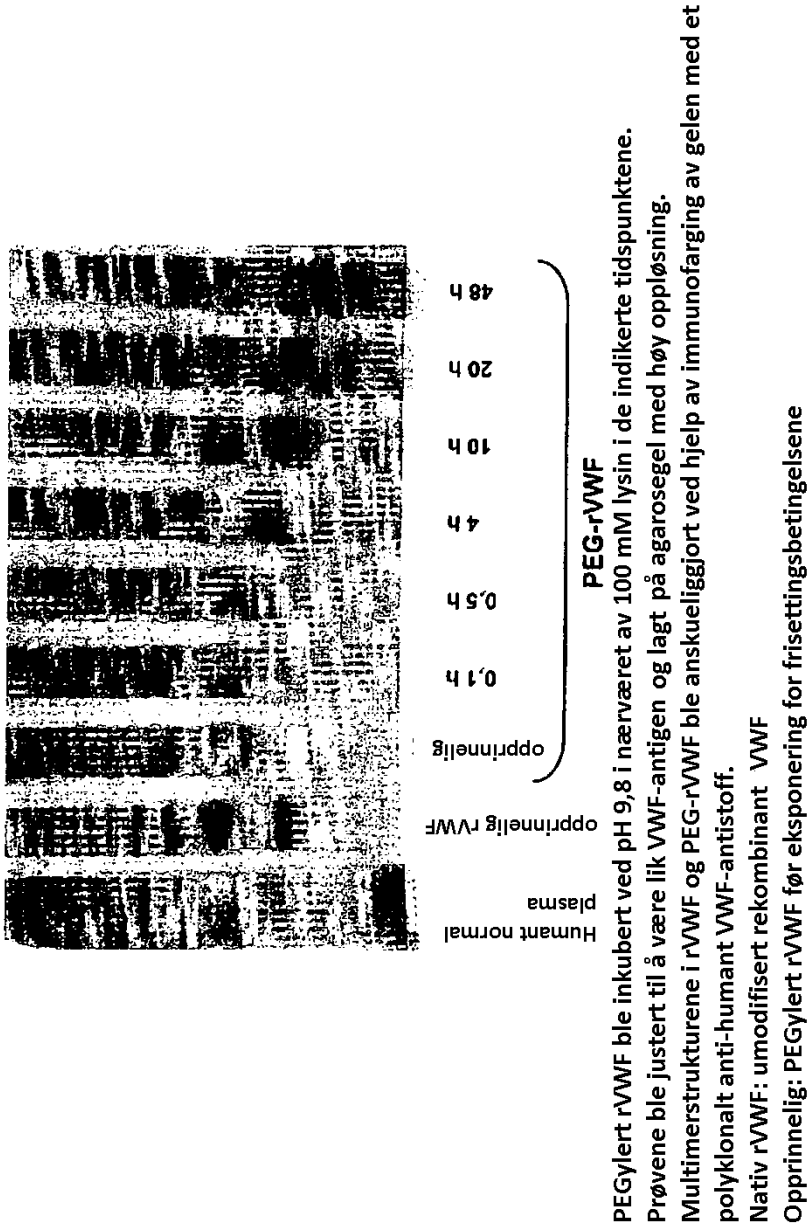
5 **12.** Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori den vannløselige polymeren er polyetylglykol.

13. Fremgangsmåten ifølge krav 1 eller 2, hvori den vannløselige polymeren er polysialinsyre.

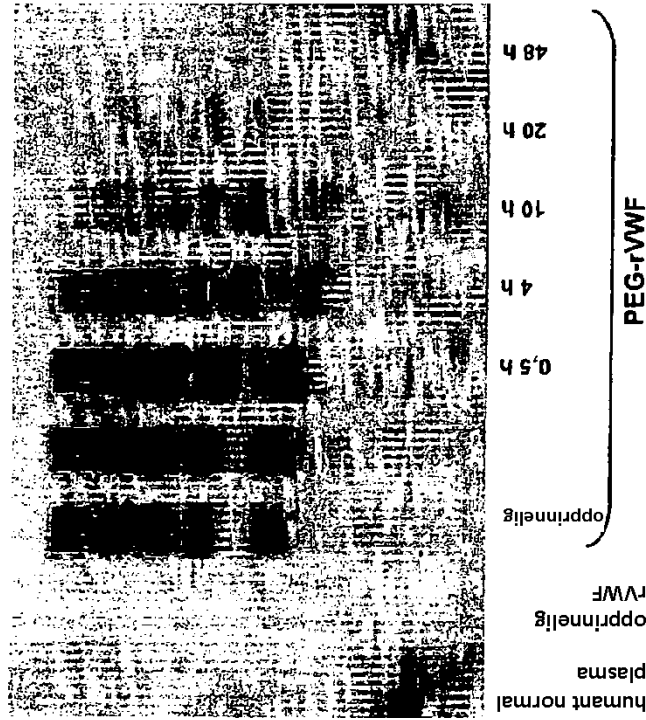
Figur 1: Innvirkning av pH-avhengig PEG-frisetting på multimerstrukturen i PEGylert rVWF



Figur 2: Innvirkning av pH- og aminavhengig PEG-frisetting på multimerstrukturen i PEGylert rVWF



Figur 3: Innvirkning av pH- og aminavhengig PEG-frisetting på multimerstrukturen i PEGylert rVWF

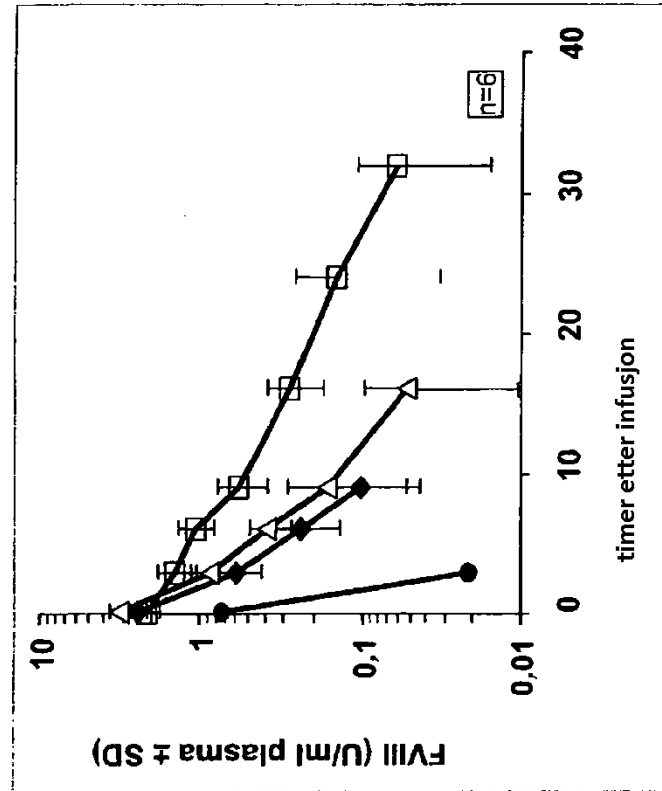


PEGylert rVWF ble inkubert ved pH 9,8 i nærværet av 100 mM lysin i de indikerte tidspunktene. Prøvene ble justert til å være lik protein, påført en agarosegel med høy oppløsning og utsatt for immunblotting ved hjelp av et polyclonalt anti-PEG antistoff. Den gradvise reduksjonen av PEGylerte multimerer er klart synlig.

Nativ rVWF: umodifisert rekombinant VWF

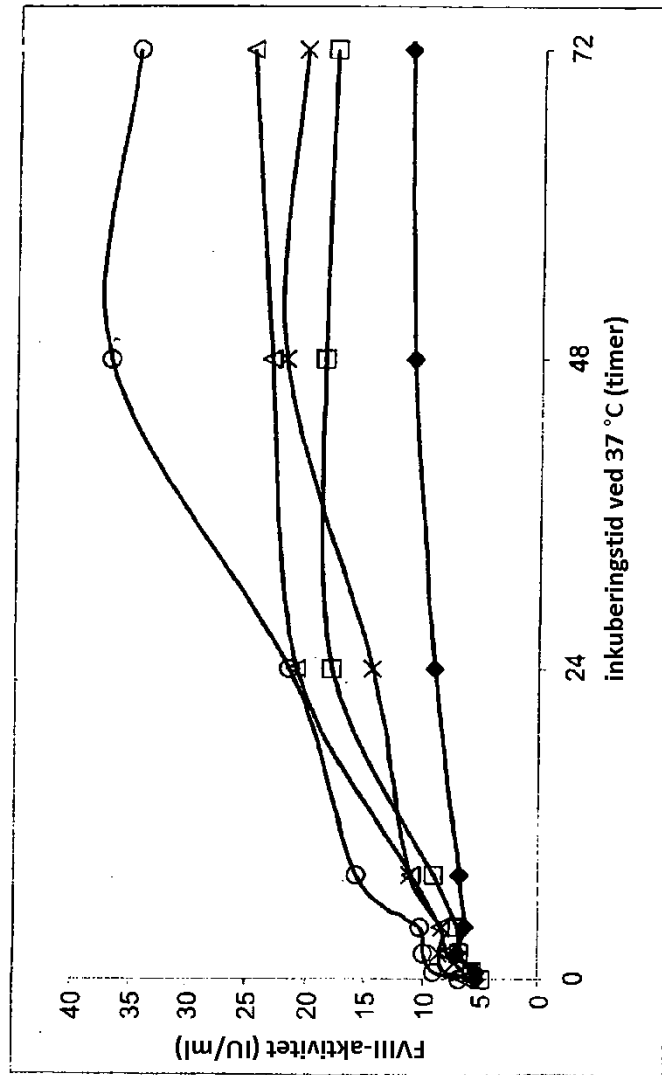
Opprinnelig: PEGylert rVWF før eksponering for frisettingsbetingelsene

Figur 4: Sammenligning mellom in vivo-rFVIII-stabiliseringseffekten for nativ og dePEGylert rVWF i en musemodell med FVIII x VWF-mangel



fylte sirkler: rFVIII 200 IU/kg uten rVWF
 fylte ruter: rFVIII 200 IU/kg og 1,6 mg/ml umodifisert rVWF
 åpne firkanter: rFVIII 200 IU/kg og 1,6 mg/ml frisettbar PEGylert rVWF
 åpne trekanter: rFVIII 200 IU/kg og 1,6 mg/ml in vitro-PEGylert rVWF

Figur 5: Sammenligning mellom økning i rFVIII-kromogen aktivitet etter inkubering av PEG-rFVIII i buffer inneholdende histidin og/eller lysin i forskjellige konsentrasjoner



fylte ruter: PEG-rFVIII inkubert i buffer med fri histidin/lysin, pH 7,3

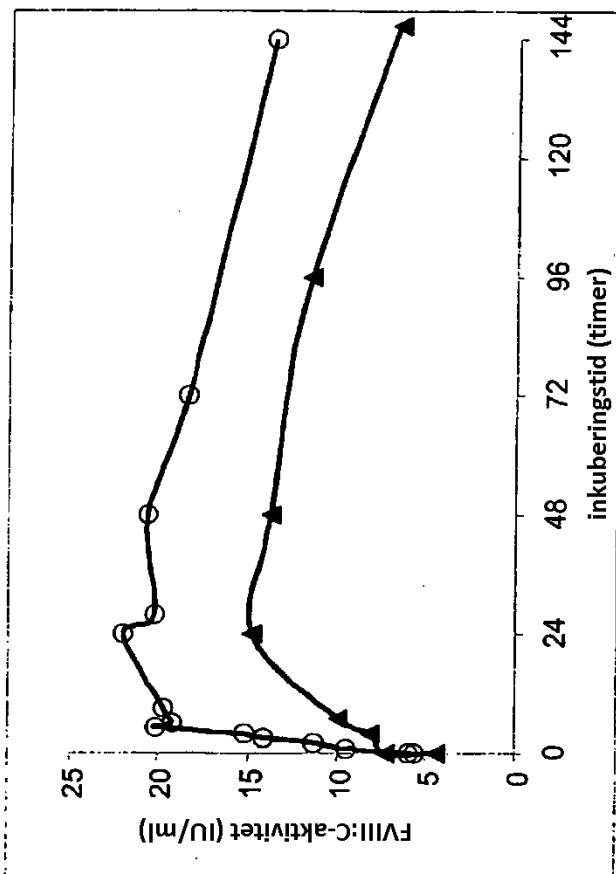
åpne firkanter: PEG-rFVIII inkubert i nærværet av 100 mM histidin, pH 7,3

åpne trekkanter: PEG-rFVIII inkubert i nærværet av 200 mM histidin, pH 7,3

kryss: PEG-rFVIII inkubert i nærværet av 100 mM lysin, pH 7,3

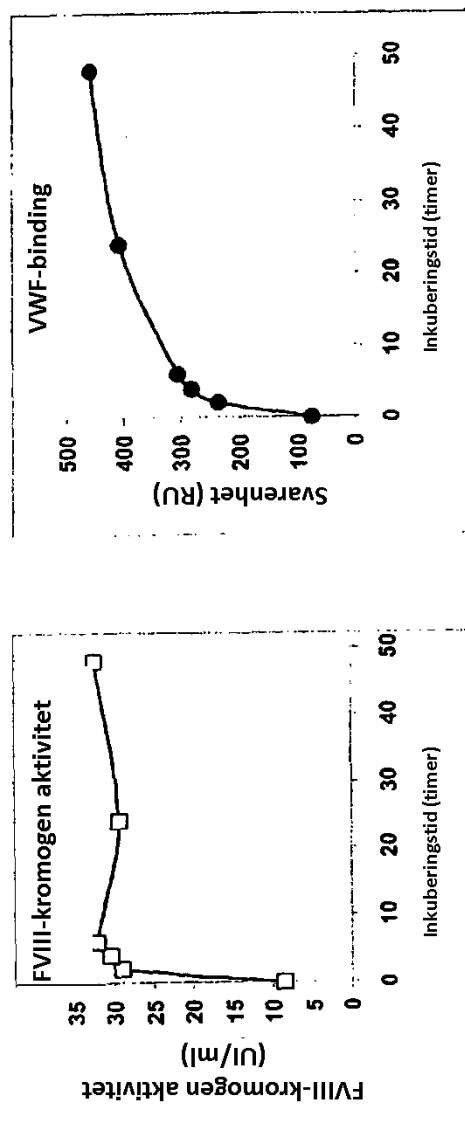
åpne sirkler: PEG-rFVIII inkubert i nærværet av 100 mM lysin og 100 mM histidin, pH 7,3

Figur 6: Sammenligning mellom økning i rFVIII-kromogen aktivitet etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH 9,8 eller i en nøytral pH-buffert inneholdende histidin og lysin



fylte trekkanter: PEG-rFVIII inkubert ved pH 9,8
åpne sirkler: PEG-rFVIII inkubert i nærværet av 100 mM lysin og 100 mM histidin ved pH 7,3

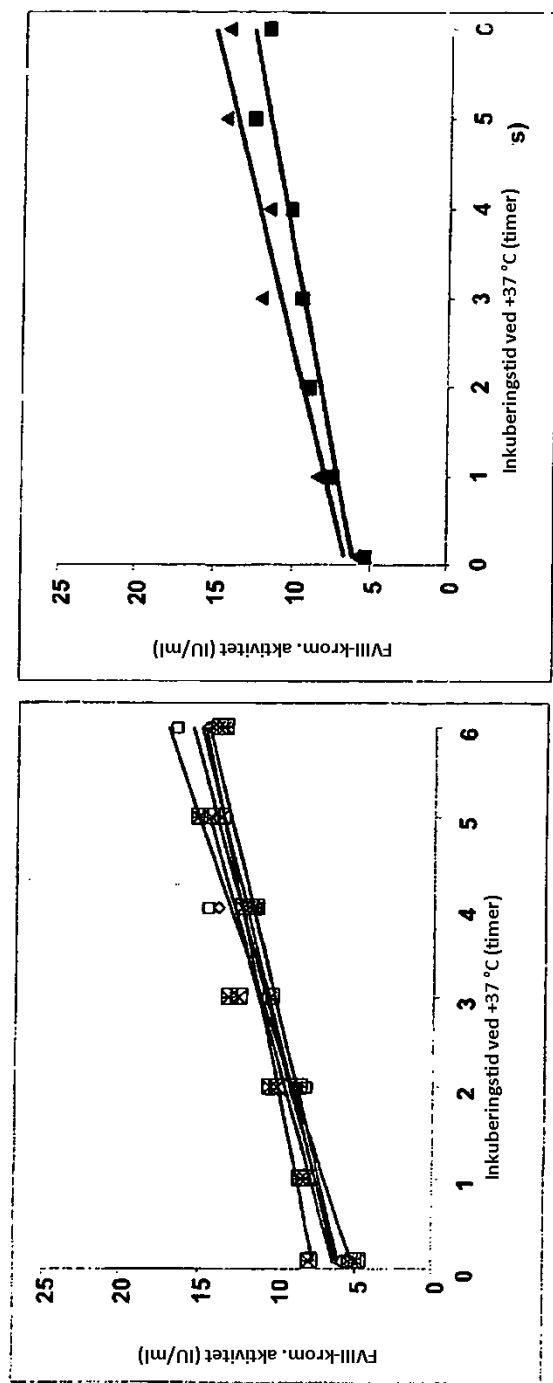
Figur 7: Innvirkning av aminbasert bufferavhengig PEG-frisetting på FVIII-kromogen aktivitet og VWF-bindingsevne for PEG-rFVIII



Venstre side: åpne firkanter: endringer i FVIII-kromogen aktivitet under inkubering i HEPES/Tris-buffer ved nøytral pH (7,4)

Høyre side: fylte sirkler: økt binding av rFVIII til immobilisert vWf under inkubering i HEPES/Tris-buffer ved nøytral pH (7,4)

Figur 8: Reproduserbarhet for in vitro frisettingsassayet og testen for å kontrollere konsekvensen fra batch til batch

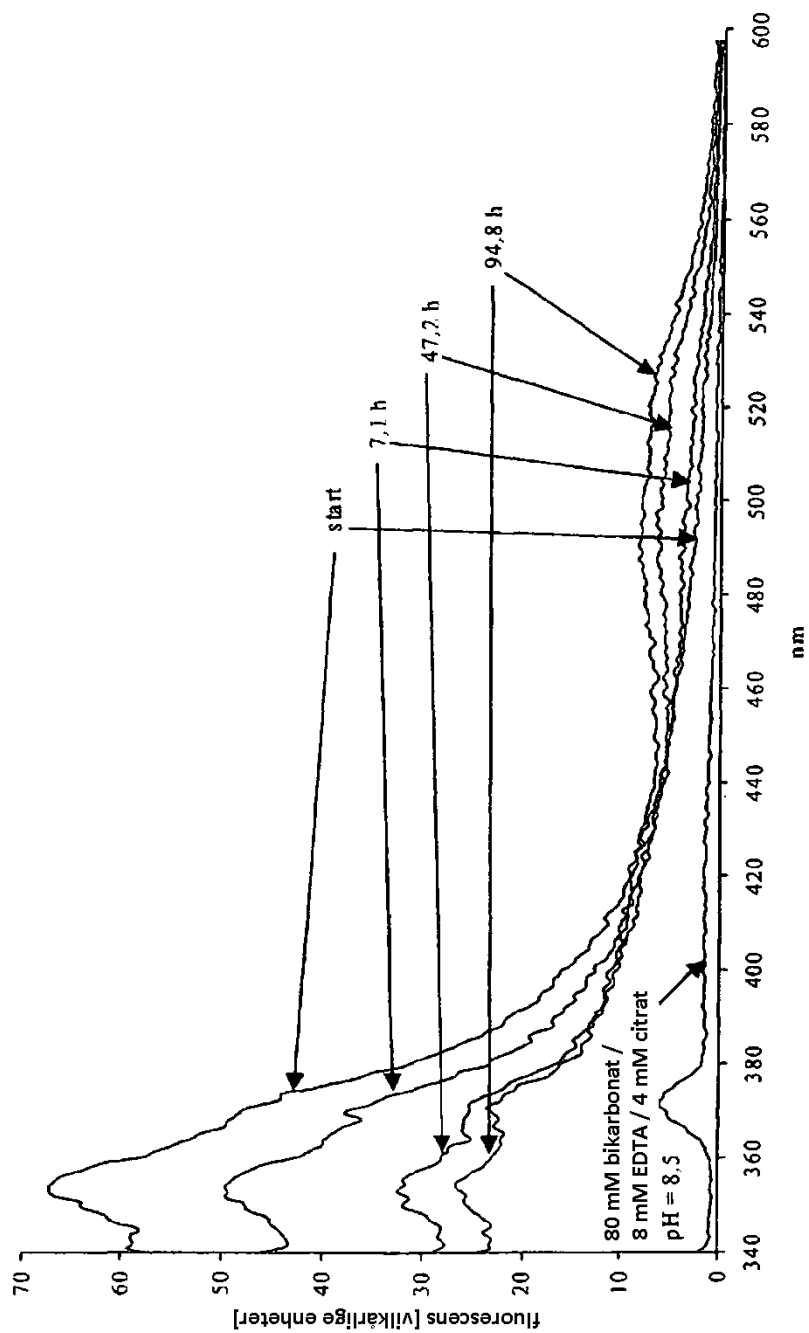


Illustrert i opprinnelige rate i FVIII-kromogen aktivitetsøkning etter inkubering av PEG-rFVIII i nærværet av 100 mM histidin / 100 mM lysin ved pH 7,4.

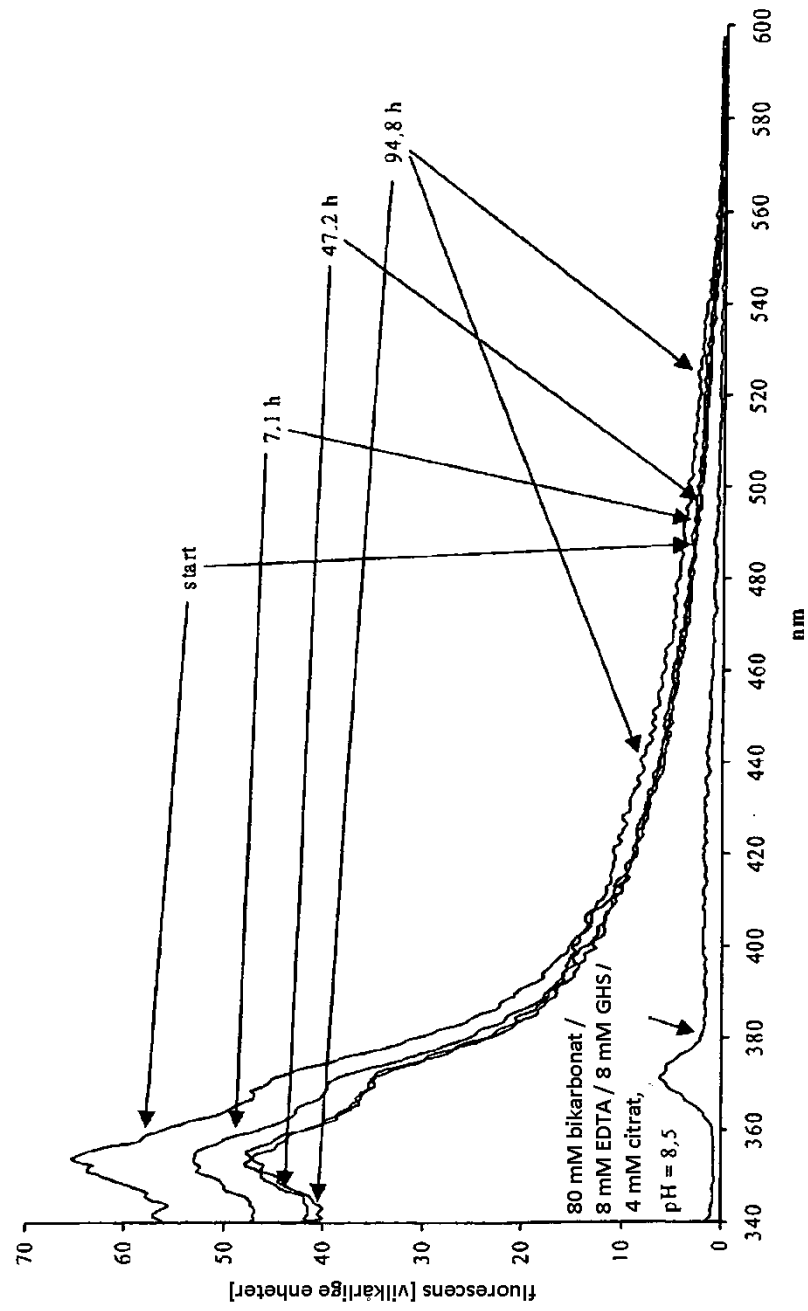
Venstre side: de 6 forskjellige symbolene representerer 6 repeterte målinger av en ankel PEG-rFVIII-batch.

Høyre side: de 2 symbolene representerer to distinkte batcher av PEG-rFVIII.

Figur 9: Flourescensspektrene viser generering av PEG-dibenzofulven (460–560 nm) og den tilhørende nedgangen i fluorescenssignalet for PEG-FMOC-konjugatet (350–355 nm) etter inkubering av PEG-rFVIII ved pH = 8,5



Figur 10: Fluorescensspektrene viser den svake nedgangen i fluorescenssignalet for PEG-FMOC-konjugatet (350–355 nm) uten dannelse av PEG-dibenzofulvenfluorescens etter inkubering av frisetbart pegylert FVIII ved pH = 8,5 i nærværet av redusert glutation.



Figur 11: Fluorescensspektrene viser stabiliteten i fluorescenssignalet for PEG-FMOC-konjugatet (350–355 nm) etter inkubering av frisettable pegylerte FVIII ved pH = 6,0.

