



B.T.

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. **05-96232**

54. TÍTULO Conjugados de Polímero- Porción del
Factor VIII

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL AGIK 42/48
A61P7/00.

71. SOLICITANTE Nektar Therapeutics AL Corporation

DOMICILIO Huntsville, AL, Estados Unidos

74. APODERADO Lilia María Rodríguez D'Alenon

22. BOGOTÁ, D. C., Sept. 15/05

(FORMA P-10)

SS

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

96-09-05

1) SOLICITUD DE:			
☒ Patente de invención		☐ Patente de Modelo de Utilidad	
☒ Capítulo I.		☐ Capítulo II.	
2) SOLICITANTE (71)	Nombre: NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION Dirección: 490 Discovery Drive Huntsville, AL35806, Estados Unidos Nacionalidad o domicilio: Huntsville, AL, Estados Unidos Lugar de constitución: AL, Estados Unidos		IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO Cual _____
	Teléfono: _____ Fax: _____ E. Mail: _____		
3) REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: DILIA MARIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN Dirección: Carrera 11 N°. 86-53 Piso 6 Bogotá D.C. Teléfono: 6181088 Fax: 6350824 E. Mail: info@clarkemodel.com.co		IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT: ☐ C.E. ☐ OTRO ☐ NÚMERO: 41.654.882 TP: 20824 CSJ
4) INVENTOR (ES) (72)	Nombre: 1. BOSSARD, Mary J.; 2. BENTLEY, Michael D. Dirección: 1. 120 Kelvingrove Drive Madison, AL 35758, Estados Unidos; 2. 4017 Nolen Avenue Huntsville, AL35801 Estados Unidos Nacionalidad o Domicilio: Todos los anteriores estadounidenses		
5) PCT (86) Solicitud Internacional No. PCT/US2004/006034 Fecha: Febrero 26, 2004 Publicación Internacional No. WO 2004/075923 A2 Fecha: Sept. 10, 2004			
6) Título (54) CONJUGADOS DE POLÍMERO-PORCIÓN DEL FACTOR VIII			
7) Clasificación Internacional: A61K 47/48			
8) PRIORIDAD		33) País de Origen	(32) Fecha
SI ☒ NO ☐		Estados Unidos	Febrero 26, 2003
			(31) Número de Solicitud 60/450,578
9) Comprobante de pago N°. 05-67,197 Fecha: Septiembre 2, 2005			
Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta página			

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 05096232 00000000 Folios: 221
 Fecha (ACB): 2005-09-22 16:52:49
 Trámite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACI 411 PRESENTAC
 Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 05 - 67,197
 FECHA : SEPTIEMBRE 2 DE 2005

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	43457850	02/09/2005	8,407,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	443,000.00
		TOTAL :	\$ 443,000.00

SON: CUATROCIENTOS CUARENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

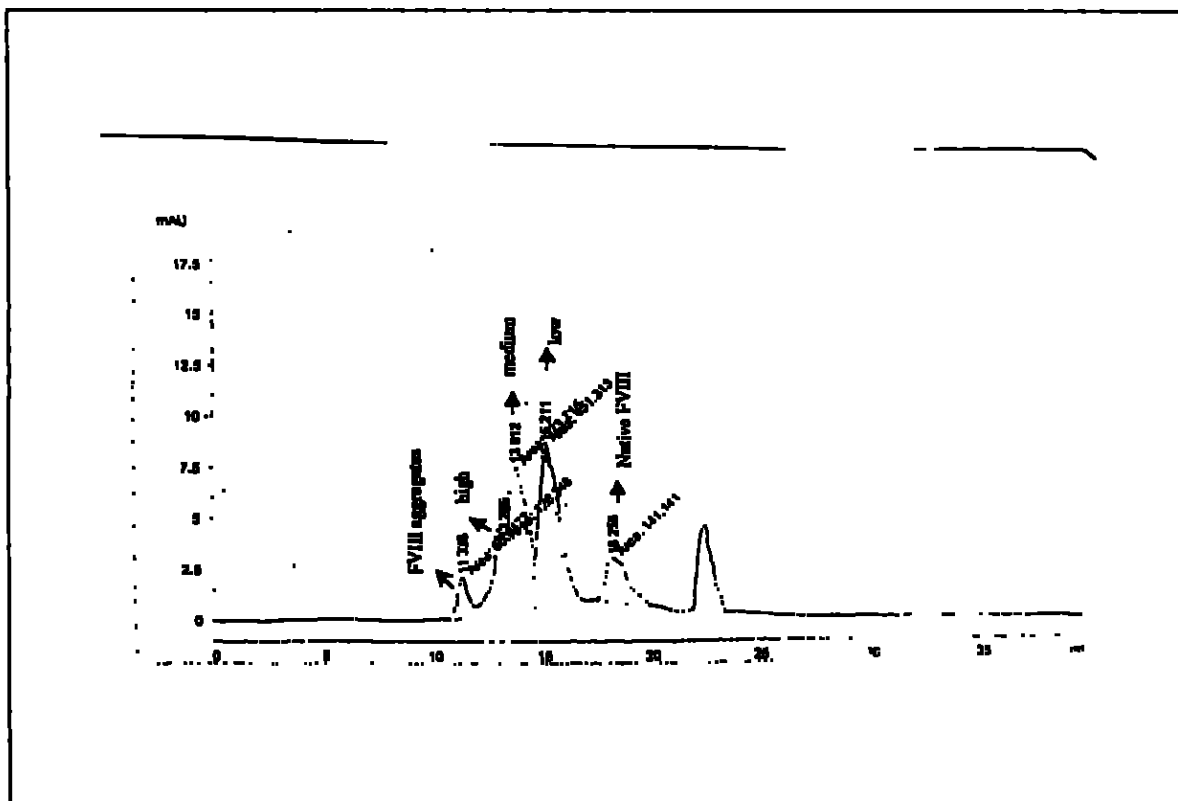
RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

10)

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad
- ☐ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona Jurídica
- ☐ Poderes, si fuera el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos).
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicación, Dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12 y 6 x 6 cm
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros:
 1. Reporte Internacional de búsqueda
 2. Notificación de la transmisión de la copia de la publicación
 3. Notificación de la transmisión del reporte de búsqueda
 4. Reporte de búsqueda
 5. Opinión escrita

11) FIGURA CARACTERÍSTICA:



12) Solicitud concesión de la patente,

NOMBRE: DILIA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: [Signature]

C.C. 41.654.882 de Bogotá TP 20824 CSJ

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario. Ver reverso de esta pagina

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 September 2004 (10.09.2004)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2004/075923 A2

(51) International Patent Classification⁷: **A61K 47/48**

(21) International Application Number:
PCT/US2004/006034

(22) International Filing Date: 26 February 2004 (26.02.2004)

(25) Filing Language: **English**

(26) Publication Language: **English**

(30) Priority Data:
60/450,578 26 February 2003 (26.02.2003) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **NEKTAR THERAPEUTICS AI., CORPORATION [US/US]; 490 Discovery Drive, Huntsville, AL 35806 (US).**

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **BOSSARD, Mary, J. [US/US]; 130 Kelvingrove Drive, Madison, AL 35758 (US). BENTLEY, Michael, D. [US/US]; 4017 Nolen Avenue, Huntsville, AL 35801 (US).**

(74) Agents: **WILSON, Mark, A. et al.; Nektar Therapeutics, 150 Industrial Road, San Carlos, CA 94070 (US).**

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): **AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**

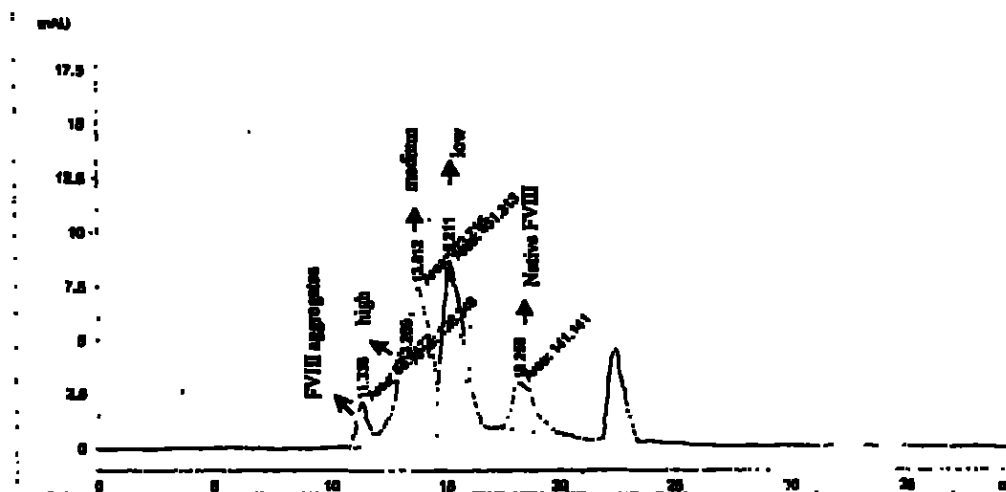
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): **ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

Published:

— without international search report and to be republished upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: **POLYMER-FACTOR VIII MOIETY CONJUGATES**



(57) Abstract: Conjugates of a Factor VIII moiety and one or more water-soluble polymers are provided. Typically, the water-soluble polymer is poly(ethylene glycol) or a derivative thereof. Also provided are compositions comprising the conjugates, methods of making the conjugates, and methods of administering compositions comprising the conjugates to a patient.

WO 2004/075923 A2

6
5

- 1 -

POLYMER-FACTOR VIII MOIETY CONJUGATES

FIELD OF THE INVENTION

[0001] The present invention relates generally to conjugates comprising a Factor VIII moiety (i.e., a moiety having Factor VIII activity) and a polymer.

[0002] In addition, the invention relates to compositions comprising the conjugates, methods for synthesizing the conjugates, and methods for treating patients.

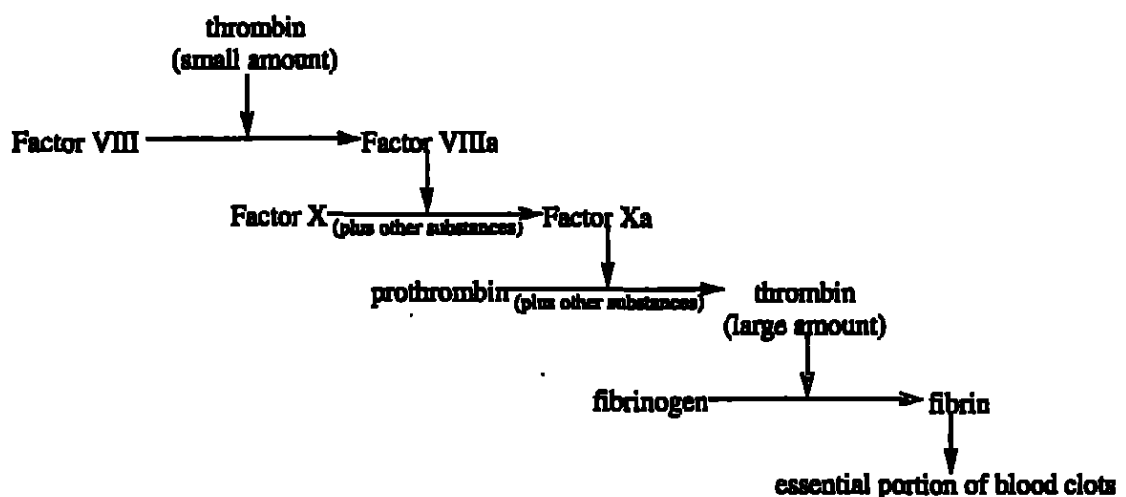
BACKGROUND OF THE INVENTION

[0003] Hemostasis is the process of arresting the outflow of blood from an injured blood vessel. For mammals, as well as many other organisms, the hemostatic process is critically important for continued survival. Defects in the hemostatic process can result in, for example, the inability to effectively form blood clots that serve to stop the loss of blood following vascular injury. In humans, individuals who suffer from an inability to form blood clots are called hemophiliacs. Of particular concern for hemophiliacs is the life-threatening risk that once started, bleeding will never cease.

[0004] Generally, hemophiliacs lack the ability to produce effective amounts of one or more substances required to form blood clots. For example, hemophiliacs who suffer from hemophilia A (also called "classic hemophilia") have an inability to produce effective levels of Factor VIII (also known as "antihemophilia factor A," "antihemophilic globulin," and "AHG"). Factor VIII is a key component of one of several "cascades" of reactions that result in the formation of blood clots. Critical for the cascade of reactions referred to as the "intrinsic pathway," Factor VIII ultimately influences the conversion of fibrinogen into the major component of blood clots, fibrin.

- 2 -

[0005] Although the intrinsic pathway of blood clot formation is relatively complex, the role of Factor VIII can be described briefly. In the presence of relatively small amounts of thrombin (released, for example, by the cells of ruptured tissues), Factor VIII is converted into its activated form known as Factor VIIIa. Factor VIIIa (along with other substances), in turn, activates another factor, Factor X into Factor Xa. Thereafter, Factor Xa (along with other substances) converts prothrombin into thrombin, with the result that a relatively large amount of thrombin is produced over time. Relatively large amounts of thrombin effectively convert fibrinogen into fibrin. Fibrin, in turn, forms the matrix or lattice responsible for the formation of blood clots. Factor VIII's role in the intrinsic pathway of blood clotting is shown schematically below.



[0006] Affecting one or two males for every 10,000 live births in all populations, hemophilia A can result from any one of a variety of mutations of the Factor VIII gene, which is located on the X-chromosome. Depending on the particular mutation, hemophilia A can manifest itself as severe, moderate or mild. Individuals suffering from the severest forms of hemophilia A entirely lack the ability to express active forms of Factor VIII. Clinically, individuals affected with hemophilia A suffer from muscle hemorrhage, joint hemorrhage, easy bruising, and prolonged bleeding from wounds. The mean age of individuals suffering from hemophilia A without treatment is twenty. Current treatment of hemophilia A

- 3 -

involves the infusion of exogenous Factor VIII concentrate collected from human plasma or prepared via recombinant DNA techniques. Because these treatments serve only to supplement the lack of effective levels of Factor VIII, individuals suffering from Factor VIII require regular injections of Factor VIII concentrate throughout their lives.

[0007] Several commercial forms of Factor VIII concentrates are available to provide replacement therapy for patients suffering from hemophilia A. For example, blood-derived Factor VIII concentrate products sold under the Hemofil[®] M (Baxter, Deerfield, IL), Koate[®]-DVI (Bayer, Research Triangle Park, NC), Monarc-M[™] (American Red Cross, Washington, D.C.), and Monoclate-P[®] (Aventis, Bridgewater, NJ) brands. With respect to recombinantly prepared Factor VIII concentrates, commercial products are provided under the Helixate[®] FS (Aventis, Bridgewater, NJ), Kogenate FS[®] (Bayer, Research Triangle Park, NC), Recombinate[®] (Baxter, Deerfield, IL), Advate[®] (Baxter, Deerfield, IL), and ReFacto[®] (Wyeth/Genetics Institute, Cambridge, MA) brands.

[0008] Generally, recombinant sources of Factor VIII concentrates are favored over blood-derived sources since the latter involves the risk of transmitting viruses and/or other diseases associated with blood donation. While recombinant-based formulations avoid these drawbacks, the processing of recombinant-based products often requires the presence of certain proteins such as albumin, which are inevitably present in the final formulation administered to the patient. Often, patients who receive such formulations develop allergic reactions to these foreign proteins. In any event, both blood-derived and recombinant-based products suffer from the disadvantage of repeated administration.

[0009] PEGylation, or the attachment of a poly(ethylene glycol) derivative to a protein, has been described as a means to reduce immunogenicity as well as a means to prolong a protein's *in vivo* half-life. With respect to Factor VIII, however, previous experiences with forming protein-polymer conjugates has proven to be of little predictive value *vis-à-vis* polymer coupling to Factor VIII. See U.S. Patent No. 4,970,300.

[0010] Notwithstanding these difficulties, attempts of preparing satisfactory compositions of conjugates of certain polymers to Factor VIII have been described. For example, previously referenced U.S. Patent No. 4,970,300 describes the PEGylation of Factor VIII using a specific poly(ethylene glycol) derivative having a molecular weight within the range of about 500 to 5,000. In addition, U.S. Patent No. 6,048,720 describes efficient protection against degradation in an *in vitro* environment when four to five monomethoxy poly(ethylene glycol) strands are conjugated to Factor VIII.

[0011] None of these described conjugates, however, has proven to satisfactorily address the problems associated with current Factor VIII-based therapies. For example, conjugates comprised of relatively small polymers (*e.g.*, of about 5,000 Daltons or less) may not suitably provide extended *in vivo* half-life and/or sufficiently reduced immune response. In addition, conjugates having many individual polymers attached to Factor VIII are more likely to have reduced activity as a result of the polymer(s) blocking sites necessary for activity.

[0012] Thus, there remains a need in the art to provide additional conjugates between water-soluble polymers and moieties having Factor VIII activity. The present invention is therefore directed to such conjugates as well as compositions comprising the conjugates and related methods as described herein, which are believed to be new and completely unsuggested by the art.

SUMMARY OF THE INVENTION

[0013] Accordingly, it is a primary object of this invention to provide a composition comprising a plurality of conjugates, preferably although not necessarily, each having one to three water-soluble polymers covalently attached to a Factor VIII moiety, wherein each water-soluble polymer preferably has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5,000 Daltons to about 100,000 Daltons.

[0014] It is another object of the invention to provide such a conjugate wherein each of the water-soluble polymers is a poly(alkylene oxide).

- 5 -

[0015] It is an additional object of the invention to provide such a conjugate wherein each of the water-soluble polymers is a poly(ethylene glycol).

[0016] It is a further object of the invention to provide a conjugate comprising a plurality of monoPEGylated Factor VIII moiety conjugates.

[0017] It is still a further object of the invention to provide a method for preparing polymer conjugates comprising the steps of contacting one or more activated, water-soluble polymers to a Factor VIII moiety under conditions sufficient to result in a plurality of conjugates, preferably although not necessarily, each having one to three water-soluble polymers covalently attached to a Factor VIII moiety, wherein the water-soluble polymer preferably has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5,000 Daltons to about 150,000 Daltons.

[0018] It is an additional object of the invention to provide a method for treating a patient in need of Factor VIII therapy, comprising the step of administering to the patient a composition as described herein, wherein the composition contains a therapeutically effective amount of one or more of the conjugates.

[0019] It is still yet an additional object of the invention to provide a method for preparing a water-soluble polymer-Factor VIII moiety conjugate comprising the step of contacting, under conjugation conditions, a Factor VIII moiety with a polymeric reagent.

[0020] Additional objects, advantages and novel features of the invention will be set forth in the description that follows, and in part, will become apparent to those skilled in the art upon reading the following, or may be learned by practice of the invention.

[0021] In one embodiment then, a composition is provided comprising a plurality of conjugates, preferably although not necessarily, each having one to three water soluble polymers covalently attached to a Factor VIII moiety, wherein each water-soluble polymer preferably has a nominal average molecular weight in

the range of greater than 5,000 Daltons to about 150,000 Daltons. Although any Factor VIII moiety can be used, it is preferred that the compositions comprise Factor VIII *per se* (as described in, for example, U.S. Patent No. 4,757,006), Factor VIIIa (*i.e.*, the activated form of Factor VIII produced when Factor VIII is placed in contact with relatively small amounts of thrombin), Factor VIII:vWF (*i.e.*, Factor VIII bound to von Willebrand Factor), and/or truncated versions of Factor VIII such as B-domain deleted Factor VIII (as described in, for example, U.S. Patent No. 4,868,112).

[0022] The polymer(s) can be any water-soluble polymer and the invention is not limited in this regard. It is preferred, however, that each polymer present in the conjugate is selected from the group consisting of poly(alkylene oxide), poly(vinyl pyrrolidone), poly(vinyl alcohol), polyoxazoline, poly(acryloylmorpholine), and combinations thereof. It is particularly, preferred, however, that a poly(alkylene oxide) such as a poly(ethylene glycol) derivative is used as the polymer in the present invention.

[0023] The conjugates described herein advantageously reduce immunogenicity, a problem encountered by many hemophiliacs treated with exogenous sources of Factor VIII. In addition, the present conjugates require decreased frequency of dosing compared to Factor VIII compositions lacking conjugates. By reducing the frequency of dosing, the conjugates advantageously decrease the number of painful injections hemophiliacs must endure in order to provide sustained levels of an agent having Factor VIII activity.

[0024] In another embodiment, a method for preparing a conjugate is provided. The method comprises the step of contacting one or more activated, water-soluble polymers (*i.e.*, a polymeric reagent) preferably having a nominal average molecular weight in the range of greater than 5,000 Daltons to about 150,000 Daltons to a Factor VIII moiety. Activation of the water-soluble polymer can be accomplished under any art-known method so long as the resulting polymer, under the proper conditions of pH, temperature, and so forth, will form a covalent bond such that the Factor VIII moiety is covalently attached to the polymer.

- 7 -

Contacting of the one or more activated, water-soluble polymers to the Factor VIII moiety is carried out under those conditions required for the activated, water-soluble polymer to form a covalent attachment at the desired site in the moiety. The method results in a plurality of conjugates, preferably although not necessarily, each having one to three water-soluble polymers covalently attached to the Factor VIII moiety. In some instances, the conjugate can comprise a single polymer attached to two, three, four, five, six, seven, eight, or more Factor VIII moieties. Optionally, the resulting composition can be further processed in order to remove undesired species such as, for example, conjugates having an undesired number of polymers. In order to remove such undesired species, purification techniques such as size-exclusion chromatography can be used.

[0025] In still another embodiment of the invention, compositions are provided comprising a conjugate of the invention in combination with a pharmaceutically acceptable excipient. The compositions encompass all types of formulations and in particular those that are suited for injection such as powders that can be reconstituted, as well as liquids (*e.g.*, suspensions and solutions).

[0026] In an additional embodiment of the invention, a method of administering the conjugate is provided. The method of administering comprises the step of administering to the patient a composition as described herein, wherein the composition contains a therapeutically effective amount of the conjugate. Typically, the step of administering the conjugate-containing composition is effected by injection (*e.g.*, intramuscular injection, intravenous injection, subcutaneous injection, and so forth).

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

[0027] FIG. 1 is a SEC plot corresponding to the reaction mixture formed upon pegylation of B-Domain deleted Factor VIII with mPEG-SPA, 30K, as described in Example 6.

[0028] FIG. 2 is a SEC plot corresponding to purified B-Domain Deleted Factor VIII-PEG conjugate prepared by conjugating the protein to mPEG-SPA, 30K, as described in Example 6.

[0029] FIG. 3 is SEC plot corresponding to the reaction mixture formed upon PEGylation of B-Domain deleted Factor VIII with mPEG-MAL, 20K, as described in Example 7. As can be seen, the yield of monoPEGylated product was approximately 33%.

[0030] FIG. 4 is a SEC plot corresponding to purified B-Domain Deleted Factor VIII-PEG conjugate prepared by conjugating the protein to mPEG-MAL, 20K, as described in Example 7. The purified conjugate was ~94% PEG monomer.

[0031] FIG. 5 is a SEC plot corresponding to the reaction mixture formed upon PEGylation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-SMB, 30K, as described in Example 8. The yield of monoPEGylated protein (1-mer) was approximately 41%.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

[0032] Before describing the present invention in detail, it is to be understood that this invention is not limited to the particular polymers, synthetic techniques, Factor VIII moieties, and the like, as such may vary.

[0033] It must be noted that, as used in this specification and the intended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include plural referents unless the context clearly dictates otherwise. Thus, for example, reference to "a polymer" includes a single polymer as well as two or more of the same or different polymers, reference to a "an optional excipient" refers to a single optional excipient as well as two or more of the same or different optional excipients, and the like.

[0034] In describing and claiming the present invention, the following terminology will be used in accordance with the definitions described below.

a

- 9 -

[0035] "PEG," "polyethylene glycol" and "poly(ethylene glycol)" as used herein, are interchangeable and meant to encompass any water-soluble poly(ethylene oxide). Typically, PEGs for use in accordance with the invention comprise the following structure $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$ where (n) is 2 to 4000. As used herein, PEG also includes $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ and $-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n\text{O}-$, depending upon whether or not the terminal oxygens have been displaced. Throughout the specification and claims, it should be remembered that the term "PEG" includes structures having various terminal or "end capping" groups and so forth. The term "PEG" also means a polymer that contains a majority, that is to say, greater than 50%, of $-\text{OCH}_2\text{CH}_2-$ repeating subunits. With respect to specific forms, the PEG can take any number of a variety of molecular weights, as well as structures or geometries such as "branched," "linear," "forked," "multifunctional," and the like, to be described in greater detail below.

[0036] The terms "end-capped" and "terminally capped" are interchangeably used herein to refer to a terminal or endpoint of a polymer having an end-capping moiety. Typically, although not necessarily, the end-capping moiety comprises a hydroxy or C_{1-20} alkoxy group, more preferably a C_{1-10} alkoxy group, and still more preferably a C_{1-5} alkoxy group. Thus, examples of end-capping moieties include alkoxy (e.g., methoxy, ethoxy and benzyloxy), as well as aryl, heteroaryl, cyclo, heterocyclo, and the like. It must be remembered that the end-capping moiety may include one or more atoms of the terminal monomer in the polymer [e.g., the end-capping moiety "methoxy" in $\text{CH}_3(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-$]. In addition, saturated, unsaturated, substituted and unsubstituted forms of each of the foregoing are envisioned. Moreover, the end-capping group can also be a silane. The end-capping group can also advantageously comprise a detectable label. When the polymer has an end-capping group comprising a detectable label, the amount or location of the polymer and/or the moiety (e.g., active agent) to which the polymer is coupled can be determined by using a suitable detector. Such labels include, without limitation, fluorescers, chemiluminescers, moieties used in enzyme labeling, colorimetric (e.g., dyes), metal ions, radioactive moieties, and the like. Suitable detectors include photometers, films, spectrometers, and the like. The

end-capping group can also advantageously comprise a phospholipid. When the polymer has an end-capping group comprising a phospholipid, unique properties are imparted to the polymer and the resulting conjugate. Exemplary phospholipids include, without limitation, those selected from the class of phospholipids called phosphatidylcholines. Specific phospholipids include, without limitation, those selected from the group consisting of dilauroylphosphatidylcholine, dioleoylphosphatidylcholine, dipalmitoylphosphatidylcholine, disteoylphosphatidylcholine, behenoylphosphatidylcholine, arachidoylphosphatidylcholine, and lecithin.

[0037] "Non-naturally occurring" with respect to a polymer as described herein, means a polymer that in its entirety is not found in nature. A non-naturally occurring polymer of the invention may, however, contain one or more monomers or segments of monomers that are naturally occurring, so long as the overall polymer structure is not found in nature.

[0038] The term "water soluble" as in a "water-soluble polymer" polymer is any polymer that is soluble in water at room temperature. Typically, a water-soluble polymer will transmit at least about 75%, more preferably at least about 95%, of light transmitted by the same solution after filtering. On a weight basis, a water-soluble polymer will preferably be at least about 35% (by weight) soluble in water, more preferably at least about 50% (by weight) soluble in water, still more preferably about 70% (by weight) soluble in water, and still more preferably about 85% (by weight) soluble in water. It is most preferred, however, that the water-soluble polymer is about 95% (by weight) soluble in water or completely soluble in water.

[0039] "Nominal average molecular weight" in the context of a water-soluble, non-naturally occurring polymer such as PEG, refers to the mass average molecular weight of the polymer, typically determined by size-exclusion chromatography, MALDI (matrix assisted laser desorption/ionization), light scattering techniques, or intrinsic viscosity determination in 1,2,4-trichlorobenzene. The polymers are typically polydisperse, possessing low polydispersity values of

- 11 -

preferably less than about 1.2, more preferably less than about 1.15, still more preferably less than about 1.10, yet still more preferably less than about 1.05, and most preferably less than about 1.03.

[0040] The term "active" or "activated" when used in conjunction with a particular functional group, refers to a reactive functional group that reacts readily with an electrophile or a nucleophile on another molecule. This is in contrast to those groups that require strong catalysts or highly impractical reaction conditions in order to react (*i.e.*, a "non-reactive" or "inert" group).

[0041] As used herein, the term "functional group" or any synonym thereof is meant to encompass protected forms thereof as well as unprotected forms.

[0042] The terms "linkage" or "linker" are used herein to refer to an atom or a collection of atoms optionally used to link interconnecting moieties such as a terminus of a polymer segment and a Factor VIII moiety or an electrophile or nucleophile of a Factor VIII moiety. The linker of the invention may be hydrolytically stable or may include a physiologically hydrolyzable or enzymatically degradable linkage.

[0043] "Alkyl" refers to a hydrocarbon chain, typically ranging from about 1 to 15 atoms in length. Such hydrocarbon chains are preferably but not necessarily saturated and may be branched or straight chain, although typically straight chain is preferred. Exemplary alkyl groups include methyl, ethyl, propyl, butyl, pentyl, 1-methylbutyl, 1-ethylpropyl, 3-methylpentyl, and the like. As used herein, "alkyl" includes cycloalkyl as well as cycloalkylene-containing alkyl.

[0044] "Lower alkyl" refers to an alkyl group containing from 1 to 6 carbon atoms, and may be straight chain or branched, as exemplified by methyl, ethyl, *n*-butyl, *i*-butyl, and *t*-butyl.

[0045] "Cycloalkyl" refers to a saturated or unsaturated cyclic hydrocarbon chain, including bridged, fused, or spiro cyclic compounds, preferably made up of 3 to about 12 carbon atoms, more preferably 3 to about 8 carbon atoms.

"Cycloalkylene" refers to a cycloalkyl group that is inserted into an alkyl chain by bonding of the chain at any two carbons in the cyclic ring system.

[0046] "Alkoxy" refers to an -O-R group, wherein R is alkyl or substituted alkyl, preferably C₁₋₆ alkyl (*e.g.*, methoxy, ethoxy, propyloxy, and so forth).

[0047] The term "substituted" as in, for example, "substituted alkyl," refers to a moiety (*e.g.*, an alkyl group) substituted with one or more noninterfering substituents, such as, but not limited to: alkyl, C₃₋₈ cycloalkyl, *e.g.*, cyclopropyl, cyclobutyl, and the like; halo, *e.g.*, fluoro, chloro, bromo, and iodo; cyano; alkoxy, lower phenyl; substituted phenyl; and the like. "Substituted aryl" is aryl having one or more noninterfering groups as a substituent. For substitutions on a phenyl ring, the substituents may be in any orientation (*i.e.*, ortho, meta, or para).

[0048] "Noninterfering substituents" are those groups that, when present in a molecule, are typically nonreactive with other functional groups contained within the molecule.

[0049] "Aryl" means one or more aromatic rings, each of 5 or 6 core carbon atoms. Aryl includes multiple aryl rings that may be fused, as in naphthyl or unfused, as in biphenyl. Aryl rings may also be fused or unfused with one or more cyclic hydrocarbon, heteroaryl, or heterocyclic rings. As used herein, "aryl" includes heteroaryl.

[0050] "Heteroaryl" is an aryl group containing from one to four heteroatoms, preferably sulfur, oxygen, or nitrogen, or a combination thereof. Heteroaryl rings may also be fused with one or more cyclic hydrocarbon, heterocyclic, aryl, or heteroaryl rings.

[0051] "Heterocycle" or "heterocyclic" means one or more rings of 5-12 atoms, preferably 5-7 atoms, with or without unsaturation or aromatic character and having at least one ring atom that is not a carbon. Preferred heteroatoms include sulfur, oxygen, and nitrogen.

[0052] "Substituted heteroaryl" is heteroaryl having one or more noninterfering groups as substituents.

[0053] "Substituted heterocycle" is a heterocycle having one or more side chains formed from noninterfering substituents.

[0054] "Electrophile" and "electrophilic group" refer to an ion or atom or collection of atoms, that may be ionic, having an electrophilic center, *i.e.*, a center that is electron seeking, capable of reacting with a nucleophile.

[0055] "Nucleophile" and "nucleophilic group" refers to an ion or atom or collection of atoms that may be ionic having a nucleophilic center, *i.e.*, a center that is seeking an electrophilic center or with an electrophile.

[0056] A "physiologically cleavable" or "hydrolysable" or "degradable" bond is a bond that reacts with water (*i.e.*, is hydrolyzed) under physiological conditions. Preferred are bonds that have a hydrolysis half-life at pH 8, 25 °C of less than about 30 minutes. The tendency of a bond to hydrolyze in water will depend not only on the general type of linkage connecting two central atoms but also on the substituents attached to these central atoms. Appropriate hydrolytically unstable or weak linkages include but are not limited to carboxylate ester, phosphate ester, anhydrides, acetals, ketals, acyloxyalkyl ether, imines, orthoesters, peptides and oligonucleotides.

[0057] An "enzymatically degradable linkage" means a linkage that is subject to degradation by one or more enzymes.

[0058] A "hydrolytically stable" linkage or bond refers to a chemical bond, typically a covalent bond, that is substantially stable in water, that is to say, does not undergo hydrolysis under physiological conditions to any appreciable extent over an extended period of time. Examples of hydrolytically stable linkages include, but are not limited to, the following: carbon-carbon bonds (*e.g.*, in aliphatic chains), ethers, amides, urethanes, and the like. Generally, a hydrolytically stable linkage is one that exhibits a rate of hydrolysis of less than about 1-2% per day under physiological conditions. Hydrolysis rates of representative chemical bonds can be found in most standard chemistry textbooks.

[0059] "Pharmaceutically acceptable excipient or carrier" refers to an excipient that may optionally be included in the compositions of the invention and that causes no significant adverse toxicological effects to the patient.

"Pharmacologically effective amount," "physiologically effective amount," and "therapeutically effective amount" are used interchangeably herein to mean the amount of a polymer-Factor VIII moiety conjugate that is needed to provide a desired level of the conjugate (or corresponding unconjugated Factor VIII moiety) in the bloodstream or in the target tissue. The precise amount will depend upon numerous factors, *e.g.*, the particular Factor VIII moiety, the components and physical characteristics of the therapeutic composition, intended patient population, individual patient considerations, and the like, and can readily be determined by one skilled in the art, based upon the information provided herein.

[0060] "Multi-functional" means a polymer having 3 or more functional groups contained therein, where the functional groups may be the same or different. Multi-functional polymeric reagents of the invention will typically contain from about 3-100 functional groups, or from 3-50 functional groups, or from 3-25 functional groups, or from 3-15 functional groups, or from 3 to 10 functional groups, or will contain 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or 10 functional groups within the polymer backbone.

[0061] The term "Factor VIII moiety," as used herein, refers to a moiety having Factor VIII activity. The Factor VIII moiety will also have at least one electrophilic group or nucleophilic group suitable for reaction with a polymeric reagent. Typically, although not necessarily, the Factor VIII moiety is a protein. In addition, the term "Factor VIII moiety" encompasses both the Factor VIII moiety prior to conjugation as well as the Factor VIII moiety residue following conjugation. As will be explained in further detail below, one of ordinary skill in the art can determine whether any given moiety has Factor VIII activity.

[0062] The term "patient," refers to a living organism suffering from or prone to a condition that can be prevented or treated by administration of an active agent (*e.g.*, conjugate), and includes both humans and animals.

[0063] "Optional" or "optionally" means that the subsequently described circumstance may or may not occur, so that the description includes instances where the circumstance occurs and instances where it does not.

[0064] Amino acid residues in peptides are abbreviated as follows: Phenylalanine is Phe or F; Leucine is Leu or L; Isoleucine is Ile or I; Methionine is Met or M; Valine is Val or V; Serine is Ser or S; Proline is Pro or P; Threonine is Thr or T; Alanine is Ala or A; Tyrosine is Tyr or Y; Histidine is His or H; Glutamine is Gln or Q; Asparagine is Asn or N; Lysine is Lys or K; Aspartic Acid is Asp or D; Glutamic Acid is Glu or E; Cysteine is Cys or C; Tryptophan is Trp or W; Arginine is Arg or R; and Glycine is Gly or G.

[0065] Turning to a first embodiment of the invention then, a composition is provided comprising a plurality of conjugates, preferably although not necessarily, each having one to three water-soluble polymers covalently attached to a Factor VIII moiety, wherein each of the water-soluble polymers preferably has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5,000 Daltons to about 150,000 Daltons.

[0066] Native Factor VIII is a 2,351 amino acid, single chain glycoprotein that is structurally organized as A1-A2-B-A3-C1-C2. The expressed 2,351 amino acid sequence is provided as SEQ. ID. NO: 1. When the expressed polypeptide is translocated into the lumen of the endoplasmic reticulum, however, a 19-amino acid signal sequence is cleaved, resulting in a second sequence. This second sequence, herein provided as SEQ. ID. NO: 2, lacks the leading 19 amino acids is conventionally used by researchers to assign a numeric location (e.g., Arg³⁷²) to a given amino acid residue of Factor VIII. Thus, unless specifically noted, all assignments of a numeric location of an amino acid residue as provided herein are based on SEQ. ID. NO: 2.

[0067] In the presence of relatively small amounts of thrombin, Factor VIII is cleaved by thrombin at Arg³⁷², Arg⁷⁴⁰, and Arg¹⁶⁸⁹ to produce Factor VIIIa. Factor VIIIa is a heterotrimer comprised of the A1 subunit bound (via a copper ion) to the thrombin-cleaved light chain A3-C1-C2 and the free A2 subunit bound via

ionic interactions to A1. It will be appreciated that a Factor VIII moiety is not limited to merely "active" forms of Factor VIII (e.g., Factor VIIIa) and that the term "Factor VIII moiety" encompasses "precursor" forms as well as other substances that having a similar procoagulant effect .

[0068] For any given moiety, it is possible to determine whether that moiety has Factor VIII activity. For example, several animal lines have been intentionally bred with the genetic mutation for hemophilia such that an animal produced from such a line has very low and insufficient levels of Factor VIII. Such lines are available from a variety of sources such as, without limitation, the Division of Laboratories and Research, New York Department of Public Health, Albany, NY and the Department of Pathology, University of North Carolina, Chapel Hill, NC. Both of these sources, for example, provide canines suffering from canine hemophilia A. In order to test the Factor VIII activity of any given moiety in question, the moiety is injected into the diseased animal, a small cut made and bleeding time compared to a healthy control. Another method useful for determining Factor VIII activity is to determine cofactor and procoagulant activity. See, for example, Mertens *et al.* (1993) *Brit. J. Haematol.* 85:133-42. Other methods known to those of ordinary skill in the art can also be used to determine whether a given moiety has Factor VIII activity. Such methods are useful for determining the Factor VIII activity of both the moiety itself (and therefore can be used as a "Factor VIII moiety) as well as the corresponding polymer-moiety conjugate.

[0069] Nonlimiting examples of Factor VIII moieties include the following: Factor VIII; Factor VIIIa; Factor VIII:C; Factor VIII:vWF; B-domain deleted Factor VIII (and other truncated versions of Factor VIII); hybrid proteins, such as those described in U.S. Patent No. 6,158,888; glycosylated proteins having Factor VIII activity, such as those described in U.S. Patent Application Publication No. US2003/0077752; and peptide mimetics having Factor VIII activity. Preferred truncated Factor VIII versions (encompassed by the term "B-domain deleted Factor VIII) corresponds to a protein having the amino acid sequence of human Factor VIII

3

- 17 -

(SEQ. ID. NO. 1) having a deletion corresponding to at least 581 amino acids within the region between Arg⁷⁵⁹ and Ser¹⁷⁰⁹, more preferably wherein the deletion corresponds to one of the region between Pro¹⁰⁰⁰ and Asp¹⁵⁸², the region between Thr⁷⁷⁸ and Pro¹⁶³⁹, and the region between Thr⁷⁷⁸ and Glu¹⁶⁹⁴. Biologically active fragments, deletion variants, substitution variants or addition variants of any of the foregoing that maintain at least some degree of Factor VIII activity can also serve as a Factor VIII moiety.

[0070] The moiety having Factor VIII activity can advantageously be modified to include one or more amino acid residues such as, for example, lysine, cysteine and/or arginine, in order to provide facile attachment of the polymer to an atom within the side chain of the amino acid. Techniques for adding amino acid residues are well known to those of ordinary skill in the art. Reference is made to J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992).

[0071] The Factor VIII moiety can be obtained from blood-derived sources. For example, Factor VIII can be fractionated from human plasma using precipitation and centrifugation techniques known to those of ordinary skill in the art. See, for example, Wickerhauser (1976) *Transfusion* 16(4):345-350 and Slichter *et al.* (1976) *Transfusion* 16(6):616-626. Factor VIII can also be isolated from human granulocytes. See Szmitkoski *et al.* (1977) *Haematologia (Budap.)* 11(1-2):177-187.

[0072] In addition, the Factor VIII moiety can also be obtained from recombinant methods. Briefly, recombinant methods involve constructing the nucleic acid encoding the desired polypeptide or fragment, cloning the nucleic acid into an expression vector, transforming a host cell (*e.g.*, bacteria, yeast, or mammalian cell such as Chinese hamster ovary cell or baby hamster kidney cell), and expressing the nucleic acid to produce the desired polypeptide or fragment. Methods for producing and expressing recombinant polypeptides *in vitro* and in prokaryotic and eukaryotic host cells are known to those of ordinary skill in the art. See, for example, U.S. Patent No. 4,868,122.

[0073] To facilitate identification and purification of the recombinant polypeptide, nucleic acid sequences that encode for an epitope tag or other affinity binding sequence can be inserted or added in-frame with the coding sequence, thereby producing a fusion protein comprised of the desired polypeptide and a polypeptide suited for binding. Fusion proteins can be identified and purified by first running a mixture containing the fusion protein through an affinity column bearing binding moieties (*e.g.*, antibodies) directed against the epitope tag or other binding sequence in the fusion proteins, thereby binding the fusion protein within the column. Thereafter, the fusion protein can be recovered by washing the column with the appropriate solution (*e.g.*, acid) to release the bound fusion protein. The recombinant polypeptide can also be identified and purified by lysing the host cells, separating the polypeptide, *e.g.*, by size exclusion chromatography, and collecting the polypeptide. These and other methods for identifying and purifying recombinant polypeptides are known to those of ordinary skill in the art.

[0074] The compositions of the invention can comprise a plurality of conjugates, each conjugate comprised of the same Factor VIII moiety (*i.e.*, within the entire composition, only one type of Factor VIII moiety is found). In addition, the composition can comprise a plurality of conjugates wherein any given conjugate is comprised of a moiety selected from the group consisting of two or more different Factor VIII moieties (*i.e.*, within the entire composition, two or more different Factor VIII moieties are found). Optimally, however, substantially all of the plurality of conjugates in the composition (*e.g.*, 85% or more of the plurality of conjugates in the composition) are each comprised of the same Factor VIII moiety.

[0075] Moreover, it is preferred that the composition containing the conjugates is free or substantially free from albumin. It is also preferred that the composition is free or substantially free proteins that do not have Factor VIII activity. Thus, it is preferred that the composition is 85%, more preferably 95%, and most preferably 99% free from albumin. Additionally, it is preferred that the composition is 85%, more preferably 95%, and most preferably 99% free from any protein that does not have Factor VIII activity.

- 19 -

[0076] As previously discussed, each conjugate comprises a Factor VIII moiety attached to a water-soluble polymer. With respect to the water-soluble polymer, the water-soluble polymer is nonpeptidic, nontoxic, non-naturally occurring and biocompatible. With respect to biocompatibility, a substance is considered biocompatible if the beneficial effects associated with use of the substance alone or with another substance (*e.g.*, active agent such a Factor VIII moiety) in connection with living tissues (*e.g.*, administration to a patient) outweighs any deleterious effects as evaluated by a clinician, *e.g.*, a physician. With respect to non-immunogenicity, a substance is considered nonimmunogenic if the intended use of the substance *in vivo* does not produce an undesired immune response (*e.g.*, the formation of antibodies) or, if an immune response is produced, that such a response is not deemed clinically significant or important as evaluated by a clinician. It is particularly preferred that the water-soluble polymer is biocompatible and nonimmunogenic.

[0077] Further the polymer is typically characterized as having from 2 to about 300 termini. Examples of such polymers include, but are not limited to, poly(alkylene glycols) such as polyethylene glycol (PEG), poly(propylene glycol) ("PPG"), copolymers of ethylene glycol and propylene glycol and the like, poly(oxyethylated polyol), poly(olefinic alcohol), poly(vinylpyrrolidone), poly(hydroxyalkylmethacrylamide), poly(hydroxyalkylmethacrylate), poly(saccharides), poly(α -hydroxy acid), poly(vinyl alcohol), polyphosphazene, polyoxazoline, poly(N-acryloylmorpholine), and combinations of any of the foregoing.

[0078] The polymer is not limited in a particular structure and can be linear (*e.g.*, alkoxy PEG or bifunctional PEG), branched or multi-armed (*e.g.*, forked PEG or PEG attached to a polyol core), dendritic, or with degradable linkages. Moreover, the internal structure of the polymer can be organized in any of number of different patterns and can be selected from the group consisting of homopolymer, alternating copolymer, random copolymer, block copolymer, alternating tripolymer, random tripolymer, and block tripolymer.

[0079] Typically, PEG and other water-soluble polymers are activated with a suitable activating group appropriate for coupling to a desired site on the Factor VIII moiety. An activated polymeric reagent will possess a reactive group for reaction with the Factor VIII moiety. Representative polymeric reagents and methods for conjugating these polymers to an active moiety are known in the art and further described in Zalipsky, S., *et al.*, "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" in Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Plenus Press, New York (1992), and in Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16:157-182.

[0080] Typically, the nominal average molecular weight of any given polymer in the conjugate is from about 100 Daltons to about 150,000 Daltons. Exemplary ranges, however, include nominal average molecular weights in the range of greater than 5,000 Daltons to about 100,000 Daltons, in the range of from about 6,000 Daltons to about 90,000 Daltons, in the range of from about 10,000 Daltons to about 85,000 Daltons, in the range of from about 20,000 Daltons to about 85,000 Daltons, and in the range of from about 53,000 Daltons to about 85,000 Daltons. For any given water-soluble polymer, PEGs having these molecular weight ranges are preferred.

[0081] Exemplary nominal average molecular weights for the water-soluble polymer segment include about 100 Daltons, about 200 Daltons, about 300 Daltons, about 400 Daltons, about 500 Daltons, about 600 Daltons, about 700 Daltons, about 750 Daltons, about 800 Daltons, about 900 Daltons, about 1,000 Daltons, about 2,000 Daltons, about 2,200 Daltons, about 2,500 Daltons, about 3,000 Daltons, about 4,000 Daltons, about 4,400 Daltons, about 5,000 Daltons, about 6,000 Daltons, about 7,000 Daltons, about 7,500 Daltons, about 8,000 Daltons, about 9,000 Daltons, about 10,000 Daltons, about 11,000 Daltons, about 12,000 Daltons, about 13,000 Daltons, about 14,000 Daltons, about 15,000 Daltons, about 20,000 Daltons, about 22,500 Daltons, about 25,000 Daltons, about 30,000 Daltons, about 40,000 Daltons, about 50,000 Daltons, about 60,000 Daltons, and about 75,000 Daltons.

[0082] When used as the polymer, PEGs will typically comprise a number of $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)$ monomers. As used throughout the description, the number of repeating units is identified by the subscript "n" in " $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$." Thus, the value of (n) typically falls within one or more of the following ranges: from 2 to about 2,300, from about 100 to about 2,300, from about 135 to about 2,000, from about 230 to about 1,900, from about 450 to about 1,900, and from about 1,200 to about 1,900. For any given polymer in which the molecular weight is known, it is possible to determine the number of repeating units (i.e., "n") by dividing the total molecular weight of the polymer by the molecular weight of the repeating unit.

[0083] One particularly preferred polymer for use in the invention is an end-capped polymer, that is, a polymer having at least one terminus capped with a relatively inert group, such as a lower C_{1-6} alkoxy group. When the polymer is PEG, for example, it is preferred to use a methoxy-PEG (commonly referred to as mPEG), which is a linear form of PEG wherein one terminus of the polymer is a methoxy $(-\text{OCH}_3)$ group, while the other terminus is a hydroxyl or other functional group that can be optionally chemically modified.

[0084] In one form useful in the present invention, free or unbound PEG is a linear polymer terminated at each end with hydroxyl groups:



wherein (m) typically ranges from zero to about 4,000.

[0085] The above polymer, alpha-, omega-dihydroxypoly(ethylene glycol), can be represented in brief form as HO-PEG-OH where it is understood that the -PEG- symbol can represent the following structural unit:



wherein (m) is as defined as above.

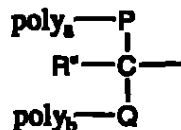
[0086] Another type of PEG useful in the present invention is methoxy-PEG-OH, or mPEG in brief, in which one terminus is the relatively inert methoxy group, while the other terminus is a hydroxyl group. The structure of mPEG is given below.

- 22 -



wherein (m) is as described above.

[0087] Multi-armed or branched PEG molecules, such as those described in U.S. Patent No. 5,932,462, can also be used as the PEG polymer. For example, PEG can have the structure:



[0088] wherein:

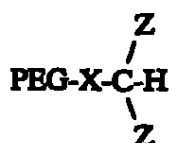
[0089] poly_a and poly_b are PEG backbones (either the same or different), such as methoxy poly(ethylene glycol);

[0090] R'' is a nonreactive moiety, such as H, methyl or a PEG backbone; and

[0091] P and Q are nonreactive linkages. In a preferred embodiment, the branched PEG polymer is methoxy poly(ethylene glycol) disubstituted lysine. Depending on the specific Factor VIII moiety used, the reactive ester functional group of the disubstituted lysine may be further modified to form a functional group suitable for reaction with the target group within the Factor VIII moiety.

[0092] These polymers may be linear, or may be in any of the above-described forms.

[0093] In addition, the PEG can comprise a forked PEG. An example of a forked PEG is represented by the following structure:

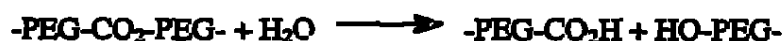


[0094] wherein: X is a spacer moiety of one or more atoms and each Z is an activated terminal group linked to CH by a chain of atoms of defined length.

International Application No. PCT/US99/05333, discloses various forked PEG structures capable of use in the present invention. The chain of atoms linking the Z functional groups to the branching carbon atom serve as a tethering group and may comprise, for example, alkyl chains, ether chains, ester chains, amide chains and combinations thereof.

[0095] The PEG polymer may comprise a pendant PEG molecule having reactive groups, such as carboxyl, covalently attached along the length of the PEG rather than at the end of the PEG chain. The pendant reactive groups can be attached to the PEG directly or through a spacer moiety, such as an alkylene group.

[0096] In addition to the above-described forms of PEG, the polymer can also be prepared with one or more weak or degradable linkages in the polymer, including any of the above described polymers. For example, PEG can be prepared with ester linkages in the polymer that are subject to hydrolysis. As shown below, this hydrolysis results in cleavage of the polymer into fragments of lower molecular weight:



[0097] Other hydrolytically degradable linkages, useful as a degradable linkage within a polymer backbone, include: carbonate linkages; imine linkages resulting, for example, from reaction of an amine and an aldehyde (see, *e.g.*, Ouchi *et al.* (1997) *Polymer Preprints* 38(1):582-3); phosphate ester linkages formed, for example, by reacting an alcohol with a phosphate group; hydrazone linkages which are typically formed by reaction of a hydrazide and an aldehyde; acetal linkages that are typically formed by reaction between an aldehyde and an alcohol; orthoester linkages that are, for example, formed by reaction between a formate and an alcohol; amide linkages formed by an amine group, *e.g.*, at an end of a polymer such as PEG, and a carboxyl group of another PEG chain; urethane linkages formed from reaction of, *e.g.*, a PEG with a terminal isocyanate group and a PEG alcohol; peptide linkages formed by an amine group, *e.g.*, at an end of a polymer such as

PEG, and a carboxyl group of a peptide; and oligonucleotide linkages formed by, for example, a phosphoramidite group, e.g., at the end of a polymer, and a 5' hydroxyl group of an oligonucleotide.

[0098] Such optional features of the polymer conjugate, *i.e.*, the introduction of one or more degradable linkages into the polymer chain, may provide for additional control over the final desired pharmacological properties of the conjugate upon administration. For example, a large and relatively inert conjugate (*i.e.*, having one or more high molecular weight PEG chains attached thereto, for example, one or more PEG chains having a molecular weight greater than about 10,000, wherein the conjugate possesses essentially no bioactivity) may be administered, which is hydrolyzed to generate a bioactive conjugate possessing a portion of the original PEG chain. In this way, the properties of the conjugate can be more effectively tailored to balance the bioactivity of the conjugate over time.

[0099] Those of ordinary skill in the art will recognize that the foregoing discussion concerning substantially water-soluble polymer segments is by no means exhaustive and is merely illustrative, and that all polymeric materials having the qualities described above are contemplated. As used herein, the term "polymeric reagent" generally refers to an entire molecule, which can comprise a water-soluble polymer segment and a functional group.

[0100] As described above, a conjugate of the invention comprises a water-soluble polymer covalently attached to a Factor VIII moiety. Typically, for any given conjugate, there will be one to three water-soluble polymers covalently attached to one or more moieties having Factor VIII activity. In some instances, however, the conjugate may have 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 or more water-soluble polymers individually attached to a Factor VIII moiety.

[0101] The particular linkage within the moiety having Factor VIII activity and the polymer depends on a number of factors. Such factors include, for example, the particular linkage chemistry employed, the particular moiety having Factor VIII activity, the available functional groups within the moiety having Factor VIII activity (either for attachment to a polymer or conversion to a suitable attachment

- 25 -

site), the possible presence of additional reactive functional groups within the moiety having Factor VIII activity, and the like.

[0102] The conjugates of the invention can be, although not necessarily, prodrugs, meaning that the linkage between the polymer and the Factor VIII moiety is hydrolytically degradable to allow release of the parent moiety. Exemplary degradable linkages include carboxylate ester, phosphate ester, thiolester, anhydrides, acetals, ketals, acyloxyalkyl ether, imines, orthoesters, peptides and oligonucleotides. Such linkages can be readily prepared by appropriate modification of either the Factor VIII moiety (*e.g.*, the carboxyl group C terminus of the protein or a side chain hydroxyl group of an amino acid such as serine or threonine contained within the protein) and/or the polymeric reagent using coupling methods commonly employed in the art. Most preferred, however, are hydrolyzable linkages that are readily formed by reaction of a suitably activated polymer with a non-modified functional group contained within the moiety having Factor VIII activity.

[0103] Alternatively, a hydrolytically stable linkage, such as an amide, urethane (also known as carbamate), amine, thioether (also known as sulfide), or urea (also known as carbamide) linkage can also be employed as the linkage for coupling the Factor VIII moiety. In some cases, however, it is preferred that the linkage is not a carbamate linkage and not a carbamide linkage, and furthermore, that no linkage is formed based on the reaction of a polymer derivative bearing an isocyanate or isothiocyanate species to a Factor VIII moiety. Again, a preferred hydrolytically stable linkage is an amide. An amide can be readily prepared by reaction of a carboxyl group contained within the Factor VIII moiety (*e.g.*, the terminal carboxyl of a peptidic moiety having Factor VIII activity) with an amino-terminated polymer.

[0104] The conjugates (as opposed to an unconjugated Factor VIII moiety) may or may not possess a measurable degree of Factor VIII activity. That is to say, a polymer conjugate in accordance with the invention will possess anywhere from about 0.1% to about 100 or more of the bioactivity of the unmodified parent

Factor VIII moiety. Preferably, compounds possessing little or no Factor VIII activity typically contain a hydrolyzable linkage connecting the polymer to the moiety, so that regardless of the lack of activity in the conjugate, the active parent molecule (or a derivative thereof) is released upon aqueous-induced cleavage of the hydrolyzable linkage. Such activity may be determined using a suitable *in-vivo* or *in-vitro* model, depending upon the known activity of the particular moiety having Factor VIII activity employed.

[0105] For conjugates possessing a hydrolytically stable linkage that couples the moiety having Factor VIII activity to the polymer, the conjugate will typically possess a measurable degree of specific activity. For instance, such polymer conjugates are typically characterized as having an activity of at least about 2%, 5%, 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 100%, or more relative to that of the unmodified parent moiety having Factor VIII activity, when measured in a suitable model, such as those well known in the art. Preferably, compounds having a hydrolytically stable linkage (e.g., an amide linkage) will possess at least some degree of the bioactivity of the unmodified parent moiety having Factor VIII activity.

[0106] Exemplary polymer conjugates in accordance with the invention will now be described wherein the moiety having Factor VIII activity is a protein. Typically, such a protein is expected to share (at least in part) a similar amino acid sequence as native Factor VIII. Thus, while reference will be made to specific locations or atoms within the native Factor VIII protein, such a reference is for convenience only and one having ordinary skill in the art will be able to readily determine the corresponding location or atom in other moieties having Factor VIII activity. In particular, the description provided herein for native Factor VIII is applicable to Factor VIIIa, Factor VIII:vWF, and B-domain deleted Factor VIII versions, as well as fragments, deletion variants, substitution variants or addition variants of any of the foregoing.

[0107] Amino groups on Factor VIII moieties provide a point of attachment between the Factor VIII moiety and the water-soluble polymer. Native Factor VIII

comprises 158 amine-containing lysine residues (6.8 weight percent of the entire protein) and one amino terminus. With respect to Factor VIIIa, there are 78 lysine residues (5.5 weight percent of the entire protein) and two amino termini (resulting from the cleavage of Factor VIII). Consequently, notwithstanding secondary and tertiary structural considerations, both Factor VIII and Factor VIIIa (as well as any peptidic Factor VIII moiety, *e.g.*, B-domain deleted Factor VIII) have several amines available for participation in conjugating reactions.

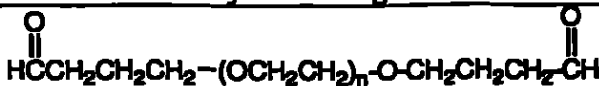
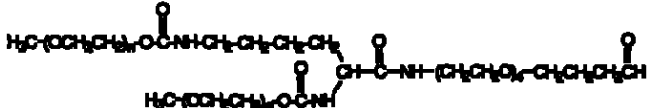
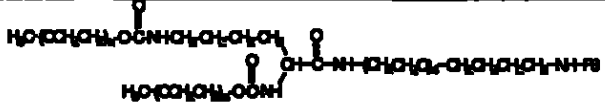
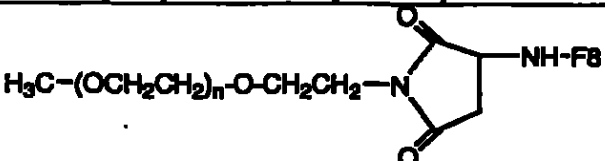
[0108] There are a number of examples of suitable water-soluble polymeric reagents useful for forming covalent linkages with available amines of a Factor VIII moiety. Specific examples, along with the corresponding conjugate, are provided in Table 1, below. In the table, the variable (n) represents the number of repeating monomeric units and "-NH-F8" represents the Factor VIII moiety following conjugation to the water-soluble polymer. While each polymeric portion presented in Table 1 terminates in a "CH₃" group, other groups (such as H and benzyl) can be substituted therefor.

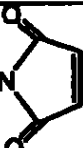
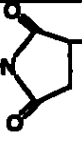
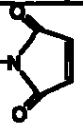
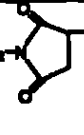
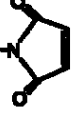
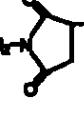
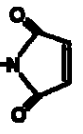
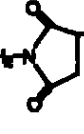
Table 1
Amine-Specific Polymeric Reagents and the Factor VIII Moiety Conjugate Formed Therefrom

Polymeric Reagent	Corresponding Conjugate
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \text{C}_4\text{H}_4$ mPEG-Succinimidyl Propionate	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Amide Linkage
$\begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \text{C}_4\text{H}_4-\text{N}-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \text{C}_4\text{H}_4$ Homobifunctional PEG-Succinimidyl Propionate	$\text{F8}-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Amide Linkages
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \\ \diagdown \end{array} \text{C}_4\text{H}_4$ mPEG-Succinimidyl Butanoate	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Amide Linkage

Polymeric Reagent	Corresponding Conjugate
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-Benzotriazole Carbonate	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Carbamate Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-Succinimidyl Derivative	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{C}_6\text{H}_4-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Carbamate Linkage
$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{N}=\text{N} \end{array}) \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{N}=\text{N} \end{array}) \end{array}$ Branched mPEG2-N-Hydroxysuccinimide	$\begin{array}{c} \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}) \\ \text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}) \end{array}$ Amide Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-Succinimidyl Derivative	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Amide Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C}_6\text{H}_5 \\ \diagdown \text{N}=\text{N} \end{array}$ mPEG-Succinimidyl Derivative	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Amide Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{S}-\text{C}_5\text{H}_4\text{N}$	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{F8}$ Amide Linkage
$\text{HC}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(=\text{O})$ Homobifunctional PEG Propionaldehyde	$\text{F8}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F8}$ Secondary Amine Linkages
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}(=\text{O})$ mPEG Propionaldehyde	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{F8}$ Secondary Amine Linkage

19

Polymeric Reagent	Corresponding Conjugate
 Homobifunctional PEG Butyraldehyde	$F8-NH-CH_2CH_2CH_2CH_2-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2CH_2CH_2-NH-F8$ Secondary Amine Linkage
$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2CH_2CH=O$ mPEG Butyraldehyde	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2CH_2CH_2-NH-F8$ Secondary Amine Linkage
$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-C(=O)NH-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2CH_2CH=O$ mPEG Butyraldehyde Derivative	 Secondary Amine Linkage
 Branched mPEG2 Butyraldehyde	 Secondary Amine Linkage
$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH(OCH_2CH_3)-OCH_2CH_3$ mPEG Acetal	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-NH-F8$ Secondary Amine Linkage
$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-C(=O)-N$ mPEG Piperidone	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-C(=O)-N-NH-F8$ Secondary Amine Linkage (to a secondary carbon)
$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-(CH_2)_{2.5}-C(=O)CH_3$ mPEG Methylketone	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-(CH_2)_{2.5}-CH(NH-F8)-CH_3$ secondary amine linkage (to a secondary carbon)
$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-N$ mPEG "Linkerless" Maleimide (under certain reaction conditions such as pH > 8)	 Secondary Amine Linkage

Polymeric Reagent	Corresponding Conjugate
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ mPEG Maleimide Derivative (under certain reaction conditions such as pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ NH-F8 Secondary Amine Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ mPEG Maleimide Derivative (under certain reaction conditions such as pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ NH-F8 Secondary Amine Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ NH-CH2CH2-NH-C(=O)-CH2CH2-N NH-CH2CH2-NH-C(=O)-CH2CH2-N mPEG Forked Maleimide Derivative (under certain reaction conditions such as pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ NH-F8 NH-CH2CH2-NH-C(=O)-CH2CH2-N NH-CH2CH2-NH-C(=O)-CH2CH2-N mPEG Forked Maleimide Derivative (under certain reaction conditions such as pH > 8)
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ branched mPEG2 Maleimide Derivative (under certain reaction conditions such as pH > 8)	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{CH}_2\text{CH}_2-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}$ NH-F8 Secondary Amine Linkage

[0109] Conjugation of a polymeric reagent to an amino group of a Factor VIII moiety can be accomplished by one of ordinary skill in the art without undue experimentation. Typical of one approach is a reductive amination reaction used, for example, to conjugate a primary amine of a Factor VIII moiety with a polymer functionalized with a ketone, aldehyde or hydrated forms thereof (e.g., ketone

- 31 -

hydrate, aldehyde hydrate). In this approach, the primary amine from the Factor VIII moiety reacts with the carbonyl group of the aldehyde or ketone (or the corresponding hydroxy-containing group of a hydrated aldehyde or ketone), thereby forming a Schiff base. The Schiff base, in turn, can then be reductively converted to a stable conjugate through use of a reducing agent such as sodium borohydride. Selective reactions (*e.g.*, at the N-terminus are possible) are possible, particularly with a polymer functionalized with a ketone or an alpha-methyl branched aldehyde and/or under specific reaction conditions (*e.g.*, reduced pH).

[0110] Preferred amine groups in Factor VIII that can serve as a site for attaching a polymer include those amine groups found within the following lysine residues: Lys⁴⁹³, Lys⁴⁹⁶, Lys⁴⁹⁹, Lys¹⁸⁰⁴, Lys¹⁸⁰⁸, Lys¹⁸¹³, Lys¹⁸¹⁸, Lys²¹⁸³, Lys²²⁰⁷, Lys²²²⁷, Lys²²³⁶, with Lys⁴⁹⁶, Lys¹⁸⁰⁴, and Lys¹⁸⁰⁸ being particularly preferred. Numbering corresponds to the sequence provided in SEQ. ID. NO. 2. As stated above, the amine group corresponding to each of these lysine residues in a protein other than human Factor VIII can serve as a useful site for conjugation. In addition, the N-terminus of any Factor VIII moiety that is a protein can serve as a polymeric attachment site.

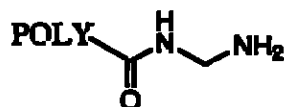
[0111] Carboxyl groups represent another functional group that can serve as a point of attachment on the Factor VIII moiety. Structurally, the conjugate will comprise the following:



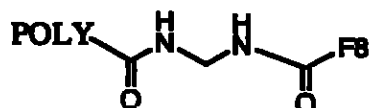
where F8 and the adjacent carbonyl group corresponds to the carboxyl-containing Factor VIII moiety, X is a linkage, preferably a heteroatom selected from O, N(H), and S, and POLY is a water-soluble polymer such as PEG, optionally terminating in an end-capping moiety.

[0112] The C(O)-X linkage results from the reaction between a polymeric derivative bearing a terminal functional group and a carboxyl-containing Factor VIII moiety. As discussed above, the specific linkage will depend on the type of functional group utilized. If the polymer is end-functionalized or "activated" with a hydroxyl group, the resulting linkage will be a carboxylic acid ester and X will be O. If the polymer backbone is functionalized with a thiol group, the resulting linkage will be a thioester and X will be S. When certain multi-arm, branched or forked polymers are employed, the C(O)X moiety, and in particular the X moiety, may be relatively more complex and may include a longer linkage structure.

[0113] Water-soluble derivatives containing a hydrazide moiety are also useful for conjugation at carboxyl groups. An example of such a derivative includes a polymer having the following structure:



which, upon conjugation with a Factor VIII moiety, has the following structure:



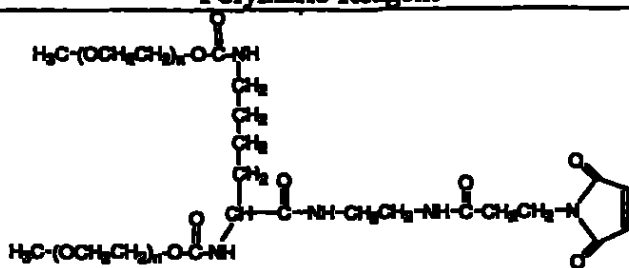
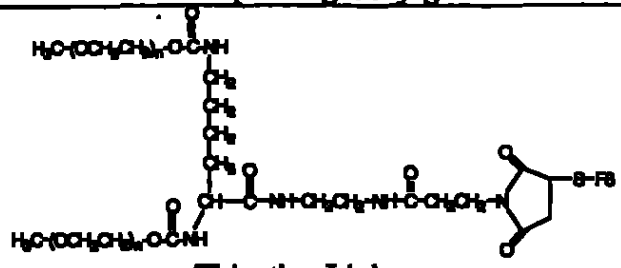
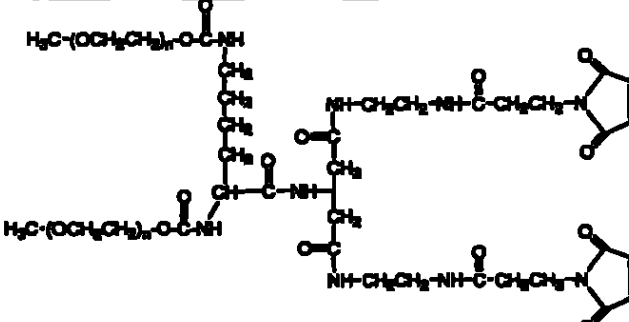
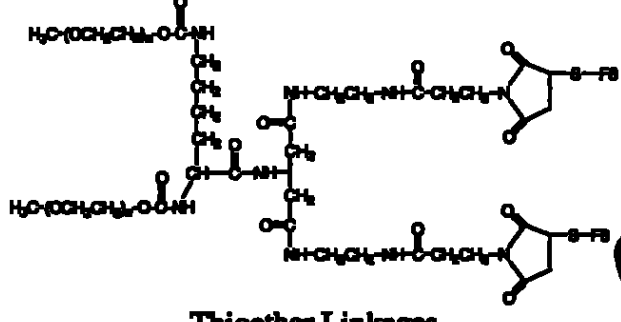
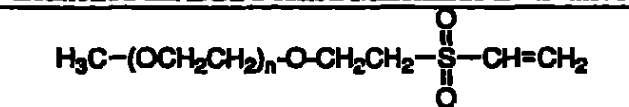
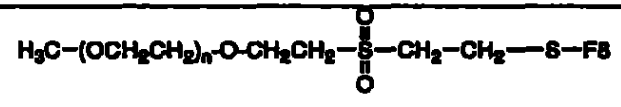
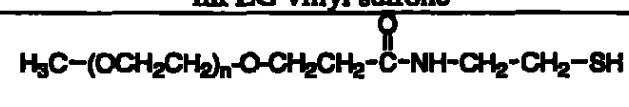
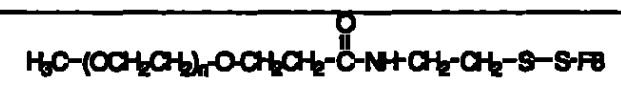
where F8 is the Factor VIII moiety following conjugation and POLY is a water-soluble polymer such as PEG, optionally terminating in an end-capping moiety.

[0114] Thiol groups contained within the Factor VIII moiety can serve as effective sites of attachment for the water-soluble polymer. In particular, cysteine residues provide thiol groups when the Factor VIII moiety is a protein. The thiol groups in such cysteine residues can then be reacted with an activated PEG that is specific for reaction with thiol groups, *e.g.*, an N-maleimidyl polymer or other derivative, as described in U.S. Patent No. 5,739,208 and in International Patent Publication No. WO 01/62827.

[0115] Specific examples, along with the corresponding conjugate, are provided in Table 2, below. In the table, the variable (n) represents the number of repeating monomeric units and "-S-P8" represents the Factor VIII moiety following conjugation to the water-soluble polymer. While each polymeric portion presented in Table 1 terminates in a "CH₃" group, other groups (such as H and benzyl) can be substituted therefor.

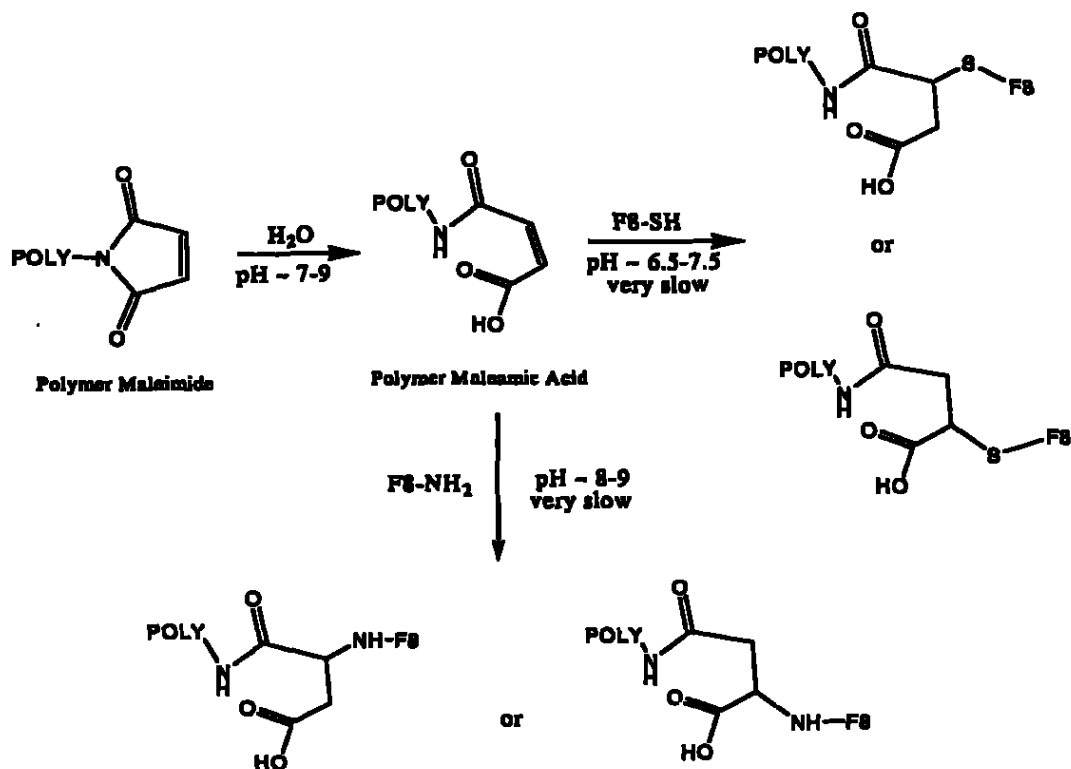
Table 2
Thiol-Specific Polymeric Reagents and the Factor VIII Moiety Conjugate Formed Therefrom

Polymeric Reagent	Corresponding Conjugate
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG "Linkerless" Maleimide	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{S-F8}$ Thioether Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG Maleimide Derivative	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{S-F8}$ Thioether Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG Maleimide Derivative	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{S-F8}$ Thioether Linkage
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array}$ mPEG Forked Maleimide Derivative	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} \text{S-F8}$ Thioether Linkage

Polymeric Reagent	Corresponding Conjugate
 branched mPEG2 Maleimide Derivative	 Thioether Linkage
 Branched mPEG2 Forked Maleimide Derivative	 Thioether Linkages
 mPEG vinyl sulfone	 Thioether Linkage
 mPEG thiol	 Disulfide Linkage

[0116] With respect to conjugates formed from water-soluble polymers bearing one or more maleimide functional groups (regardless of whether the maleimide reacts with an amine or thiol group on the Factor VIII moiety), the corresponding maleamic acid form(s) of the water-soluble polymer can also react with the Factor VIII moiety. Under certain conditions (e.g., a pH of about 7-9 and in the presence of water), the maleimide ring will "open" to form the corresponding maleamic acid. The maleamic acid, in turn, can react with an amine or thiol group of a Factor VIII moiety. Exemplary maleamic acid-based reactions are schematically shown below. POLY represents the water-soluble polymer, and F8 represents the Factor VIII moiety.

- 35 -



[0117] A representative conjugate in accordance with the invention can have the following structure:



wherein POLY is a water-soluble polymer, L is an optional linker, Z is a heteroatom selected from the group consisting of O, NH, and S, and Y is selected from the group consisting of C₂₋₁₀ alkyl, C₂₋₁₀ substituted alkyl, aryl, and substituted aryl. Polymeric reagents that can be reacted with a Factor VIII moiety and result in this type of conjugate are described in copending application filed on January 6, 2004, entitled "Thiol Selective Water Soluble Polymer Derivatives," and assigned U.S. Serial No. 10/753,047.

[0118] Preferred thiol groups in Factor VIII that can serve as a site for attaching a polymeric reagent include those thiol groups found within the following cysteine residues: Cys²⁴⁸, Cys³¹⁰, Cys³²⁹, Cys⁶³⁰, Cys⁶⁹², Cys⁷¹¹, Cys¹⁸⁹⁹, Cys¹⁹⁰³,

- 36 -

and Cys²⁰⁰⁰, with Cys⁶³⁰, Cys⁷¹¹, and Cys¹⁹⁰³, being particularly preferred. Numbering corresponds to the sequence provided in SEQ. ID. NO. 2.

[0119] With respect to polymeric reagents, those described here and elsewhere can be purchased from commercial sources (e.g., Nektar Therapeutics, Huntsville AL). In addition, methods for preparing the polymeric reagents are described in the literature.

[0120] Typically, although not necessarily, the linkage between the Factor VIII moiety and the polymeric reagent includes one or more atoms such as one or more of carbon, nitrogen, sulfur, and combinations thereof. Preferably, the linkage comprises an amide, secondary amine, carbamate, thioether, or disulfide group. Optionally, additional atoms can connect the linkage to the chain of repeating monomers within the polymeric reagent. Nonlimiting examples of specific series of atoms connecting the Factor VIII moiety to the chain of repeating monomers include those selected from the group consisting of -O-, -S-, -S-S-, -C(O)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-O-CH₂-, -CH₂-C(O)-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-O-CH₂-, -C(O)-O-CH₂-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-, -NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -O-C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-,

- 37 -

$\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-O-C(O)-NH-[CH}_2\text{]}_{0-6}\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_{0-2}\text{-}$, $\text{-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_{1-6}\text{-NH-C(O)-}$,
 $\text{-NH-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_{1-6}\text{-NH-C(O)-}$, $\text{-O-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-O-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, and
 $\text{-O-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$.

[0121] The conjugates are typically part of a composition. Generally, the composition comprises a plurality of conjugates, preferably although not necessarily, each having one to three water-soluble polymers covalently attached to one Factor VIII moiety. The compositions, however, can also comprise other conjugates having four, five, six, seven, eight or more polymers attached to any given moiety having Factor VIII activity. In addition, the invention includes instances wherein the composition comprises a plurality of conjugates, each conjugate comprising one water-soluble polymer covalently attached to one Factor VIII moiety, as well as compositions comprising two, three, four, five, six, seven, eight, or more water-soluble polymers covalently attached to one Factor VIII moiety.

[0122] Control of the desired number of polymers for any given moiety can be achieved by selecting the proper polymeric reagent, the ratio of polymeric reagent to the Factor VIII moiety, temperature, pH conditions, and other aspects of the conjugation reaction. In addition, reduction or elimination of the undesired conjugates (*e.g.*, those conjugates having four or more attached polymers) can be achieved through purification means.

[0123] For example, the polymer-Factor VIII moiety conjugates can be purified to obtain/isolate different conjugated species. Specifically, the product mixture can be purified to obtain an average of anywhere from one, two, three, four,

five or more PEGs per Factor VIII moiety, typically one, two or three PEGs per Factor VIII moiety. The strategy for purification of the final conjugate reaction mixture will depend upon a number of factors, including, for example, the molecular weight of the polymeric reagent employed, the particular Factor VIII moiety, the desired dosing regimen, and the residual activity and *in vivo* properties of the individual conjugate(s).

[0124] If desired, conjugates having different molecular weights can be isolated using gel filtration chromatography and/or ion exchange chromatography. That is to say, gel filtration chromatography is used to fractionate differently numbered polymer-to-Factor VIII moiety ratios (*e.g.*, 1-mer, 2-mer, 3-mer, and so forth, wherein "1-mer" indicates 1 polymer to Factor VIII moiety, "2-mer" indicates two polymers to Factor VIII moiety, and so on) on the basis of their differing molecular weights (where the difference corresponds essentially to the average molecular weight of the water-soluble polymer portion). For example, in an exemplary reaction where a 100,000 Dalton protein is randomly conjugated to a polymeric reagent having a molecular weight of about 20,000 Daltons, the resulting reaction mixture may contain unmodified protein (having a molecular weight of about 100,000 Daltons), monoPEGylated protein (having a molecular weight of about 120,000 Daltons), diPEGylated protein (having a molecular weight of about 140,000 Daltons), and so forth.

[0125] While this approach can be used to separate PEG and other polymer-Factor VIII moiety conjugates having different molecular weights, this approach is generally ineffective for separating positional isomers having different polymer attachment sites within the Factor VIII moiety. For example, gel filtration chromatography can be used to separate from each other mixtures of PEG 1-mers, 2-mers, 3-mers, and so forth, although each of the recovered PEG-mer compositions may contain PEGs attached to different reactive amino groups (*e.g.*, lysine residues) within Factor VIII moiety.

[0126] Gel filtration columns suitable for carrying out this type of separation include Superdex™ and Sephadex™ columns available from Amersham

Biosciences (Piscataway, NJ). Selection of a particular column will depend upon the desired fractionation range desired. Elution is generally carried out using a suitable buffer, such as phosphate, acetate, or the like. The collected fractions may be analyzed by a number of different methods, for example, (i) optical density (OD) at 280 nm for protein content, (ii) bovine serum albumin (BSA) protein analysis, (iii) iodine testing for PEG content (Sims *et al.* (1980) *Anal. Biochem.*, 107:60-63), and (iv) sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS PAGE), followed by staining with barium iodide.

[0127] Separation of positional isomers is carried out by reverse phase chromatography using a reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) C18 column (Amersham Biosciences or Vydac) or by ion exchange chromatography using an ion exchange column, *e.g.*, a Sepharose™ ion exchange column available from Amersham Biosciences. Either approach can be used to separate polymer-active agent isomers having the same molecular weight (positional isomers).

[0128] The compositions are preferably substantially free of proteins that do not have Factor VIII activity. In addition, the compositions preferably are substantially free of all other noncovalently attached water-soluble polymers. Moreover, at least one species of conjugate in the composition has at least one water-soluble water polymer attached to a moiety that transforms Factor X to Factor Xa. In some circumstances, however, the composition can contain a mixture of polymer-Factor VIII moiety conjugates and unconjugated Factor VIII.

[0129] Optionally, the composition of the invention further comprises a pharmaceutically acceptable excipient. If desired, the pharmaceutically acceptable excipient can be added to a conjugate to form a composition.

[0130] Exemplary excipients include, without limitation, those selected from the group consisting of carbohydrates, inorganic salts, antimicrobial agents, antioxidants, surfactants, buffers, acids, bases, and combinations thereof.

[0131] A carbohydrate such as a sugar, a derivatized sugar such as an alditol, aldonic acid, an esterified sugar, and/or a sugar polymer may be present as

an excipient. Specific carbohydrate excipients include, for example: monosaccharides, such as fructose, maltose, galactose, glucose, D-mannose, sorbose, and the like; disaccharides, such as lactose, sucrose, trehalose, cellobiose, and the like; polysaccharides, such as raffinose, melezitose, maltodextrins, dextrans, starches, and the like; and alditols, such as mannitol, xylitol, maltitol, lactitol, xylitol, sorbitol (glucitol), pyranosyl sorbitol, myoinositol, and the like.

[0132] The excipient can also include an inorganic salt or buffer such as citric acid, sodium chloride, potassium chloride, sodium sulfate, potassium nitrate, sodium phosphate monobasic, sodium phosphate dibasic, and combinations thereof.

[0133] The composition can also include an antimicrobial agent for preventing or deterring microbial growth. Nonlimiting examples of antimicrobial agents suitable for the present invention include benzalkonium chloride, benzethonium chloride, benzyl alcohol, cetylpyridinium chloride, chlorobutanol, phenol, phenylethyl alcohol, phenylmercuric nitrate, thimerol, and combinations thereof.

[0134] An antioxidant can be present in the composition as well. Antioxidants are used to prevent oxidation, thereby preventing the deterioration of the conjugate or other components of the preparation. Suitable antioxidants for use in the present invention include, for example, ascorbyl palmitate, butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, hypophosphorous acid, monothioglycerol, propyl gallate, sodium bisulfite, sodium formaldehyde sulfoxylate, sodium metabisulfite, and combinations thereof.

[0135] A surfactant can be present as an excipient. Exemplary surfactants include: polysorbates, such as "Tween 20" and "Tween 80," and pluronics such as F68 and F88 (both of which are available from BASF, Mount Olive, New Jersey); sorbitan esters; lipids, such as phospholipids such as lecithin and other phosphatidylcholines, phosphatidylethanolamines (although preferably not in liposomal form), fatty acids and fatty esters; steroids, such as cholesterol; and chelating agents, such as EDTA, zinc and other such suitable cations.

[0136] Acids or bases can be present as an excipient in the composition. Nonlimiting examples of acids that can be used include those acids selected from the group consisting of hydrochloric acid, acetic acid, phosphoric acid, citric acid, malic acid, lactic acid, formic acid, trichloroacetic acid, nitric acid, perchloric acid, phosphoric acid, sulfuric acid, fumaric acid, and combinations thereof. Examples of suitable bases include, without limitation, bases selected from the group consisting of sodium hydroxide, sodium acetate, ammonium hydroxide, potassium hydroxide, ammonium acetate, potassium acetate, sodium phosphate, potassium phosphate, sodium citrate, sodium formate, sodium sulfate, potassium sulfate, potassium fumarate, and combinations thereof.

[0137] The amount of the conjugate (*i.e.*, the conjugate formed between the active agent and the polymeric reagent) in the composition will vary depending on a number of factors, but will optimally be a therapeutically effective dose when the composition is stored in a unit dose container (*e.g.*, a vial). In addition, the pharmaceutical preparation can be housed in a syringe. A therapeutically effective dose can be determined experimentally by repeated administration of increasing amounts of the conjugate in order to determine which amount produces a clinically desired endpoint.

[0138] The amount of any individual excipient in the composition will vary depending on the activity of the excipient and particular needs of the composition. Typically, the optimal amount of any individual excipient is determined through routine experimentation, *i.e.*, by preparing compositions containing varying amounts of the excipient (ranging from low to high), examining the stability and other parameters, and then determining the range at which optimal performance is attained with no significant adverse effects.

[0139] Generally, however, the excipient will be present in the composition in an amount of about 1% to about 99% by weight, preferably from about 5% to about 98% by weight, more preferably from about 15 to about 95% by weight of the excipient, with concentrations less than 30% by weight most preferred.

[0140] These foregoing pharmaceutical excipients along with other excipients are described in "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), the "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), and Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd Edition, American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

[0141] The compositions encompass all types of formulations and in particular those that are suited for injection, *e.g.*, powders or lyophilates that can be reconstituted as well as liquids. Examples of suitable diluents for reconstituting solid compositions prior to injection include bacteriostatic water for injection, dextrose 5% in water, phosphate-buffered saline, Ringer's solution, saline, sterile water, deionized water, and combinations thereof. With respect to liquid pharmaceutical compositions, solutions and suspensions are envisioned.

[0142] The compositions of the present invention are typically, although not necessarily, administered via injection and are therefore generally liquid solutions or suspensions immediately prior to administration. The pharmaceutical preparation can also take other forms such as syrups, creams, ointments, tablets, powders, and the like. Other modes of administration are also included, such as pulmonary, rectal, transdermal, transmucosal, oral, intrathecal, subcutaneous, intra-arterial, and so forth.

[0143] The invention also provides a method for administering a conjugate as provided herein to a patient suffering from a condition that is responsive to treatment with conjugate. The method comprises administering, generally via injection, a therapeutically effective amount of the conjugate (preferably provided as part of a pharmaceutical composition). As previously described, the conjugates can be administered injected parenterally by intravenous injection, or less preferably by intramuscular or by subcutaneous injection. Suitable formulation types for parenteral administration include ready-for-injection solutions, dry powders for combination with a solvent prior to use, suspensions ready for injection, dry

- 43 -

insoluble compositions for combination with a vehicle prior to use, and emulsions and liquid concentrates for dilution prior to administration, among others.

[0144] The method of administering may be used to treat any condition that can be remedied or prevented by administration of the conjugate. Those of ordinary skill in the art appreciate which conditions a specific conjugate can effectively treat. For example, the conjugates can be used to treat individuals suffering from hemophilia A. In addition, the conjugates are suited for use as a prophylactic against uncontrolled bleeding, optionally in patients not suffering from hemophilia. Thus, for example, the conjugate can be administered to a patient at risk for uncontrolled bleeding prior to surgery.

[0145] The actual dose to be administered will vary depend upon the age, weight, and general condition of the subject as well as the severity of the condition being treated, the judgment of the health care professional, and conjugate being administered. Therapeutically effective amounts are known to those skilled in the art and/or are described in the pertinent reference texts and literature. Generally, a therapeutically effective amount will range from about 0.001 mg to 100 mg, preferably in doses from 0.01 mg/day to 75 mg/day, and more preferably in doses from 0.10 mg/day to 50 mg/day.

[0146] The unit dosage of any given conjugate (again, preferably provided as part of a pharmaceutical preparation) can be administered in a variety of dosing schedules depending on the judgment of the clinician, needs of the patient, and so forth. The specific dosing schedule will be known by those of ordinary skill in the art or can be determined experimentally using routine methods. Exemplary dosing schedules include, without limitation, administration five times a day, four times a day, three times a day, twice daily, once daily, three times weekly, twice weekly, once weekly, twice monthly, once monthly, and any combination thereof. Once the clinical endpoint has been achieved, dosing of the composition is halted.

[0147] One advantage of administering certain conjugates of the present invention is that individual water-soluble polymer portions can be cleaved off. Such a result is advantageous when clearance from the body is potentially a

- 44 -

problem because of the polymer size. Optimally, cleavage of each water-soluble polymer portion is facilitated through the use of physiologically cleavable and/or enzymatically degradable linkages such as urethane, amide, carbonate or ester-containing linkages. In this way, clearance of the conjugate (via cleavage of individual water-soluble polymer portions) can be modulated by selecting the polymer molecular size and the type functional group that would provide the desired clearance properties. One of ordinary skill in the art can determine the proper molecular size of the polymer as well as the cleavable functional group. For example, one of ordinary skill in the art, using routine experimentation, can determine a proper molecular size and cleavable functional group by first preparing a variety of polymer derivatives with different polymer weights and cleavable functional groups, and then obtaining the clearance profile (e.g., through periodic blood or urine sampling) by administering the polymer derivative to a patient and taking periodic blood and/or urine sampling. Once a series of clearance profiles have been obtained for each tested conjugate, a suitable conjugate can be identified.

[0148] It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the preferred specific embodiments thereof, that the foregoing description as well as the examples that follow are intended to illustrate and not limit the scope of the invention. Other aspects, advantages and modifications within the scope of the invention will be apparent to those skilled in the art to which the invention pertains.

[0149] All articles, books, patents and other publications referenced herein can be referenced by one of ordinary skill in the art.

EXPERIMENTAL

[0150] The practice of the invention will employ, unless otherwise indicated, conventional techniques of organic synthesis and the like, which are within the skill of the art. Such techniques are fully explained in the literature. See,

for example, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4th Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992), *supra*.

[0151] In the following examples, efforts have been made to ensure accuracy with respect to numbers used (*e.g.*, amounts, temperatures, etc.) but some experimental error and deviation should be accounted for. Unless indicated otherwise, temperature is in degrees C and pressure is at or near atmospheric pressure at sea level.

[0152] ABBREVIATIONS:

[0153]	DCM	dichloromethane
[0154]	mPEG-SPA	mPEG-succinimidyl propionate
[0155]	mPEG-SBA	mPEG-succinimidyl butanoate
[0156]	mPEG-OPSS	mPEG-orthopyridyl-disulfide
[0157]	mPEG-MAL	mPEG-maleimide, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-MAL}$
[0158]	mPEG-SMB	mPEG-succinimidyl α -methylbutanoate, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{-C(O)-O-succinimide}$
[0159]	mPEG-ButyrALD	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-C(O)-NH-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_4\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C(O)H}$
[0160]	mPEG-PIP	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(O)-piperidin-4-one}$
[0161]	SUC	succinimide or succinimidyl
[0162]	NaCNBH_3	sodium cyanoborohydride
[0163]	HCl	hydrochloric acid
[0164]	HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

- 46 -

[0165]	NMR	nuclear magnetic resonance
[0166]	DCC	1,3-dicyclohexylcarbodiimide
[0167]	DI	deionized
[0168]	MW	molecular weight
[0169]	r.t.	room temperature
[0170]	K or kDa	kilodaltons
[0171]	SEC	Size exclusion chromatography
[0172]	HPLC	high performance liquid chromatography
[0173]	FPLC	fast protein liquid chromatography
[0174]	SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
[0175]	MALDI-TOF	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight

[0176] MATERIALS:

[0177] All PEG reagents referred to in the appended examples are commercially available unless otherwise indicated.

[0178] mPEG-succinimidyl propionate, mPEG-SPA, molecular weight, 30K ($M_n=31.3$ kDa, Nektar Therapeutics)

[0179] mPEG-orthopyridyl-disulfide, mPEG-OPSS, molecular weight, 10K ($M_n=10.3$ kDa, Nektar Therapeutics)

[0180] mPEG-maleimide, mPEG-MAL, molecular weight, 20K ($M_n=21.8$ kDa, Nektar Therapeutics)

[0181] mPEG-maleimide, mPEG-MAL, molecular weight, 30K ($M_n=31.4$ kDa, Nektar Therapeutics)

- 47 -

- [0182] mPEG-succinimidyl α -methylbutanoate, mPEG-SMB, molecular weight, 30K (M_n =30.5 kDa, Nektar Therapeutics)
- [0183] mPEG-butyraldehyde, mPEG-ButyrALD, molecular weight, 30K (M_n =31.5 kDa, Nektar Therapeutics)
- [0184] L-Histidine, biotechnology performance certified (Sigma)
- [0185] HEPES, biotechnology performance certified, 99.5+% (Sigma)
- [0186] Calcium chloride, dihydrate, for molecular biology, 99% (Sigma)
- [0187] Sodium chloride, for molecular biology (Sigma)
- [0188] Tween 80, Sigma Ultra, (Sigma)
- [0189] Ethyl alcohol, USP, Absolute-200 Proof (AAPER)
- [0190] Polyethylene glycol, MW 3,350, SigmaUltra (Sigma)
- [0191] Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette, 0.5-3ml, or 3-12ml capacity (Pierce)
- [0192] Acetic acid, A.C.S. reagent, 99.7+% (Aldrich)
- [0193] 1N Acetic acid, volumetric standard (VWR)
- [0194] 1N Sodium hydroxide, volumetric standard (J.T.Baker)
- [0195] Sodium cyanoborohydride, 95% (Aldrich)
- [0196] Tris/glycine/SDS, 10x, protein electrophoresis buffer (Bio-Rad)
- [0197] Laemmli sample buffer (Bio-Rad)
- [0198] SigmaMarker, low range (M.W. 6,500-66,000) (Sigma)
- [0199] SigmaMarker, high range (M.W. 36,000-205,000) (Sigma)
- [0200] 7.5% Tris-HCl ready gel (10-well, 30ul, Bio-Rad)
- [0201] GelCode blue stain reagent (Pierce)
- [0202] METHODS (ANALYTICAL)

[0203] SEC-HPLC Analysis

[0204] Size exclusion chromatography (SEC) was performed on an Agilent 1100 HPLC system (Agilent). Samples were analyzed using a BIOSEP-SEC-S 4000 column (Phenomenex) and a mobile phase of 45 mM histidine, 4.5 mM calcium chloride, 0.36 M sodium chloride, 0.009%(v/v) Tween 80 and 10% ethyl alcohol, pH 6.7. The flow rate for the column was 0.3 ml/min. Eluted protein and PEG-protein conjugates were detected by UV at a wavelength of 280nm.

[0205] SDS-PAGE Analysis

[0206] Samples were analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) using Mini-PROTEAN 3 Precast Gel Electrophoresis System (Bio-Rad). Samples were mixed with 2x Laemmli sample buffer, and were placed in a 95 °C water bath for ~ 5 minutes. Then, the prepared samples were loaded onto a 7.5% Tris-HCl ready gel and run for approximately 30 minutes at 200 V using Tris/glycine/SDS electrophoresis buffer.

[0207] OTHER METHODS**[0208] Purification of PEG-Factor VIII Conjugates**

[0209] A Superose 6 HR 10/30, 24 ml gel filtration column (Amersham) was used with an FPLC system and AKTA prime system (Amersham) to purify the PEG-Factor VIII conjugates in Examples 6-11. The flow rate was 0.3 ml/min and the elution buffer was 50 mM Histidine, 0.5 M NaCl, 4.0 mM CaCl₂, and 0.01% (w/v) Tween 80, pH 6.7.

[0210] Buffer exchange of Factor VIII Stock Solution

[0211] A Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette (3-12 ml, 10,000 MWCO, Pierce) was removed from the protective pouch, and was soaked in MiliQ H₂O for 15 minutes (water was changed every 5 minutes). The Factor VIII stock solution [0.398 mg/ml in 50 mM Histidine, 0.5 M NaCl, 4.0 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01 (w/v) Tween 80, pH 6.7] was then transferred into the cassette cavity

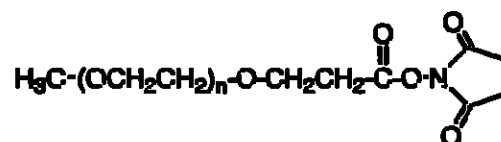
- 49 -

through one of the guide ports on the top of the gasket. The cassette was placed in a 1 L beaker of HEPES buffer [50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01% (v/v) Tween 80, pH 7.0] with a flotation buoy attached to the top of the cassette. The beaker was then placed on the stir plate to start the dialysis at 4 °C. The HEPES buffer was changed for four times at intervals of 2-3 hrs, and was then left in a cold room (4 °C) for overnight dialysis. After dialysis, the cassette chamber was injected with air and the dialyzed sample was withdrawn from the cassette. The concentration of Factor VIII in HEPES buffer was measured at UV 280nm from a SPECTRA max PLUS Spectrophotometer (Molecular Devices).

Example 1

PEGylation of B-domain Deleted Factor VIII with mPEG-SPA, 20K

[0212] mPEG-Succinimidyl propionate having a molecular weight of 20,000 Daltons is obtained from Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). The basic structure of the polymer reagent is provided below:



[0213] B-domain deleted Factor VIII is dissolved in deionized water, to which is added triethylamine to raise the pH to 7.2-9. To the above solution is added a 1.5 to 10-fold molar excess of the PEG reagent, mPEG-SPA. The resulting mixture is stirred at room temperature for several hours.

[0214] The reaction mixture is analyzed by SDS-PAGE to determine the degree of PEGylation of the protein. The degree of PEGylation, 1-mer, 2 mers, etc., can also be determined by any of a number of analytical techniques appropriate for proteins of this size, such as light angle scattering. The displayed peaks for native and mono-PEGylated species differ by approximately 20,000 Da. Increasing the

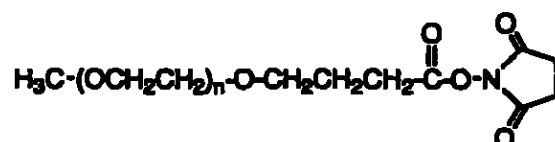
- 50 -

ratio of PEG reagent to protein increases the degree of polyPEGylation, that is to say, the formation of 2-mers, 3-mers, etc.

Example 2

PEGylation of B-domain Deleted Factor VIII with mPEG-SBA

[0215] mPEG-Succinimidyl butanoate having a molecular weight of 10,000 daltons is obtained from Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). The basic structure of the polymer reagent is provided below:



[0216] B-domain deleted Factor VIII is dissolved in deionized water, to which is added triethylamine to raise the pH to 7.2-9. To this solution is then added a 1.5 to 10-fold molar excess of mPEG-SBA. The resulting mixture is stirred at room temperature for several hours.

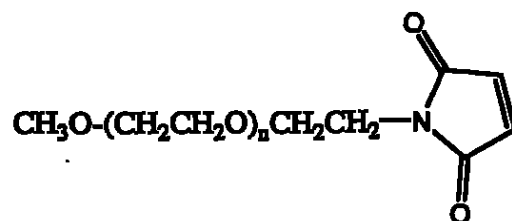
[0217] The reaction mixture is analyzed by SDS-PAGE to determine the degree of PEGylation of the protein.

Example 3

PEGylation of B-domain Deleted Factor VIII with mPEG-MAL, 20K

[0218] mPEG-Maleimide having a molecular weight of 20,000 daltons is obtained from Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). The basic structure of the polymer reagent is provided below:

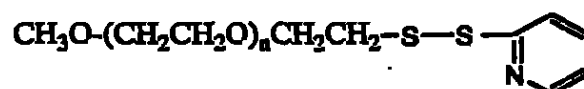
30



[0219] B-domain deleted Factor VIII is dissolved in buffer. To this protein solution is added a 3-5 fold molar excess of mPEG-MAL. The mixture is stirred at room temperature under an inert atmosphere for several hours. The reaction mixture is analyzed and purified by HPLC to provide a mixture of conjugated species.

Example 4

PEGylation of B-domain Deleted Factor VIII with mPEG-OPSS, 20K

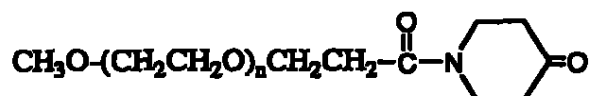


[0220] The sulfhydryl-selective polymer reagent, mPEG-orthopyridyl-disulfide (structure shown above), having a molecular weight of 20,000, is obtained from Nektar Therapeutics (Huntsville, AL). A five-fold molar excess of mPEG-OPSS is added to B-domain deleted Factor VIII in a buffered solution. The reaction mixture is stirred for several hours at room temperature under an inert atmosphere to form the desired conjugate having a disulfide linkage connecting the polymer to the protein.

- 52 -

Example 5

PEGylation of B-domain Deleted Factor VIII with mPEG-PIP, 5K



[0221] The above polymeric reagent, shown as both the ketone and corresponding ketal, is prepared as described in Nektar Therapeutics' Provisional Patent Application No. 60/437,325, entitled "Polymer Derivatives and Conjugates Thereof."

[0222] To prepare the above polymeric reagent, to a solution of methoxy-polyethylene glycol-succinimidyl propionate having a weight average molecular weight of 5,000 Daltons (1.0 g, 0.002 moles) in methylene chloride (20 ml), triethyl amine (0.084 ml, 0.006 moles) and 4-piperidone monohydrate hydrochloride (0.077g, 0.005 moles) are added. The reaction mixture is stirred at room temperature under a nitrogen atmosphere overnight and then purified prior to conjugation. Alternatively, the polymer reagent may be purchased from Nektar Therapeutics.

[0223] To effect conjugation, to a solution of B-domain deleted Factor VIII in aqueous buffer is added a 20-fold molar excess of mPEG-PIP, 5K. The resulting solution is placed on a Roto Mix™ orbital shaker (Thermolyne Corp., Dubuque, IA) set at slow speed to facilitate reaction at room temperature. After 15 minutes, aqueous NaCNBH₃ is added in an amount equal to a 50 fold-molar excess relative to the B-domain deleted Factor VIII. Aliquots are withdrawn at timed intervals from the reaction mixture and are analyzed by SDS-PAGE (using gels available from Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

- 53 -

[0224] SDS-PAGE analysis indicates the presence of PEG derivatives of B-domain deleted Factor VIII having 1, 2, and 3 PEG moieties attached.

Example 6

Conjugation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-SPA, 30K

[0225] Prior to conjugation, a buffer exchange for B-domain deleted Factor VIII (Factor VIII) was performed to replace histidine with HEPES.

[0226] mPEG-SPA, 30K, stored at -20 °C under argon, was warmed to ambient temperature. The warmed mPEG-SPA (2.2 mg) was dissolved in 0.022 ml of 2 mM HCl to provide a 10% solution of polymer reagent. The mPEG-SPA solution was quickly added to 3 ml of Factor VIII solution [0.412mg/ml in 50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 4.0 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 7.0] and mixed well. After 30 minutes of reaction at room temperature, the reaction vial was transferred to a cold room (4 °C), and another 0.022 ml of mPEG-SPA solution was added to the reaction mixture, and mixed well. The pH was determined (pH 7.0±0.2). The molar ratio of mPEG-SPA to protein was 20:1. The final mPEG-SPA concentration was 1.445 mg/ml, and the final Factor VIII concentration was 0.406 mg/ml. The reaction was allowed to proceed overnight at 4 °C on Rotomix (slow speed, Thermolyne). The resulting conjugate was assigned identifier "pz041701."

[0227] The conjugate mixture was purified using gel filtration chromatography. A size exclusion chromatography method was developed for analyzing the reaction mixtures, and the final products. SDS-PAGE analysis was also used for the characterization of the samples.

[0228] CONJUGATE CHARACTERIZATION. The resulting conjugate mixture, prior to purification, was a mixture of Factor VII PEG-monomer (or 1-mer), dimer (or 2-mer) and trimer (or 3-mer), corresponding to the identifiers "pz041701 (low)," "pz041701 (medium)," and "pz041701 (high)" respectively, as determined by SEC. That is to say: "pz041701 (low)" corresponds to mostly Factor VIII mono-

- 54 -

PEGylated species or Factor VIII having one PEG moiety attached thereto; "pz041701 (medium)" corresponds to primarily Factor VIII di-PEGylated species, that is to say, Factor VIII having two PEG moieties attached thereto; and "pz041701 (high)" corresponds mostly to Factor VIII having three PEG moieties attached thereto. The corresponding SEC plots are shown in FIGs. 1 and 2. FIG. 1 shows the SEC plot corresponding to fractions collected upon SEC of the Factor VIII reaction mixture. According to the size exclusion chromatography (SEC) results, the PEGylation yield of mPEG-SPA-30K-FVIII (pz041701 low) was ~ 39%. The PEGylation yield of mPEG30-SPA-30K-FVIII (pz041701 medium) was ~ 32%, and the PEGylation yield of mPEG-SPA-30K-FVIII (pz041701 high) was ~ 11%, with percentages based upon relative amounts compared to all species present in the resulting reaction mixture. The conjugate mixture was further purified by FPLC and analyzed by SDS-PAGE.

Example 7

Conjugation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-MAL, 20K

[0229] Prior to the conjugation, a buffer exchange for B-domain deleted Factor VIII (Factor VIII) was performed to replace histidine with HEPES.

[0230] mPEG-MAL, 20K, stored at -20 °C under argon, was warmed to ambient temperature. The warmed mPEG-MAL reagent (4.4 mg) was dissolved in 0.044 ml of HEPES buffer [50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 4.0 mM CaCl₂, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 7.0] to make a 10% mPEG-MAL solution. The mPEG-MAL solution was quickly added to 4 ml of Factor VIII solution [0.4324 mg/ml in 50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 7.0] and mixed well. After 30 minutes of reaction at room temperature, the reaction vial was transferred to the cold room (4 °C), and another 0.044 ml of mPEG-MAL solution was added to the reaction mixture, followed by the addition of three more aliquots of 0.044 ml of mPEG-MAL solution over the course of two hours. The pH was determined (pH 7.0±0.2). The molar ratio of mPEG-MAL to

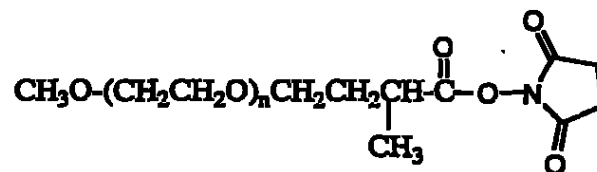
protein was 100:1. The final mPEG-MAL concentration was 5.213 mg/ml, and the final Factor VIII concentration was 0.410 mg/ml. The reaction was allowed to proceed overnight at 4 °C on Rotomix (slow speed, Thermolyne). The conjugate was assigned identifier "pz061201."

[0231] The conjugate mixture was purified using gel filtration chromatography. A size exclusion chromatography method was developed for analyzing the reaction mixtures, and the final products. SDS-PAGE analysis was also used for the characterization of the samples.

[0232] CONJUGATE CHARACTERIZATION (Mono-PEGylated product). According to the size exclusion chromatography (SEC) results, the PEGylation yield of monoPEGylated conjugate (1-mer) was ~ 33% (FIG. 3). The Factor VIII conjugate mixture fractions were combined and purified by FPLC, and then further purified by gel filtration chromatography. The pz061201 final product was analyzed by both SDS-PAGE and SEC, and the purity of the "pz061201" product was determined to be approximately 94% Factor VIII PEG monomer (*i.e.*, monopegylated Factor VIII), with ~ 6% Factor VIII PEG high-mers (FIG 4).

Example 8

Conjugation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-SMB, 30K



[0233] Prior to conjugation, a buffer exchange for B-domain deleted Factor VIII (Factor VIII) was performed to replace histidine with HEPES.

[0234] mPEG-SMB, 30K, stored at -20 °C under argon, was warmed to ambient temperature. The warmed mPEG-SMB (6.5 mg) was dissolved in 0.065 ml

- 56 -

of 2mM HCl to form a 10% mPEG-SMB solution. The mPEG-SMB solution was quickly added to 4 ml of Factor VIII solution [0.435 mg/ml in 50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 5.0 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01% (v/v) Tween 80, pH 7.0] and mixed well. After 30 minutes of reaction at room temperature, the reaction vial was transferred to a cold room (4 °C). The pH was determined (pH 7.0±0.2). The molar ratio of mPEG-SMB to protein was 20:1. The final mPEG-SMB concentration was 1.599 mg/ml, and the final Factor VIII concentration was 0.428 mg/ml. The reaction was allowed to proceed for approximately 48 hrs at 4 °C on Rotomix (slow speed, Thermolyne), and was then quenched by the addition of acetic acid (99.7+%) to lower the pH to 6.0±0.3. The conjugate was assigned identifier "pz082501."

[0235] The conjugate mixture was purified using gel filtration chromatography. A size exclusion chromatography method was developed for analyzing the reaction mixtures, and the final products. SDS-PAGE analysis was also used for the characterization of the samples.

[0236] CONJUGATE CHARACTERIZATION: The mixture designated "pz082501" resulted from the PEGylation of Factor VIII with mPEG-SMB30K at pH 7.0±0.2. The conjugate mixture was purified and analyzed by SEC. Based upon the size exclusion chromatography (SEC) results, the PEGylation yield of pz082501, monoPEGylated conjugate (Factor VIII 1-mer) was ~41% (FIG. 5). The product mixture was further purified by FPLC and analyzed by SDS-PAGE and SEC. Characterization of the purified Factor VIII PEG conjugate product, pz082501, was ~95% mono-conjugated PEG Factor VIII with ~ 5% higher-mers.

Example 9

Conjugation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-OPSS, 10K

[0237] Prior to conjugation, a buffer exchange for B-domain deleted Factor VIII (Factor VIII) was performed to replace histidine with HEPES.

- 57 -

[0238] mPEG-OPSS, 10K, stored at -20 °C under argon, was warmed to ambient temperature. mPEG-OPSS (1.2 mg) was dissolved in 0.012 ml of H₂O to make a 10% mPEG-OPSS solution. The mPEG-OPSS solution was quickly added to 0.5 ml of Factor VIII solution [0.398 mg/ml in 50 mM Histidine, 0.5 M NaCl, 4.0 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 6.7] and mixed well. After 30 minutes of reaction at room temperature, the reaction vial was transferred to a cold room (4 °C). The pH was determined (pH 6.7±0.2). The molar ratio of mPEG-OPSS-10K to protein was 100:1. The final mPEG-OPSS concentration was 2.344 mg/ml, and the final Factor VIII concentration was 0.389 mg/ml. The reaction was allowed to proceed overnight at 4 °C on Rotomix (slow speed, Thermolyne).

[0239] The conjugate mixture was purified using gel filtration chromatography. A size exclusion chromatography method was developed for analyzing the reaction mixtures, and the final products. SDS-PAGE analysis was also used for the characterization of the samples. The pegylation results and yields using the mPEG-OPSS reagent were similar to those in Example 7, which employed the mPEG-MAL reagent having a molecular weight of 20K.

Example 10

Conjugation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-MAL, 30K

[0240] Prior to conjugation, a buffer exchange for B-domain deleted Factor VIII (Factor VIII) was performed to replace histidine with HEPES.

[0241] mPEG-MAL, 30K, stored at -20K °C under argon, was warmed to ambient temperature. The warmed mPEG-MAL (1.0 mg) was dissolved in 0.010 ml of HEPES buffer [50 mM HEPES, 0.15 M NaCl, 4.0 mM CaCl₂, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 7.0] to make a 10% mPEG-MAL solution. The mPEG-MAL solution was quickly added to 0.5 ml of Factor VIII solution [0.447 mg/ml in 50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 4 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350, 0.01% (w/v) Tween 80, pH 7.0] and mixed well. After 30 minutes of reaction at room

- 58 -

temperature, the reaction vial was transferred to a cold room (4 °C), and another 0.010 ml of mPEG-MAL solution was added to the reaction mixture, followed by the addition of three more aliquots of 0.010 ml of mPEG-MAL solution over the course of two hours. The pH was determined (pH 7.0±0.2). The molar ratio of mPEG-MAL to protein was 100:1. The final mPEG-MAL concentration was 9.091 mg/ml, and the final Factor VIII concentration was 0.406 mg/ml. The reaction was allowed to proceed overnight at 4 °C on Rotomix (slow speed, Thermolyne).

[0242] The conjugate mixture was purified using gel filtration chromatography. A size exclusion chromatography method was developed for analyzing the reaction mixtures, and the final products. SDS-PAGE analysis was also used for the characterization of the samples. The PEGylation results and yields using the mPEG-MAL reagent having a molecular weight of 30 K were similar to those in Example 7, which employed the mPEG-MAL reagent having a molecular weight of 20K.

Example 11

Conjugation of B-Domain Deleted Factor VIII with mPEG-Butyr-ALD, 30K

[0243] Prior to conjugation, a buffer exchange for B-domain deleted Factor VIII (Factor VIII) was performed to replace histidine with HEPES.



[0244] mPEG-Butyr-ALD, 30K (shown above), stored at -20 °C under argon, was warmed to ambient temperature. The warmed mPEG-Butyr-ALD (3.8 mg) was dissolved in 0.038 ml of H₂O to make a 10% mPEG-Butyr-ALD solution. The mPEG-Butyr-ALD solution was quickly added to 0.5 ml of Factor VIII solution [0.400 mg/ml in 50 mM HEPES, 0.5 M NaCl, 5 mM CaCl₂, 0.1% (w/v) PEG 3,350,

25

- 59 -

0.01% (v/v) Tween 80, pH 7.0] and mixed well. After 15 minutes, 0.060 ml of 10 mM sodium cyanoborohydride solution was added. The pH was determined (pH 7.0±0.2). The molar ratio of mPEG-Butyr-ALD to protein was 100:1. The final mPEG-Butyr-ALD concentration was 6.355 mg/ml. The final Factor VIII concentration was 0.334 mg/ml, and the final concentration of NaCNBH₃ was 1.003 mM. The reaction was allowed to proceed for 5 hours at room temperature, and then, overnight at 4 °C on Rotomix (slow speed, Thermolyne).

[0245] The conjugate mixture was purified using gel filtration chromatography. A size exclusion chromatography method was developed for analyzing the reaction mixtures, and the final products. SDS-PAGE analysis was also used for the characterization of the samples. The yield of Factor VIII mono-PEG conjugate was approximately 20%.

Example 12

In-vitro Activity of Exemplary Factor VIII-PEG Conjugates

[0246] The in-vitro activities of the Factor VIII-PEG conjugates described in Examples 6, 7, and 8 were determined. All of the Factor VIII conjugates tested were bioactive.

What is claimed is:

- 1. A composition comprising a plurality of conjugates each conjugate having one to three water-soluble polymers covalently attached to a Factor VIII moiety, wherein each water-soluble polymer has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5,000 Daltons to about 150,000 Daltons.**
- 2. The composition of claim 1, wherein the water-soluble polymer in each conjugate is selected from the group consisting of a poly(alkylene oxide), poly(vinyl pyrrolidone), poly(vinyl alcohol), polyoxazoline, and poly(acryloylmorpholine)**
- 3. The composition of claim 2, wherein each water-soluble polymer is a poly(alkylene oxide).**
- 4. The composition of claim 3, wherein each poly(alkylene oxide) is a poly(ethylene glycol).**
- 5. The composition of claim 4, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with an end-capping moiety selected from the group consisting hydroxy, alkoxy, substituted alkoxy, alkenoxy, substituted alkenoxy, alkynoxy, substituted alkynoxy, aryloxy and substituted aryloxy.**
- 6. The composition of claim 4, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with methoxy.**
- 7. The composition of claim 4, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with hydroxy.**
- 8. The composition of claim 4, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 6,000 Daltons to about 100,000 Daltons.**

b3

9. The composition of claim 8, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 10,000 Daltons to about 85,000 Daltons.

10. The composition of claim 9, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 20,000 Daltons to about 85,000 Daltons.

11. The composition of claim 10, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 53,000 Daltons to about 75,000 Daltons.

12. The composition of claim 3, wherein each water-soluble polymer is linear.

13. The composition of claim 3, wherein each water-soluble polymer is branched.

14. The composition of claim 3, wherein the Factor VIII moiety is selected from the group consisting of Factor VIII, Factor VIIIa, Factor VIII:C, Factor VIII:vWF, B-domain deleted Factor VIII, and biologically active fragments, deletion variants, substitution variants or addition variants of any of the foregoing.

15. The composition of claim 14, wherein the Factor VIII moiety is selected from the group consisting of Factor VIII, Factor VIIIa, Factor VIII:C, and Factor VIII:vWF.

16. The composition of claim 14, wherein the Factor VIII moiety is B-domain deleted Factor VIII.

17. The composition of claim 3, wherein the Factor VIII moiety is recombinantly derived.
18. The composition of claim 3, wherein the Factor VIII moiety is blood-derived.
19. The composition of claim 3, wherein the composition is substantially free of albumin.
20. The composition of claim 3, wherein the composition is substantially free of proteins that do not have Factor VIII activity.
21. The composition of claim 3, wherein the composition is substantially free of noncovalently attached water-soluble polymers.
22. The composition of claim 3, wherein at least one water-soluble polymer is covalently attached to a site in the active form of the moiety having Factor VIII activity.
23. The composition of claim 1, in lyophilized form.
24. The composition of claim 1, in the form of a liquid.
25. The composition of claim 1, further comprising a pharmaceutically acceptable excipient.
26. The composition of claim 1, wherein each conjugate comprises an amide linkage.
27. The composition of claim 1, wherein each conjugate comprises a secondary amine linkage.

28. The composition of claim 1, wherein each conjugate comprises a carbamate linkage.

29. The composition of claim 1, wherein each conjugate comprises a thioether linkage.

30. The composition of claim 1, wherein each conjugate comprises a disulfide linkage.

31. A composition comprising a plurality of monoPEGylated Factor VIII moiety conjugates.

32. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises one poly(ethylene glycol) terminally capped with an end-capping moiety selected from the group consisting hydroxy, alkoxy, substituted alkoxy, alkenoxy, substituted alkenoxy, alkynoxy, substituted alkynoxy, aryloxy and substituted aryloxy.

33. The composition of claim 31, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with methoxy.

34. The composition of claim 31, wherein the poly(ethylene glycol) is terminally capped with hydroxy.

35. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises a poly(ethylene glycol) having a nominal average molecular weight in the range of greater than 5,000 Daltons to about 150,000 Daltons.

36. The composition of claim 35, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 6,000 Daltons to about 100,000 Daltons.

37. The composition of claim 36, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 10,000 Daltons to about 85,000 Daltons.

38. The composition of claim 37, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 20,000 Daltons to about 85,000 Daltons.

39. The composition of claim 38, wherein the poly(ethylene glycol) has a nominal average molecular weight in the range of from about 53,000 Daltons to about 75,000 Daltons.

40. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises a linear poly(ethylene glycol).

41. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety comprises a branched poly(ethylene glycol).

42. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises a Factor VIII moiety selected from the group consisting of Factor VIII, Factor VIIIa, Factor VIII:C, Factor VIII:vWF, B-domain deleted Factor VIII, and biologically active fragments, deletion variants, substitution variants or addition variants of any of the foregoing.

43. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises a Factor VIII moiety selected from the group consisting of Factor VIII, Factor VIIIa, Factor VIII:C, and Factor VIII:vWF.

27

44. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises B-domain deleted Factor VIII.

45. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises a Factor VIII moiety that is recombinantly derived.

46. The composition of claim 31, wherein each monoPEGylated Factor VIII moiety conjugate comprises a Factor VIII moiety that is blood-derived.

47. The composition of claim 31, wherein the composition is substantially free of albumin.

48. The composition of claim 31, wherein the composition is substantially free of proteins that do not have Factor VIII activity.

49. The composition of claim 31, wherein the composition is substantially free of noncovalently attached water-soluble polymers.

50. The composition of claim 31, in lyophilized form.

51. The composition of claim 31, in the form of a liquid.

52. The composition of claim 31, further comprising a pharmaceutically acceptable excipient.

53. The composition of claim 31, wherein each conjugate comprises an amide linkage.

54. The composition of claim 31, wherein each conjugate comprises a secondary amine linkage.

55. The composition of claim 31, wherein each conjugate comprises a carbamate linkage.

56. The composition of claim 31, wherein each conjugate comprises a thioether linkage.

57. The composition of claim 31, wherein each conjugate comprises a disulfide linkage.

58. A method for making a conjugate comprising contacting, under conjugation conditions, a Factor VIII moiety with a polymeric reagent.

59. A method for treating a patient in need of Factor VIII therapy, comprising the step of administering to the patient the composition of claim 1 or claim 31, wherein the composition contains a therapeutically effective amount the conjugates.

60. The method of claim 59, wherein the patient is suffering from hemophilia A.

61. The method of claim 59, wherein the patient is administered the composition within two days prior to undergoing surgery.

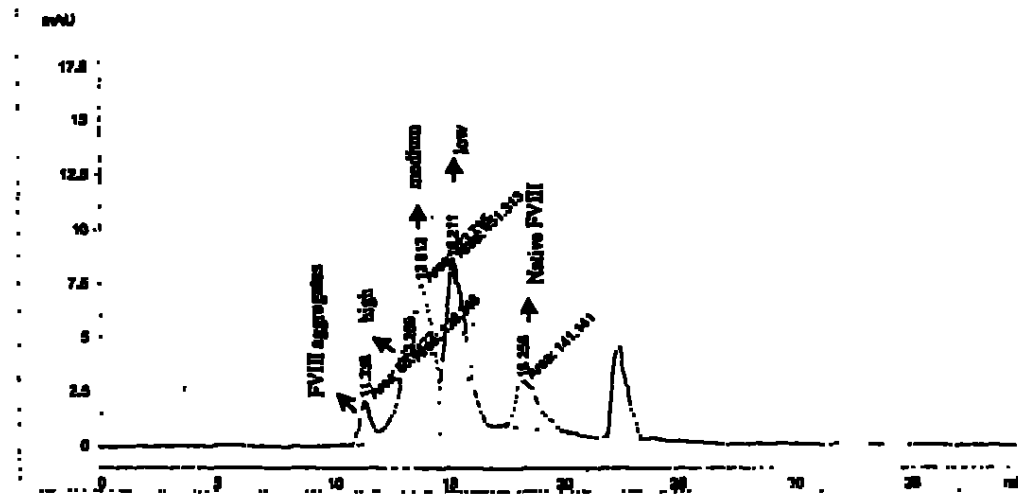


FIG. 1

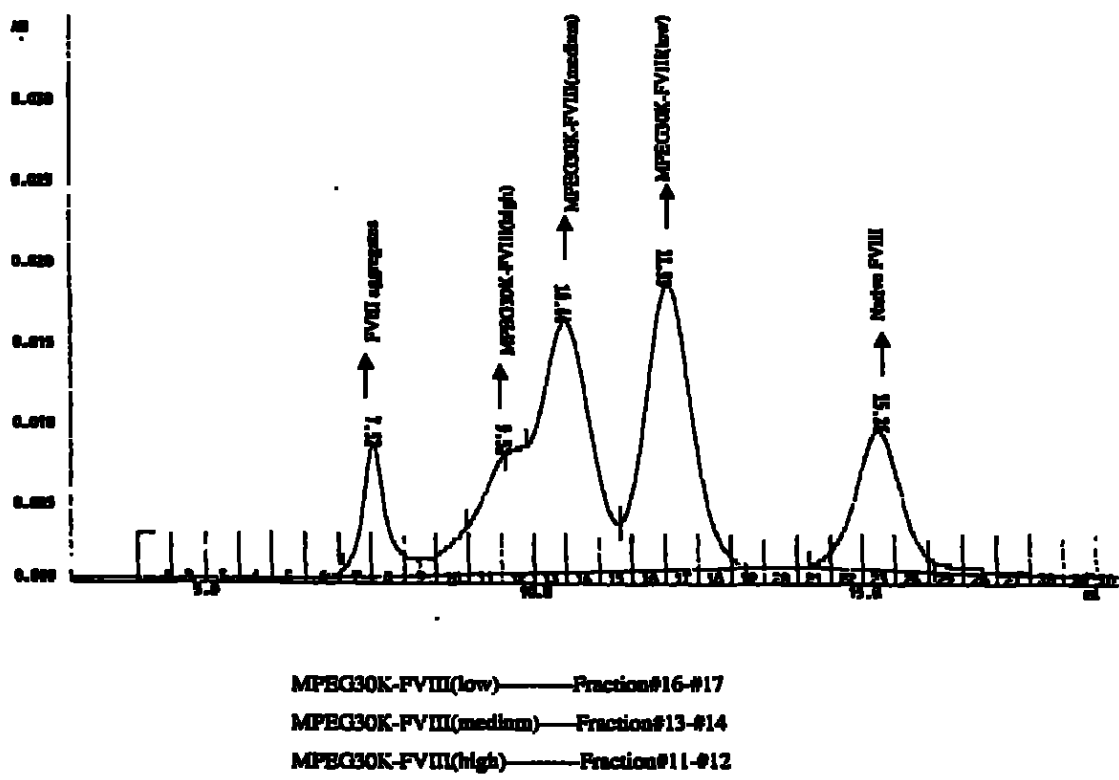


FIG. 2

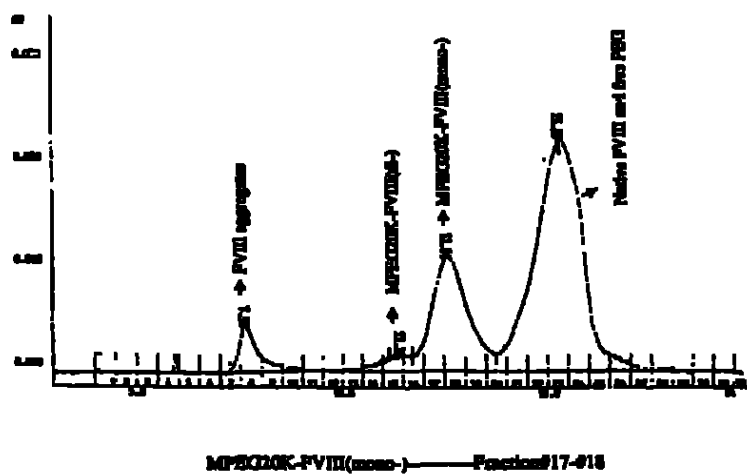


FIG. 3

1b

4/5

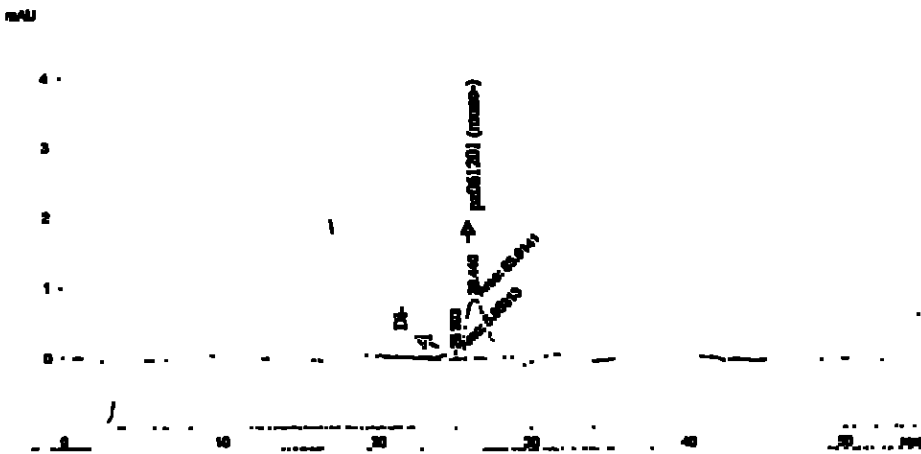


FIG. 4

5/5

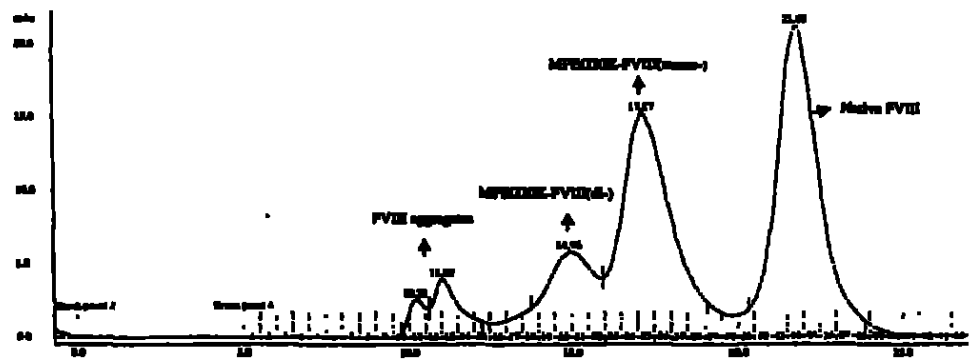


FIG. 5

SEQUENCE LISTING

<110> Bentley, Michael
Mary J. Bossard

<120> Compositions Comprising Conjugates of Moieties Having Factor
VIII Activity

<130> SHE-0081.00

<140> To Be Assigned

<141> 2003-02-26

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<311> 2351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145 150 155 160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
180 185 190

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr

195					200					205					
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly
210					215					220					
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp
225					230					235					240
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr
				245					250					255	
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val
			260					265					270		
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile
		275					280					285			
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser
	290					295					300				
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met
305					310					315					320
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His
				325					330					335	
Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro
			340					345					350		
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp
		355					360					365			
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser
	370					375					380				
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr
385					390					395					400
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro
				405					410					415	
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn
			420				425						430		
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met
	435					440						445			
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu
	450					455					460				
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu
465					470					475					480
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro
			485						490				495		
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys
			500				505						510		
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe
		515					520					525			

44

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765
 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860
 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880
 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895
 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925
 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940
 Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960
 Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965 970 975
 Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
 980 985 990
 Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
 995 1000 1005
 Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser
 1010 1015 1020
 Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser
 1025 1030 1035
 Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu
 1040 1045 1050
 Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg
 1055 1060 1065
 Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met
 1070 1075 1080
 Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln
 1085 1090 1095
 Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met
 1100 1105 1110
 Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile
 1115 1120 1125
 Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro
 1130 1135 1140
 Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu
 1145 1150 1155
 Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys

45

1160				1165				1170							
Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Asp	Val		Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro
1175						1180						1185			
Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu		Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu
1190						1195						1200			
Asn	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu		Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu
1205						1210						1215			
Lys	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln		Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile
1220						1225						1230			
His	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys		Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu
1235						1240						1245			
Leu	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val		Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr
1250						1255						1260			
Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe		Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn
1265						1270						1275			
Arg	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala		His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu
1280						1285						1290			
Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly		Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu
1295						1300						1305			
Lys	Tyr	Ala	Cys	Thr	Thr	Arg		Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln
1310						1315						1320			
Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Arg	Ser		Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg
1325						1330						1335			
Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu		Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp
1340						1345						1350			
Asp	Thr	Ser	Thr	Gln	Trp	Ser		Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro
1355						1360						1365			
Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Asp		Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala
1370						1375						1380			
Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser		Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser
1385						1390						1395			
Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser		Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser
1400						1405						1410			
Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro		Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe
1415						1420						1425			
Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu		Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys
1430						1435						1440			
Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Glu	Ser		Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys
1445						1450						1455			
Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala		Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly
1460						1465						1470			

Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
1475						1480					1485			
Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp
1490						1495					1500			
Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His
1505						1510					1515			
Ile	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser
1520						1525					1530			
Pro	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr
1535						1540					1545			
Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val
1550						1555					1560			
Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
1565						1570					1575			
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
1580						1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
1610						1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
1625						1630					1635			
Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
1640						1645					1650			
Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1670						1675					1680			
Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1760						1765					1770			

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
 1775 1780 1785
 Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
 1790 1795 1800
 Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 1805 1810 1815
 Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
 1820 1825 1830
 Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
 1835 1840 1845
 Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
 1850 1855 1860
 Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
 1865 1870 1875
 Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 1880 1885 1890
 Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
 1895 1900 1905
 Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1910 1915 1920
 Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 1925 1930 1935
 Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
 1940 1945 1950
 Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1955 1960 1965
 Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
 1970 1975 1980
 Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
 1985 1990 1995
 Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
 2000 2005 2010
 Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
 2015 2020 2025
 Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
 2030 2035 2040
 Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 2045 2050 2055
 Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
 2060 2065 2070
 Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser

2075	2080	2085
Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu 2090	Ala Pro Met Ile Ile 2095	His Gly Ile 2100
Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln 2105	Lys Phe Ser Ser Leu 2110	Tyr Ile Ser 2115
Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser 2120	Leu Asp Gly Lys Lys 2125	Trp Gln Thr 2130
Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly 2135	Thr Leu Met Val Phe 2140	Phe Gly Asn 2145
Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys 2150	His Asn Ile Phe Asn 2155	Pro Pro Ile 2160
Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu 2165	His Pro Thr His Tyr 2170	Ser Ile Arg 2175
Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu 2180	Met Gly Cys Asp Leu 2185	Asn Ser Cys 2190
Ser Met Pro Leu Gly Met Glu 2195	Ser Lys Ala Ile Ser 2200	Asp Ala Gln 2205
Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe 2210	Thr Asn Met Phe Ala 2215	Thr Trp Ser 2220
Pro Ser Lys Ala Arg Leu His 2225	Leu Gln Gly Arg Ser 2230	Asn Ala Trp 2235
Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro 2240	Lys Glu Trp Leu Gln 2245	Val Asp Phe 2250
Gln Lys Thr Met Lys Val Thr 2255	Gly Val Thr Thr Gln 2260	Gly Val Lys 2265
Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr 2270	Val Lys Glu Phe Leu 2275	Ile Ser Ser 2280
Ser Gln Asp Gly His Gln Trp 2285	Thr Leu Phe Phe Gln 2290	Asn Gly Lys 2295
Val Lys Val Phe Gln Gly Asn 2300	Gln Asp Ser Phe Thr 2305	Pro Val Val 2310
Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu 2315	Leu Thr Arg Tyr Leu 2320	Arg Ile His 2325
Pro Gln Ser Trp Val His Gln 2330	Ile Ala Leu Arg Met 2335	Glu Val Leu 2340
Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu 2345	Tyr 2350	

<210> 2
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr
 1 5 10 15
 Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro
 20 25 30
 Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys
 35 40 45
 Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile Ala Lys Pro
 50 55 60
 Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val
 65 70 75 80
 Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val
 85 90 95
 Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala
 100 105 110
 Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val
 115 120 125
 Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn
 130 135 140
 Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser
 145 150 155 160
 His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu
 165 170 175
 Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu
 180 185 190
 His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp
 195 200 205
 His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser
 210 215 220
 Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg
 225 230 235 240
 Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His
 245 250 255
 Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu
 260 265 270
 Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile
 275 280 285
 Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly
 290 295 300
 Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met
 305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg
 325 330 335
 Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp
 340 345 350
 Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe
 355 360 365
 Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His
 370 375 380
 Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu
 385 390 395 400
 Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro
 405 410 415
 Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr
 420 425 430
 Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile
 435 440 445
 Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile
 450 455 460
 Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile
 465 470 475 480
 Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys
 485 490 495
 His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys
 500 505 510
 Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys
 515 520 525
 Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala
 530 535 540
 Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp
 545 550 555 560
 Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe
 565 570 575
 Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln
 580 585 590
 Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe
 595 600 605
 Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser
 610 615 620
 Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu
 625 630 635 640
 Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr

645										650					655				
Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro				
			660					665					670						
Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp				
		675					680					685							
Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala				
	690					695					700								
Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu				
705					710					715					720				
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala				
				725					730					735					
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg				
			740					745					750						
Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys				
		755					760					765							
Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn				
	770					775					780								
Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro				
785					790					795					800				
His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	Glu	Thr	Phe				
				805					810					815					
Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser				
			820					825					830						
Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	Asp	Met	Val				
		835					840					845							
Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	Lys	Leu	Gly				
	850					855					860								
Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Val	Ser	Ser				
865					870					875					880				
Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	Leu	Ala	Ala				
				885					890					895					
Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Pro	Ser	Met	Pro	Val	His				
			900					905					910						
Tyr	Asp	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Lys	Lys	Ser	Ser	Pro				
		915					920					925							
Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	Asn	Asn	Asp				
	930					935					940								
Ser	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Met	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Ser	Trp				
945					950					955					960				
Gly	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe	Lys	Gly	Lys				
				965					970					975					

Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu
 1010 1015 1020
 Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu
 1025 1030 1035
 Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp
 1040 1045 1050
 Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr
 1055 1060 1065
 Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly
 1070 1075 1080
 Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys
 1085 1090 1095
 Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His
 1100 1105 1110
 Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln
 1115 1120 1125
 Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe
 1130 1135 1140
 Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr
 1145 1150 1155
 Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn
 1160 1165 1170
 Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu Asn Asn Thr His
 1175 1180 1185
 Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys Lys Glu Thr
 1190 1195 1200
 Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr Val Thr
 1205 1210 1215
 Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr Arg
 1220 1225 1230
 Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
 1235 1240 1245
 Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys
 1250 1255 1260
 His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu
 1265 1270 1275

Gly Leu 1280	Gly Asn Gln Thr Lys 1285	Gln Ile Val Glu Lys 1290	Tyr Ala Cys
Thr Thr 1295	Arg Ile Ser Pro Asn 1300	Thr Ser Gln Gln Asn 1305	Phe Val Thr
Gln Arg 1310	Ser Lys Arg Ala Leu 1315	Lys Gln Phe Arg Leu 1320	Pro Leu Glu
Glu Thr 1325	Glu Leu Glu Lys Arg 1330	Ile Ile Val Asp Asp 1335	Thr Ser Thr
Gln Trp 1340	Ser Lys Asn Met Lys 1345	His Leu Thr Pro Ser 1350	Thr Leu Thr
Gln Ile 1355	Asp Tyr Asn Glu Lys 1360	Glu Lys Gly Ala Ile 1365	Thr Gln Ser
Pro Leu 1370	Ser Asp Cys Leu Thr 1375	Arg Ser His Ser Ile 1380	Pro Gln Ala
Asn Arg 1385	Ser Pro Leu Pro Ile 1390	Ala Lys Val Ser Ser 1395	Phe Pro Ser
Ile Arg 1400	Pro Ile Tyr Leu Thr 1405	Arg Val Leu Phe Gln 1410	Asp Asn Ser
Ser His 1415	Leu Pro Ala Ala Ser 1420	Tyr Arg Lys Lys Asp 1425	Ser Gly Val
Gln Glu 1430	Ser Ser His Phe Leu 1435	Gln Gly Ala Lys Lys 1440	Asn Asn Leu
Ser Leu 1445	Ala Ile Leu Thr Leu 1450	Glu Met Thr Gly Asp 1455	Gln Arg Glu
Val Gly 1460	Ser Leu Gly Thr Ser 1465	Ala Thr Asn Ser Val 1470	Thr Tyr Lys
Lys Val 1475	Glu Asn Thr Val Leu 1480	Pro Lys Pro Asp Leu 1485	Pro Lys Thr
Ser Gly 1490	Lys Val Glu Leu Leu 1495	Pro Lys Val His Ile 1500	Tyr Gln Lys
Asp Leu 1505	Phe Pro Thr Glu Thr 1510	Ser Asn Gly Ser Pro 1515	Gly His Leu
Asp Leu 1520	Val Glu Gly Ser Leu 1525	Leu Gln Gly Thr Glu 1530	Gly Ala Ile
Lys Trp 1535	Asn Glu Ala Asn Arg 1540	Pro Gly Lys Val Pro 1545	Phe Leu Arg
Val Ala 1550	Thr Glu Ser Ser Ala 1555	Lys Thr Pro Ser Lys 1560	Leu Leu Asp
Pro Leu 1565	Ala Trp Asp Asn His 1570	Tyr Gly Thr Gln Ile 1575	Pro Lys Glu
Glu Trp	Lys Ser Gln Glu Lys	Ser Pro Glu Lys Thr	Ala Phe Lys

1580	1585	1590
Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser	Leu Asn Ala Cys Glu	Ser Asn His
1595	1600	1605
Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu	Gly Gln Asn Lys Pro	Glu Ile Glu
1610	1615	1620
Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly	Arg Thr Glu Arg Leu	Cys Ser Gln
1625	1630	1635
Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg	His Gln Arg Glu Ile	Thr Arg Thr
1640	1645	1650
Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu	Glu Ile Asp Tyr Asp	Asp Thr Ile
1655	1660	1665
Ser Val Glu Met Lys Lys Glu	Asp Phe Asp Ile Tyr	Asp Glu Asp
1670	1675	1680
Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser	Phe Gln Lys Lys Thr	Arg His Tyr
1685	1690	1695
Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg	Leu Trp Asp Tyr Gly	Met Ser Ser
1700	1705	1710
Ser Pro His Val Leu Arg Asn	Arg Ala Gln Ser Gly	Ser Val Pro
1715	1720	1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe	Gln Glu Phe Thr Asp	Gly Ser Phe
1730	1735	1740
Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly	Glu Leu Asn Glu His	Leu Gly Leu
1745	1750	1755
Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala	Glu Val Glu Asp Asn	Ile Met Val
1760	1765	1770
Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser	Arg Pro Tyr Ser Phe	Tyr Ser Ser
1775	1780	1785
Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp	Gln Arg Gln Gly Ala	Glu Pro Arg
1790	1795	1800
Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn	Glu Thr Lys Thr Tyr	Phe Trp Lys
1805	1810	1815
Val Gln His His Met Ala Pro	Thr Lys Asp Glu Phe	Asp Cys Lys
1820	1825	1830
Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp	Val Asp Leu Glu Lys	Asp Val His
1835	1840	1845
Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu	Leu Val Cys His Thr	Asn Thr Leu
1850	1855	1860
Asn Pro Ala His Gly Arg Gln	Val Thr Val Gln Glu	Phe Ala Leu
1865	1870	1875
Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu	Thr Lys Ser Trp Tyr	Phe Thr Glu
1880	1885	1890

72
50

Asn Met 1895	Glu Arg Asn Cys Arg 1900	Ala Pro Cys Asn Ile 1905	Gln Met Glu
Asp Pro 1910	Thr Phe Lys Glu Asn 1915	Tyr Arg Phe His Ala 1920	Ile Asn Gly
Tyr Ile 1925	Met Asp Thr Leu Pro 1930	Gly Leu Val Met Ala 1935	Gln Asp Gln
Arg Ile 1940	Arg Trp Tyr Leu Leu 1945	Ser Met Gly Ser Asn 1950	Glu Asn Ile
His Ser 1955	Ile His Phe Ser Gly 1960	His Val Phe Thr Val 1965	Arg Lys Lys
Glu Glu 1970	Tyr Lys Met Ala Leu 1975	Tyr Asn Leu Tyr Pro 1980	Gly Val Phe
Glu Thr 1985	Val Glu Met Leu Pro 1990	Ser Lys Ala Gly Ile 1995	Trp Arg Val
Glu Cys 2000	Leu Ile Gly Glu His 2005	Leu His Ala Gly Met 2010	Ser Thr Leu
Phe Leu 2015	Val Tyr Ser Asn Lys 2020	Cys Gln Thr Pro Leu 2025	Gly Met Ala
Ser Gly 2030	His Ile Arg Asp Phe 2035	Gln Ile Thr Ala Ser 2040	Gly Gln Tyr
Gly Gln 2045	Trp Ala Pro Lys Leu 2050	Ala Arg Leu His Tyr 2055	Ser Gly Ser
Ile Asn 2060	Ala Trp Ser Thr Lys 2065	Glu Pro Phe Ser Trp 2070	Ile Lys Val
Asp Leu 2075	Leu Ala Pro Met Ile 2080	Ile His Gly Ile Lys 2085	Thr Gln Gly
Ala Arg 2090	Gln Lys Phe Ser Ser 2095	Leu Tyr Ile Ser Gln 2100	Phe Ile Ile
Met Tyr 2105	Ser Leu Asp Gly Lys 2110	Lys Trp Gln Thr Tyr 2115	Arg Gly Asn
Ser Thr 2120	Gly Thr Leu Met Val 2125	Phe Phe Gly Asn Val 2130	Asp Ser Ser
Gly Ile 2135	Lys His Asn Ile Phe 2140	Asn Pro Pro Ile Ile 2145	Ala Arg Tyr
Ile Arg 2150	Leu His Pro Thr His 2155	Tyr Ser Ile Arg Ser 2160	Thr Leu Arg
Met Glu 2165	Leu Met Gly Cys Asp 2170	Leu Asn Ser Cys Ser 2175	Met Pro Leu
Gly Met 2180	Glu Ser Lys Ala Ile 2185	Ser Asp Ala Gln Ile 2190	Thr Ala Ser

[illegible]

CONJUGADOS DE POLIMERO-PORCION DEL FACTOR VIII

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención se refiere en términos generales a conjugados que comprenden una porción del Factor VIII (es decir, una porción que tiene actividad de Factor VIII) y un polímero.

 Además, la invención se refiere a composiciones
10 que comprenden los conjugados, métodos para sintetizar los conjugados, y métodos para tratar pacientes.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

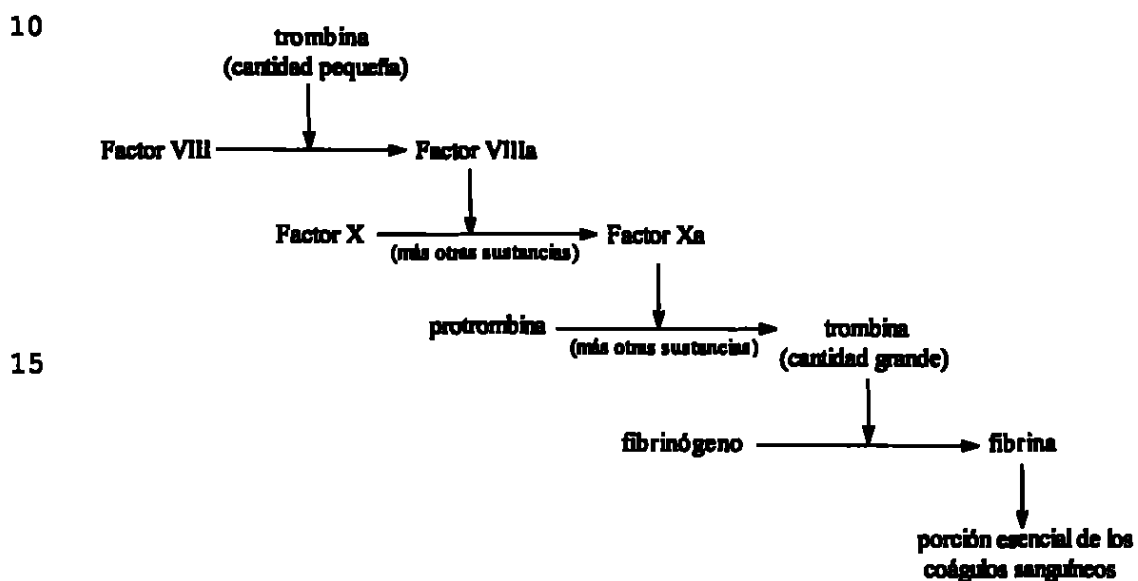
15 La hemostasis es el proceso de detener la salida de sangre proveniente de un vaso sanguíneo lesionado. Para mamíferos, así como para muchos otros organismos, el proceso hemostático es críticamente importante para continuar la supervivencia. Los defectos en el proceso
20 hemostático pueden dar como resultado, por ejemplo, la incapacidad de formar efectivamente coágulos sanguíneos que sirven para detener la pérdida de sangre después de lesión vascular. En humanos, a los individuos que padecen de la incapacidad para formar coágulos sanguíneos se les llama
25 hemofílicos. De interés particular para los hemofílicos es

el riesgo que pone en peligro la vida que una vez iniciado, el sangrado nunca se detenga.

En términos generales, los hemofílicos carecen de la habilidad para producir cantidades efectivas de una o
5 más sustancias requeridas para formar coágulos sanguíneos. Por ejemplo, los hemofílicos que padecen de hemofilia A (también llamada "hemofilia clásica") no tienen la capacidad de producir niveles efectivos del Factor VIII (también conocido como "Factor A anti-hemofilia",
10 "globulina anti-hemofílica", y "AHG"). El Factor VIII es un componente clave de una de varias "cascadas" de reacciones que dan como resultado la formación de coágulo sanguíneos. El Factor VIII, crítico para la cascada de reacciones conocida como la "ruta intrínseca", finalmente influye en
15 la conversión de fibrinógeno hasta el componente principal de coágulos sanguíneos, fibrina.

Aunque la ruta intrínseca de formación de coágulos sanguíneos es relativamente compleja, se puede describir brevemente la función del Factor VIII. En
20 presencia de cantidades relativamente pequeñas de trombina (liberada, por ejemplo, por las células de tejidos desgarrados), el Factor VIII se convierte en su forma activada conocida como Factor VIIIa. El Factor VIIIa (junto con otras sustancias), a su vez, activa otro factor, el
25 factor X hasta el factor Xa. Después de esto, el factor Xa

(junto con otras sustancias) convierte la protrombina en trombina, con el resultado que con el paso del tiempo se produce una cantidad relativamente grande de trombina. Las cantidades relativamente grandes de trombina convierten de manera efectiva el fibrinógeno en fibrina. La fibrina, a su vez, forma la matriz o red responsable de la formación de los coágulos sanguíneos. El papel del Factor VIII en la ruta intrínseca de coagulación sanguínea se muestra a continuación en forma esquemática.



20 La hemofilia A, que afecta a uno o dos individuos de género masculino por cada 10,000 nacimientos en todas las poblaciones, puede resultar de cualquiera de una variedad de mutaciones del gen del Factor VIII el cual se ubica en el cromosoma X. Dependiendo de la mutación

25 particular, la hemofilia A se puede manifestar por sí misma

como severa, moderada o ligera. Los individuos que parecen de las formas más severas de hemofilia A carecen completamente de la capacidad para expresar formas activas del Factor VIII. Desde el punto de vista clínico, los individuos afectados con hemofilia A padecen de hemorragia muscular, hemorragia de articulaciones, magulladuras fáciles, y sangrado prolongado a partir de heridas. La edad promedio de los individuos que padecen de hemofilia A sin tratamiento es de veinte años. El tratamiento actual de la hemofilia A implica la infusión de concentrado de Factor VIII exógeno recolectado a partir de plasma humano o preparado mediante técnicas de ADN recombinante. Debido a que estos tratamientos sirven únicamente para complementar la falta de niveles efectivos de Factor VIII, los individuos que padecen del Factor VIII requieren inyecciones regulares del concentrado de Factor VIII a lo largo de sus vidas.

Se dispone de varias formas comerciales de concentrados de Factor VIII para brindar terapia de reemplazo para pacientes que padecen de hemofilia A. Por ejemplo, los productos de concentrado de Factor VIII obtenidos a partir de sangre vendidos bajo las marcas comerciales Hemofil® M (Baxter, Deerfield, IL), Koate®-DVI (Bayer, Research Triangle Park, NC), Monarc-M™ (Cruz Roja Norteamericana, Washington, D.C.), y Monoclalte-P® (Aventis,

Bridgewater, NJ). Con respecto a concentrados de Factor VIII preparados en forma recombinante, se proveen productos comerciales bajo las marcas Helixate® FS (Aventis, Bridgewater, NJ), Kogenate FS® (Bayer, Research Triangle Park, NC), Recombinate® (Baxter, Deerfield, IL), Advate® (Baxter, Deerfield, IL), y ReFacto® (Wyeth/Genetics Institute, Cambridge, MA).

En términos generales, las fuentes recombinantes de concentrados de Factor VIII son más favorecidas con respecto a las fuentes obtenidas de sangre debido a que ésta última implica el riesgo de transmisión de virus y/u otras enfermedades asociadas con la donación de sangre. Aunque las formulaciones basadas en productos recombinantes evitan estos inconvenientes, el procesamiento de productos basados en recombinantes con frecuencia requiere la presencia de ciertas proteínas tales como albúmina, las cuales están inevitablemente presentes en la formulación final administrada al paciente. Con frecuencia, los pacientes que reciben dichas formulaciones desarrollan reacciones alérgicas hacia estas proteínas extrañas. En cualquier caso, los productos derivados de sangre así como los de base recombinante padecen de la desventaja de administración repetida.

La modificación con PEG, o la unión de un derivado de poli(etilenglicol) a una proteína, se ha

descrito como un medio para reducir la antigenicidad así como medios para prolongar el tiempo de vida media *in vivo* de la proteína. Sin embargo, con respecto al Factor VIII, las experiencias previas con la formación de conjugados de
5 proteína-polímero ha demostrado que es de poco valor previsible con respecto a la copulación de un polímero al Factor VIII. Véase patente E.U.A. No. 4,970,300.

A pesar de estas dificultades, se han descrito intentos para preparar composiciones satisfactorias de
10 conjugados de ciertos polímeros con el Factor VIII. Por ejemplo, la patente E.U.A. No. 4,970,300 previamente referida, describe la modificación con PEG del Factor VIII utilizando un derivado de poli(etilenglicol) específico que tiene un peso molecular dentro del intervalo de 500 hasta
15 5000 aproximadamente. Además, la patente E.U.A. No. 6,048,720 describe la protección eficiente contra la degradación en un entorno *in vitro* cuando se conjugan cuatro a cinco filamentos de monometoxi-poli(etilenglicol) con el Factor VIII.

20 Sin embargo, ninguno de estos conjugados descritos ha demostrado solucionar en forma satisfactoria los problemas asociados con las terapias actuales basadas en Factor VIII. Por ejemplo, los conjugados constituidos por polímeros relativamente pequeños (por ejemplo de 5,000
25 daltons aproximadamente o menores) podrían no proveer de

manera adecuada tiempo de vida media *in vivo* extendido y/o respuesta inmune lo suficientemente reducida. Además, es más probable que los conjugados que tienen muchos polímeros individuales unidos al Factor VIII tengan actividad reducida como resultado de los sitios de bloqueo del polímero(s) necesarios para actividad.

Por lo tanto, existe la necesidad en la técnica de proveer conjugados adicionales entre polímeros solubles en agua y porciones que tengan actividad de Factor VIII.

10 Por lo tanto, la presente invención está dirigida a dichos conjugados así como a composiciones que comprenden los conjugados y métodos relacionados como los descritos en la presente invención, los cuales se cree que son novedosos y completamente no sugeridos por la técnica antecedente.

15

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Por consiguiente, es un objetivo primario de esta invención proveer una composición que comprende una pluralidad de conjugados, de preferencia aunque no necesariamente, en el que cada uno tiene de uno a tres polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una porción de Factor VIII, en el cual cada polímero soluble en agua de preferencia tiene un peso molecular promedio

20

25 nominal en el intervalo de más de 5,000 daltons hasta

100,000 daltons aproximadamente.

Es otro objetivo de la invención proveer dicho conjugado en el cual cada uno de los polímeros solubles en agua sea un poli(óxido de alquilenos).

5 Es un objetivo adicional de la invención proveer dicho conjugado en el cual cada uno de los polímeros soluble en agua es un poli(etilenglicol).

Es un objetivo adicional de la invención proveer un conjugado que comprenda una pluralidad de conjugados de
10 porción de Factor VIII mono-sustituida con PEG.

Es incluso un objetivo adicional de la invención proveer un método para preparar conjugados de polímero que comprende los pasos de poner en contacto uno o más polímeros solubles en agua activados, con una porción de
15 Factor VIII bajo condiciones suficientes que den como resultado una pluralidad de conjugados, de preferencia aunque no necesariamente, en el que cada uno tiene uno a tres polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una porción del Factor VIII, en la cual el polímero soluble
20 en agua de preferencia tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de más de 5,000 daltons hasta 150,000 daltons aproximadamente.

Es un objetivo adicional de la invención proveer un método para tratar a un paciente en necesidad de terapia
25 del Factor VIII, que comprende el paso de administrar al

paciente una composición como la descrita en la presente invención, en el cual la composición contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de uno o más de los conjugados.

Es incluso un objetivo adicional de la invención
5 proveer un método para preparar un conjugado de polímero soluble en agua-porción de Factor VIII que comprende el paso de poner en contacto, bajo condiciones de conjugación, una porción del Factor VIII con un reactivo polimérico.

Los objetivos, ventajas y características
10 novedosas adicionales de la invención se indican en la siguiente descripción, y en parte, se harán evidentes para los expertos en la técnica después de leer lo que sigue, o se pueden aprender practicando la invención.

Entonces, en una modalidad, se provee una
15 composición que comprende una pluralidad de conjugados, de preferencia aunque no necesariamente, en el que cada uno tiene uno a tres polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una porción del Factor VIII, en la cual cada polímero soluble en agua de preferencia tiene un peso
20 molecular promedio nominal en el intervalo de más de 5,000 daltons hasta 150,000 daltons aproximadamente. Aunque se puede utilizar cualquier porción del Factor VIII, se prefiere que las composiciones comprendan el Factor VIII *per se* (como se describe, por ejemplo, en la patente E.U.A.
25 No. 4,757,006), Factor VIIIa (es decir, la forma activada

del Factor VIII que se produce cuando el Factor VIII se pone en contacto con cantidades relativamente pequeñas de trombina), Factor VIII:vWF (es decir, Factor VIII unido al factor de von Willebrand), y/o versiones truncadas del Factor VIII tales como el Factor VIII con dominio B suprimido (como se describe, por ejemplo, en la patente E.U.A. No. 4,868,112).

El polímero o polímeros pueden ser cualquier polímero soluble en agua y la invención no queda limitada en este sentido. Sin embargo, se prefiere que cada polímero presente en el conjugado se seleccione a partir del grupo que consiste de poli(óxido de alquileno), poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico), polioxazolina, poli(acriloilmorfolina), y combinaciones de los mismos. Sin embargo, se prefiere de manera particular, que se utilice en la presente invención un poli(óxido de alquileno) tal como un derivado de poli(etilenglicol) como el polímero.

Los conjugados descritos en la presente invención reducen de manera conveniente la antigenicidad, un problema encontrado por muchos hemofílicos tratados con fuentes exógenas de Factor VIII. Además, los conjugados de la presente invención requieren una frecuencia reducida de dosificación en comparación con las composiciones del Factor VIII que carecen de conjugados. Al reducir la frecuencia de dosificación, los conjugados de manera

conveniente reducen el número de inyecciones dolorosas que los hemofílicos deben enfrentar con el fin de proveer niveles sostenidos de un agente que tenga actividad de Factor VIII.

5 En otra modalidad, se provee un método para preparar un conjugado. El método comprende el paso de poner en contacto uno o más polímeros solubles en agua, activados, (es decir, un reactivo polimérico), que de preferencia tiene un peso molecular promedio nominal en el
10 intervalo de más de 5,000 daltons hasta aproximadamente 150,000 daltons con una porción del Factor VIII. La activación del polímero soluble en agua se puede lograr bajo cualquier método conocido en la técnica en tanto que el polímero resultante, bajo las condiciones adecuadas de
15 pH, temperatura, etc, forme un enlace covalente de manera tal que la porción del Factor VIII quede unida covalentemente al polímero. El poner en contacto dicho uno o más polímeros activados, solubles en agua, con la porción del Factor VIII se efectúa bajo aquellas condiciones
20 requeridas para que el polímero soluble en agua, activado forme un enlace covalente en el sitio deseado en la porción. El método da como resultado una pluralidad de conjugados, de preferencia aunque no necesariamente, en los que cada uno tiene uno a tres polímeros solubles en agua
25 unidos en forma covalente a la porción del Factor VIII. En

algunos casos, el conjugado puede comprender un solo polímero unido a dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más porciones del Factor VIII. De manera opcional, la composición resultante también se puede procesar
5 adicionalmente con el fin de eliminar especies no deseadas tales como, por ejemplo, conjugados que tengan un número indeseado de polímeros. Para remover dichas especies no deseadas, se pueden utilizar técnicas de purificación tales como cromatografía por exclusión de tamaños.

10 Incluso en otra modalidad de la invención, se proveen composiciones que comprenden un conjugado de la invención en combinación con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Las composiciones abarcan todos los tipos de formulaciones y, en particular aquellas
15 que son adecuadas para inyección tales como polvos que se pueden reconstituir, así como líquidos (por ejemplo, suspensiones y soluciones).

En una modalidad adicional de la invención, se provee un método para administrar el conjugado. El método
20 de administración comprende el paso de administrar al paciente una composición como la descrita en la presente invención, en la cual la composición contiene una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado. Típicamente, el paso de administrar la composición que contiene conjugado
25 se efectúa mediante inyección (por ejemplo, inyección

intramuscular, inyección intravenosa, inyección subcutánea, etc).

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

5

La figura 1 es una gráfica de cromatografía por exclusión de tamaños (SEC por sus siglas en inglés) que corresponde a la mezcla de reacción que se forma después de modificar con PEG el Factor VIII con dominio B suprimido
10 utilizando mPEG-SPA, 30K, como se describe en el ejemplo 6.

La figura 2 es una gráfica de SEC que corresponde al conjugado de Factor VIII con dominio B suprimido-PEG que se prepara conjugando la proteína con mPEG-SPA, 30K, como se describe en el ejemplo 6.

15

La figura 3 es una gráfica de SEC que corresponde a la mezcla de reacción que se forma después de modificar con PEG el Factor VIII con dominio B suprimido utilizando mPEG-MAL, 20K, como se describe en el ejemplo 7. Como se puede observar, el rendimiento del producto mono-sustituido
20 con PEG es de aproximadamente 33%.

La figura 4 es una gráfica de SEC que corresponde al conjugado de Factor VIII con dominio B suprimido-PEG que se prepara conjugando la proteína con mPEG-MAL, 20K, como se describe en el ejemplo 7. El conjugado purificado es
25 aproximadamente 94% de monómero de PEG.

La figura 5 es una gráfica de SEC que corresponde a la mezcla de reacción que se forma después de modificar con PEG el Factor VIII con dominio B suprimido utilizando mPEG-SMB, 30K, como se describe en el ejemplo 8. El
5 rendimiento de proteína mono-sustituida con PEG (1-mero) es de aproximadamente 41%.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10 Antes de describir la presente invención con mayor detalle, se debe entender que esta invención no queda limitada a los polímeros particulares, técnicas de síntesis, porciones del Factor VIII, y similares, debido a que éstos pueden variar.

15 Se debe indicar que, tal como se utiliza en esta descripción y en las reivindicaciones pretendidas, las formas en singular "un(a)" "uno(a)", y "el(la)" incluyen las referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario. De esta manera, por ejemplo, la
20 referencia a "un polímero" incluye un solo polímero así como dos o más polímeros iguales o diferentes, la referencia a un "excipiente opcional" se refiere a un solo excipiente opcional así como dos o más excipientes opcionales iguales o diferentes, y similares.

25 Para describir y reclamar la presente invención,

se utiliza la siguiente terminología de conformidad con las definiciones descritas a continuación.

"PEG", "polietilenglicol" y "poli(etilenglicol)" tal como se utilizan en la presente invención son
5 intercambiables y pretenden abarcar cualquier poli(óxido de etileno) soluble en agua. Típicamente, los PEG para ser utilizados de conformidad con la invención comprenden la siguiente estructura $\text{-O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-}$ en la cual (n) es 2 a 4,000. Tal como se utiliza en la presente invención, PEG
10 también incluye $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-O(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-}$ y $\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}_n\text{-}$, dependiendo de que se hayan desplazado o no los oxígenos terminales. A través de toda la descripción y reivindicaciones, se debe recordar que el término "PEG" incluye estructuras que tienen diversos grupos terminales o
15 "bloqueadores de extremo" etcétera. El término "PEG" también significa un polímero que contiene una mayoría, es decir, más del 50%, de subunidades $\text{-OCH}_2\text{CH}_2\text{-}$ repetitivas. Con respecto a las formas específicas, el PEG puede tomar cualquier número de una variedad de pesos moleculares, así
20 como estructuras o geometrías tales como "ramificada", "lineal", "en horquilla", "multifuncional", y similares, que serán descritas con mayor detalle más adelante.

Los términos "con extremos bloqueados" y "bloqueado en los extremos terminales" se utilizan de
25 manera intercambiable en la presente invención para hacer

referencia a un extremo terminal o punto final de un polímero que tiene una porción bloqueadora de extremo. Típicamente, aunque no necesariamente, la porción bloqueadora de extremo comprende un grupo hidroxilo o alcoxi de C_{1-20} , de manera más preferida un grupo alcoxi de C_{1-10} , y más preferido aún un grupo alcoxi de C_{1-5} . Por lo tanto, los ejemplos de porciones bloqueadoras de extremo incluyen alcoxi (por ejemplo, metoxi, etoxi y benciloxi), así como arilo, heteroarilo, ciclo, heterociclo, y similares. Se debe recordar que la porción bloqueadora de extremo puede incluir uno o más átomos del monómero terminal en el polímero [por ejemplo, la porción bloqueadora de extremo "metoxi" en $CH_3(OCH_2CH_2)_n-$]. Además, se contemplan las formas saturada, insaturada, sustituida y no sustituida de cada uno de los anteriores. Asimismo, el grupo bloqueador de extremo también puede ser un silano. El grupo bloqueador de extremo puede también comprender de manera conveniente una marca detectable. Cuando el polímero tiene un grupo bloqueador de extremo que comprende una marca detectable, se puede determinar la cantidad o ubicación del polímero y/o la porción (por ejemplo agente activo) a la cual está copulado el polímero utilizando un detector apropiado. Dichas marcas incluyen, sin limitación, agentes fluorescentes, agentes quimio-luminiscentes, porciones utilizadas en el marcado de enzimas, agentes colorimétricos

(por ejemplo, colorantes), iones metálicos, porciones radioactivas, y similares. Los detectores apropiados incluyen fotómetros, películas, espectrómetros, y similares. El grupo bloqueador de extremo también puede
5 comprender de manera conveniente un fosfolípido. Cuando el polímero tiene un grupo bloqueador de extremo que comprende un fosfolípido, se imparten al polímero y al conjugado resultante propiedades únicas. Los fosfolípidos de ejemplo incluyen, sin limitación, aquellos que se seleccionan a
10 partir de la clase de fosfolípidos denominados fosfatidilcolinas. Los fosfolípidos específicos incluyen, sin limitación, aquellos que se seleccionan a partir del grupo que consiste de dilauroilfosfatidilcolina, dioleilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina,
15 diestearoilfosfatidilcolina, behenoilfosfatidilcolina, araquidoilfosfatidilcolina, y lecitina.

"No presente en la naturaleza" con respecto a un polímero como el descrito en la presente invención, significa un polímero que en su totalidad no se encuentra
20 en la naturaleza. Sin embargo, un polímero de la invención que no se presente en la naturaleza, puede contener uno o más monómeros o segmentos de monómeros que se encuentran en la naturaleza, en tanto que la estructura total del polímero no se encuentre en la naturaleza.

25 El término polímero "soluble en agua" tal como en

"polímero soluble en agua" es cualquier polímero que sea soluble en agua a temperatura ambiente. Típicamente, un polímero soluble en agua transmite por lo menos 75% aproximadamente, más preferido por lo menos 95% aproximadamente, de la luz transmitida por la misma solución después de filtrar. En una base en peso, un polímero soluble en agua de preferencia será soluble en agua por lo menos en un 35% aproximadamente (en peso), más preferido soluble en agua por lo menos en un 50% (en peso) aproximadamente, más preferido aún soluble en agua en un 70% (en peso) aproximadamente, y de manera incluso más preferida soluble en agua en un 85% (en peso) aproximadamente. Sin embargo, es más preferido que el polímero soluble en agua sea soluble en agua en un 95% (en peso) aproximadamente o completamente soluble en agua.

"Peso molecular promedio nominal" en el contexto de un polímero soluble en agua, no presente en la naturaleza tal como PEG, se refiere al peso molecular promedio en masa del polímero, que se determina típicamente mediante cromatografía por exclusión de tamaño, MALDI (desorción/ionización de láser asistida por matriz), técnicas de dispersión de luz, o determinación de velocidad intrínseca en 1,2,4-triclorobenceno. Los polímeros de la invención típicamente son polidispersos, poseyendo valores de polidispersidad bajos de preferencia menores de 1.2

aproximadamente, más preferido menores de 1.15
aproximadamente, incluso más preferido menores de 1.10
aproximadamente, más preferido aún menores de 1.05
aproximadamente, y de manera más preferida menores de 1.03
5 aproximadamente.

El término "activo" o "activado" cuando se
utiliza en conjunto con un grupo funcional particular, se
refiere a un grupo funcional reactivo que reacciona
fácilmente con un electrófilo o un nucleófilo en otra
10 molécula. Esto está en oposición a aquellos grupos que
requieren de catalizadores fuertes o de condiciones de
reacción bastante imprácticas para que reaccionen (es
decir, un grupo "no reactivo" o "inerte").

Tal como se utiliza en la presente invención, el
15 término "grupo funcional" o cualquier sinónimo del mismo
pretende abarcar formas protegidas del mismo así como
formas no protegidas.

Los términos "enlazamiento" o "enlazador" se
utilizan en la presente invención para referirse a un átomo
20 o un grupo de átomos utilizado en forma opcional para ligar
porciones que se conecten entre sí tales como un extremo
terminal de un segmento de polímero y una porción del
Factor VIII o un electrófilo o nucleófilo de una porción
del Factor VIII. El enlazador de la invención puede ser
25 hidrolíticamente estable o puede incluir un enlace

fisiológicamente hidrolizable o que se pueda degradar enzimáticamente.

"Alquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo, que típicamente varía desde 1 hasta 15 átomos de longitud aproximadamente. Dichas cadenas de hidrocarburo de preferencia, pero no necesariamente, están saturadas y pueden ser cadenas rectas o ramificadas, aunque típicamente se prefiere la cadena recta. Los grupos alquilo de ejemplo incluyen metilo, etilo, propilo, butilo, pentilo, 1-metilbutilo, 1-etilpropilo, 3-metilpentilo, y similares. Tal como se utiliza en la presente invención, "alquilo" incluye cicloalquilo así como alquilo que contiene cicloalquileno.

"Alquilo inferior" se refiere a un grupo alquilo que contiene de 1 hasta 6 átomos de carbono, y puede ser de cadena recta o ramificado, como queda ejemplificado por metilo, etilo, n-butilo, i-butilo, y t-butilo.

"Cicloalquilo" se refiere a una cadena de hidrocarburo cíclica saturada o no saturada, incluyendo compuestos con estructura en puente, fusionados, o espirocíclicos, de preferencia constituidos por 3 a 12 átomos de carbono aproximadamente, de manera más preferida de 3 a 8 átomos de carbono aproximadamente. "Cicloalquileno" se refiere a un grupo cicloalquilo que está insertado en una cadena alquilo mediante unión de la cadena en cualesquiera dos átomos de carbono en el sistema de

anillo cíclico.

"Alcoxi" se refiere a un grupo -O-R, en el cual R es alquilo o alquilo sustituido, de preferencia alquilo de C₁₋₆ (por ejemplo, metoxi, etoxi, propiloxi, etc.)

5 El término "sustituido" tal como por ejemplo, en "alquilo sustituido", se refiere a una porción (por ejemplo un grupo alquilo) sustituido con uno o más sustituyentes no interferentes, tales como, pero sin limitarse a: alquilo, cicloalquilo de C₃₋₈, por ejemplo, ciclopropilo, 10 ciclobutilo, y similares; halógeno, por ejemplo, fluoro, cloro, bromo, y yodo; ciano; alcoxi, fenilo inferior; fenilo sustituido; y similares. "Arilo sustituido" es arilo que tiene uno o más grupos no interferentes como un sustituyente. Para las sustituciones en un anillo fenilo, 15 los sustituyentes pueden estar en cualquier orientación (es decir, orto, meta, o para).

"Sustituyentes no interferentes" son aquellos grupos que, cuando están presentes en una molécula, típicamente son no reactivos con otros grupos funcionales 20 contenidos dentro de la molécula.

"Arilo" significa uno o más anillos aromáticos, cada uno de 5 ó 6 átomos de carbono centrales. Arilo incluye anillos arilo múltiples que pueden estar fusionados, como en naftilo, o no fusionados, como en 25 bifenilo. Los anillos arilo también pueden estar fusionados

o no fusionados con uno o más anillos de hidrocarburo cíclico, heteroarilo, o heterocíclicos. Tal como se utiliza en la presente invención, "arilo" incluye heteroarilo.

"Heteroarilo" es un grupo arilo que contiene de uno a cuatro heteroátomos, de preferencia azufre, oxígeno o nitrógeno, o una combinación de los mismos. Los anillos heteroarilo también pueden estar fusionados con uno o más anillos de hidrocarburo cíclicos, heterocíclicos, arilo o heteroarilo.

"Heterociclo" o "heterocíclico" significa uno o más anillos de 5-12 átomos, de preferencia 5-7 átomos, con o sin insaturación o carácter aromático y que tiene por lo menos un átomo de anillo que no es un carbono. Los heteroátomos preferidos incluyen azufre, oxígeno, y nitrógeno.

"Heteroarilo sustituido" es heteroarilo que tiene como sustituyentes uno o más grupos no interferentes.

"Heterociclo sustituido" es un heterocíclico que tiene una o más cadenas laterales formadas a partir de sustituyentes no interferentes.

"Electrófilo" y "grupo electrofílico" se refieren a un ión o átomo o grupo de átomos, que puede ser iónico, que tienen un centro electrofílico, es decir, un centro que busca electrones, que puede reaccionar con un nucleófilo.

"Nucleófilo" y "grupo nucleofílico" se refieren a

un ión o átomo o grupo de átomos que puede ser iónico, que tienen un centro nucleofílico, es decir, un centro que busca un centro electrofílico o que tenga un electrófilo.

Un enlace "fisiológicamente dissociable" o "que se pueda hidrolizar" o "degradable" es un enlace que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) bajo condiciones fisiológicas. Son preferidos los enlaces que tienen un tiempo de vida media de hidrólisis a pH 8 y 25°C menor de 30 minutos aproximadamente. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua depende no solamente del tipo general de enlazamiento que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes unidos a estos átomos centrales. Los enlazamientos apropiados hidrolíticamente inestables o débiles incluyen, pero no se limitan a, éster carboxilato, éster fosfato, anhídridos, acetales, cetales, éter aciloxi-alquílico, iminas, ortoésteres, péptidos y oligonucleótidos.

Un "enlazamiento susceptible de degradación enzimática" significa un enlazamiento que está sujeto a degradación mediante una o más enzimas.

Un enlazamiento o enlace "hidrolíticamente estable" se refiere a un enlace químico, típicamente un enlace covalente, que es sustancialmente estable en agua, es decir, que no experimenta hidrólisis bajo condiciones fisiológicas en ningún grado apreciable a lo largo de un

intervalo prolongado de tiempo. Los ejemplos de enlaces hidrolíticamente estables incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: enlaces carbono-carbono (por ejemplo en cadenas alifáticas), éteres, amidas, uretanos, y similares.

5 En términos generales, un enlace hidrolíticamente estable es aquel que presenta una velocidad de hidrólisis menor de 1-2% aproximadamente por día bajo condiciones fisiológicas. Las velocidades de hidrólisis de enlaces químicos representativos se pueden encontrar en la mayoría de libros
10 de texto de química normales.

"Excipiente o vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a un excipiente que puede ser incluido opcionalmente en las composiciones de la invención y que no ocasiona efectos toxicológicos adversos
15 significativos al paciente. "Cantidad farmacológicamente efectiva", "cantidad fisiológicamente efectiva", y "cantidad terapéuticamente efectiva" se utilizan de manera intercambiable en la presente invención para indicar la cantidad de un conjugado de polímero-porción de Factor VIII
20 que es necesaria para proveer un nivel deseado del conjugado (o de la porción de Factor VIII sin conjugar correspondiente) en el torrente sanguíneo o en el tejido objetivo. La cantidad precisa depende de numerosos factores, por ejemplo, la porción de Factor VIII
25 particular, los componentes y características físicas de la

composición terapéutica, población de pacientes pretendida, consideraciones individuales del paciente, y similares, y ésta puede ser determinada fácilmente por el experto en la técnica, tomando como base la información suministrada en la presente invención.

"Multifuncional" significa un polímero que tiene 3 o más grupos funcionales contenidos en el mismo, en el cual los grupos funcionales pueden ser iguales o diferentes. Los reactivos poliméricos multifuncionales de la invención típicamente contienen desde 3 hasta 100 grupos funcionales, o desde 3 hasta 50 grupos funcionales, o desde 3 hasta 25 grupos funcionales, o desde 3 hasta 15 grupos funcionales, o desde 3 hasta 10 grupos funcionales, o pueden contener 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 grupos funcionales dentro de la estructura base del polímero.

El término "porción de Factor VIII", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a una porción que tiene actividad de factor VIII. La porción de factor VIII también puede tener por lo menos un grupo electrofílico o grupo nucleofílico adecuado para reacción con un reactivo polimérico. Típicamente, aunque no necesariamente, la porción de Factor VIII es una proteína. Además, el término "porción de Factor VIII" abarca tanto a la porción de Factor VIII antes de la conjugación así como al residuo de la porción de Factor VIII después de la

conjugación. Como se explica con mayor detalle más adelante, el experto en la técnica puede determinar si una porción dada tiene o no actividad de Factor VIII.

El término "paciente", se refiere a un organismo vivo que padece o está propenso a una condición que se puede evitar o tratar mediante administración de un agente activo (por ejemplo, conjugado), e incluye tanto humanos como animales.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que la circunstancia subsiguiente descrita se puede presentar o no, de modo tal que la descripción incluye casos en los cuales se presente la circunstancia y casos en las que no se presente.

Los residuos de aminoácido en los péptidos se abrevian de la siguiente manera: fenilalanina es Phe o F; leucina es Leu o L; isoleucina es Ile o I; metionina es Met o M; valina es Val o V; serina es Ser o S; prolina es Pro o P; treonina es Thr o T; alanina es Ala o A; tirosina es Tyr o Y; histidina es His o H; glutamina es Gln o Q; asparagina es Asn o N; lisina es Lys o K; ácido aspártico es Asp o D; ácido glutámico es Glu o E; cisteína es Cys o C; triptófano es Trp o W; arginina es Arg o R; y glicina es Gly o G.

Volviendo entonces a una primera modalidad de la invención, se provee una composición que comprende una pluralidad de conjugados, de preferencia aunque no

27

77

necesariamente, en los que cada uno tiene uno a tres polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una porción del Factor VIII, en la cual cada uno de los polímeros solubles en agua de preferencia tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de más de 5,000 daltons hasta 150,000 daltons aproximadamente.

El Factor VIII original es una glucoproteína de cadena individual, de 2,351 aminoácidos, que está organizada estructuralmente como A1-A2-B-A3-C1-C2. La secuencia de 2,351 aminoácidos expresada se provee como SEQ ID. NO: 1. Sin embargo, cuando el polipéptido expresado se transloca al interior del lumen del retículo endoplasmático, se corta una secuencia de señal de 19 aminoácidos, lo que da como resultado una segunda secuencia. Esta segunda secuencia, provista en la presente invención como SEQ ID. NO: 2, carece de los 19 aminoácidos guía y es utilizada en forma convencional por los investigadores para asignar una ubicación numérica (por ejemplo Arg³⁷²) a un residuo de aminoácido dado del Factor VIII. Por lo tanto, a menos que se indique de manera específica, todas las asignaciones de una ubicación numérica de un residuo de aminoácido como las provistas en la presente invención se basan en SEQ ID. NO: 2.

En presencia de cantidades relativamente pequeñas de trombina, el Factor VIII es cortado por la trombina en

Arg³⁷², Arg⁷⁴⁰, y Arg¹⁶⁸⁹ para producir el Factor VIIIfa. El Factor VIIIfa es un heterotrímero constituido por la sub-unidad A1 unida (mediante un ión cobre) a la cadena ligera A3-C1-C2 cortada por trombina y a la sub-unidad A2 libre unida mediante interacciones iónicas a A1. Se apreciará que una porción del Factor VIII no queda limitada a únicamente formas "activas" del Factor VIII (por ejemplo, Factor VIIIfa) y que el término "porción de Factor VIII" abarca formas "precursoras" así como otras sustancias que tienen un efecto pro-coagulante similar.

Para cualquier porción dada, es posible determinar si dicha porción tiene o no actividad de Factor VIII. Por ejemplo, se han generado intencionalmente varias líneas de animales con la mutación genética para hemofilia de modo tal que un animal que se produzca a partir de dicha línea tenga niveles muy bajos e insuficientes del Factor VIII. Dichas líneas se pueden conseguir a partir de una variedad de fuentes tales como, sin limitación, la División de Laboratorios e Investigación, Departamento de Salud Pública de Nueva York, Albany, NY y el Departamento de Patología, Universidad de Carolina del Norte, Chapel Hill, NC. Ambas fuentes, por ejemplo, proveen caninos que padecen de hemofilia A canina. Con el fin de evaluar la actividad de Factor VIII de cualquier porción dada en cuestión, la porción se inyecta en el animal enfermo, se hace una

pequeña incisión y se compara el tiempo de sangrado con un control saludable. Otro método útil para determinar la actividad de Factor VIII es determinar la actividad de cofactor y pro-coagulante. Véase, por ejemplo, Mertens et al. (1993) *Brit. J. Haematol.* 85:133-42. También se pueden utilizar otros métodos conocidos por el experto en la técnica para determinar si una porción dada tiene o no actividad de Factor VIII. Dichos métodos son útiles para determinar la actividad de Factor VIII tanto de la porción misma (y por lo tanto se puede utilizar como una "porción de Factor VIII") así como la del conjugado polímero-porción correspondiente.

Los ejemplos no limitativos de porciones del Factor VIII incluyen los siguientes: Factor VIII; Factor VIIIA; Factor VIII:C; Factor VIII:vWF; Factor VIII con dominio B suprimido (y otras versiones truncadas del Factor VIII); proteínas híbridas, tales como aquellas descritas en la patente E.U.A. No. 6,158,888; proteínas glucosiladas que tienen actividad de Factor VIII, tales como aquellas descritas en la publicación de solicitud de patente E.U.A. No. US2003/0077752; e imitadores de péptido que tienen actividad de Factor VIII. Las versiones del Factor VIII truncadas preferidas (abarcadas por el término "Factor VIII con dominio B suprimido") corresponden a una proteína que tiene la secuencia de aminoácido del Factor VIII de humano

(SEQ. ID. NO: 1) que tienen una delección correspondiente a por lo menos 581 aminoácidos dentro de la región entre Arg⁷⁵⁹ y Ser¹⁷⁰⁹, más preferido en la cual la delección corresponde a una de la región entre Pro¹⁰⁰⁰ y Asp¹⁵⁸², la
5 región entre Thr⁷⁷⁸ y Pro¹⁶⁵⁹, y la región entre Thr⁷⁷⁸ y Glu¹⁶⁹⁴. Los fragmentos, variantes de delección, variantes de sustitución o variantes de adición biológicamente activas de cualquiera de las anteriores que mantengan por lo menos cierto grado de actividad de Factor VIII también pueden
10 servir como una porción del Factor VIII.

La porción que tiene actividad de Factor VIII se puede modificar de manera conveniente para que incluya uno o más residuos de aminoácido tales como, por ejemplo, lisina, cisteína y/o arginina, con el fin de proveer la
15 unión fácil del polímero a un átomo dentro de la cadena lateral del aminoácido. Las técnicas para agregar residuos de aminoácido son bien conocidas por los expertos en la técnica. Se hace referencia a J. March, Advanced Organic Chemistry; Reactions Mechanisms and Structure, 4^a Ed. (New
20 York: Wiley-Interscience, 1992).

La porción de Factor VIII se puede obtener a partir de fuentes derivadas de sangre. Por ejemplo, el Factor VIII se puede fraccionar a partir de plasma de humano utilizando técnicas de precipitación y
25 centrifugación conocidas por los expertos en el campo.

Véase, por ejemplo, Wickerhauser (1976) *Transfusion* 16(4): 345-350 y Slichter et al. (1976) *Transfusion* 16(6):616-626.

El Factor VIII también se puede aislar a partir de granulocitos de humano. Véase Szmitkowski et al. (1977)

5 *Haematologia (Budap.)* 11(1-2):177-187.

Además, la porción del Factor VIII también se puede obtener a partir de métodos recombinantes. En breve, los métodos recombinantes implican construir el ácido nucleico que codifica para el polipéptido o fragmento
10 deseado, clonar el ácido nucleico en un vector de expresión, transformar una célula hospedera (por ejemplo, bacteria, levadura o célula de mamífero tal como la célula de ovario de hámster chino o la célula de riñón de hámster recién nacido), y expresar el ácido nucleico para producir
15 el polipéptido o fragmento deseado. Los métodos para producir y expresar polipéptidos recombinantes *in vitro* y en células hospederas procariotas y eucariotas son conocidos por el experto en la técnica. Véase, por ejemplo, patente E.U.A. No. 4,868,122.

20 Para facilitar la identificación y purificación del polipéptido recombinante, se pueden insertar secuencias de ácido nucleico que codifiquen para una marca de epítipo u otra secuencia de unión por afinidad, o agregar en marco con la secuencia codificadora, con lo cual se produce una
25 proteína de fusión constituida por el polipéptido deseado y

un polipéptido apropiado para unión. Las proteínas de fusión se pueden identificar y purificar corriendo primero una mezcla que contiene la proteína de fusión a través de una columna de afinidad que tiene porciones de unión (por ejemplo, anticuerpos) dirigidos contra la marca de epítopo u otra secuencia de unión en las proteínas de fusión, con lo cual se une la proteína de fusión dentro de la columna. Después de esto, la proteína de fusión se puede recuperar lavando la columna con la solución apropiada (por ejemplo ácido) para liberar la proteína de fusión unida. El polipéptido recombinante también se puede identificar y purificar lisando las células hospederas, separando el polipéptido, por ejemplo, mediante cromatografía por exclusión de tamaños, y recolectando el polipéptido. Estos y otros métodos para identificar y purificar polipéptidos recombinantes son conocidos por el experto en la técnica.

Las composiciones de la invención pueden comprender una pluralidad de conjugados, cada conjugado constituido por la misma porción de Factor VIII (es decir, dentro de la composición completa, solamente se encuentra un tipo de porción de Factor VIII). Además, la composición puede comprender una pluralidad de conjugados en los cuales cualquier conjugado dado está constituido por una porción que se selecciona a partir del grupo que consiste de dos o más porciones de Factor VIII diferentes (es decir, dentro

de la composición completa, se encuentran dos o más porciones de Factor VIII diferentes). Sin embargo, desde el punto de vista óptimo, sustancialmente todos de la pluralidad de conjugados en la composición (por ejemplo, 5 85% o más de la pluralidad de conjugados en la composición) está constituido cada uno por la misma porción del Factor VIII.

Asimismo, se prefiere que la composición que contiene los conjugados esté libre o sustancialmente libre 10 de albúmina. También se prefiere que la composición esté libre o sustancialmente libre de proteínas que no tengan actividad de Factor VIII. Por lo tanto, se prefiere que la composición esté 85%, de manera más preferida 95%, y más preferido aún 99% libre de albúmina. De manera adicional, 15 se prefiere que la composición esté 85%, más preferido 95%, y más preferido aún 99% libre de cualquier proteína que no tenga actividad de Factor VIII.

Como se discutió previamente, cada conjugado comprende una porción de Factor VIII unida a un polímero 20 soluble en agua. Con respecto al polímero soluble en agua, el polímero soluble en agua es no peptídico, no tóxico, no se presenta en la naturaleza, y es biocompatible. Con respecto a la biocompatibilidad, se considera que una sustancia es biocompatible si los efectos benéficos 25 asociados con el uso de la sustancia sola o con otra

sustancia (por ejemplo, agente activo tal como una porción de Factor VIII) en conexión con tejidos vivos (por ejemplo, administración a un paciente) sobrepasa cualesquiera efectos perjudiciales según es evaluado por un profesional clínico, por ejemplo, un médico. Con respecto a la no antigenicidad, se considera que una sustancia es no antigénica si el uso pretendido de la sustancia *in vivo* no produce una respuesta inmune no deseada (por ejemplo, la formación de anticuerpos) o, si se produce una respuesta inmune, que dicha respuesta no se considere clínicamente significativa o importante según lo evalúe un profesional clínico. Se prefiere en particular que el polímero soluble en agua sea biocompatible y no antigénico.

Además, el polímero típicamente se caracteriza por tener desde 2 hasta 300 extremos terminales aproximadamente. Los ejemplos de dichos polímeros incluyen, pero no se limitan a, poli(alquilenglicoles) tales como polietilenglicol (PEG), poli(propilenglicol) ("PPG"), copolímeros de etilenglicol y propilenglicol y similares, poli(poliol oxietilado), poli(alcohol olefínico), poli(vinilpirrolidona), poli(hidroxiálquilmacetacrilamida), poli(hidroxiálquilmacetacrilato), poli(sacáridos), poli(α -hidroxiácido), poli(alcohol vinílico), polifosfazeno, polioxazolina, poli(N-acrilóilmorfolina), y combinaciones de cualquiera de los anteriores.

El polímero no está limitado en una estructura particular y puede ser lineal (por ejemplo alcoxi PEG o PEG bifuncional), ramificado o de brazos múltiples (por ejemplo, PEG en horquilla o PEG unido a un núcleo de poliol), dendrítico, o con enlaces degradables. Asimismo, la estructura interna del polímero puede estar organizada en cualquiera de un número de patrones diferentes y se puede elegir a partir del grupo que consiste de homopolímero, copolímero alternante, copolímero aleatorio, copolímero en bloque, tri-polímero alternante, tri-polímero aleatorio, y tri-polímero en bloque.

Típicamente, el PEG y otros polímeros solubles en agua se activan con un grupo activador apropiado adecuado para copulación a un sitio deseado en la porción de Factor VIII. Un reactivo polimérico activado posee un grupo reactivo para que reaccione con la porción del Factor VIII. Los reactivos poliméricos representativos y los métodos para conjugar estos polímeros a una porción activa son conocidos en la técnica y se describen con mayor detalle en Zalipsky, S. et al., "Use of Functionalized Poly(Ethylene Glycols) for Modification of Polypeptides" en *Polyethylene Glycol Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications*, J.M. Harris, Plenus Press, New York (1992), y en Zalipsky (1995) *Advanced Drug Reviews* 16:157-182.

Típicamente, el peso molecular promedio nominal

de cualquier polímero dado en el conjugado es desde 100 daltons aproximadamente hasta 150,000 daltons aproximadamente. Sin embargo, los intervalos de ejemplo incluyen pesos moleculares promedio nominales en el
5 intervalo de más de 5,000 daltons hasta 100,000 daltons aproximadamente, en el intervalo de 6,000 daltons aproximadamente hasta 90,000 daltons aproximadamente, en el intervalo de 10,000 daltons aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente, en el intervalo de 20,000 daltons
10 aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente, y en el intervalo de 53,000 daltons aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente. Para cualquier polímero soluble en agua determinado, se prefieren los PEG que tienen estos intervalos de peso molecular.

15 Los pesos moleculares promedio nominales de ejemplo para el segmento de polímero soluble en agua incluyen 100 Daltons aproximadamente, 200 Daltons aproximadamente, 300 Daltons aproximadamente, 400 Daltons aproximadamente, 500 Daltons aproximadamente, 600 Daltons
20 aproximadamente, 700 Daltons aproximadamente, 750 Daltons aproximadamente 800 Daltons aproximadamente, 900 Daltons aproximadamente, 1,000 Daltons aproximadamente, 2,000 Daltons aproximadamente, 2,200 Daltons aproximadamente, 2,500 Daltons aproximadamente, 3,000 Daltons
25 aproximadamente, 4,000 Daltons aproximadamente, 4,400

Daltons aproximadamente, 5,000 Daltons aproximadamente,
 6,000 Daltons aproximadamente, 7,000 Daltons
 aproximadamente, 7,500 Daltons aproximadamente, 8,000
 Daltons aproximadamente, 9,000 Daltons aproximadamente,
 5 10,000 Daltons aproximadamente, 11,000 Daltons
 aproximadamente, 12,000 Daltons aproximadamente, 13,000
 Daltons aproximadamente, 14,000 Daltons aproximadamente,
 15,000 Daltons aproximadamente, 20,000 Daltons
 aproximadamente, 22,500 Daltons aproximadamente, 25,000
 10 Daltons aproximadamente, 30,000 Daltons aproximadamente,
 40,000 Daltons aproximadamente, 50,000 Daltons
 aproximadamente, 60,000 Daltons aproximadamente, y 75,000
 Daltons aproximadamente.

Cuando se utiliza como el polímero, los PEG
 15 típicamente comprenden un número de monómeros $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$.
 Tal como se utiliza a través de toda la descripción, el
 número de unidades repetitivas se identifica mediante el
 subíndice "n" en $(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n$. Por lo tanto, el valor de (n)
 cae típicamente dentro de uno o más de los siguientes
 20 intervalos: desde 2 hasta 2,300 aproximadamente, desde 100
 aproximadamente hasta 2,300 aproximadamente, desde 135
 aproximadamente hasta 2,000 aproximadamente, desde 230
 aproximadamente hasta 1,900 aproximadamente, desde 450
 aproximadamente hasta 1,900 aproximadamente, y desde 1,200
 25 aproximadamente hasta 1,900 aproximadamente. Para cualquier

polímero dado en el cual se conozca el peso molecular, es posible determinar el número de unidades repetitivas (es decir, "n") dividiendo el peso molecular total del polímero entre el peso molecular de la unidad de repetición.

5 Un polímero particularmente preferido para uso en la invención es un polímero con extremo bloqueado, es decir, un polímero que tiene por lo menos un extremo terminal bloqueado con un grupo relativamente inerte, tal como un grupo alcoxi de C₁₋₆ inferior. Cuando el polímero es
10 PEG, por ejemplo, se prefiere utilizar un metoxi-PEG (comúnmente conocido como mPEG), el cual es una forma lineal de PEG en el cual un extremo terminal del polímero es un grupo metoxi (-OCH₃), mientras que el otro extremo terminal es un hidroxilo u otro grupo funcional que
15 opcionalmente se pueda modificar químicamente.

En una forma útil en la presente invención, el PEG libre o no unido es un polímero lineal terminado en cada extremo con grupos hidroxilo:



en la cual (m') típicamente varía desde 0 hasta 4,000 aproximadamente.

El polímero anterior, alfa-,omega-dihidroxilpoli-
25 (etilenglicol), se puede representar en forma breve como

HO-PEG-OH en el cual se entiende que el símbolo -PEG- puede representar la siguiente unidad estructural:



5

en la cual (m') es como se definió anteriormente.

Otro tipo de PEG útil en la presente invención es metoxi-PEG-OH, o mPEG para abreviar, en el cual un extremo terminal es el grupo relativamente inerte metoxi, mientras que el otro extremo terminal es un grupo hidroxilo. La estructura de mPEG se brinda a continuación.

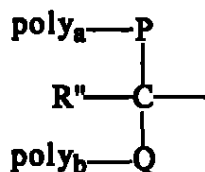
10

15

en la cual (m') es como se describió anteriormente.

También se pueden utilizar moléculas de PEG con brazos múltiples o ramificadas, tales como aquellas descritas en la patente E.U.A. No. 5,932,462, como el polímero de PEG. Por ejemplo, el PEG puede tener la estructura:

20



en la cual:

25

poly_a y poly_b son estructuras base de PEG (ya sea

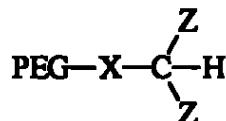
iguales o diferentes), tales como metoxipoli(etilenglicol);

R" es una porción no reactiva, tal como H, metilo o una estructura base de PEG; y

5 P y Q son enlaces no reactivos. En una modalidad preferida, el polímero de PEG ramificado es lisina disustituida con metoxipoli(etilenglicol). Dependiendo de la porción de Factor VIII específica utilizada, se puede modificar adicionalmente el grupo
10 funcional éster reactivo de la lisina disustituida para formar un grupo funcional adecuado para reacción con el grupo objetivo dentro de la porción de Factor VIII.

Estos polímeros pueden ser lineales, o pueden estar en cualquiera de las formas antes descritas.

15 Además, el PEG puede comprender un PEG en horquilla. Un ejemplo de un PEG en horquilla se representa mediante la siguiente estructura:



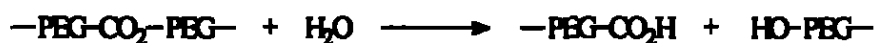
20

en la cual: X es una porción espaciadora de uno o más átomos y cada Z es un grupo terminal activado ligado a CH mediante una cadena de átomos de longitud definida. La solicitud internacional No. PCT/US99/05333, describe varias
25 estructuras de PEG en horquilla que pueden ser utilizadas

en la presente invención. La cadena de átomos que enlazan los grupos funcionales Z al átomo de carbono de ramificación sirven como un grupo de fijación y puede comprender, por ejemplo, cadenas alquilo, cadenas de éter, 5 cadenas de éster, cadenas de amida y combinaciones de las mismas.

El polímero de PEG puede comprender una molécula de PEG colgante que tenga grupos reactivos, tales como carboxilo, unidos covalentemente a lo largo de la longitud 10 del PEG en vez de hacerlo en el extremo de la cadena de PEG. Los grupos reactivos colgantes pueden estar unidos al PEG directamente o a través de una porción espaciadora, tal como un grupo alquileo.

Además de las formas de PEG antes descritas, el 15 polímero también se puede preparar con uno o más enlaces débiles o degradables en el polímero, incluyendo cualquiera de los polímeros antes descritos. Por ejemplo, se puede preparar PEG con enlaces tipo éster en el polímero que se puedan hidrolizar. Como se muestra a continuación, esta 20 hidrólisis da como resultado la disociación del polímero en fragmentos de peso molecular más bajo:



Otros enlaces hidrolíticamente degradables, 25 útiles como un enlace degradable dentro de una estructura

base polimérica, incluyen: enlaces tipo carbonato; enlaces tipo imina que resultan, por ejemplo, de la reacción de una amina y un aldehído (véase, por ejemplo, Ouchi et al. (1997) *Polymer Preprints* 38 (1): 582-3); enlaces tipo éster fosfato que se forman, por ejemplo, haciendo reaccionar un alcohol con un grupo fosfato; enlaces tipo hidrazona los cuales se forman típicamente mediante reacción de una hidrazida y un aldehído; enlaces tipo acetal que típicamente se forman mediante reacción entre un aldehído y un alcohol; enlaces tipo ortoéster que se forman, por ejemplo, mediante reacción entre un formiato y un alcohol; enlaces tipo amida que se forman mediante un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de otra cadena de PEG; enlaces tipo uretano formados a partir de la reacción de, por ejemplo, un PEG con un grupo isocianato terminal y un alcohol de PEG; enlaces tipo péptido formados por un grupo amina, por ejemplo, en un extremo de un polímero tal como PEG, y un grupo carboxilo de un péptido; y enlaces tipo oligonucleótido formados mediante, por ejemplo, un grupo fosforamidita, por ejemplo, en el extremo de un polímero, y un grupo 5' hidroxilo de un oligonucleótido.

Dichas características opcionales del conjugado de polímero, es decir, la introducción de uno o más enlaces degradables en la cadena polimérica, puede proveer el

control adicional sobre las propiedades farmacológicas
deseadas finales del conjugado después de su
administración. Por ejemplo, se puede administrar un
conjugado grande y relativamente inerte (es decir, que
5 tenga una o más cadenas de PEG de alto peso molecular
unidas al mismo, por ejemplo, una o más cadenas de PEG que
tengan un peso molecular mayor de 10,000 aproximadamente,
en el cual el conjugado no posee esencialmente
bioactividad), el cual se hidroliza para generar un
10 conjugado bioactivo que posea una porción de la cadena de
PEG original. De esta manera, se pueden confeccionar de
manera más efectiva las propiedades del conjugado para
equilibrar la bioactividad del conjugado con respecto al
tiempo.

15 Los expertos en la técnica reconocerán que la
discusión anterior concerniente a segmentos de polímero
sustancialmente solubles en agua es de ninguna manera
exhaustiva y es solamente ilustrativa, y que se contemplan
todos los materiales poliméricos que tengan las cualidades
20 antes descritas. Tal como se utiliza en la presente
invención, el término "reactivo polimérico" se refiere en
términos generales a una molécula completa, la cual puede
comprender un segmento de polímero soluble en agua y un
grupo funcional.

25 Como se describió anteriormente, un conjugado de

94

la invención comprende un polímero soluble en agua unido en forma covalente a una porción de Factor VIII. Típicamente, para cualquier conjugado dado, habrá uno a tres polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una o más porciones que tengan actividad de Factor VIII. En algunos casos, sin embargo, el conjugado puede tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más polímeros solubles en agua unidos de manera individual a una porción del Factor VIII.

El enlazamiento particular dentro de la porción que tiene actividad de Factor VIII y el polímero depende de un número de factores. Dichos factores incluyen, por ejemplo, la química del enlazamiento particular empleado, la porción particular que tiene actividad de Factor VIII, los grupos funcionales disponibles dentro de la porción que tiene actividad de Factor VIII (ya sea para unión a un polímero o para conversión hasta un sitio de unión apropiado), la posible presencia de grupos funcionales reactivos adicionales dentro de la porción que tiene actividad de Factor VIII, y similares.

Los conjugados de la invención pueden ser, aunque no necesariamente, profármacos, lo que significa que el enlace entre el polímero y la porción de Factor VIII se puede degradar hidrolíticamente para permitir la liberación de la porción precursora. Los ejemplos de enlaces degradables incluyen éster carboxilato, éster fosfato,

tioléster, anhídridos, acetales, cetales, éter
aciloxialquílico, iminas, ortoésteres, péptidos y
oligonucleótidos. Dichos enlaces se pueden preparar
fácilmente mediante modificación apropiada de cualquiera de
5 la porción del Factor VIII (por ejemplo, el grupo
carboxílico del extremo C terminal de la proteína o un
grupo hidroxilo de cadena lateral de un aminoácido tal como
serina o treonina contenido dentro de la proteína) y/o el
reactivo polimérico utilizando métodos de copulación
10 empleados comúnmente en la técnica. Sin embargo, más
preferido, son enlaces hidrolizables que se forman
fácilmente mediante reacción de un polímero activado de
manera apropiada con un grupo funcional no modificado
contenido dentro de la porción que tiene actividad de
15 Factor VIII.

De manera alternativa, también se puede emplear
un enlace hidrolíticamente estable, tal como una amida,
uretano (también conocido como carbamato), amina, tioéter
(también conocido como sulfuro), o urea (también conocida
20 como carbamida) como el enlazamiento para copular la
porción del Factor VIII. Sin embargo, en algunos casos se
prefiere que el enlazamiento no sea un enlace carbamato ni
tampoco un enlace carbamida, y además, que no se forme
enlace tomando como base la reacción de un derivado
25 polimérico que lleve una especie isocianato o isotiocianato

96

a una porción de Factor VIII. De nuevo, un enlace hidrolíticamente estable preferido es una amida. Una amida se puede preparar fácilmente mediante reacción de un grupo carboxilo contenido dentro de la porción del Factor VIII
5 (por ejemplo, el carboxilo terminal de una porción peptídica que tenga actividad de Factor VIII) con un polímero terminado en amino.

Los conjugados (en oposición a una porción de Factor VIII no conjugada) pueden o no poseer un grado
10 mensurable de actividad de Factor VIII. Es decir, un conjugado de polímero de conformidad con la invención puede tener cualquier valor desde 0.1% aproximadamente hasta 100% aproximadamente o más de bioactividad de la porción de Factor VIII precursora sin modificar. De preferencia, los
15 compuestos que poseen poca o ninguna actividad de Factor VIII típicamente contienen un enlazamiento hidrolizable que conecta el polímero a la porción, de modo que sin tomar en cuenta la falta de actividad en el conjugado, la molécula precursora activa (o un derivado de la misma) se libera
20 después de disociación inducida por medio acuoso del enlazamiento hidrolizable. Dicha actividad se puede determinar utilizando un modelo *in vivo* o *in vitro* apropiado, dependiendo de la actividad conocida de la porción particular que tiene actividad de Factor VIII
25 empleada.

92

Para conjugados que poseen un enlazamiento hidrolíticamente estable que copula la porción que tiene actividad de Factor VIII al polímero, el conjugado típicamente posee un grado mensurable de actividad específica. Por ejemplo, dichos conjugados de polímero se caracterizan típicamente por tener una actividad de por lo menos 2%, 5%, 10%, 15%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 80%, 90%, 95%, 97%, 100%, aproximadamente o más, con relación a la de la porción precursora sin modificar que tiene actividad de Factor VIII, cuando se mide en un modelo apropiado, tal como aquellos bien conocidos en la técnica. De preferencia, los compuestos que tienen un enlazamiento hidrolíticamente estable (por ejemplo, un enlace amida) poseen por lo menos cierto grado de la bioactividad de la porción precursora sin modificar que tiene actividad de Factor VIII.

A continuación se describen conjugados poliméricos de ejemplo de conformidad con la invención, en los cuales la porción que tiene actividad de Factor VIII es una proteína. Típicamente, se espera que dicha proteína comparta (por lo menos en parte) una secuencia de aminoácido similar a la del Factor VIII original. Por lo tanto, aunque se haga referencia a ubicaciones o átomos específicos dentro de la proteína de Factor VIII original, dicha referencia es sólo por conveniencia y el experto en la técnica podrá determinar fácilmente la ubicación o átomo

correspondiente en otras porciones que tengan actividad de Factor VIII. En particular, la descripción provista en la presente invención para el Factor VIII original se puede aplicar al Factor VIIIa, Factor VIII:vWF, y versiones de Factor VIII con dominio B suprimido, así como fragmentos, variantes de delección, variantes de sustitución o variantes de adición de cualquiera de los anteriores.

Los grupos amino en las porciones de Factor VIII proveen un punto de unión entre la porción de Factor VIII y el polímero soluble en agua. El Factor VIII original comprende 158 residuos de lisina que contienen amina (6.8 por ciento en peso de la proteína completa) y un extremo amino terminal. Con respecto al Factor VIIIa, existen 78 residuos de lisina (5.5 por ciento en peso de la proteína completa) y dos extremos amino terminales (que resultan del corte del Factor VIII). Por consiguiente, a pesar de las consideraciones estructurales secundarias y terciarias, tanto el Factor VIII como el Factor VIIIa (así como cualquier porción de Factor VIII peptídicas, por ejemplo, Factor VIII con dominio B suprimido) tienen varias aminas disponibles para que participen en reacciones de conjugación.

Existe un número de ejemplos de reactivos poliméricos solubles en agua apropiados, útiles para formar enlaces covalentes con las aminas disponibles de una

porción de Factor VIII. Los ejemplos específicos, junto con el conjugado correspondiente, se proveen en el siguiente cuadro 1. En el cuadro, la variable (n) representa el número de unidades monoméricas repetitivas y "-NH-F8" representa la porción de Factor VIII después de la conjugación al polímero soluble en agua. Aunque cada porción polimérica presentada en el cuadro 1 termina en un grupo "CH₃", éste puede ser sustituido por otros grupos (tales como H y bencilo).

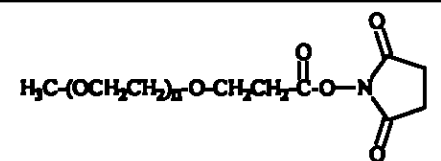
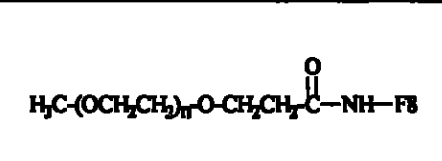
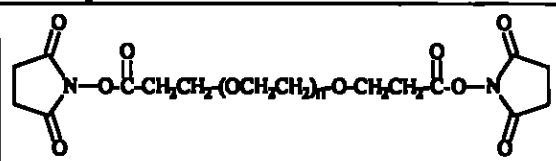
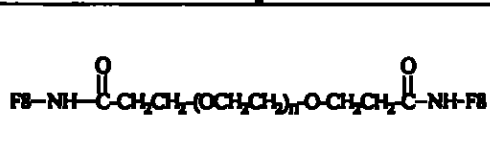
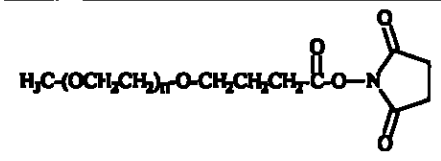
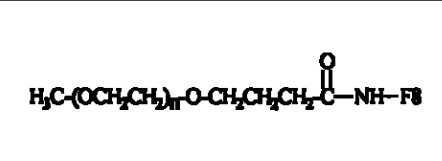
10

CUADRO 1

Reactivos poliméricos específicos de amina y el conjugado de porción de Factor VIII formado a partir de los mismos

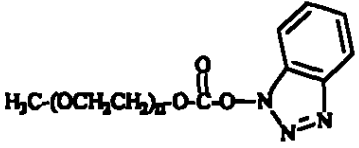
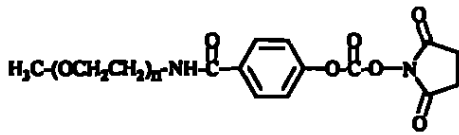
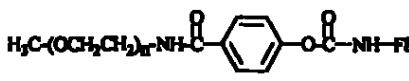
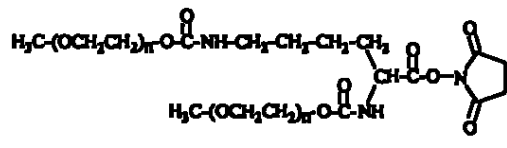
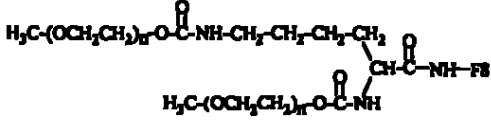
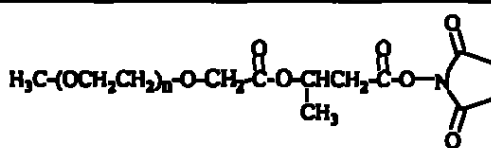
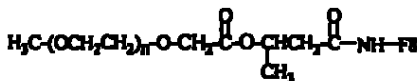
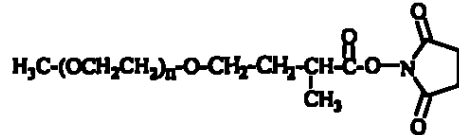
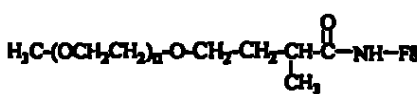
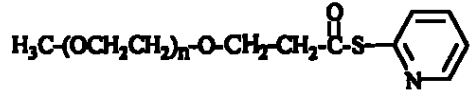
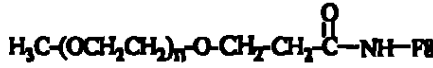
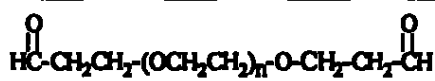
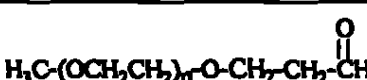
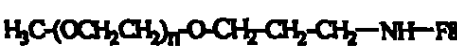
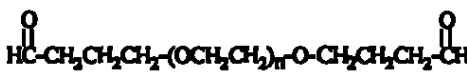
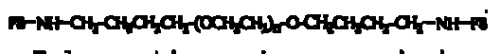
15

20

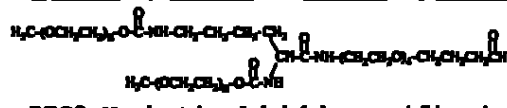
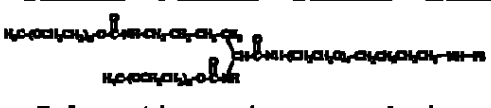
Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
 Propionato de mPEG-succinimidilo	 Enlace tipo amida
 Propionato de PEG-succinimidilo homobifuncional	 Enlaces tipo amida
 Butanoato de mPEG-succinimidilo	 Enlace tipo amida

25

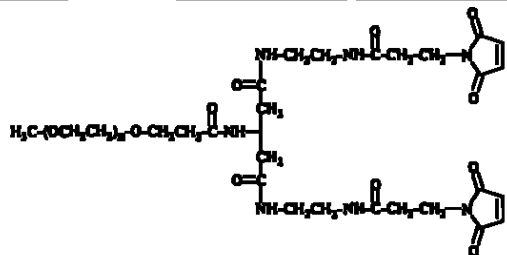
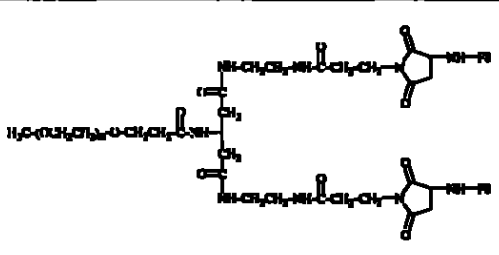
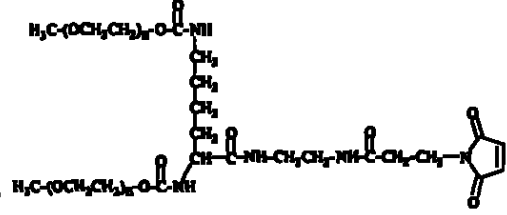
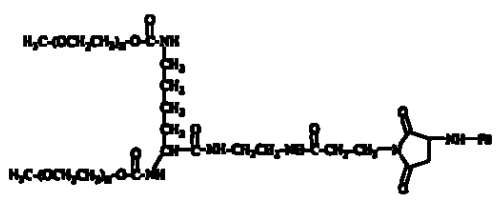
CUADRO 1 (cont.)

	Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
5	 Carbonato de mPEG-benzotriazol	 Enlace tipo carbamato
	 Derivado de mPEG-succinimidilo	 Enlaces tipo amida
10	 mPEG2-N-hidroxisuccinimida ramificado	 Enlace tipo amida
	 Derivado de mPEG-succinimidilo	 Enlace tipo amida
15	 Derivado de mPEG-succinimidilo	 Enlace tipo amida
		 Enlace tipo amida
20	 PEG propionaldehído homobifuncional	 Enlaces tipo amina secundaria
	 mPEG propionaldehído	 Enlaces tipo amina secundaria
25	 PEG butiraldehído homobifuncional	 Enlaces tipo amina secundaria

CUADRO 1 (cont.)

	Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
5	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2CH_2-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}H$ mPEG-butiraldehido	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2CH_2-CH_2-NH-F8$ Enlace tipo amina secundaria
	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2CH_2-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}H$ Derivado de mPEG-butiraldehido	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-(CH_2CH_2O)_4-CH_2CH_2CH_2-CH_2-NH-F8$ Enlace tipo amina secundaria
	 mPEG2-N- butiraldehido ramificado	 Enlace tipo amina secundaria
10	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2\overset{\overset{OCH_2CH_3}{\mid}}{CH}-OCH_2CH_3$ mPEG-acetal	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-NH-F8$ Enlace tipo amina secundaria
	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-N\text{-(ciclohexano)}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}$ mPEG-piperidona	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-N\text{-(ciclohexano)}-NH-F8$ Enlace tipo amina secundaria (a un carbono secundario)
15	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-(CH_2)_{2,5}-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_3$ mPEG-metilcetona	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-(CH_2)_{2,5}-\overset{\overset{NH-F8}{\mid}}{CH}-CH_3$ Enlace tipo amina secundaria (a un carbono secundario)
	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-N\text{-(maleimida)}$ mPEG maleimida "sin enlazador" (bajo ciertas condiciones de reacción tales como pH>8)	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-N\text{-(maleimida)}-NH-F8$ Enlaces tipo amina secundaria
20	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-NH-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_2CH_2-N\text{-(maleimida)}$ Derivado de mPEG maleimida (bajo ciertas condiciones de reacción tales como pH>8)	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-NH-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_2CH_2-N\text{-(maleimida)}-NH-F8$ Enlace tipo amina secundaria
25	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-CH_2CH_2-NH-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_2CH_2-N\text{-(maleimida)}$ Derivado de mPEG maleimida (bajo ciertas condiciones de reacción tales como pH>8)	$H_3C-(OCH_2CH_2)_n-O-CH_2CH_2-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-NH-CH_2CH_2-NH-\overset{\overset{O}{\parallel}}{C}-CH_2CH_2-N\text{-(maleimida)}-NH-F8$ Enlace tipo amina secundaria

CUADRO 1 (cont.)

	Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
5	 Derivado de mPEG en horquilla-maleimida (bajo ciertas condiciones de reacción tales como pH>8)	 Enlaces tipo amina secundaria
10	 Derivado de mPEG2 ramificado-maleimida (bajo ciertas condiciones de reacción tales como pH>8)	 Enlace tipo amina secundaria

15 El experto en la técnica puede obtener la conjugación de un reactivo polimérico a un grupo amino de una porción de Factor VIII sin experimentación indebida. Típico de una estrategia es una reacción de aminación reductiva utilizada, por ejemplo, para conjugar una amina

20 primaria de una porción de Factor VIII con un polímero que tiene grupos funcionales cetona, aldehído o formas hidratadas de los mismos (por ejemplo, hidrato de cetona, hidrato de aldehído). En esta estrategia, la amina primaria proveniente de la porción de Factor VIII reacciona con el

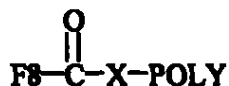
25 grupo carbonilo del aldehído o cetona (o el grupo

hidroxilado correspondiente de un aldehído o cetona hidratada), con lo cual se forma una base de Schiff. La base de Schiff, a su vez, se puede convertir en forma reductiva a un conjugado estable a través del uso de un agente reductor tal como borohidruro de sodio. Son posibles reacciones selectivas (por ejemplo, son posibles en el extremo N-terminal), en particular con un polímero funcionalizado con una cetona o un aldehído ramificado con metilo en la posición alfa y/o bajo condiciones de reacción específicas (por ejemplo, pH reducido).

Los grupos amina preferidos en el Factor VIII que pueden servir como un sitio para unir un polímero incluyen aquellos grupos amina que se encuentran dentro de los siguientes residuos de lisina: Lys⁴⁹³, Lys⁴⁹⁶, Lys⁴⁹⁹, Lys¹⁸⁰⁴, Lys¹⁸⁰⁸, Lys¹⁸¹³, Lys¹⁸¹⁸, Lys²¹⁸³, Lys²²⁰⁷, Lys²²²⁷, Lys²²³⁶, siendo particularmente preferidos Lys⁴⁹⁶, Lys¹⁸⁰⁴, y Lys¹⁸⁰⁸. La numeración corresponde a la secuencia provista en SEQ ID. NO. 2. Como se indicó anteriormente, el grupo amina correspondiente a cada uno de estos residuos lisina en una proteína diferente al Factor VIII de humano puede servir como un sitio útil para conjugación. Además, el extremo N-terminal de cualquier porción de Factor VIII que sea una proteína puede servir como un sitio de unión polimérico.

Los grupos carboxilo representan otro grupo funcional que puede servir como un punto de unión en la

porción de Factor VIII. Desde el punto de vista estructural, el conjugado comprende lo siguiente:



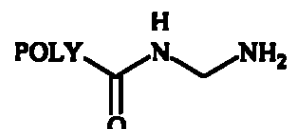
5

en la cual F8 y el grupo carbonilo adyacente corresponden a la porción de Factor VIII que contiene carboxilo, X es un enlace, de preferencia un heteroátomo que se selecciona a partir de O, N(H), y S, y POLY es un polímero soluble en
10 agua tal como PEG, que termina opcionalmente en una porción bloqueadora de extremo.

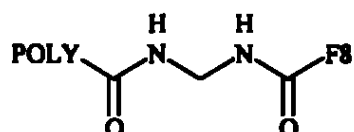
El enlace C(O)-X es el resultado de la reacción entre un derivado polimérico que tiene un grupo funcional terminal y una porción de Factor VIII que contiene
15 carboxilo. Como se discutió anteriormente, el enlace específico depende del tipo de grupo funcional utilizado. Si el polímero tiene grupo funcional de extremo o está "activado" con un grupo hidroxilo, el enlace resultante será un éster de ácido carboxílico y X será O. Si la
20 estructura base del polímero está funcionalizada con un grupo tiol, el enlace resultante será un tioéster y X será S. Cuando se emplean ciertos polímeros de brazos múltiples, ramificados o en horquilla, la porción C(O)X, y en particular la porción X, puede ser relativamente más
25 compleja y puede incluir una estructura de enlazamiento más

larga.

Los derivados solubles en agua que contienen una porción hidrazida también son útiles para conjugación en los grupos carboxilo. Un ejemplo de dicho derivado incluye
5 un polímero que tiene la siguiente estructura:



la cual, después de conjugación con una porción del Factor
10 VIII, tiene la siguiente estructura:



en la cual F8 es la porción de Factor VIII después de la
15 conjugación y POLY es un polímero soluble en agua tal como PEG, que termina opcionalmente en una porción bloqueadora de extremo.

Los grupos tiol contenidos dentro de la porción de Factor VIII pueden servir como sitios efectivos de unión
20 para el polímero soluble en agua. En particular, los residuos cisteína proveen grupos tiol cuando la porción de Factor VIII es una proteína. Los grupos tiol en dichos residuos cisteína se pueden hacer reaccionar después con un PEG activado que sea específico para reacción con grupos
25 tiol, por ejemplo, un polímero de N-maleimidilo u otro

derivado, como se describe en la patente E.U.A. No. 5,739,208 y en la publicación de patente internacional No. WO 01/62827.

Los ejemplos específicos, junto con el conjugado correspondiente, se proveen en el siguiente cuadro 2. En el cuadro, la variable (n) representa el número de unidades monoméricas repetitivas y "S-F8" representa la porción del Factor VIII después que se conjuga al polímero soluble en agua. Aunque cada porción polimérica presentada en el cuadro 1 termina en un grupo "CH₃", éste puede ser sustituido por otros grupos (tales como H y bencilo).

CUADRO 2

Reactivos poliméricos específicos de tiol y el conjugado de porción de Factor VIII formado a partir de los mismos

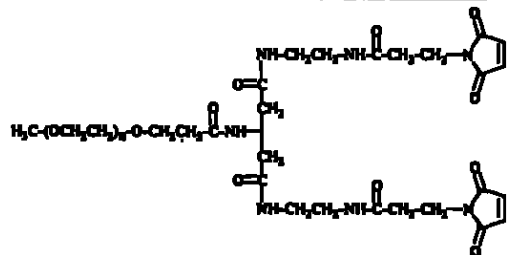
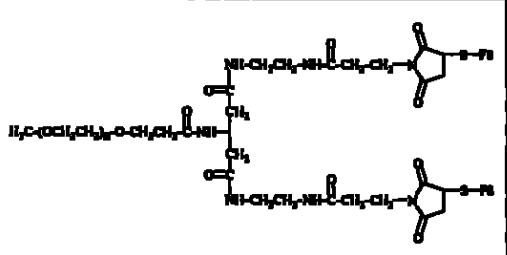
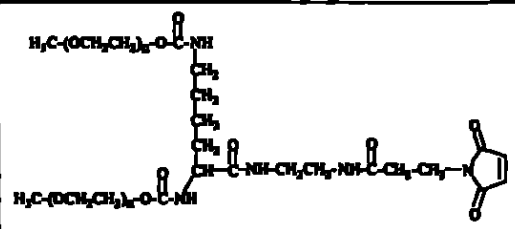
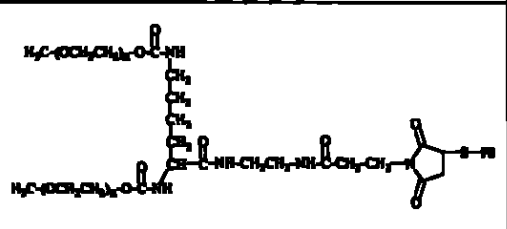
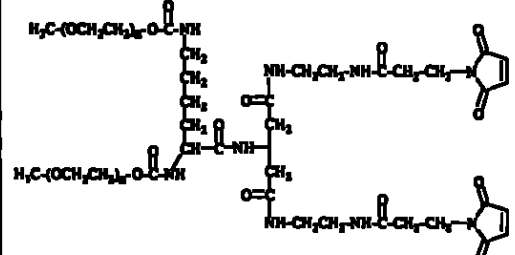
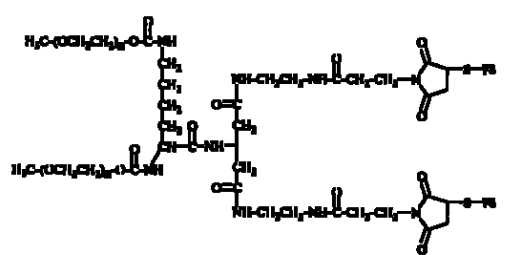
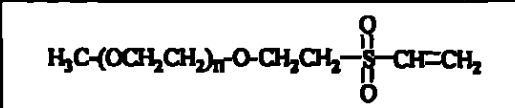
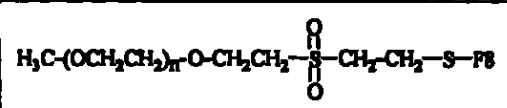
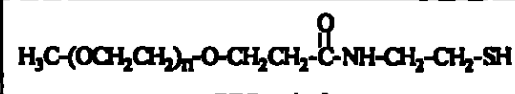
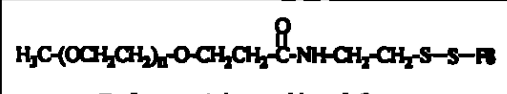
15

20

25

Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ mPEG maleimida "sin enlazador"	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S-F8}$ Enlaces tipo tioéter
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ Derivado de mPEG maleimida	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S-F8}$ Enlace tipo tioéter
$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array}$ Derivado de mPEG maleimida	$\text{H}_3\text{C}-(\text{OCH}_2\text{CH}_2)_n-\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N} \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{C} \\ \parallel \\ \text{O} \end{array} \text{S-F8}$ Enlace tipo tioéter

CUADRO 2 (cont.)

	Reactivo polimérico	Conjugado correspondiente
5	 Derivado de mPEG en horquilla-maleimida	 Enlace tipo tioéter
10	 Derivado de mPEG2-maleimida ramificado	 Enlace tipo tioéter
15	 Derivado de mPEG2 en horquilla-maleimida ramificado	 Enlaces tipo tioéter
	 mPEG vinilsulfona	 Enlace tipo tioéter
20	 mPEG tiol	 Enlace tipo disulfuro

Con respecto a los conjugados que se forman a partir de polímeros solubles en agua que tienen uno o más grupos funcionales maleimida (sin considerar si la maleimida reacciona o no con un grupo amino o tiol en la

porción de Factor VIII), la forma o formas de ácido maleámico correspondientes del polímero soluble en agua también pueden reaccionar con la porción de Factor VIII. Bajo ciertas condiciones (por ejemplo un pH de 7-9

5 aproximadamente y en presencia de agua), el anillo de maleimida se "abre" para formar el ácido maleámico correspondiente. El ácido maleámico, a su vez, puede reaccionar con un grupo amino o tiol de una porción de Factor VIII. Las reacciones basadas en ácido maleámico de

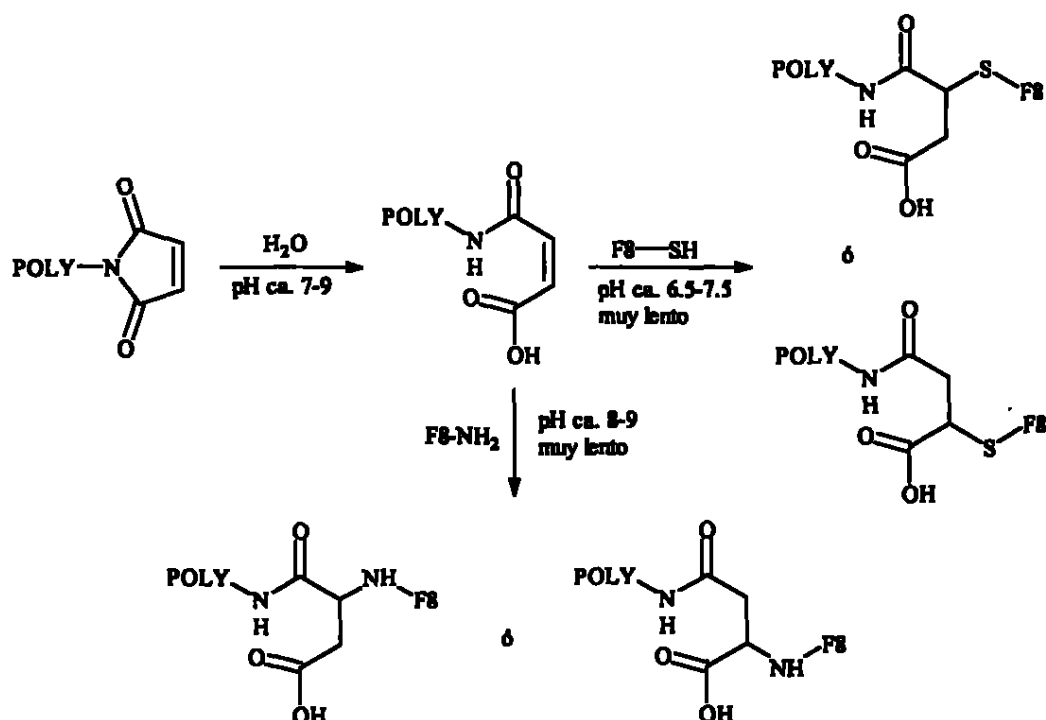
10 ejemplo se muestran a continuación en forma esquemática. POLY representa el polímero soluble en agua, y F8 representa la porción de Factor VIII.

ESQUEMA DE REACCIÓN

15

20

25



Un conjugado representativo de conformidad con la invención puede tener la siguiente estructura:



en la cual POLY es un polímero soluble en agua, L es un
5 enlazador opcional, Z es un heteroátomo que se selecciona a
partir del grupo que consiste de O, NH, y S, e Y se
selecciona a partir del grupo que consiste de alquilo de
C₂₋₁₀, alquilo sustituido de C₂₋₁₀, arilo, y arilo
sustituido. Los reactivos poliméricos que se pueden hacer
10 reaccionar con una porción del Factor VIII y que den como
resultado este tipo de conjugado se describen en la
solicitud co-pendiente presentada el 6 de enero de 2004,
titulada "Thiol Selective Water Soluble Polymer
Derivatives", y a la que se le asigna el número de serie
15 E.U.A. 10/753,047.

Los grupos tiol preferidos en el Factor VIII que
pueden servir como un sitio para unir un reactivo
polimérico incluyen aquellos grupos tiol que se encuentran
dentro de los siguientes residuos cisteína: Cys²⁴⁸, Cys³¹⁰,
20 Cys³²⁹, Cys⁶³⁰, Cys⁶⁹², Cys⁷¹¹, Cys¹⁸⁹⁹, Cys¹⁹⁰³, y Cys²⁰⁰⁰, siendo
particularmente preferidos Cys⁶³⁰, Cys⁷¹¹, y Cys¹⁹⁰³. La
numeración corresponde a la secuencia provista en SEQ. ID.
No. 2.

Con respecto a los reactivos poliméricos,
25 aquellos descritos en la presente invención y en cualquier

otra parte se pueden adquirir a partir de fuentes comerciales (por ejemplo, Nektar Therapeutics, Huntsville AL). Además, los métodos para preparar los reactivos poliméricos se describen en la literatura.

5 Típicamente, aunque no necesariamente, el enlace entre la porción de Factor VIII y el reactivo polimérico incluye uno o más átomos tales como uno o más de carbono, nitrógeno, azufre, y combinaciones de los mismos. De preferencia, el enlace comprende un grupo amida, amina
10 secundaria, carbamato, tioéter, o disulfuro. De manera opcional, átomos adicionales pueden conectar el enlace a la cadena de monómeros repetitivos dentro del reactivo polimérico. Los ejemplos no limitativos de series específicas de átomos que conectan la porción de Factor
15 VIII a la cadena de monómero repetitivos incluyen aquellos que se seleccionan a partir del grupo que consiste de: -O-, -S-, -S-S-, -C(O)-, -O-C(O)-, -C(O)-O-, -C(O)-NH-, -NH-C(O)-NH-, -O-C(O)-NH-, -C(S)-, -CH₂-, -CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -O-CH₂-, -CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-,
20 -CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-, -O-CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-O-CH₂-CH₂-CH₂-, CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-O-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-CH₂-O-,
-C(O)-NH-CH₂-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-CH₂-CH₂-, -CH₂-C(O)-NH-CH₂-CH₂-,
25 -CH₂-CH₂-C(O)-NH-CH₂-, -CH₂-CH₂-CH₂-C(O)-NH-, -C(O)-NH-CH₂-

$\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$
 $\text{CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-}$, $\text{-C(O)-O-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-O-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-O-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-}$
5 $\text{NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-}$
 $\text{NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{C(O)-NH-CH}_2\text{-}$,
 $\text{C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-O-C(O)-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-O-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, -O-
 $\text{C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$,
 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$,
10 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)CH}_2\text{-}$,
 $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-}$
 $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
 $\text{CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH-C(O)-CH}_2\text{-}$, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C(O)-NH-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$
 $\text{NH-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, $\text{-O-C(O)-NH-[CH}_2\text{]}_{0-6}\text{(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_{0-2}\text{-}$, -C(O)-NH-
15 $\text{(CH}_2\text{)}_{1-6}\text{-NH-C(O)-}$, $\text{-NH-C(O)-NH-(CH}_2\text{)}_{1-6}\text{-NH-C(O)-}$, $\text{-O-C(O)-CH}_2\text{-}$,
 $\text{-O-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$, y $\text{-O-C(O)-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$.

Los conjugados típicamente son parte de una
 composición. En general, la composición comprende una
 pluralidad de conjugados, de preferencia aunque no
 20 necesariamente, en el que cada uno tiene uno a tres
 polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una
 porción del Factor VIII. Sin embargo, las composiciones
 también pueden comprender otros conjugados que tengan
 cuatro, cinco, seis, siete, ocho o más polímeros unidos a
 25 cualquier porción dada que tengan actividad de Factor VIII.

11e

Además, la invención incluye casos en los cuales la composición comprende una pluralidad de conjugados, en el que cada conjugado comprende un polímero soluble en agua unido en forma covalente a una porción del Factor VIII, así como composiciones que comprenden dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, o más polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una porción del Factor VIII.

El control del número deseado de polímeros para cualquier porción determinada se puede lograr seleccionando el reactivo polimérico adecuado, la relación de reactivo polimérico a la porción de Factor VIII, temperatura, condiciones de pH, y otros aspectos de la reacción de conjugación. Además, se puede lograr la reducción o eliminación de los conjugados no deseados (por ejemplo, aquellos conjugados que tienen cuatro o más polímeros unidos) a través de medios de purificación.

Por ejemplo, los conjugados de polímero-porción de Factor VIII se pueden purificar para obtener/aislar diferentes especies conjugadas. De manera específica, la mezcla de producto se puede purificar para obtener un promedio de cualquiera de uno, dos, tres, cuatro, cinco o más moléculas de PEG por porción de Factor VIII, típicamente uno, dos o tres PEG por porción de Factor VIII. La estrategia para la purificación de la mezcla de reacción de conjugado final depende de un número de factores,

incluyendo, por ejemplo, el peso molecular del reactivo polimérico empleado, la porción de Factor VIII particular, el régimen de dosificación deseado, y la actividad residual y las propiedades *in vivo* del conjugado o conjugados
5 individuales.

Si se desea, se pueden aislar conjugados que tengan diferentes pesos moleculares utilizando cromatografía por filtración en gel y/o cromatografía de intercambio iónico. Es decir, la cromatografía por
10 filtración en gel se utiliza para fraccionar relaciones de polímero a porción de Factor VIII numerados en forma diferente (por ejemplo, 1-mero, 2-mero, 3-mero, etc, en la cual "1-mero" indica un polímero a porción de Factor VIII, "2-mero" indica dos polímeros a porción de Factor VIII,
15 etc) con base a sus diferentes pesos moleculares (en la cual la diferencia corresponde esencialmente al peso molecular promedio de la porción de polímero soluble en agua). Por ejemplo, en una reacción ejemplar en la cual se conjuga de manera aleatoria una proteína de 100,000 daltons
20 con un reactivo polimérico que tiene un peso molecular de 20,000 daltons aproximadamente, la mezcla de reacción resultante puede contener proteínas sin modificar (que tiene un peso molecular de 100,000 daltons aproximadamente), proteína mono-sustituida con PEG (que
25 tiene un peso molecular de 120,000 daltons

aproximadamente), proteína di-sustituida con PEG (que tiene un peso molecular 140,000 daltons aproximadamente), etc.

Aunque esta estrategia se puede utilizar para separar PEG y otros conjugados de polímero-porción de Factor VIII que tienen pesos moleculares diferentes, esta estrategia por lo general no es efectiva para separar isómeros de posición que tienen sitios de unión a polímero diferentes dentro de la porción de Factor VIII. Por ejemplo, se puede utilizar cromatografía por filtración en gel para separar una de la otra, mezclas de 1-meros, 2-meros, 3-meros, etc, de PEG, aunque cada una de las composiciones de PEG-mero recuperada puede contener moléculas de PEG unidas a grupos amino reactivos diferentes (por ejemplo, residuos de lisina) dentro de la porción de Factor VIII.

Las columnas para filtración en gel apropiadas para efectuar este tipo de separación incluyen columnas Superdex™ y Sephadex™ disponibles de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ). La selección de una columna particular depende del intervalo de fraccionamiento deseado. La elución generalmente se efectúa utilizando una solución amortiguadora apropiada, tal como la de fosfato, acetato, o similares. Las fracciones recolectadas se pueden analizar utilizando un número de métodos diferentes, por ejemplo,

(i) densidad óptica (DO) a 280 nm para contenido de

115

proteína, (ii) análisis de proteína con seroalbúmina de bovino (BSA por sus siglas en inglés), (iii) evaluación de yodo para contenido de PEG (Sims et al. (1980) *Anal. Biochem*, 107:60-63), y (iv) electroforesis en gel de

5 poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS PAGE por sus siglas en inglés), seguido por tinción con yoduro de bario.

La separación de isómeros de posición se efectúa mediante cromatografía de fase inversa utilizando una

10 columna C18 para cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC por sus siglas en inglés) (Amersham Biosciences o Vydac) o mediante cromatografía de intercambio iónico utilizando una columna de intercambio iónico, por ejemplo, una columna de

15 intercambio iónico Sepharose™ disponible de Amersham Biosciences. Se puede utilizar cualquier método para separar isómeros de polímero-agente activo que tengan el mismo peso molecular (isómeros de posición).

Las composiciones de preferencia están

20 sustancialmente libres de proteínas que no tengan actividad de Factor VIII. Además, las composiciones de preferencia están sustancialmente libres de todos los otros polímeros solubles en agua unidos en forma no covalente. Asimismo, por lo menos una especie de conjugado en la composición

25 tiene por lo menos un polímero soluble en agua unido a una

porción que transforma el Factor X en el Factor Xa. En algunas circunstancias, sin embargo, la composición puede contener una mezcla de conjugados de polímero-porción de Factor VIII y Factor VIII sin conjugar.

5 De manera opcional, la composición de la invención también comprende un excipiente farmacéuticamente aceptable. Si se desea, el excipiente farmacéuticamente aceptable se puede agregar a un conjugado para formar una composición.

10 Los excipientes de ejemplo incluyen, sin limitación, aquellos que se seleccionan a partir del grupo que consiste de carbohidratos, sales inorgánicas, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes tensioactivos, soluciones amortiguadoras, ácidos, bases, y combinaciones
15 de los mismos.

Puede estar presente como un excipiente un carbohidrato tal como un azúcar, un derivado de azúcar tal como un alditol, ácido aldónico, un azúcar esterificado, y/o un polímero de azúcar. Los excipientes tipo
20 carbohidrato específicos incluyen, por ejemplo: monosacáridos, tales como fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como rafinosa, melezitosa,
25 maltodextrinas, dextranos, almidones, y similares; y

alditales, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol, sorbitol (glucitol), piranosil-sorbitol, mioinositol, y similares.

El excipiente también puede incluir una sal
5 inorgánica o regulador de pH tal como ácido cítrico, cloruro de sodio, cloruro de potasio, sulfato de sodio, nitrato de potasio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico, y combinaciones de los mismos.

La composición también puede incluir un agente
10 antimicrobiano para prevenir o detener el crecimiento microbiano. Los ejemplos no limitativos de agentes antimicrobianos apropiados para la presente invención incluyen cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, alcohol bencílico, cloruro de cetilpiridinio, clorobutanol,
15 fenol, alcohol feniletílico, nitrato fenilmercúrico, timersol, y combinaciones de los mismos.

También puede estar presente un antioxidante en la preparación. Los antioxidantes se utilizan para evitarla oxidación, con lo cual se evita la deterioración del
20 conjugado o de otros componentes de la preparación. Los antioxidantes apropiados para ser utilizados en la presente invención incluyen, por ejemplo, palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, ácido hipofosforoso, monotioglicerol, galato de propilo,
25 bisulfito de sodio, sulfoxilato sódico de formaldehído,

metabisulfito de sodio, y combinaciones de los mismos.

Puede estar presente un agente tensioactivo como un excipiente. Los agentes tensioactivos de ejemplo incluyen: polisorbatos, tales como "Tween 20" y "Tween 80",
5 y plurónicos tales como F68 y F88 (de los cuales ambos se puede conseguir a partir de BASF, Mount Olive, New Jersey); ésteres de sorbitán; lípidos, tales como fosfolípidos tales como lecitina y otras fosfatidilcolinas, fosfatidiletanol-aminas (aunque de preferencia no en forma liposómica),
10 ácidos grasos y ésteres de ácido graso; esteroides, tales como colesterol; y agentes quelantes, tales como EDTA, zinc y otros cationes apropiados.

En la composición pueden estar presentes como un excipiente ácidos o bases. Los ejemplos no limitativos de
15 ácidos que se pueden utilizar incluyen aquellos ácidos que se seleccionan a partir del grupo que consiste de ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico, ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido fórmico, ácido tricloroacético, ácido nítrico, ácido perclórico, ácido
20 fosfórico, ácido sulfúrico, ácido fumárico, y combinaciones de los mismos. Los ejemplos de bases apropiadas incluyen, sin limitación, bases que se seleccionan a partir del grupo que consiste de hidróxido de sodio, acetato de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio, acetato de
25 amonio, acetato de potasio, fosfato de sodio, fosfato de

119
potasio, citrato de sodio, formiato de sodio, sulfato de sodio, sulfato de potasio, fumarato de potasio, y combinaciones de los mismos.

La cantidad del conjugado (es decir, el conjugado
5 formado entre el agente activo y el reactivo polimérico descrito en la presente invención) en la composición varía en función un número de factores, pero de manera óptima será una dosis terapéuticamente efectiva cuando la composición sea almacén de en un contenedor de dosis
10 unitaria (por ejemplo, un frasco). Además, la preparación farmacéutica se puede alojar en una jeringa. Se puede determinar experimentalmente una dosis terapéuticamente efectiva mediante administración repetida de cantidades cada vez mayores del conjugado con el fin de determinar
15 cuál cantidad produce un punto final clínicamente deseado.

La cantidad de cualquier excipiente individual en la composición puede variar dependiendo de la actividad del excipiente y de las necesidades particulares de la composición. Típicamente, la cantidad óptima de cualquier
20 excipiente individual se determina a través de experimentación de rutina, es decir, preparando composiciones que contengan cantidades variables del excipiente (que varían de bajas a altas), examinando la estabilidad y otros parámetros, y determinando después el
25 intervalo en el cual se logra el desempeño óptimo sin

efectos adversos significativos.

Sin embargo, en términos generales, el excipiente estará presente en la composición en una cantidad de 1% aproximadamente hasta 99% en peso aproximadamente, de preferencia de 5% aproximadamente hasta 98% en peso aproximadamente, más preferido desde 15% aproximadamente hasta 95% en peso aproximadamente del excipiente, siendo más preferidas las concentraciones menores de 30% en peso.

Estos excipientes farmacéuticos anteriores junto con otros excipientes se describen en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19ª ed., Williams & Williams, (1995), "Physician's Desk Reference", 52ª ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998), y Kibbe, A.H., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3ª Ed., American Pharmaceutical Association, Washington, D.C., 2000.

Las composiciones abarcan todo los tipos de formulaciones y en particular aquellas que son adecuadas para inyección, por ejemplo, polvos o liofilizados que se pueden reconstituir así como líquidos. Los ejemplos de diluyentes apropiados para reconstituir composiciones sólidas antes de la inyección incluyen agua bacteriostática para inyección, dextrosa al 5% en agua, solución salina regulada con fosfatos, solución de Ringer, solución salina, agua estéril, agua desionizada, y combinaciones de las mismas. Con respecto a composiciones farmacéuticas líquidas

se contemplan soluciones y suspensiones.

Las composiciones de la presente invención típicamente, aunque no necesariamente, se administran mediante inyección y por lo tanto por lo general son
5 soluciones o suspensiones líquidas inmediatamente antes de la administración. La preparación farmacéutica también puede tomar otras formas tales como jarabes, cremas, ungüentos, tabletas, polvos, y similares. También se incluyen otros modos de administración, tales como
10 pulmonar, rectal, transdérmica, trans-mucosas, oral, intratecal, subcutánea, intra-arterial, etcétera.

La invención también provee un método para administrar un conjugado como el que se provee en la presente invención a un paciente que padece de una
15 condición que responda al tratamiento con conjugado. El método comprende administrar, por lo general mediante inyección, una cantidad terapéuticamente efectiva del conjugado (de preferencia provista como parte de una composición farmacéutica). Como se describió previamente,
20 los conjugados se pueden administrar inyectados por vía parenteral mediante inyección intravenosa, o de manera menos preferida mediante inyección intramuscular o subcutánea. Los tipos de formulación apropiados para administración parenteral incluyen soluciones listas para
25 inyección, polvos secos que se combinan con un solvente

antes del uso, suspensiones listas para inyección, composiciones insolubles secas que se combinan con un vehículo antes del uso, y emulsiones y concentrados líquidos que se diluyen antes de la administración, entre
5 otros.

Se puede utilizar el método de administración para tratar cualquier condición que se pueda aliviar o prevenir mediante administración del conjugado. Los expertos en la técnica aprecian cuáles condiciones puede
10 tratar de manera efectiva un conjugado específico. Por ejemplo, los conjugados se pueden utilizar para tratar individuos que padecen de hemofilia A. Además, los conjugados son adecuados para uso como un profiláctico contra el sangrado no controlado, opcionalmente en
15 pacientes que no padecen de hemofilia. Por ejemplo, el conjugado se puede administrar a un paciente en riesgo de sangrado no controlado antes de la intervención quirúrgica.

La dosis real que será administrada varía en función de la edad, peso, y condición general del individuo
20 así como de la gravedad de la condición bajo tratamiento, el juicio del profesional de cuidado de la salud, y el conjugado que se está administrando. Las cantidades terapéuticamente efectivas son conocidas por el experto en la técnica y/o se describen en los textos de referencia y
25 literatura pertinentes. En general, una cantidad

terapéuticamente efectiva varía desde 0.001 mg hasta 100 mg aproximadamente, de preferencia en dosis de 0.01 mg/día hasta 75 mg/día, y de manera más preferida en dosis de 0.10 mg/día hasta 50 mg/día.

5 La dosis unitaria de cualquier conjugado determinado (de nuevo, de preferencia suministrado como parte de una preparación farmacéutica) se puede administrar en una variedad de programas de dosificación que dependen de el juicio del médico, las necesidades del paciente,
10 etcétera. El programa de dosificación específico puede ser conocido por los expertos en la técnica o se puede determinar en forma experimental utilizando métodos de rutina. Los programas de dosificación de ejemplo incluyen, sin limitación, administración cinco veces por día, cuatro
15 veces por día, tres veces por día, dos veces por día, una vez por día, tres veces por semana, dos veces por semana, una vez por semana, dos veces al mes, una vez al mes, y cualquier combinación de los mismos. Una vez que se obtiene el punto final clínico, se detiene la dosificación de la
20 composición.

Una ventaja de administrar ciertos conjugados de la presente invención es que se pueden cortar porciones individuales del polímero soluble en agua. Dicho resultado es conveniente cuando la depuración
25 desde el cuerpo es potencialmente un problema debido al

tamaño del polímero. De manera óptima, el corte de cada porción de polímero soluble en agua se facilita mediante el uso de enlaces fisiológicamente dissociables y/o enzimáticamente degradables tales como enlaces que
5 contengan uretano, amida, carbonato o éster. De esta manera, se puede modular la depuración del conjugado (mediante corte de porciones individuales del polímero soluble en agua) seleccionando el tamaño molecular del polímero y el tipo de grupo funcional que provean las
10 propiedades de depuración deseadas. El experto en la técnica puede determinar el tamaño molecular apropiado del polímero así como el grupo funcional dissociable. Por ejemplo, el experto en la técnica, utilizando experimentación de rutina, puede determinar un tamaño
15 molecular apropiado y un grupo funcional dissociable preparando primero una variedad de derivados de polímero con pesos de polímero y grupos funcionales dissociables diferentes, y obteniendo después el perfil de depuración (por ejemplo, a través de muestreo periódico de sangre u
20 orina) mediante administración del derivado polimérico a un paciente y tomando muestras periódicas de sangre y/u orina. Una vez que se obtiene una serie de perfiles de depuración para cada conjugado evaluado, se puede identificar un conjugado adecuado.

25 Se debe entender que aunque la invención se ha

descrito en conjunto con modalidades específicas preferidas de la misma, que la descripción anterior así como los ejemplos que siguen pretenden ilustrar y no limitar el campo de la invención. Otros aspectos, ventajas y modificaciones dentro del campo de la invención serán evidentes para los expertos en la técnica a la cual pertenece la invención.

Todos los artículos, libros, patentes y otras publicaciones a las que se hace referencia en la presente invención pueden ser referidas por el experto en la técnica.

VII. Experimental

La práctica de la invención emplea, a menos que se indique de otra manera, técnicas convencionales de síntesis orgánica y similares, las cuales están dentro de labilidad de la técnica. Dichas técnicas se explican completamente en la literatura. Véase, por ejemplo, J. March, *Advanced Organic Chemistry: Reactions Mechanisms and Structure*, 4^a Ed. (New York: Wiley-Interscience, 1992), *supra*.

En los siguientes ejemplos, se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperaturas, etc) pero se debe tomar en consideración cierto error

experimental y desviación. A menos que se indique de otra manera, la temperatura está en grados C y la presión es o está cerca de la presión atmosférica a nivel de mar.

5

Abreviaturas:

DCM	Diclorometano
mPEG-SPA	Propionato de mPEG-succinimidilo
mPEG-SBA	Butanoato de mPEG-succinimidilo
mPEG-OPSS	Disulfuro de mPEG-ortopiridilo
10 mPEG-MAL	mPEG-maleimida, $\text{CH}_3\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-MAL}$
mPEG-SMB	α -metilbutanoato de mPEG-succinimidilo, $\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-CH}(\text{CH}_3)\text{C}(\text{O})\text{-O-}$ succinimida
mPEG-ButirALD	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-O-C}(\text{O})\text{-NH}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_4\text{-}$ 15 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}(\text{O})\text{H}$
mPEG-PIP	$\text{CH}_3\text{O}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{-(O)-piperidin-4-ona}$
SUC	Succinimida o succinimidilo
NaCNBH_3	Cianoborohidruro de sodio
HCl	ácido clorhídrico
20 HEPES	ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinetansulfónico
RMN	Resonancia magnética nuclear
DCC	1,3-diciclohexilcarbodi-imida
DI	Agua desionizada

25

	P.Mol	Peso molecular
	t.amb.	Temperatura ambiente
	K o kDa	Kilodaltons
	SEC	Cromatografía por exclusión de tamaños
5	HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
	FPLC	Cromatografía líquida de proteína rápida
	SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio
10	MALDI-TOF	Desorción-Ionización de Láser Asistida con Matriz-Tiempo de Vuelo

Materiales:

Todos los reactivos de PEG a los que se hace referencia en los ejemplos anexos se pueden conseguir comercialmente a menos que se indique de otra manera

Propionato de mPEG-succinimidilo, mPEG-SPA, peso molecular, 30K ($M_n = 31.3$ kDa, Nektar Therapeutics)

Disulfuro de mPEG-ortopiridilo, mPEG-OPSS, peso molecular, 10K ($M_n = 10.3$ kDa, Nektar Therapeutics)

mPEG-maleimida, mPEG-MAL, peso molecular, 20K ($M_n = 21.8$ kDa, Nektar Therapeutics)

mPEG-maleimida, mPEG-MAL, peso molecular, 30K ($M_n = 31.4$ kDa, Nektar Therapeutics)

α -metilbutanoato de mPEG-succinimidilo, mPEG-SMB,

- peso molecular, 30K ($M_n = 30.5$ KDa, Nektar Therapeutics)
- mPEG-butiraldehído, mPEG-ButirALD, peso molecular, 30K ($M_n = 31.5$ KDa, Nektar Therapeutics)
- L-histidina, certificado de desempeño en biotecnología (Sigma)
- HEPES, certificado de desempeño en biotecnología, 99.5+% (Sigma)
- Cloruro de calcio, dihidratado, para biología molecular, 99% (Sigma)
- 10 Cloruro de sodio, para biología molecular (Sigma)
- Tween 80, Sigma Ultra, (Sigma)
- Alcohol etílico, USP, Absoluto-200 Proof (AAPER)
- Polietilenglicol, P.Mol 3,350, Sigma Ultra (Sigma)
- 15 Cassette para diálisis Slide-A-Lyzer, 0.5-3 ml, o 3-12 ml de capacidad (Pierce)
- Acido acético, reactivo A.C.S., 99.7+% (Aldrich)
- Acido acético 1N, patrón de referencia volumétrico (VWR)
- 20 Hidróxido de sodio 1N, patrón de referencia volumétrico (J.T.Baker)
- Cianoborohidruro de sodio, 95% (Aldrich)
- Solución reguladora para electroforesis de proteína Tris/glicina/SDS, 10x (Bio-Rad)
- 25 Solución reguladora para muestra Laemmli (Bio-

Rad)

Marcador Sigma, intervalo bajo (P.Mol 6,500-66,000) (Sigma)

Marcador Sigma, intervalo alto (P.Mol 36,000-5 205,000) (Sigma)

Gel preparado para Tris al 7.5%-HCl (10-well, 30ul, Bio-Rad)

Reactivo para tinción azul GelCode (Pierce)

10 Métodos (analíticos)

Análisis SEC-HPLC

Se efectúa la cromatografía por exclusión de tamaños (SEC) en un sistema de HPLC Agilent 1100 (Agilent). Las muestras se analizan utilizando una columna BIOSEP-SEC-15 S 4000 (Phenomenex) y una fase móvil de histidina 45 mM, cloruro de calcio 4.5 mM, cloruro de sodio 0.36 M, Tween 80 al 0.009% (v/v) y 10% de alcohol etílico, pH 6.7. La velocidad de flujo para la columna es de 0.3 ml/min. La proteína eluida y los conjugados de PEG-proteína se20 detectan mediante UV a una longitud de onda de 280 nm.

Análisis SDS-PAGE

Las muestras se analizan mediante electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)25 utilizando el sistema para electroforesis en gel pre-

120
fabricado Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad). Las muestras se mezclan con solución reguladora para muestra 2xLaemmli, y se colocan en un baño de agua a 95°C durante 5 minutos aproximadamente. Después, las muestras preparadas se cargan en un gel preparado de 7.5% de Tris-HCl y se corren durante 30 minutos aproximadamente a 200 V utilizando solución reguladora para electroforesis Tris/glicina/SDS.

Otros métodos

10 Purificación de conjugados PEG-Factor VIII

Se utiliza una columna para filtración en gel de 24 ml Superose 6 HR 10/30, (Amersham) con un sistema FPLC y un sistema de iniciador AKTA (Amersham) para purificar los conjugados de PEG-Factor VIII en los ejemplos 6-11. La velocidad de flujo es de 0.3 ml/min y la solución reguladora para elución es 50 mM de histidina, 0.5 M de NaCl, 4.0 mM de CaCl₂, y 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 6.7.

20 Intercambio de solución reguladora de la solución de reserva de Factor VIII

Se retira un cassette para diálisis Slide-A-Lyzer (3-12 ml, fracción de corte de peso molecular (MWCO) 10,000, Pierce) de la bolsa protectora, y se remoja en MilliQ H₂O durante 15 minutos (el agua se cambia cada 5 minutos). La solución de reserva de Factor VIII [0.398

121

mg/ml en 50 mM de histidina, 0.5 M de NaCl, 4.0 mM de CaCl₂, 0.1% de PEG 3,350, (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 6.7] se transfiere después al interior de la cavidad del cassette a través de una de las aberturas guía en la parte superior del empaque. El cassette se coloca en un vaso de precipitados de 1 l de solución reguladora HEPES [50 mM HEPES, 0.5 M de NaCl, 5 mM de CaCl₂, 0.1% de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] con una boya de flotación unida a la parte superior del cassette. El vaso de precipitado se coloca después en una parrilla de agitación para iniciar la diálisis a 4°C. La solución reguladora HEPES se cambia cuatro veces a intervalos de 2-3 horas aproximadamente y después se deja en un cuarto frío (4°C) para diálisis durante la noche. Después de la diálisis, la cámara del cassette se inyecta con aire y la muestra dializada se extrae del cassette. La concentración del Factor VIII en la solución reguladora HEPES se mide a UV 280 nm a partir de un espectrofotómetro SPECTRA max PLUS (Molecular Devices).

20

EJEMPLO 1

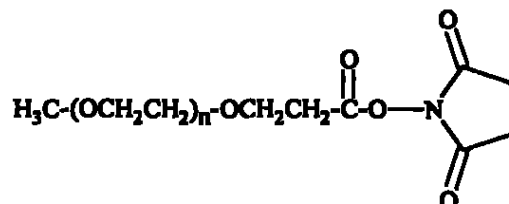
Modificación con PEG del Factor VIII con dominio B suprimido utilizando mPEG-SPA, 20K

25

Se obtiene propionato de mPEG-succinimidilo que

tiene un peso molecular de 20,000 daltons a partir de Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). La estructura básica del reactivo polimérico se provee a continuación:

5



Se disuelve el Factor VIII con dominio B suprimido en agua desionizada, a la cual se agrega trietilamina para elevar el pH a 7.2-9. A la solución anterior se agrega un exceso molar de 1.5 a 10 veces del reactivo PEG, mPEG-SPA. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas.

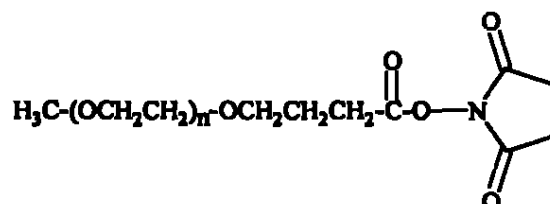
La mezcla de reacción se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de sustitución con PEG de la proteína. El grado de sustitución de PEG, 1-mero, 2-mero, etc, también se puede determinar utilizando cualquiera de un número de técnicas analíticas apropiadas para proteínas de este tamaño, tales como dispersión de ángulo de luz. Los picos desplegados para las especies original y mono-sustituidas con PEG difieren en aproximadamente 20,000 daltons. Al incrementar la relación de reactivo PEG a proteína se incrementa el grado de poli-sustitución con PEG, es decir la formación de 2-meros, 3-meros, etc.

25

EJEMPLO 2**Sustitución con PEG de Factor VIII con dominio B suprimido
utilizando mPEG-SDA**

5 Se obtiene butanoato de mPEG-succinimidilo que tiene un peso molecular de 10,000 daltons a partir de Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). La estructura básica del reactivo polimérico se provee a continuación:

10



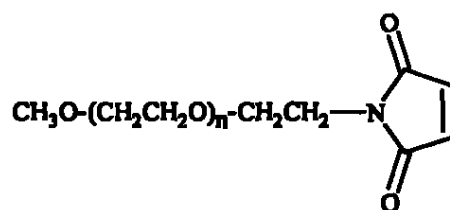
Se disuelve el Factor VIII con dominio B suprimido en agua desionizada, a la cual se agrega trietilamina para elevar el pH a 7.2-9. A esta solución se
20 agrega después un exceso molar de 1.5 a 10 veces de mPEG-SDA. La mezcla resultante se agita a temperatura ambiente durante varias horas.

La mezcla de reacción se analiza mediante SDS-PAGE para determinar el grado de sustitución con PEG de la
25 proteína.

EJEMPLO 3**Sustitución con PEG de Factor VIII con dominio B suprimido
utilizando mPEG-MAL, 20K**

Se obtiene mPEG-maleimida que tiene un peso molecular de 20,000 daltons a partir de Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). La estructura básica del reactivo polimérico se provee a continuación:

5

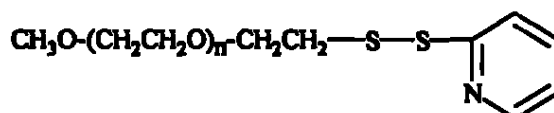


El Factor VIII con dominio B suprimido se disuelve en solución reguladora. A esta solución de proteína se agrega un exceso molecular de 3-5 veces de mPEG-MAL. La mezcla se agita a temperatura ambiente bajo una atmósfera inerte durante varias horas. La mezcla de reacción se analiza y purifica mediante HPLC para proveer una mezcla de especies conjugadas.

EJEMPLO 4

Sustitución con PEG de Factor VIII con dominio B suprimido
utilizando mPEG-OPSS, 20K

20

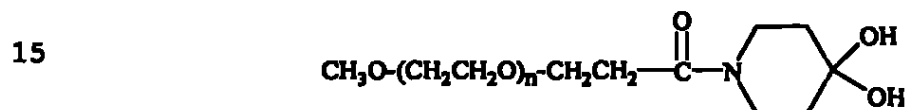
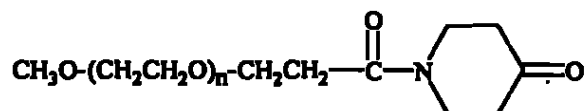


El reactivo de polímero selectivo de sulfhidrilo, disulfuro de mPEG-ortopiridilo (estructura mostrada anteriormente), que tiene un peso molecular de 20,000, se

obtiene a partir de Nektar Therapeutics, (Huntsville, AL). Se agrega un exceso molar de cinco veces de mPEG-OPSS al Factor VIII con dominio B suprimido en una solución regulada. La mezcla de reacción se agita durante varias horas a temperatura ambiente bajo una atmósfera inerte para formar el conjugado deseado que tiene un enlace de puente de disulfuro que conecta el polímero a la proteína.

EJEMPLO 5

10 Sustitución con PEG de Factor VIII con dominio B suprimido
utilizando mPEG-PIP, 5K



El reactivo polimérico anterior, mostrado tanto como la cetona y como el cetal correspondiente, se prepara como se describe en la solicitud de patente provisional No. 20 60/437,325 de Nektar Therapeutics, titulada "Polymer Derivatives and Conjugates Thereof".

Para preparar el reactivo polimérico anterior, a una solución de propionato de metoxi-polietilenglicol-succinimidilo que tiene un peso molecular promedio en peso 25 de 5,000 daltons (1.0 g, 0.002 moles) en cloruro de

136

metileno (20 ml), se agregan trietilamina (0.084 ml, 0.006 moles) y clorhidrato de 4-piperidona monohidratada (0.077 g, 0.005 moles). La mezcla de reacción se agita a temperatura ambiente bajo una atmósfera de nitrógeno durante la noche y después se purifica antes de la conjugación. De manera alternativa, el reactivo polimérico se puede adquirir de Nektar Therapeutics.

Para efectuar la conjugación, a una solución del Factor VIII con dominio B suprimido en solución reguladora acuosa se agrega un exceso molar de 20 veces de mPEG-PIP, 5K. La solución resultante se coloca en un agitador orbital Roto Mix™ (Thermolyne Corp., Dubuque, IA) ajustado a baja velocidad para facilitar la reacción a temperatura ambiente. Después de 15 minutos, se agrega NaCNBH₃ acuoso en una cantidad igual a un exceso molar de 50 veces con relación al Factor VIII con dominio B suprimido. Se extraen alícuotas a intervalos de tiempo a partir de la mezcla de reacción y se analizan mediante SDS-PAGE (utilizando geles disponibles de Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

El análisis SDS-PAGE indicará la presencia de derivados de PEG del Factor VIII con dominio B suprimido que tiene 1, 2, y 3 porciones de PEG unidas.

EJEMPLO 6**Conjugación del Factor VIII con dominio B suprimido con
mPEG-SPA, 30K**

5 Antes de la conjugación, se efectúa un intercambio de solución reguladora para el Factor VIII con dominio B suprimido (Factor VIII) para reemplazar histidina con HEPES.

 Se calienta hasta temperatura ambiente mPEG-SPA,
10 30K, almacenado a -20°C bajo argón. El mPEG-SPA calentado (2.2 ml) se disuelve en 0.022 ml de HCl 2 mM para proveer una solución al 10% de reactivo polimérico. La solución de mPEG-SPA se agrega rápidamente a 3 ml de solución del Factor VIII [0.412 mg/ml en 50 mM de HEPES, 0.5 M de NaCl,
15 4.0 mM de CaCl₂, 0.1% de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] y se mezcla bien. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el frasco de reacción se transfiere a un cuarto frío (4°C), y se agregan otros 0.022 ml de solución de mPEG-SPA a la mezcla de reacción, y se
20 mezcla bien. Se determina el pH (pH 7.0 ± 0.2). La relación molar de mPEG-SPA a proteína es de 20:1. La concentración final de mPEG-SPA es de 1.445 mg/ml, y la concentración final de Factor VIII es de 0.406 mg/ml. Se deja que la reacción avance durante la noche a 4°C en un agitador
25 Rotomix (baja velocidad, Thermolyne). Al conjugado

resultante se le asigna el identificador "pz041701"

La mezcla de conjugado se purifica utilizando cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un método de cromatografía por exclusión de tamaños para
5 analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se utiliza el análisis SDS-PAGE para la caracterización de las muestras.

Caracterización del conjugado

10 La mezcla de conjugado resultante, antes de la purificación, es una mezcla de Factor VIII-monómero de PEG (o 1-mero), dímero (o 2-mero) y trímero (o 3-mero), correspondiente a los identificadores "pz041701 (low)", "pz041701 (medium)" y "pz041701 (high)", respectivamente,
15 según se determina mediante SEC. Es decir: "pz041701 (bajo)" corresponde en su mayoría a especies mono-sustituidas con PEG de Factor VIII o Factor VIII que tienen una porción de PEG unida al mismo; "pz041701 (medio)" corresponde principalmente a especies di-sustituidas con
20 PEG de Factor VIII, es decir, Factor VIII que tiene dos porciones de PEG unidas al mismo; y "pz041701 (alto)" corresponde en su gran mayoría a Factor VIII que tiene tres porciones de PEG unidas al mismo. Las gráficas de SEC correspondientes se muestran en las figuras 1 y 2. La
25 figura 1 muestra la gráfica de SEC correspondiente a

fracciones recolectadas después de SEC de la mezcla de reacción del Factor VIII. De conformidad con los resultados de cromatografía por exclusión de tamaños (SEC), el resultado de sustitución con PEG de mPEG-SPA-30K-FVIII (pz041701 bajo) es de aproximadamente 39%. El rendimiento de sustitución con PEG de mPEG30-SPA-30K-FVIII (pz041701 medio) es de aproximadamente 32%, y el rendimiento de sustitución con PEG de mPEG-SPA-30K-FVIII (pz041701 alto) es de aproximadamente 11%, en los que los porcentajes se basan en cantidades relativas comparadas con todas las especies presentes en la mezcla de reacción resultante. La mezcla de conjugado se purifica adicionalmente mediante FPLC y se analiza utilizando SDS-PAGE.

15

EJEMPLO 7**Conjugación de Factor VIII con dominio B suprimido con mPEG-MAL, 20K**

Antes de la conjugación, se efectúa un intercambio de solución reguladora para el Factor VIII con dominio B suprimido (Factor VIII) para reemplazar histidina con HEPES.

Se calienta hasta temperatura ambiente mPEG-MAL, 20K, almacenado a -20°C bajo argón. El reactivo mPEG-MAL caliente (4.4 ml) se disuelve en 0.044 ml de solución

140
140

reguladora HEPES [50 mM de HEPES, 0.15 M de NaCl, 4.0 mM de CaCl₂, 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] para elaborar una solución al 10% de mPEG-MAL. La solución de mPEG-MAL se agrega rápidamente a 4 ml de solución del Factor VIII

5 [0.4324 mg/ml en 50 mM de HEPES, 0.5 M de NaCl, 4 mM de CaCl₂, 0.1% de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] y se mezcla bien. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el frasco de reacción se transfiere a un cuarto frío (4°C), y se agregan otros 0.044 ml de

10 solución de mPEG-MAL a la mezcla de reacción, seguido por la adición de tres alícuotas más de 0.044 ml de solución de mPEG-MAL en el transcurso de dos horas. Se determina el pH (pH 7.0 ± 0.2). La relación molar de mPEG-MAL a proteína es de 100:1. La concentración final de mPEG-MAL es de 5.213

15 mg/ml, y la concentración final de Factor VIII es de 0.410 mg/ml. Se deja que la reacción proceda durante la noche a 4°C en un agitador Rotomix (baja velocidad, Thermolyne). Al conjugado se le asigna el identificador "pz061201"

La mezcla de conjugado se purifica utilizando

20 cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un método de cromatografía por exclusión de tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se utiliza en análisis SDS-PAGE para la caracterización de las muestras.

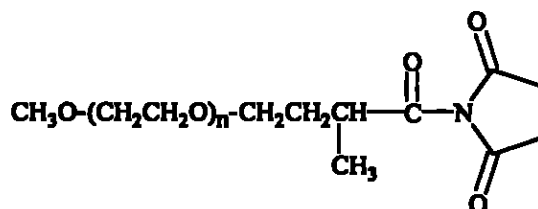
Caracterización del conjugado (producto mono-sustituido con PEG)

De conformidad con los resultados de cromatografía por exclusión de tamaños (SEC), el
 5 rendimiento de sustitución con PEG de conjugado mono-sustituido con PEG (1-mero) es de aproximadamente 33% (figura 3). Las fracciones de mezcla de conjugado de Factor VIII se combinan y purifican mediante FPLC, y después también se purifican mediante cromatografía por filtración
 10 en gel. El producto final pz061201 se analiza tanto con SDS-PAGE como con SEC, y se determina que la pureza del producto "pz061201" es de aproximadamente 94% de Factor VIII-monómero de PEG (es decir, Factor VIII mono-sustituido con PEG), con aproximadamente el 6% de Factor VIII-
 15 monómeros superiores de PEG (figura 4).

EJEMPLO 8

Conjugación de Factor VIII con dominio B suprimido con
mPEG-SMB, 30K

20



Antes de la conjugación, se efectúa un
 25 intercambio de solución reguladora para el Factor VIII con

dominio B suprimido (Factor VIII) para reemplazar histidina con HEPES.

Se calienta hasta temperatura ambiente mPEG-SMB, 30K, almacenado a -20°C bajo argón. El mPEG-SMB caliente (6.5 mg) se disuelve en 0.065 ml de HCl 2 mM para formar una solución al 10% de mPEG-SMB. La solución de mPEG-SMB se agrega rápidamente a 4 ml de solución del Factor VIII [0.435 mg/ml en 50 mM de HEPES, 0.5 M de NaCl, 5.0 mM de CaCl_2 , 0.1% de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0], y se mezcla bien. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el frasco de reacción se transfiere a un cuarto frío (4°C). Se determina el pH ($\text{pH } 7.0 \pm 0.2$). La relación molar de mPEG-SMB a proteína es de 20:1. La concentración final de mPEG-SMB es de 1.599 mg/ml, y la concentración final del Factor VIII es de 0.428 mg/ml. Se deja que la reacción proceda durante aproximadamente 48 horas a 4°C en un agitador Rotomix (baja velocidad, Thermolyne), y después se extingue mediante adición de ácido acético (99.7+%) para bajar el pH a 6.0 ± 0.3 . Al conjugado se le asigna el identificador "pz082501"

La mezcla de conjugado se purifica utilizando cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un método de cromatografía por exclusión de tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se utiliza en análisis de SDS-PAGE para la

caracterización de las muestras.

Caracterización del conjugado

La mezcla designada "pz082501" resulta de la
5 sustitución con PEG del Factor VIII con mPEG-SMB30K a pH
7.0 $\pm$ 0.2. La mezcla de conjugado se purifica y analiza
mediante SEC. Tomando como base los resultados de
cromatografía por exclusión de tamaño (SEC), el rendimiento
de sustitución con PEG de pz082501, conjugado mono-
10 sustituido con PEG (Factor VIII-1-mero) es de
aproximadamente 41% (figura 5). La mezcla de producto se
purifica adicionalmente mediante FPLC y se analiza
utilizando SDS-PAGE y SEC. La caracterización del producto
conjugado Factor VIII-PEG purificado, pz082501, es de
15 aproximadamente 95% de Factor VIII mono-conjugado con PEG
con aproximadamente 5% de números más altos de unidades
monoméricas.

EJEMPLO 9

20 Conjugación del Factor VIII con dominio B suprimido
utilizando mPEG-OPSS, 10K

Antes de la conjugación, se efectúa un
intercambio de solución reguladora para el Factor VIII con
25 dominio B suprimido (Factor VIII) para reemplazar histidina

con HEPES.

Se calienta hasta temperatura ambiente mPEG-OPSS, 10K, almacenado a -20°C bajo argón. Se disuelve mPEG-OPSS (1.2 mg) en 0.012 ml de H_2O para elaborar una solución al 10% de mPEG-OPSS. La solución de mPEG-OPSS se agrega rápidamente a 0.5 ml de solución del Factor VIII [0.398 mg/ml en 50 mM de Histidina, 0.5 M de NaCl, 4.0 mM de CaCl_2 , 0.1% de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0], y se mezcla bien. Después de 30 minutos de reacción da temperatura ambiente, el frasco de reacción se transfiere a un cuarto frío (4°C). Se determina el pH (pH 6.7 ± 0.2). La relación molar de mPEG-OPSS-10K a proteína es de 100:1. La concentración final de mPEG-OPSS es de 2.344 mg/ml, y la concentración final del Factor VIII es de 0.389 mg/ml. Se deja que la reacción proceda durante la noche a 4°C en un agitador Rotomix (baja velocidad, Thermolyne).

La mezcla de conjugado se purifica utilizando cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un método de cromatografía por exclusión de tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se utiliza el análisis SDS-PAGE para la caracterización de las muestras. Los resultados y rendimientos de sustitución con PEG utilizando el reactivo mPEG-OPSS son similares a aquellos en el ejemplo 7, en el

cual se emplea el reactivo mPEG-MAL que tiene un peso molecular de 20K.

EJEMPLO 10

5 Conjugación de Factor VIII con dominio B suprimido con mPEG-MAL, 30K

Antes de la conjugación, se efectúa un intercambio de solución reguladora para el Factor VIII con
10 dominio B suprimido (Factor VIII) para reemplazar histidina con HEPES.

Se calienta hasta temperatura ambiente mPEG-MAL, 30K, almacenado a -20°C bajo argón. El mPEG-MAL (1.0 mg) caliente se disuelve en 0.010 ml de solución reguladora
15 HEPES [50 mM de HEPES, 0.15 M de NaCl, 4.0 mM de CaCl₂, 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] para elaborar una solución de mPEG-MAL al 10%. La solución de mPEG-MAL se agrega rápidamente a 0.5 ml de solución de Factor VIII [0.447 mg/ml en 50 mM de HEPES, 0.5 M de NaCl, 4 mM de CaCl₂, 0.1%
20 de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] y se mezcla bien. Después de 30 minutos de reacción a temperatura ambiente, el frasco de reacción se transfiere a un cuarto frío (4°C), y se agregan otros 0.010 ml de solución de mPEG-MAL a la mezcla de reacción, seguido por
25 la adición de tres alícuotas más de 0.010 ml de solución de

mPEG-MAL en el transcurso de dos horas. Se determina el pH (pH 7.0 ± 0.2). La relación molar de mPEG-MAL a proteína es de 100:1. La concentración final de mPEG-MAL es de 9.091 mg/ml, y la concentración final del Factor VIII es de 0.406 mg/ml. Se deja que la reacción proceda durante la noche a 4°C en un agitador Rotomix (baja velocidad, Thermolyne).

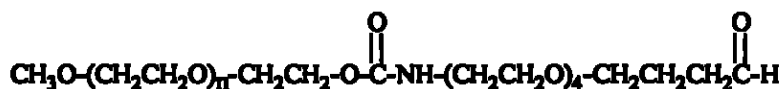
La mezcla de conjugado se purifica utilizando cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un método de cromatografía por exclusión de tamaño para analizar las mezclas de reacción, y los productos finales. También se utiliza el análisis SDS-PAGE para la caracterización de las muestras. Los resultados y rendimientos de sustitución con PEG utilizando el reactivo mPEG-MAL que tiene un peso molecular de 30K son similares a aquellos en el ejemplo 7, en el cual se emplea el reactivo mPEG-MAL que tiene un peso molecular de 20K.

EJEMPLO 11

Conjugación de Factor VIII con dominio B suprimido con

mPEG-Butir-ALD, 30K

Antes de la conjugación, se efectúa un intercambio de solución reguladora para el Factor VIII con dominio B suprimido (Factor VIII) para reemplazar histidina con HEPES.



Se calienta hasta temperatura ambiente mPEG-
 5 Butir-ALD, 30K (mostrado anteriormente), almacenado a -20°C
 bajo argón. El mPEG-Butir-ALD (3.8 mg) caliente se disuelve
 en 0.038 ml de H_2O para elaborar una solución al 10% de
 mPEG-Butir-ALD. La solución de mPEG-Butir-ALD se agrega
 rápidamente a 0.5 ml de solución del Factor VIII [0.400
 10 mg/ml en 50 mM de HEPES, 0.5 M de NaCl, 5 mM de CaCl_2 , 0.1%
 de PEG 3,350 (p/v), 0.01% de Tween 80 (p/v), pH 7.0] y se
 mezcla bien. Después de 15 minutos, se agregan 0.060 ml de
 solución 10 mM de cianoborohidruro de sodio. Se determina
 el pH (pH 7.0 ± 0.2). La relación molar de mPEG-Butir-ALD a
 15 proteína es de 100:1. La concentración final de mPEG-Butir-
 ALD es de 6.355 mg/ml. La concentración final de Factor
 VIII es de 0.334 mg/ml, y la concentración final de NaCNBH_3
 es de 1.003 mM. Se deja que la reacción proceda durante 5
 horas a temperatura ambiente, y después, durante la noche a
 20 4°C en un agitador Rotomix (baja velocidad, Thermolyne).

La mezcla de conjugado se purifica utilizando
 cromatografía por filtración en gel. Se desarrolla un
 método de cromatografía por exclusión de tamaño para
 analizar las mezclas de reacción, y los productos finales.
 25 El análisis de SDS-PAGE también se utiliza para la

caracterización de las muestras. El rendimiento de Factor VIII-mono-conjugado de PEG es de aproximadamente 20%.

EJEMPLO 12

5 Actividad in vitro de conjugados de ejemplo de Factor VIII- PEG

Se determinan las actividades in vitro de los conjugados de Factor VIII-PEG descritos en los ejemplos 6,
10 7, y 8. Todos los conjugados de Factor VIII evaluados son bioactivos.

15

20

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION

5 <120> CONJUGADOS DE POLIMERO-PORCION DE FACTOR VIII

<130> SHE0081.00 (PCT)

<140> PCT/US04/06034

<141> 2004-02-26

10

<150> 60/450,578

<151> 2003-02-26

<160> 2

15

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 2351

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

25 Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
20 25 30

30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
35 40 45

35 Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65 70 75 80

40 Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
100 105 110

45

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
115 120 125

50 Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
 145 150 155 160
 5 Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
 165 170 175
 Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
 180 185 190
 10 Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205
 Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 15 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 20 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 25 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 30 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 35 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 40 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 45 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 50 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 5 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 10 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 15 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 20 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 25 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 30 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 35 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 40 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 45 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 50 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

5 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
755 760 765

10 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
770 775 780

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
785 790 795 800

15 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
805 810 815

20 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
835 840 845

25 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
865 870 875 880

30 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
885 890 895

35 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
900 905 910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
915 920 925

40 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
930 935 940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
945 950 955 960

45 Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
965 970 975

50 Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
980 985 990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
995 1000 1005

	Leu	Phe	Lys	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Asn	Lys	Thr	Ser
	1010						1015					1020			
5	Asn	Asn	Ser	Ala	Thr	Asn	Arg	Lys	Thr	His	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser
	1025						1030					1035			
	Leu	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu
	1040						1045					1050			1055
10	Ser	Asp	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Ile	His	Asp	Arg
	1055						1060					1065			
	Met	Leu	Met	Asp	Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	His	Met
	1070						1075					1080			
15	Ser	Asn	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Asn	Met	Glu	Met	Val	Gln	Gln
	1085						1090					1095			
	Lys	Lys	Glu	Gly	Pro	Ile	Pro	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn	Pro	Asp	Met
20	1100						1105					1110			
	Ser	Phe	Phe	Lys	Met	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Arg	Trp	Ile
	1115						1120					1125			
25	Gln	Arg	Thr	His	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro
	1130						1135					1140			
	Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Glu
	1145						1150					1155			
30	Gly	Gln	Asn	Phe	Leu	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Val	Val	Gly	Lys
	1160						1165					1170			
	Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Asp	Val	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro
35	1175						1180					1185			
	Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu
	1190						1195					1200			
40	Asn	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu
	1205						1210					1215			
	Lys	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile
	1220						1225					1230			
45	His	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu
	1235						1240					1245			
	Leu	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr
50	1250						1255					1260			
	Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn
	1265						1270					1275			

	Arg	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu
	1280						1285					1290			
5	Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu
	1295						1300					1305			
	Lys	Tyr	Ala	Cys	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln
	1310						1315					1320			
10	Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg
	1325						1330					1335			
	Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp
	1340						1345					1350			
15	Asp	Thr	Ser	Thr	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro
	1355						1360					1365			
20	Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala
	1370						1375					1380			
	Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser
	1385						1390					1395			
25	Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser
	1490						1405					1410			
	Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe
	1415						1420					1425			
30	Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys
	1430						1435					1440			
	Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys
35	1445						1450					1455			
	Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly
	1460						1465					1470			
40	Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
	1475						1480					1485			
	Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp
	1490						1495					1500			
45	Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His
	1505						1510					1515			
	Ile	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser
50	1520						1525					1530			
	Pro	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr
	1535						1540					1545			

	Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val
	1550						1555					1560			
5	Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
	1565						1570					1575			
	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
	1580						1585					1590			
10	Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
	1595						1600					1605			
	Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
	1610						1615					1620			
15	Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
	1625						1630					1635			
	Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
20	1640						1645					1650			
	Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
	1655						1660					1665			
25	Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
	1670						1675					1680			
	Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
	1685						1690					1695			
30	Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
	1700						1705					1710			
	Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
35	1715						1720					1725			
	Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
	1730						1735					1740			
40	Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
	1745						1750					1755			
	Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
	1760						1765					1770			
45	His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
	1775						1780					1785			
	Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
50	1790						1795					1800			
	Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
	1805						1810					1815			

	Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
	1820						1825					1830			
5	Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
	1835						1840					1845			
	Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
	1850						1855					1860			
10	Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
	1865						1870					1875			
	Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
	1880						1885					1890			
15	Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
	1895						1900					1905			
	Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn
20	1910						1915					1920			
	Ile	Gln	Met	Glu	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His
	1925						1930					1935			
25	Ala	Ile	Asn	Gly	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met
	1940						1945					1950			
	Ala	Gln	Asp	Gln	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser
30	1955						1960					1965			
	Asn	Glu	Asn	Ile	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr
	1970						1975					1980			
	Val	Arg	Lys	Lys	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr
35	1985						1990					1995			
	Pro	Gly	Val	Phe	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly
	2000						2005					2010			
40	Ile	Trp	Arg	Val	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly
	2015						2020					2025			
	Met	Ser	Thr	Leu	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro
	2030						2035					2040			
45	Leu	Gly	Met	Ala	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala
	2045						2050					2055			
	Ser	Gly	Gln	Tyr	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His
50	2060						2065					2070			
	Tyr	Ser	Gly	Ser	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser
	2075						2080					2085			

Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
 2090 2095 2100
 5 Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 2105 2110 2115
 Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 2120 2125 2130
 10 Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 2135 2140 2145
 Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2150 2155 2160
 15 Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 2165 2170 2175
 Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
 2180 2185 2190
 Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205
 25 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
 2210 2215 2220
 Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
 2225 2230 2235
 30 Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
 2240 2245 2250
 Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
 2255 2260 2265
 35 Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
 2270 2275 2280
 40 Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
 2285 2290 2295
 Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
 2300 2305 2310
 45 Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
 2315 2320 2325
 Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
 2330 2335 2340
 50 Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2345 2350

158

<210> 2
 <211> 2332
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5 <400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	Phe	Leu	Glu	
				260					265					270			
5	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	Leu	Glu	Ile	
			275					280					285				
	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	Asp	Leu	Gly	
		290					295						300				
10	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	Asp	Gly	Met	
	305					310					315					320	
	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	Gln	Leu	Arg	
					325					330					335		
15	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	Leu	Thr	Asp	
				340					345					350			
20	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	Pro	Ser	Phe	
			355					360					365				
	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	Trp	Val	His	
		370					375					380					
25	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	Leu	Val	Leu	
	385					390					395					400	
	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	Asn	Gly	Pro	
				405						410					415		
30	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	Ala	Tyr	Thr	
				420					425					430			
35	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	Ser	Gly	Ile	
		435						440					445				
	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	
		450					455					460					
40	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro	His	Gly	Ile	
	465					470					475					480	
	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys	Gly	Val	Lys	
				485						490					495		
45	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe	Lys	Tyr	Lys	
			500						505					510			
50	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	Pro	Arg	Cys	
		515						520					525				
	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala	
		530					535					540					

	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp	
	545					550				555						560	
5	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe	
					565					570					575		
	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln	
				580					585					590			
10	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe	
			595					600					605				
	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser	
	610						615					620					
15	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu	
	625					630					635					640	
	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr	
20					645					650					655		
	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro	
				660					665					670			
25	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp	
			675					680					685				
	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala	
	690						695					700					
30	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu	
	705					710					715					720	
	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala	
35				725					730					735			
	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg	
				740					745					750			
40	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys	
			755					760					765				
	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn	
	770						775					780					
45	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro	
	785					790					795					800	
	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	Glu	Thr	Phe	
50					805					810					815		
	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser	
				820					825					830			

	Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val	
	835 840 845	
5	Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly	
	850 855 860	
	Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser	
	865 870 875 880	
10	Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala	
	885 890 895	
	Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His	
15	900 905 910	
	Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro	
	915 920 925	
20	Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp	
	930 935 940	
	Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp	
	945 950 955 960	
25	Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys	
	965 970 975	
	Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys	
30	980 985 990	
	Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala	
	995 1000 1005	
35	Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu	
	1010 1015 1020	
	Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu	
	1025 1030 1035	
40	Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp	
	1040 1045 1050	
	Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr	
45	1055 1060 1065	
	Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly	
	1070 1075 1080	
50	Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys	
	1085 1090 1095	
	Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His	
	1100 1105 1110	

	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro	Ser	Pro	Lys	Gln
	1115						1120					1125			
5	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Glu	Gly	Gln	Asn	Phe
	1130						1135					1140			
	Leu	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Val	Val	Gly	Lys	Gly	Glu	Phe	Thr
	1145						1150					1155			
10	Lys	Asp	Val	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro	Ser	Ser	Arg	Asn
	1160						1165					1170			
	Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu	Asn	Asn	Thr	His
	1175						1180					1185			
15	Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu	Lys	Lys	Glu	Thr
	1190						1195					1200			
	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile	His	Thr	Val	Thr
20	1205						1210					1215			
	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu	Leu	Ser	Thr	Arg
	1220						1225					1230			
25	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr	Ala	Pro	Val	Leu
	1235						1240					1245			
	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn	Arg	Thr	Lys	Lys
	1250						1255					1260			
30	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu	Glu	Asn	Leu	Glu
	1265						1270					1275			
	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu	Lys	Tyr	Ala	Cys
35	1280						1285					1290			
	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln	Asn	Phe	Val	Thr
	1295						1300					1305			
40	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg	Leu	Pro	Leu	Glu
	1310						1315					1320			
	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp	Asp	Thr	Ser	Thr
	1325						1330					1335			
45	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro	Ser	Thr	Leu	Thr
	1340						1345					1350			
	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala	Ile	Thr	Gln	Ser
50	1355						1360					1365			
	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser	Ile	Pro	Gln	Ala
	1370						1375					1380			

	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser	Ser	Phe	Pro	Ser
	1385						1390					1395			
5	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe	Gln	Asp	Asn	Ser
	1400						1405					1410			
	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	Asp	Ser	Gly	Val
	1415						1420					1425			
10	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	Lys	Asn	Asn	Leu
	1430						1435					1440			
	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly	Asp	Gln	Arg	Glu
	1445						1450					1455			
15	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser	Val	Thr	Tyr	Lys
	1460						1465					1470			
	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp	Leu	Pro	Lys	Thr
20	1475						1480					1485			
	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His	Ile	Tyr	Gln	Lys
	1490						1495					1500			
25	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	Pro	Gly	His	Leu
	1505						1510					1515			
	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	Glu	Gly	Ala	Ile
	1520						1525					1530			
30	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val	Pro	Phe	Leu	Arg
	1535						1540					1545			
	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser	Lys	Leu	Leu	Asp
35	1550						1555					1560			
	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln	Ile	Pro	Lys	Glu
	1565						1570					1575			
40	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys	Thr	Ala	Phe	Lys
	1580						1585					1590			
	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys	Glu	Ser	Asn	His
	1595						1600					1605			
45	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys	Pro	Glu	Ile	Glu
	1610						1615					1620			
	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg	Leu	Cys	Ser	Gln
50	1625						1630					1635			
	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu	Ile	Thr	Arg	Thr
	1640						1645					1650			

	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr	Asp	Asp	Thr	Ile
	1655						1660					1665			
5	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile	Tyr	Asp	Glu	Asp
	1670						1675					1680			
	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys	Thr	Arg	His	Tyr
	1685						1690					1695			
10	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr	Gly	Met	Ser	Ser
	1700						1705					1710			
	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Pro
	1715						1720					1725			
15	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr	Asp	Gly	Ser	Phe
	1730						1735					1740			
	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu	His	Leu	Gly	Leu
20	1745						1750					1755			
	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp	Asn	Ile	Met	Val
	1760						1765					1770			
25	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser	Phe	Tyr	Ser	Ser
	1775						1780					1785			
	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly	Ala	Glu	Pro	Arg
	1790						1795					1800			
30	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr	Tyr	Phe	Trp	Lys
	1805						1810					1815			
	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu	Phe	Asp	Cys	Lys
35	1820						1825					1830			
	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu	Lys	Asp	Val	His
	1835						1840					1845			
40	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His	Thr	Asn	Thr	Leu
	1850						1855					1860			
	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Phe	Ala	Leu
	1865						1870					1875			
45	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp	Tyr	Phe	Thr	Glu
	1880						1885					1890			
	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn	Ile	Gln	Met	Glu
50	1895						1900					1905			
	Asp	Pro	Thr	Phe	Lys	Glu	Asn	Tyr	Arg	Phe	His	Ala	Ile	Asn	Gly
	1910						1915					1920			

	Tyr	Ile	Met	Asp	Thr	Leu	Pro	Gly	Leu	Val	Met	Ala	Gln	Asp	Gln
	1925						1930					1935			
5	Arg	Ile	Arg	Trp	Tyr	Leu	Leu	Ser	Met	Gly	Ser	Asn	Glu	Asn	Ile
	1940						1945					1950			
	His	Ser	Ile	His	Phe	Ser	Gly	His	Val	Phe	Thr	Val	Arg	Lys	Lys
	1955						1960					1965			
10	Glu	Glu	Tyr	Lys	Met	Ala	Leu	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Pro	Gly	Val	Phe
	1970						1975					1980			
	Glu	Thr	Val	Glu	Met	Leu	Pro	Ser	Lys	Ala	Gly	Ile	Trp	Arg	Val
	1985						1990					1995			
15	Glu	Cys	Leu	Ile	Gly	Glu	His	Leu	His	Ala	Gly	Met	Ser	Thr	Leu
	2000						2005					2010			
20	Phe	Leu	Val	Tyr	Ser	Asn	Lys	Cys	Gln	Thr	Pro	Leu	Gly	Met	Ala
	2015						2020					2025			
	Ser	Gly	His	Ile	Arg	Asp	Phe	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser	Gly	Gln	Tyr
	2030						2035					2040			
25	Gly	Gln	Trp	Ala	Pro	Lys	Leu	Ala	Arg	Leu	His	Tyr	Ser	Gly	Ser
	2045						2050					2055			
	Ile	Asn	Ala	Trp	Ser	Thr	Lys	Glu	Pro	Phe	Ser	Trp	Ile	Lys	Val
	2060						2065					2070			
30	Asp	Leu	Leu	Ala	Pro	Met	Ile	Ile	His	Gly	Ile	Lys	Thr	Gln	Gly
	2075						2080					2085			
35	Ala	Arg	Gln	Lys	Phe	Ser	Ser	Leu	Tyr	Ile	Ser	Gln	Phe	Ile	Ile
	2090						2095					2100			
	Met	Tyr	Ser	Leu	Asp	Gly	Lys	Lys	Trp	Gln	Thr	Tyr	Arg	Gly	Asn
	2105						2110					2115			
40	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Met	Val	Phe	Phe	Gly	Asn	Val	Asp	Ser	Ser
	2120						2125					2130			
	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile	Ile	Ala	Arg	Tyr
	2135						2140					2145			
45	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg	Ser	Thr	Leu	Arg
	2150						2155					2160			
50	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys	Ser	Met	Pro	Leu
	2165						2170					2175			
	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln	Ile	Thr	Ala	Ser
	2180						2185					2190			

30

NOVEDAD DE LA INVENCIÓN

Habiendo descrito el presente invento se considera como novedad y por lo tanto se reclama como
5 propiedad lo contenido en las siguientes:

REIVINDICACIONES

1.- Una composición que comprende una pluralidad
10 de conjugados en el que cada conjugado tienen uno a tres
polímeros solubles en agua unidos en forma covalente a una
porción de Factor VIII, caracterizada porque cada polímero
soluble en agua tienen un peso molecular promedio nominal
en el intervalo de más de 5,000 daltons hasta 150,000
15 daltons aproximadamente.

2.- La composición de conformidad con la
reivindicación 1, caracterizada porque el polímero soluble
en agua en cada conjugado se selecciona a partir del grupo
que consiste de un poli(óxido de alquilenos),
20 poli(vinilpirrolidona), poli(alcohol vinílico),
polioxazolina, y poli(acrilóilmorfolina).

3.- La composición de conformidad con la
reivindicación 2, caracterizada porque cada polímero
soluble en agua es un poli(óxido de alquilenos).

25 4.- La composición de conformidad con la

reivindicación 3, caracterizado porque cada poli(óxido de alquilenos) es un poli(etilenglicol).

5.- La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el poli(etilenglicol) está bloqueada en los extremos terminales con una porción bloqueadora de extremo que se selecciona a partir del grupo que consiste de hidroxilo, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenoxi, alquenoxi sustituido, alquinoxio, alquinoxio sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido.

6.- La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el poli(etilenglicol) está bloqueado en los extremos terminales con metoxi.

7.- La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el poli(etilenglicol) está bloqueado en los extremos terminales con hidroxilo.

8.- La composición de conformidad con la reivindicación 4, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 6,000 daltons aproximadamente hasta 100,000 daltons aproximadamente.

9.- La composición de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada porque el

poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 10,000 daltons aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente.

10.- La composición de conformidad con la
5 reivindicación 9, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 20,000 daltons aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente.

11.- La composición de conformidad con la
10 reivindicación 10, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 53,000 daltons aproximadamente hasta 75,000 daltons aproximadamente.

12.- La composición de conformidad con la
15 reivindicación 3, caracterizada porque polímero soluble en agua es lineal.

13.- La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque cada polímero soluble en agua está ramificado.

20 14.- La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque la porción de Factor VIII se selecciona a partir del grupo que consiste de Factor VIII, Factor VIIla, Factor VIII: C, Factor VIII:vWF, Factor VIII con dominio B suprimido, y fragmentos,
25 variantes de delección, variantes de sustitución o variantes

de adición biológicamente activas de cualquiera de las anteriores.

15.- La composición de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque la porción de
5 Factor VIII se selecciona a partir del grupo que consiste de Factor VIII, Factor VIIla, Factor VIII:C, y Factor VIII:vWF.

16.- La composición de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque la porción del
10 Factor VIII es Factor VIII con dominio B suprimido.

17.- La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque la porción de Factor VIII se obtiene en forma recombinante.

18.- La composición de conformidad con la
15 reivindicación 3, caracterizada porque la porción de Factor VIII se obtiene a partir de sangre.

19.- La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de albúmina.

20 20.- La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de proteínas que no tienen actividad de Factor VIII.

21.- La composición de conformidad con la
25 reivindicación 3, caracterizada porque la composición está

sustancialmente libre de polímeros solubles en agua unidos en forma no covalente.

22.- La composición de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque por lo menos un
5 polímero soluble en agua está unido en forma covalente a un sitio en la forma activa de la porción que tiene actividad de Factor VIII.

23.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, en forma liofilizada.

10 24.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, en forma de un líquido.

25.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, que comprende también un excipiente farmacéuticamente aceptable.

15 26.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace tipo amida.

27.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque cada conjugado
20 comprende un enlace amina secundaria.

28.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace tipo carbamato.

29.- La composición de conformidad con la
25 reivindicación 1, caracterizada porque cada conjugado

comprende un enlace tipo tioéter.

30.- La composición de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace disulfuro.

5 31.- Una composición que comprende una pluralidad de conjugados de porción de Factor VIII mono-sustituidas con PEG.

32.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de
10 porción de Factor VIII mono-sustituido con PEG comprende un poli(etilenglicol) bloqueado en los extremos terminales con una porción bloqueadora de extremo que se selecciona a partir del grupo que consiste de hidroxí, alcoxi, alcoxi sustituido, alquenoxi, alquenoxi sustituido, alquinoxi,
15 alquinoxi sustituido, ariloxi y ariloxi sustituido.

33.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque el poli(etilenglicol) está bloqueado en los extremos terminales con metoxi.

20 34.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque el poli(etilenglicol) está bloqueado en los extremos terminales con hidroxí.

35.- La composición de conformidad con la
25 reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de

porción de Factor VIII mono-sustituida con PEG comprende un polietilenglicol que tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de más de 5,000 daltons hasta 150,000 daltons aproximadamente.

5 36.- La composición de conformidad con la reivindicación 35, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 6,000 daltons aproximadamente hasta 100,000 daltons aproximadamente.

10 37.- La composición de conformidad con la reivindicación 36, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 10,000 daltons aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente.

15 38.- La composición de conformidad con la reivindicación 37, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 20,000 daltons aproximadamente hasta 85,000 daltons aproximadamente.

20 39.- La composición de conformidad con la reivindicación 38, caracterizada porque el poli(etilenglicol) tiene un peso molecular promedio nominal en el intervalo de 53,000 daltons aproximadamente hasta 75,000 daltons aproximadamente.

25 40.- La composición de conformidad con la

174

reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de porción de Factor VIII mono-sustituido con PEG comprende un poli(etilenglicol) lineal.

41.- La composición de conformidad con la
5 reivindicación 31, caracterizada porque cada porción de Factor VIII mono-sustituida con PEG comprende un poli(etilenglicol) ramificado.

42.- La composición de conformidad con la
10 reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de porción de Factor VIII mono-sustituida con PEG comprende una porción de Factor VIII que se selecciona a partir del grupo que consiste de Factor VIII, Factor VIIIA, Factor VIII:C, Factor VIII:vWF, Factor VIII con dominio B suprimido y fragmentos, variantes de delección, variantes de
15 sustitución o variantes de adición biológicamente activas de cualquiera de las anteriores.

43.- La composición de conformidad con la
reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de porción de Factor VIII mono-sustituida con PEG comprende
20 una porción de Factor VIII que se selección a partir del grupo que consiste de Factor VIII, Factor VIIIA, Factor VIII:C, y Factor VIII:vWF.

44.- La composición de conformidad con la
reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de
25 porción de Factor VIII mono-sustituido con PEG comprende

Factor VIII con dominio B suprimido.

45.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de porción de Factor VIII mono-sustituida con PEG comprende
5 una porción de Factor VIII que se obtiene en forma recombinante.

46.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado de porción de Factor VIII mono-sustituido con PEG comprende
10 una porción de Factor VIII que se obtiene a partir de sangre.

47.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de albúmina.

15 48.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de proteínas que no tienen actividad de Factor VIII.

49.- La composición de conformidad con la
20 reivindicación 31, caracterizada porque la composición está sustancialmente libre de polímeros solubles en agua unidos en forma no covalente.

50.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, en forma liofilizada.

25 51.- La composición de conformidad con la

reivindicación 31, en forma de un líquido.

52.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, que comprende también un excipiente farmacéuticamente aceptable.

5 53.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace tipo amida.

54.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado
10 comprende un enlace tipo amina secundaria.

55.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace tipo carbamato.

56.- La composición de conformidad con la
15 reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace tipo tioéter.

57.- La composición de conformidad con la reivindicación 31, caracterizada porque cada conjugado comprende un enlace disulfuro.

20 58.- Un método para elaborar un conjugado que comprende poner en contacto, bajo condiciones de conjugación, una porción de Factor VIII con un reactivo polimérico.

59.- Un método para tratar a un paciente en
25 necesidad de terapia con Factor VIII, que comprende el paso

de administrar la paciente la composición de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 31, caracterizado porque la composición contiene una cantidad terapéuticamente efectiva de los conjugados.

5 60.- El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque el paciente padece de hemofilia A.

 61.- El método de conformidad con la reivindicación 59, caracterizado porque el paciente se
10 administra de la composición dentro de dos días antes de someterse a cirugía.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proveen conjugados de una porción de Factor VIII y uno o más polímeros solubles en agua. Típicamente, 5 el polímero soluble en agua es poli(etilenglicol) o un derivado del mismo. También se proveen composiciones que comprenden los conjugados, métodos para elaborar los conjugados, y métodos para administrar composiciones que comprenden los conjugados a un paciente.

959

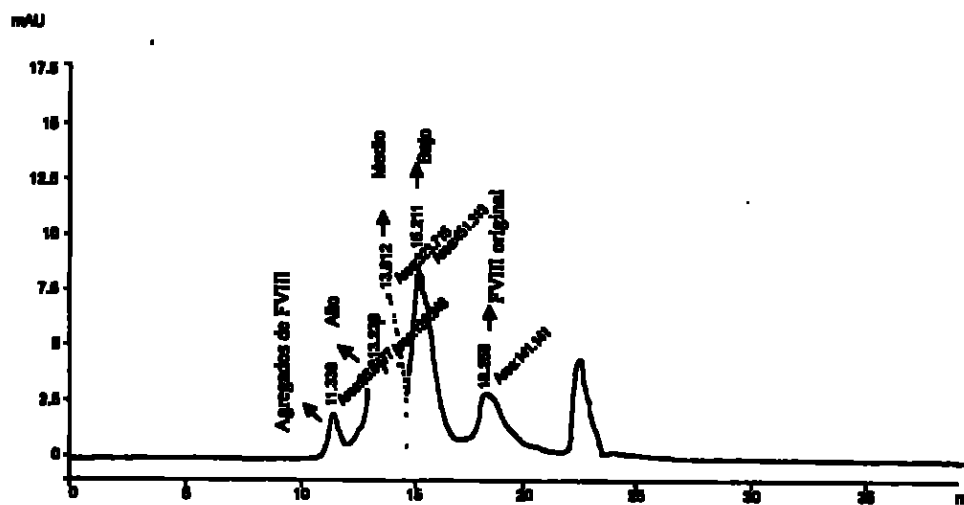


FIG.1

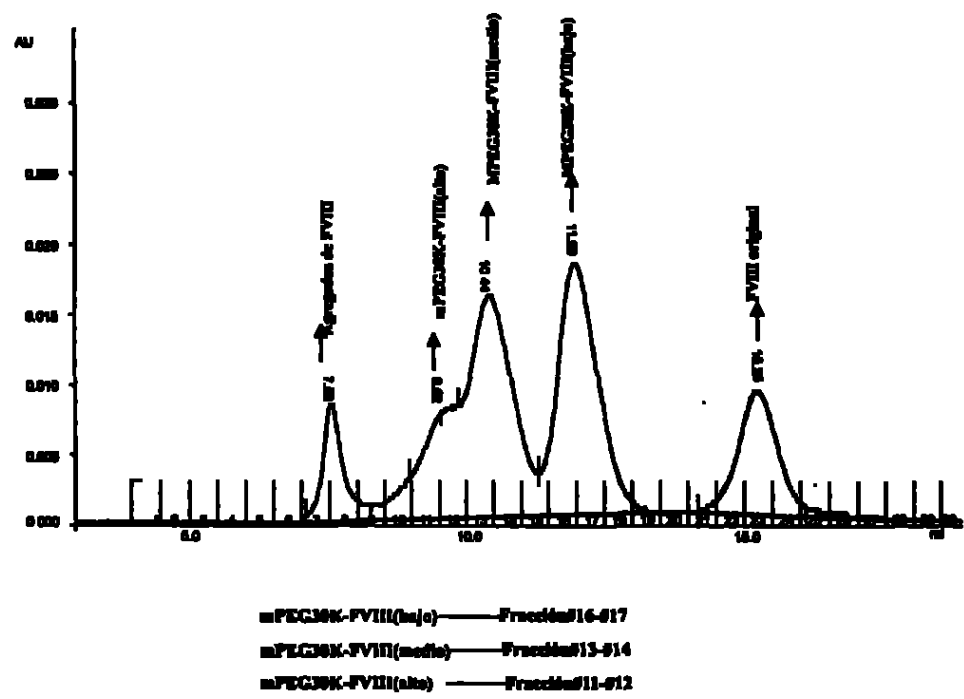


FIG.2

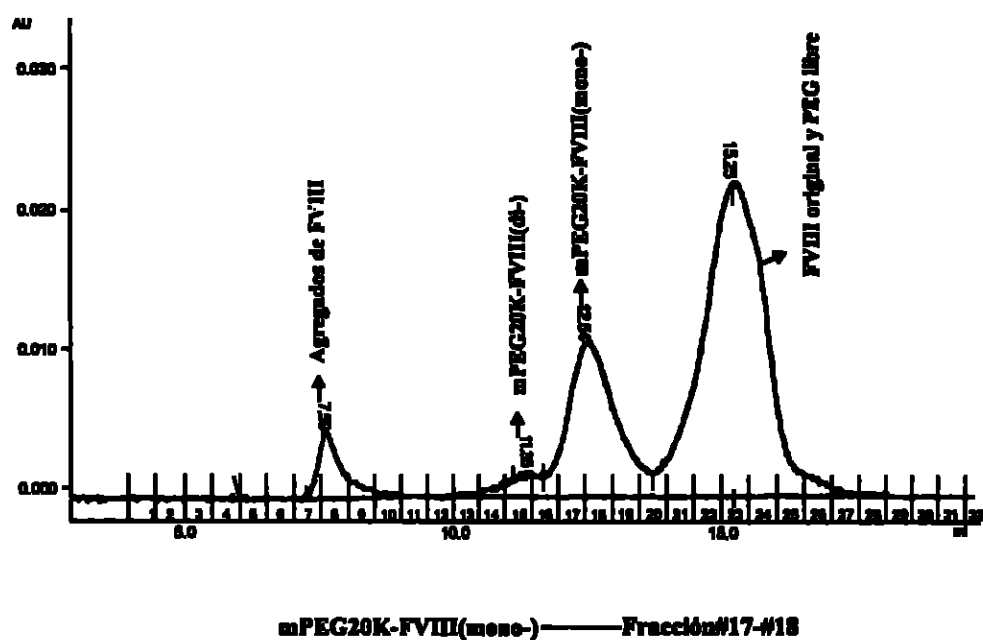


FIG.3

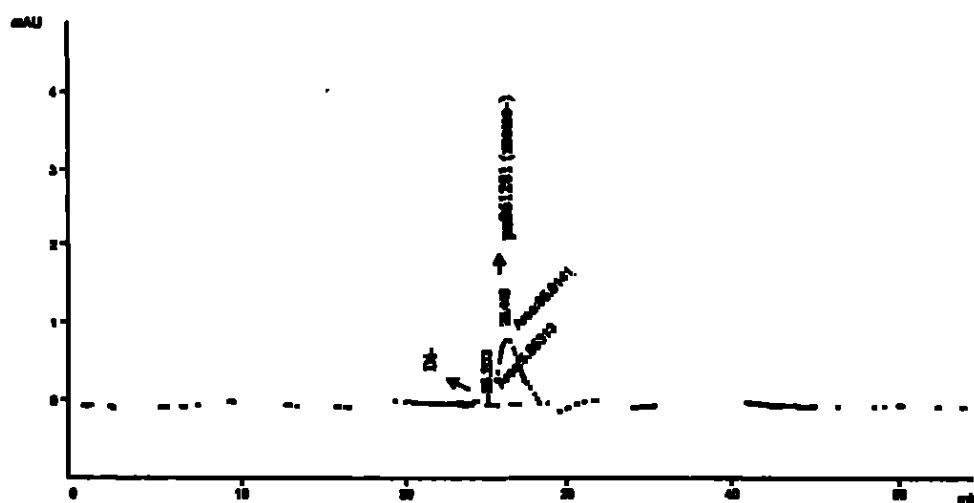


FIG.4

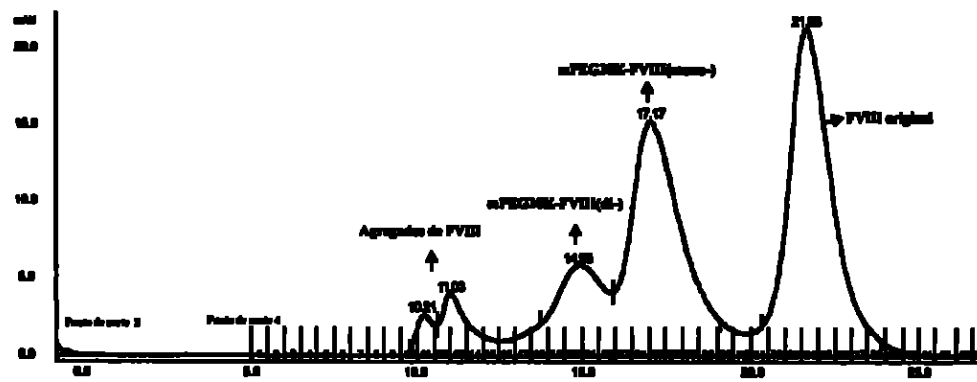


FIG.5

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

NEKTAR THERAPEUTICS
Attn. Wilson, Mark A.
150 Industrial Road
San Carlos, CA 94070
UNITED STATES OF AMERICA

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY OR THE DECLARATION

RECEIVED

DEC 07 2004

BY (PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year)

29/11/2004

Applicant's or agent's file reference

SHE0081.PCT

FOR FURTHER ACTION

See paragraphs 1 and 4 below

International application No.

PCT/US2004/006034

International filing date

(day/month/year)

26/02/2004

Applicant

NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION

1. ☒ The applicant is hereby notified that the International search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 18:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 48):

When? The time limit for filing such amendments is normally 2 months from the date of transmittal of the International Search Report; however, for more details, see the notes on the accompanying sheet.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no International search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. Reminders

Shortly after the expiration of 18 months from the priority date, the International application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the International application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for International publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an International preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within 18 months from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for International preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase until 30 months from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within 20 months from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of 30 months (or later) will apply even if no demand is filed within 18 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority



European Patent Office, P.B. 5818 Patentkanal 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Catriona Cleere

Form PCT/ISA/220 (January 2004)

(See notes on accompanying sheet)

Refused U.S.

185

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48-replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 8 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)".

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 82.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 88.1 bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43 bis.1(c)).

Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference SHE0081.PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US2004/006034	International filing date (day/month/year) 26/02/2004	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26/02/2003
Applicant NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION		
This International Search Report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau. This International Search Report consists of a total of <u>6</u> sheets. ☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.		
1. Basis of the report a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item. ☐ The international search was carried out on the basis of a translation of the international application furnished to this Authority (Rule 23.1(b)). b. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I. 2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box II). 3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box III). 4. With regard to the title, ☒ the text is approved as submitted by the applicant. ☐ the text has been established by this Authority to read as follows: 5. With regard to the abstract, ☒ the text is approved as submitted by the applicant. ☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority. 6. With regards to the drawings, a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. <u>2</u> ☐ as suggested by the applicant. ☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure. ☒ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention. b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.		

157

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/006034

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- ☒ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- ☒ in written format
- ☒ in computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- ☒ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☒ furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/US2004/006034

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 A61K47/48

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 048 720 A (AAKERBLOM EVA ET AL) 11 April 2000 (2000-04-11) whole document, in particular col. 6, lines 51-54	1-10, 12-30, 58
X	US 4 970 300 A (FULTON ANNE J ET AL) 13 November 1990 (1990-11-13) whole document, in particular col. 9, line 7 and 57-62	1-7, 12-30, 58
X	WO 94/04193 A (ENZON INC) 3 March 1994 (1994-03-03) whole document, in particular claims 33-34	1-30, 58
X	US 6 037 452 A (MEALEY EDWARD H ET AL) 14 March 2000 (2000-03-14) whole document, in particular col. 6, line 64	1-30, 58



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 July 2004

Date of mailing of the international search report

29. 11. 2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentplan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Lüdemann, S

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/006034

129

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 6048720	A	11-04-2000	AT 228531 T	15-12-2002
			AU 706246 B2	10-06-1999
			AU 7151796 A	17-04-1997
			BR 9610695 A	06-07-1999
			CA 2231801 A1	03-04-1997
			DE 69625085 D1	09-01-2003
			DE 69625085 T2	17-07-2003
			DK 871649 T3	24-03-2003
			EP 1260582 A1	27-11-2002
			EP 1258497 A2	20-11-2002
			EP 0871649 A1	21-10-1998
			ES 2187676 T3	16-06-2003
			HU 9901203 A2	28-07-1999
			JP 11513378 T	16-11-1999
			NO 981408 A	27-03-1998
			NZ 319322 A	26-08-1998
			PL 325958 A1	17-08-1998
			PT 871649 T	30-04-2003
			WO 9711957 A1	03-04-1997
			ZA 9608139 A	29-05-1997
US 4970300	A	13-11-1990	US 4847362 A	11-07-1989
			US 4743680 A	10-05-1988
			US 4952675 A	28-08-1990
			AU 594325 B2	08-03-1990
			AU 5454086 A	26-08-1986
			BR 8605129 A	05-05-1987
			CN 86102829 A	04-11-1987
			DE 211895 T1	03-09-1987
			DK 448686 A	28-11-1986
			EP 0211895 A1	04-03-1987
			ES 8702432 A1	16-03-1987
			FI 863954 A	30-09-1986
			IE 860305 L	01-08-1986
			JP 62501562 T	25-06-1987
			NO 863902 A	30-09-1986
			WO 8604486 A1	14-08-1986
WO 9404193	A	03-03-1994	AU 5006993 A	15-03-1994
			WO 9404193 A1	03-03-1994
			US 5614549 A	25-03-1997
US 6037452	A	14-03-2000	NONE	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/006034

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 59-61 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been (partially) carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-30, 58-61 (part)

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-30, 58-61 (partially)

a composition comprising a plurality of conjugates each conjugate having one to three water-soluble polymers covalently attached to a factor VIII moiety, wherein each water-soluble polymer has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5000 Daltons to about 150000 Daltons and method for making the conjugate

2. claims: 31-57, 58-61 (partially)

a composition comprising a plurality of monoPEGylated factor VIII moiety conjugates.

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

see form PCT/ISA/220

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 belowInternational application No.
PCT/US2004/006034International filing date (day/month/year)
26.02.2004Priority date (day/month/year)
26.02.2003International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
A61K47/48Applicant
NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☒ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 65.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80288 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Lüdemann, S
Telephone No. +49 89 2399-7842



Box No. 1 Basis of the opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item.
☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
☒ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
☒ in written format
☒ in computer readable form
 - c. time of filing/furnishing:
☒ contained in the international application as filed.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

194

Box No. II Priority

1. ☒ The following document has not been furnished:

☒ copy of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43*bis*.1 and 66.7(a)).

☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed (Rule 43*bis*.1 and 66.7(b)).

Consequently it has not been possible to consider the validity of the priority claim. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

2. ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43*bis*.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. ☐ It has not been possible to consider the validity of the priority claim because a copy of the priority document was not available to the ISA at the time that the search was conducted (Rule 17.1). This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date is the claimed priority date.

4. Additional observations, if necessary:

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire International application,
☒ claims Nos. 59-61 with respect to industrial applicability

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 59-61 relate to the following subject matter which does not require an International preliminary examination (*specify*):

see separate sheet

- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no International search report has been established for the whole application or for said claims Nos.
- ☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that:
- | | |
|----------------------------|--|
| the written form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
| the computer readable form | ☐ has not been furnished |
| | ☐ does not comply with the standard |
- ☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.
- ☐ See separate sheet for further details

146

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has:
- ☐ paid additional fees.
 - ☐ paid additional fees under protest.
 - ☒ not paid additional fees.
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☐ all parts.
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-30, 58-61 (partially)

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-30, 58-61 (partially)
Inventive step (IS)	Yes: Claims	-
	No: Claims	1-30, 58-61 (partially)
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	1-30, 58
	No: Claims	-

2. Citations and explanations

see separate sheet

Re Item III.

Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human or animal body by therapy:

The subject-matter of claims 59-61 can be seen as directed to a method of treatment of the human and/or animal body. No unified criteria exist in PCT for the assessment of whether such methods are industrially applicable or not. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims directed to the use of a compound in medical treatment, but will allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Re Item IV.

1. The separate inventions/groups of inventions are:

1.1 Invention 1: claims 1-30, 58-61 (partially)

a composition comprising a plurality of conjugates each conjugate having one to three water-soluble polymers covalently attached to a factor VIII moiety, wherein each water-soluble polymer has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5000 Daltons to about 150000 Daltons and method for making the conjugate

1.2 Invention 2: claims 31-57, 58-61 (partially)

a composition comprising a plurality of monoPEGylated factor VIII moiety conjugates.

2. They are not so linked as to form a single general inventive concept (Rule 13.1 PCT) for the following reasons:

2.1 The present invention does not meet the requirements of R.13.1 and 13.2 PCT, because the subject-matter of independent claims 1 and 31 does not involve the same or corresponding special technical features nor are they linked by a single general inventive concept. Claim 1 reads as a composition comprising a plurality of conjugates each conjugate having one to three water-soluble polymers covalently attached to a factor VIII moiety, wherein each water-soluble polymer

has a nominal average molecular weight in the range of greater than 5000 Daltons to about 150000 Daltons. Claim 31 reads as a composition comprising a plurality of monoPEGylated factor VIII moiety conjugates. Thus, the feature "nominal average molecular weight in the range of greater than 5000 Daltons to about 150000 Daltons" of claim 1 is not part of claim 31 and vice versa, the feature "monoPEGylated" is not part of claim 1.

- 2.2 In view of D1-D4 (as listed under V.), the problem underlying the single inventive concept is therefore considered as the provision of an alternative factor VIII-conjugate with extended in vivo half-life.
- 2.3 The solution forming the single common concept which links claim 1 and 31 is to be seen as a conjugate comprising one to three water-soluble polymers covalently attached to factor VIII (without any further specification of the molecular weight). Such a conjugate is not novel over documents D1-D4 (see corresponding abstracts and claims) as cited in the search report.

Re Item V.

1. The following documents are referred to in this communication:

D1 : US 6 048 720 A (AAKERBLOM EVA ET AL) 11 April 2000 (2000-04-11)
D2 : US 4 970 300 A (FULTON ANNE J ET AL) 13 November 1990 (1990-11-13)
D3 : WO 94/04193 A (ENZON INC) 3 March 1994 (1994-03-03)
D4 : US 6 037 452 A (MEALEY EDWARD H ET AL) 14 March 2000 (2000-03-14)

2. Novelty (Article 33(2) PCT)

The present application does not meet the criteria of Article 33(1) PCT, because the subject-matter of claims 1-30 is not new in the sense of Article 33(2) PCT.

D1-D4 all disclose compositions comprising a plurality (two or more) of conjugates each conjugate having one to three water-soluble polymers covalently attached to factor VIII, wherein each polymer has an average molecular weight (MW) greater than 5000 Daltons.

- 2.1 Document D1 discloses (the references in parenthesis applying to this document):
Conjugates of factor VIII with monomethoxy polyalkyleneoxide (col. 1, line 20), in particular with PEG of molecular weight 300 up to 20000 (see col.6, lines 51-54).
- 2.2 Document D2 discloses (the references in parenthesis applying to this document):
Conjugates of factor VIII with nonantigenic ligands, such as dextran, a water-soluble polymer, of MW 10-200 kD or PEG or M-PEG with MW between 500-5000 (see col. 9, lines 7 and 57-62).
- 2.3 Document D3 discloses (the references in parenthesis applying to this document):
Conjugates of factor VIII with polyalkylene oxide, in particular PEG, with a MW ranging from 600-100000 D (see in particular claims 25, 32).
- 2.4 Document D4 discloses (the references in parenthesis applying to this document):
Conjugates of factor VIII with polyalkylene oxide. It is explicitly stated that the polyoxyethylene moiety has a molecular weight of 5000 or more (see col.6, line 64).

3. Inventive step (Article 33(3) PCT)

D1-D4 can all be considered as the closest prior art. The examples in D1-D4, disclose conjugates of factor VIII and PEG with a MW of 5000, but there is no contra-indication in documents D1-D4 that PEG with a MW larger than 5 kD should not be used.

In view of these documents, the difference between claims 8-11 and D1-D4 is that in the examples of the present application, conjugates comprising PEG with a MW above 6000 Daltons have been synthesized. The problem to be solved by claims 8-11 could therefore be seen as the provision of an alternative factor VIII-conjugate with extended in vivo half-life.

Coupling factor VIII to PEG with a MW of larger than about 6000 D can however not be seen as involving an inventive step for the following reasons:

Since there is no contra-indication in D1-D4, no surprising effect to such conjugates can be attributed. Furthermore, no advantages have been provided in the present application for conjugates of factor VIII with PEG of a MW larger than about 6000 D. Such advantages could be extended in vivo half-life or reduced immune response vis-à-vis to conjugates with lower molecular weight PEG

(MW=5000D).

It rather appears that, as given example 5, the present application deals with conjugates comprising PEG of 5K (as anticipated by D1-D4).

4: Additional remarks:

Dependent claims 12-30 do not contain any features which, in combination with the features of any claim to which they refer, meet the requirements of the PCT in respect of novelty and/or inventive step (Article 33(2) and (3) PCT).

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
TRANSMITTAL OF COPY OF INTERNATIONAL
APPLICATION AS PUBLISHED OR REPUBLISHED

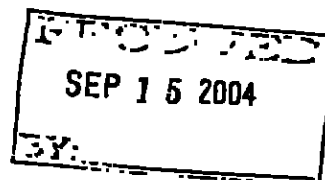
To:

WILSON, Mark, A.
Nektar Therapeutics
150 Industrial Road
San Carlos, CA 94070
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 10 September 2004 (10.09.2004)		
Applicant's or agent's file reference SHE0081.PCT		IMPORTANT NOTICE
International application No. PCT/US2004/006034	International filing date (day/month/year) 26 February 2004 (26.02.2004)	Priority date (day/month/year) 26 February 2003 (26.02.2003)
Applicant NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION et al		

The International Bureau transmits herewith the following documents:

- ☒ copy of the international application as published by the International Bureau on 10 September 2004 (10.09.2004) under No. WO 2004/075923
- ☐ copy of international application as republished by the International Bureau on under No. WO
For an explanation as to the reason for this republication of the international application, reference is made to INID codes (15), (48) or (88) (as the case may be) on the front page of the attached document.



The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Nora Lindner
Facsimile No. +41 22 740 14 35	Facsimile No. +41 22 338 89 65

Practitioner's Docket Number SHE0081.PCT

**PATENT COOPERATION TREATY
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY IN THE EUROPEAN PATENT OFFICE**

International Application No.: PCT/US04/06034

International Filing Date: 26 February 2004 (26.02.2004)

Title: POLYMER-FACTOR VIII MOIETY CONJUGATES

Applicant: Nektar Therapeutics AL, Corporation et al.

**RESPONSE TO INVITATION TO FURNISH NUCLEOTIDE
AND/OR AMINO ACID SEQUENCE LISTING COMPLYING
WITH WIPO STANDARD ST25**

VIA FEDERAL EXPRESS

Ms. Nina Vercio
European Patent Office
STRAND Program
Directorate Documentation
Room S 13 C 10
Patentlaan 2
NL-2288 EE Rijswijk (NL)

Dear Ms. Vercio:

In response to the Invitation to Furnish Nucleotide and/or Amino Acid Sequence Listing Complying with WIPO Standard ST25 mailed 10 June 2004, Applicants submit herewith: (i) a duly executed Statement Accompanying Sequence Listing (1 sheet); (ii) a "floppy disk" containing the required sequence listing in computer readable form; and (iii) a printed listing of the sequence (16 sheets).

Applicant believes that the above application is now in full compliance with the formal requirements of the PCT.

Please do not hesitate to contact me directly at (650) 620-5506 should you require any additional information.



Mark A. Wilson, Reg. No. 43,275
Nektar Therapeutics
150 Industrial Road
San Carlos, California 94070

103

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Atty. Docket No: SHE0081.00 (PCT)

In re International patent application of

NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION

International Application No. PCT/US04/06034

International Filing Date: February 26, 2004

For: POLYMER-FACTOR VIII MOIETY CONJUGATES

Assistant Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450
Mail Stop PCT SEQUENCE

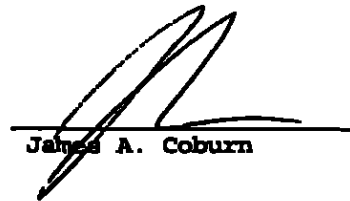
STATEMENT ACCOMPANYING SEQUENCE LISTING

Dear Sir:

The undersigned hereby states that the Sequence Listing submitted concurrently herewith does not include matter which goes beyond the content of the application as filed and that the information recorded on the diskette submitted concurrently herewith is identical to the written Sequence Listing.

Respectfully submitted,

March 19, 2004
Date


James A. Coburn

HARBOR CONSULTING IP SERVICES, INC.
1500A Lafayette Road, #262
Portsmouth, N.H.
800-318-3021

SEQUENCE LISTING

<110> NEKTAR THERAPEUTICS AL, CORPORATION

<120> POLYMER-FACTOR VIII MOIETY CONJUGATES

<130> SHE0081.00 (PCT)

<140> PCT/US04/06034

<141> 2004-02-26

<150> 60/450,578

<151> 2003-02-26

<160> 2

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1

<211> 2351

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
 1             5             10             15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
          20             25             30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
          35             40             45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
 50             55             60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
 65             70             75             80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
          85             90             95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
          100             105             110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
          115             120             125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
          130             135             140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
          145             150             155             160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
          165             170             175

```

265

2/16

Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	180	185	190	
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	195	200	205	
Gln	Thr	Leu	His	Lys	Phe	Ile	Leu	Leu	Phe	Ala	Val	Phe	Asp	Glu	Gly	210	215	220	
Lys	Ser	Trp	His	Ser	Glu	Thr	Lys	Asn	Ser	Leu	Met	Gln	Asp	Arg	Asp	225	230	235	240
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg	Ala	Trp	Pro	Lys	Met	His	Thr	Val	Asn	Gly	Tyr	245	250	255	
Val	Asn	Arg	Ser	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile	Gly	Cys	His	Arg	Lys	Ser	Val	260	265	270	
Tyr	Trp	His	Val	Ile	Gly	Met	Gly	Thr	Thr	Pro	Glu	Val	His	Ser	Ile	275	280	285	
Phe	Leu	Glu	Gly	His	Thr	Phe	Leu	Val	Arg	Asn	His	Arg	Gln	Ala	Ser	290	295	300	
Leu	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala	Gln	Thr	Leu	Leu	Met	305	310	315	320
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe	Leu	Leu	Phe	Cys	His	Ile	Ser	Ser	His	Gln	His	325	330	335	
Asp	Gly	Met	Glu	Ala	Tyr	Val	Lys	Val	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu	Glu	Pro	340	345	350	
Gln	Leu	Arg	Met	Lys	Asn	Asn	Glu	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr	Asp	Asp	Asp	355	360	365	
Leu	Thr	Asp	Ser	Glu	Met	Asp	Val	Val	Arg	Phe	Asp	Asp	Asp	Asn	Ser	370	375	380	
Pro	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile	Arg	Ser	Val	Ala	Lys	Lys	His	Pro	Lys	Thr	385	390	395	400
Trp	Val	His	Tyr	Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala	Pro	405	410	415	.
Leu	Val	Leu	Ala	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr	Leu	Asn	420	425	430	
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met	435	440	445	
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu	450	455	460	
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu	465	470	475	480

206

3/16

Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro
			485						490					495	
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys
			500					505					510		
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe
		515					520					525			
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp
	530					535					540				
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg
	545				550					555				560	
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu
				565					570					575	
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val
			580					585					590		
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu
		595					600					605			
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp
	610					615					620				
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val
	625				630					635					640
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp
			645					650						655	
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe
		660						665						670	
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr
		675					680					685			
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro
	690					695					700				
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly
	705				710					715					720
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp
			725						730					735	
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys
		740						745					750		
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro
		755					760					765			
Ser	Thr	Arg	Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp
	770					775						780			

207

4/16

Ile	Glu	Lys	Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	785	790	795	800
Ile	Gln	Asn	Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	805	810		815
Pro	Thr	Pro	His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	820	825		830
Glu	Thr	Phe	Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	835	840		845
Ser	Leu	Ser	Glu	Met	Thr	His	Phe	Arg	Pro	Gln	Leu	His	His	Ser	Gly	850	855		860
Asp	Met	Val	Phe	Thr	Pro	Glu	Ser	Gly	Leu	Gln	Leu	Arg	Leu	Asn	Glu	865	870		880
Lys	Leu	Gly	Thr	Thr	Ala	Ala	Thr	Glu	Leu	Lys	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	885	890		895
Val	Ser	Ser	Thr	Ser	Asn	Asn	Leu	Ile	Ser	Thr	Ile	Pro	Ser	Asp	Asn	900	905		910
Leu	Ala	Ala	Gly	Thr	Asp	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Gly	Pro	Pro	Ser	Met	915	920		925
Pro	Val	His	Tyr	Asp	Ser	Gln	Leu	Asp	Thr	Thr	Leu	Phe	Gly	Lys	Lys	930	935		940
Ser	Ser	Pro	Leu	Thr	Glu	Ser	Gly	Gly	Pro	Leu	Ser	Leu	Ser	Glu	Glu	945	950		960
Asn	Asn	Asp	Ser	Lys	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Leu	Met	Asn	Ser	Gln	Glu	965	970		975
Ser	Ser	Trp	Gly	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe	980	985		990
Lys	Gly	Lys	Arg	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	Ala	995	1000		1005
Leu	Phe	Lys	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Asn	Lys	Thr	Ser	Asn	1010	1015		1020
Asn	Ser	Ala	Thr	Asn	Arg	Lys	Thr	His	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser	Leu	Leu	1025	1030		1040
Ile	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu	Ser	Asp	Thr	1045	1050		1055
Glu	Phe	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Ile	His	Asp	Arg	Met	Leu	Met	Asp	1060	1065		1070
Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	His	Met	Ser	Asn	Lys	Thr	Thr	1075	1080		1085

5/16

Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile
 1090 1095 1100
 Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe
 1105 1110 1115 1120
 Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser
 1125 1130 1135
 Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly
 1140 1145 1150
 Pro Glu Lys Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys
 1155 1160 1165
 Val Val Val Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu
 1170 1175 1180
 Met Val Phe Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn
 1185 1190 1195 1200
 Leu His Glu Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu
 1205 1210 1215
 Ile Glu Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln
 1220 1225 1230
 Ile His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu
 1235 1240 1245
 Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala
 1250 1255 1260
 Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr
 1265 1270 1275 1280
 Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu
 1285 1290 1295
 Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys
 1300 1305 1310
 Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln
 1315 1320 1325
 Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr
 1330 1335 1340
 Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser
 1345 1350 1355 1360
 Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr
 1365 1370 1375
 Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys
 1380 1385 1390

6/16

Leu Thr Arg Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro
 1395 1400 1405
 Ile Ala Lys Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr
 1410 1415 1420
 Arg Val Leu Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr
 1425 1430 1435 1440
 Arg Lys Lys Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly
 1445 1450 1455
 Ala Lys Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr
 1460 1465 1470
 Gly Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser
 1475 1480 1485
 Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu
 1490 1495 1500
 Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr
 1505 1510 1515 1520
 Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His
 1525 1530 1535
 Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile
 1540 1545 1550
 Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg Val
 1555 1560 1565
 Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp Pro Leu
 1570 1575 1580
 Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys
 1585 1590 1595 1600
 Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr
 1605 1610 1615
 Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile
 1620 1625 1630
 Asn Glu Gly Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln
 1635 1640 1645
 Gly Arg Thr Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg
 1650 1655 1660
 His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu
 1665 1670 1675 1680
 Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe
 1685 1690 1695

7/16

Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys
 1700 1705 1710
 Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
 1715 1720 1725
 Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly
 1730 1735 1740
 Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly
 1745 1750 1755 1760
 Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly
 1765 1770 1775
 Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val
 1780 1785 1790
 Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu
 1795 1800 1805
 Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn
 1810 1815 1820
 Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His
 1825 1830 1835 1840
 His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr
 1845 1850 1855
 Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly
 1860 1865 1870
 Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg
 1875 1880 1885
 Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu
 1890 1895 1900
 Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala
 1905 1910 1915 1920
 Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg
 1925 1930 1935
 Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val
 1940 1945 1950
 Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1955 1960 1965
 Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val
 1970 1975 1980
 Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly
 1985 1990 1995 2000

8/16

Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg
 2005 2010 2015
 Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu
 2020 2025 2030
 Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser
 2035 2040 2045
 Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln
 2050 2055 2060
 Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala
 2065 2070 2075 2080
 Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala
 2085 2090 2095
 Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 2100 2105 2110
 Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly
 2115 2120 2125
 Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val
 2130 2135 2140
 Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn
 2145 2150 2155 2160
 Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser
 2165 2170 2175
 Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser
 2180 2185 2190
 Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205
 Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro
 2210 2215 2220
 Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro
 2225 2230 2235 2240
 Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr
 2245 2250 2255
 Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr
 2260 2265 2270
 Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His
 2275 2280 2285
 Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly
 2290 2295 2300

9/16

Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu
 2305 2310 2315 2320

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile
 2325 2330 2335

Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2340 2345 2350

<210> 2

<211> 2332

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

10/16

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

11/16

Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	Asp	Leu	Ala
530						535					540				
Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	Ser	Val	Asp
545					550					555					560
Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	Ile	Leu	Phe
			565						570					575	
Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	Asn	Ile	Gln
			580					585					590		
Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	Pro	Glu	Phe
		595					600					605			
Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	Phe	Asp	Ser
610						615					620				
Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	Tyr	Ile	Leu
625					630					635					640
Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Tyr
				645					650					655	
Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	Leu	Phe	Pro
			660					665					670		
Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	Gly	Leu	Trp
		675					680					685			
Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	Met	Thr	Ala
690						695					700				
Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	Tyr	Tyr	Glu
705					710					715					720
Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	Asn	Asn	Ala
				725					730					735	
Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	Ser	Thr	Arg
			740					745					750		
Gln	Lys	Gln	Phe	Asn	Ala	Thr	Thr	Ile	Pro	Glu	Asn	Asp	Ile	Glu	Lys
		755					760					765			
Thr	Asp	Pro	Trp	Phe	Ala	His	Arg	Thr	Pro	Met	Pro	Lys	Ile	Gln	Asn
770						775					780				
Val	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Leu	Met	Leu	Leu	Arg	Gln	Ser	Pro	Thr	Pro
785					790					795					800
His	Gly	Leu	Ser	Leu	Ser	Asp	Leu	Gln	Glu	Ala	Lys	Tyr	Glu	Thr	Phe
				805					810					815	
Ser	Asp	Asp	Pro	Ser	Pro	Gly	Ala	Ile	Asp	Ser	Asn	Asn	Ser	Leu	Ser
			820					825					830		

12/16

Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly Asp Met Val
 835 840 845
 Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu Lys Leu Gly
 850 855 860
 Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys Val Ser Ser
 865 870 875 880
 Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn Leu Ala Ala
 885 890 895
 Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met Pro Val His
 900 905 910
 Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys Ser Ser Pro
 915 920 925
 Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu Asn Asn Asp
 930 935 940
 Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu Ser Ser Trp
 945 950 955 960
 Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe Lys Gly Lys
 965 970 975
 Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala Leu Phe Lys
 980 985 990
 Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn Asn Ser Ala
 995 1000 1005
 Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser Leu Leu Ile Glu Asn
 1010 1015 1020
 Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu Ser Asp Thr Glu Phe Lys
 1025 1030 1035 1040
 Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg Met Leu Met Asp Lys Asn Ala
 1045 1050 1055
 Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys
 1060 1065 1070
 Asn Met Glu Met Val Gln Gln Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp
 1075 1080 1085
 Ala Gln Asn Pro Asp Met Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu
 1090 1095 1100
 Ser Ala Arg Trp Ile Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser
 1105 1110 1115 1120
 Gly Gln Gly Pro Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys
 1125 1130 1135

13/16

Ser Val Glu Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val
 1140 1145 1150
 Gly Lys Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe
 1155 1160 1165
 Pro Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu
 1170 1175 1180
 Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu Lys
 1185 1190 1195 1200
 Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile His Thr
 1205 1210 1215
 Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu Leu Ser Thr
 1220 1225 1230
 Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr Ala Pro Val Leu
 1235 1240 1245
 Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg Thr Lys Lys His
 1250 1255 1260
 Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu Asn Leu Glu Gly Leu
 1265 1270 1275 1280
 Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg
 1285 1290 1295
 Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys
 1300 1305 1310
 Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu
 1315 1320 1325
 Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met
 1330 1335 1340
 Lys His Leu Thr Pro Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys
 1345 1350 1355 1360
 Glu Lys Gly Ala Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg
 1365 1370 1375
 Ser His Ser Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys
 1380 1385 1390
 Val Ser Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu
 1395 1400 1405
 Phe Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys
 1410 1415 1420
 Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys
 1425 1430 1435 1440

Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp Gln		
1445	1450	1455
Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val Thr Tyr		
1460	1465	1470
Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu Pro Lys Thr		
1475	1480	1485
Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His Ile Tyr Gln Lys Asp		
1490	1495	1500
Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser Pro Gly His Leu Asp Leu		
1505	1510	1515
Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn		
1525	1530	1535
Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu		
1540	1545	1550
Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp		
1555	1560	1565
Asn His Tyr Gly Thr Gln Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu		
1570	1575	1580
Lys Ser Pro Glu Lys Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser		
1585	1590	1595
Leu Asn Ala Cys Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly		
1605	1610	1615
Gln Asn Lys Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr		
1620	1625	1630
Glu Arg Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg		
1635	1640	1645
Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr		
1650	1655	1660
Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile Tyr		
1665	1670	1675
Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys Thr Arg		
1685	1690	1695
His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr Gly Met Ser		
1700	1705	1710
Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly Ser Val Pro		
1715	1720	1725
Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp Gly Ser Phe Thr		
1730	1735	1740

218

15/16

Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu Gly Leu Leu Gly
1745 1750 1755 1760

Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met Val Thr Phe Arg
1765 1770 1775

Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr
1780 1785 1790

Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys
1795 1800 1805

Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala
1810 1815 1820

Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp
1825 1830 1835 1840

Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu
1845 1850 1855

Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr
1860 1865 1870

Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser
1875 1880 1885

Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
1890 1895 1900

Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala
1905 1910 1915 1920

Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln
1925 1930 1935

Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn
1940 1945 1950

Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys
1955 1960 1965

Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu
1970 1975 1980

Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys
1985 1990 1995 2000

Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val
2005 2010 2015

Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile
2020 2025 2030

Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
2035 2040 2045

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr
 2050 2055 2060
 Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile
 2065 2070 2075 2080
 Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu
 2085 2090 2095
 Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp
 2100 2105 2110
 Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly
 2115 2120 2125
 Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2130 2135 2140
 Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser
 2145 2150 2155 2160
 Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met
 2165 2170 2175
 Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala
 2180 2185 2190
 Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala
 2195 2200 2205
 Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn
 2210 2215 2220
 Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val
 2225 2230 2235 2240
 Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr
 2245 2250 2255
 Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr
 2260 2265 2270
 Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
 2275 2280 2285
 Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg
 2290 2295 2300
 Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg
 2305 2310 2315 2320
 Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr
 2325 2330

PC/MS-DOS PATENTIN 3.2
NEKTAR THERAPEUTICS
AL, CORPORATION
Appl. No.: PCT/US04/06034
Filed: 26-FEB-2004
Data Rec: 19-MAR-2004
Atty. Dkt. No:
SHE0081.00 (PCT)



FORMATO DE DIGITALIZACION
RELACION DE ANEXOS



Royal
Technologies S.A.
Calle 10 No. 10-10, San José, Costa Rica

221

Expediente No		No de Unidades	No de Folia
Item			
1	CD		✓
2	DVD		
3	REVISTA		
4	LIBRO		
5	PERIODICO		
6	DISQUETES		
7	SOBRE DE MANILA X	1	✓
8	SOBRE BLANCO TAMAÑO CARTA		
9	SOBRE BLANCO TAMAÑO OFICIO		
10	OTROS:		

Observaciones:

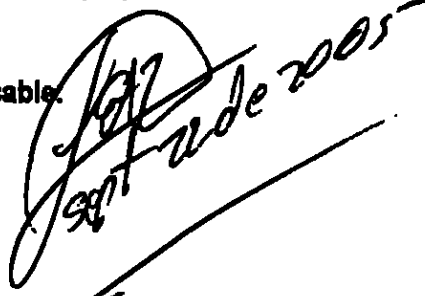
Contiene disk final

222

Superindustria y Comercio
Radicacion : 65896232 00000000 Folios: 221
Fecha (AMD): 2005-09-22 16:52:49
Tramite : 011 PCT-PATENT 378 FASE NACT 411 PRESENTAR
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACION Y AGILIZACION DEL TRAMITE

	USUARIO	RADICADOR
PATENTE DE INVENCION	()	()
MODELO DE UTILIDAD	()	()
- Indicación de que se solicita la concesión de una patente.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud.	()	()
- Descripción de la invención.	()	()
- Dibujos de ser estos pertinentes.	()	()
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
DISEÑO INDUSTRIAL ()		
- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud.	()	()
- Representación gráfica o fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño.	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()
ESQUEMA DE TRAZADO ()		
- Indicación de que solicita el registro de un Esquema de trazado.	()	()
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta La solicitud.	()	()
- Representación gráfica del esquema de trazado	()	()
- Comprobante de pago de las tasas establecidas.	()	()
COMPLETA ()	INCOMPLETA ()	()

Firma Responsable: 
Fecha: _____

223

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCI

Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D'ALEMAN DILIA MARIA

669

REFERENCIA	Radicación No.	5 96232
	Solicitud internacional	US2004/006034
	Fecha inicio fase nacional	26/09/2005
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	11783

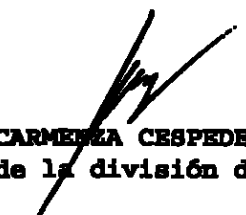
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMEN CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 09 Dic. 2005
adpal