

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 004 108**

51 Int. Cl.:

A61K 38/36 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.07.2018 PCT/US2018/041319**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.01.2019 WO19010496**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.07.2018 E 18746457 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.10.2024 EP 3648787**

54 Título: **Tratamiento de pacientes con enfermedad grave de von Willebrand que se someten a cirugía electiva mediante administración de VWF recombinante**

30 Prioridad:

07.07.2017 US 201762530024 P

17.08.2017 US 201762546999 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

11.03.2025

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED
(100.00%)**

**1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka, JP**

72 Inventor/es:

**CHAPMAN, MIRANDA;
EWENSTEIN, BRUCE y
PLODER, BETTINA**

74 Agente/Representante:

FERNÁNDEZ POU, Felipe

ES 3 004 108 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Tratamiento de pacientes con enfermedad grave de von Willebrand que se someten a cirugía electiva mediante administración de VWF recombinante

5

Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

10

Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/546,999, presentada el 17 de agosto de 2017, y la solicitud de patente provisional de EE. UU. n.º 62/530,024, presentada el 7 de julio de 2017.

Antecedentes de la invención

15

Las enfermedades de la coagulación, tales como la enfermedad de von Willebrand (VWD), generalmente son resultado de una deficiencia en la cascada de la coagulación. La enfermedad de von Willebrand (VWD) se refiere al grupo de enfermedades causadas por una deficiencia del factor de von Willebrand. El factor von Willebrand ayuda a que las plaquetas sanguíneas se agreguen entre sí y se adhieran a la pared de los vasos sanguíneos, lo cual es necesario para la coagulación sanguínea normal.

20

La enfermedad de von Willebrand (VWD) es el trastorno hemorrágico hereditario más común, con una tasa de prevalencia estimada del 1% (Veyradier A, et al., *Medicine* (Baltimore). 2016, 95(11):e3038). Sin embargo, excluyendo las formas más leves de la enfermedad, sólo aproximadamente 1/10.000 pacientes realmente requieren tratamiento. El tratamiento actual de estas coagulopatías incluye una terapia sustitutiva utilizando preparaciones farmacéuticas que comprenden el factor de coagulación normal.

25

30

El VWF es una glicoproteína que circula en el plasma como una serie de multímeros cuyo tamaño varía de aproximadamente 500 a 20.000 kD. Se ha clonado la longitud completa del ADNc del VWF; el propolipéptido corresponde a los restos de aminoácidos 23 a 764 del prepro-VWF de longitud completa (Eikenboom et al (1995) *Haemophilia* 1, 77-90). Las formas multiméricas del VWF están compuestas por subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El VWF media la adhesión plaquetaria inicial al subendotelio de la pared del vaso dañado, presentando los multímeros más grandes actividad hemostática mejorada. El VWF multimerizado se une a la glicoproteína de la superficie plaquetaria Gp1b α , a través de una interacción en el dominio A1 del VWF, facilitando la adhesión plaquetaria. Otros sitios del VWF median la unión a la pared de los vasos sanguíneos. De esta forma, el VWF forma un puente entre la plaqueta y la pared del vaso que es esencial para la adhesión plaquetaria y la hemostasia primaria en condiciones de tensión de cizallamiento alto. Normalmente, las células endoteliales secretan formas poliméricas grandes de VWF y las formas de VWF que tienen un peso molecular más bajo surgen de la escisión proteolítica. Los multímeros de masas moleculares excepcionalmente grandes se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y son liberados tras la estimulación por agonistas tales como la trombina y la histamina.

40

45

Para los pacientes con VWD, se recomienda que sean tratados con reemplazo del factor de von Willebrand (VWF) dada la necesidad de hemostasia prolongada, particularmente en cirugía mayor (Mannucci PM y Franchini M., *Haemophilia*, 2017, 23(2): 182-187; Institutos Nacionales de Salud. Instituto Nacional del Corazón, los Pulmones y la Sangre. The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Publicación del NIH n.º 08-5832; diciembre de 2007). Las terapias con VWF derivado del plasma contienen factor VIII (FVIII) y tienen el potencial de acumulación de FVIII con dosis repetidas. VONVENDI® (factor von Willebrand [recombinante], Shire, Westlake Village, CA) es el primer y único concentrado de VWF recombinante (rVWF) (Turecek PL, et al. *Hamostaseologie*. 2009;29(suppl 1):532-38; Mannucci PM, et al. *Blood*, 2013;122(5):648-657; Gill JC, et al. *Blood*, 2015;126(17):2038-2046). El documento EP 1 593 390 se refiere a un tratamiento con vWF derivado de plasma y no describe la presente pauta posológica específica.

50

Breve compendio de la invención

55

60

La presente invención proporciona factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para usar en métodos de pretratamiento para un paciente con enfermedad de von Willebrand grave antes de un procedimiento quirúrgico administrando 20-60 UI/kg de factor de von Willebrand recombinante (rVWF) al paciente entre 12 horas y 24 horas, p. ej., 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 12 horas y 24 horas, 14 horas y 24 horas, 16 y 24 horas, 18 horas y 24 horas, o 20 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y sin administrar factor VIII (FVIII) con el rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, el rVWF para usar en el método de pretratamiento comprende además administrar al sujeto 5-90 UI/kg de rVWF 1 hora antes de la cirugía. En algunas realizaciones, se administran al sujeto 70-200 UI de rVWF después de la cirugía, con o sin el pretratamiento descrito anteriormente. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico se selecciona de un grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.

65

En algunas realizaciones, se administran al sujeto 35-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de un

procedimiento quirúrgico mayor. En otras realizaciones, se administran al sujeto 15-90 ILT/kg de rVWF 1 hora antes de un procedimiento quirúrgico mayor. En otra realización, se administran al sujeto 150-220 UI/kg de rVWF después de un procedimiento quirúrgico mayor. En algunos casos, se administra al sujeto sometido a un procedimiento quirúrgico mayor una dosis total de 220-320 UI/kg. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor y el pretratamiento comprende la administración de al menos dos dosis aproximadamente iguales de rVWF antes del procedimiento quirúrgico. Por "aproximadamente igual" como se utiliza en el presente documento se hace referencia a dosis que tienen concentraciones dentro de 1-15%, 2-14%, 3-13%, 4-12%, 5-11%, 6-10%, 7-9%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% entre sí.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto 50-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de un procedimiento quirúrgico menor. En otras realizaciones, se administra al sujeto 5-50 ILT/kg de rVWF 1 hora antes de una cirugía menor. En otra realización, se administran al sujeto 70-150 UI/kg de rVWF después de un procedimiento quirúrgico menor. En algunos casos, se administra al sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico menor una dosis total de 100-220 UI/kg. En algunos casos, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende la administración de al menos dos dosis de rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto 20-40 ILT/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de un procedimiento quirúrgico oral. En otras realizaciones, se administran al sujeto 20-50 UI/kg de rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico oral. En otra realización, se administran al sujeto 10-50 UI/kg de rVWF durante el procedimiento quirúrgico oral. En otra realización, se administran al sujeto 70-150 UI/kg de rVWF después de un procedimiento quirúrgico oral. En algunos casos, se administra al sujeto sometido a un procedimiento quirúrgico oral una dosis total de 70-190 UI/kg. En algunos casos, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral y el pretratamiento comprende la administración de al menos dos dosis aproximadamente iguales de rVWF antes del procedimiento quirúrgico.

Otros objetos, ventajas y realizaciones de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra la eficiencia hemostática general (criterio de valoración principal) en los pacientes del estudio.

La FIG. 2 muestra la eficiencia hemostática (criterio de valoración secundario) en los pacientes del estudio.

La FIG. 3 muestra datos demográficos y características clínicas iniciales.

La FIG. 4 muestra los parámetros PK para VWF:RCO (n=11).

La FIG. 5A y la FIG. 5B muestran los niveles medios de VWF:RCO y FVIII:C endógeno en respuesta a rVWF 50±5 UI de rVWF:RCO/kg en todos los pacientes con VWD con datos PK analizados (n = 11) (FIG. 5A) y el subconjunto de pacientes con VWD tipo 3 (n = 5) (FIG. 5B).

La FIG. 6 muestra las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos del VWF.

Descripción detallada de la invención

Introducción

La presente invención proporciona rVWF para usar en métodos para el pretratamiento de un paciente con enfermedad de von Willebrand grave antes de cirugía mediante la administración al paciente de factor de von Willebrand recombinante (rVWF) 45-60 IG/kg de rVWF sin administrar factor VIII con el rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico se selecciona de un grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.

Definiciones

Como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el", "la" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Así, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye una pluralidad de dichos anticuerpos y la referencia a "una célula hospedante" incluye la referencia a una o más células hospedantes y equivalentes de las mismas conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente. Se observa además que las reivindicaciones pueden ser redactadas para excluir cualquier elemento opcional. Como tal, esta declaración pretende servir como base antecedente para el uso de terminología exclusiva tal como "únicamente", "solamente" y similares en relación

con la enumeración de elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación "negativa".

Antes de describir la invención en más detalle, se debe comprender que esta invención no se limita a las realizaciones particulares descritas, ya que estas evidentemente pueden variar. También debe comprenderse que la terminología utilizada en el presente documento tiene solo el fin de describir realizaciones particulares y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

El término "pre-propéptido de VWF", "prepro-VWF" o "pro-VWF" se refiere a un polipéptido de VWF no maduro que comprende un péptido señal de aproximadamente 22 restos de aminoácidos, un propéptido de VWF de aproximadamente 741 restos de aminoácidos y una subunidad de VWF madura de aproximadamente 2050 restos de aminoácidos. Las subunidades de pro-VWF pueden dimerizarse por medio de enlaces disulfuro cerca de sus extremos carboxilo en el retículo endoplásmico para formar dímeros cola-cola que luego son transportados al Golgi. En el Golgi, se forman enlaces disulfuro cabeza-cabeza adicionales cerca de los extremos amino de las subunidades, formándose así multímeros. La escisión proteolítica del propéptido de VWF se produce a través de la proteasa furina de procesamiento, produciendo así un complejo VWF/VWF-PP maduro. Cuando se incluye "r" antes de la designación del VWF, esto se refiere a la versión recombinante. En algunas realizaciones, los métodos descritos en el presente documento se aplican al VWF recombinante (rVWF).

La expresión "complejo de VWF" o "complejo mat-VWF/VWF-PP" se refiere a una estructura heterodímera unida no covalentemente que comprende una subunidad de VWF madura y un propéptido de VWF. El complejo de VWF se puede generar como un producto de la escisión de furina entre la parte de propéptido y la parte de VWF madura del pre-propéptido de VWF. Cuando se incluye "r" antes de la designación del VWF, esto se refiere a la versión recombinante. En algunas realizaciones, el rVWF para el uso descrito en el presente documento se aplica al VWF recombinante (rVWF). Como se utiliza en el presente documento, "rVWF" se refiere a VWF recombinante.

Como se utiliza en el presente documento, "rFVIII" se refiere a FVIII recombinante.

El término "recombinante" cuando se usa con referencia, p. ej., a una célula, o ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo, o la alteración de una proteína o ácido nucleico nativo, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Así, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran en la forma nativa (no recombinante) de la célula o expresan genes nativos que de otro modo se expresan de forma anormal, subexpresan o no se expresan en absoluto.

Como se utiliza en el presente documento, "VWF recombinante" incluye VWF obtenido mediante tecnología de ADN recombinante. En ciertas realizaciones, las proteínas de VWF para el uso de la invención pueden comprender una construcción, por ejemplo, preparada como en la publicación internacional WO 1986/06096 publicada el 23 de octubre de 1986 y solicitud de patente de EE. UU. N.º de Ser. 07/559,509, presentada el 23 de julio de 1990, a nombre de Ginsburg et al. El VWF para el uso de la presente invención puede incluir todas las formas potenciales, incluidas las formas monoméricas y multiméricas. También debe entenderse que el uso de la presente invención abarca diferentes formas de VWF que se pueden utilizar en combinación. Por ejemplo, el VWF para el uso de la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados y tanto derivados biológicamente activos como derivados no biológicamente activos.

En el contexto del uso de la presente invención, el VWF recombinante abarca cualquier miembro de la familia VWF de, por ejemplo, un mamífero tal como un primate, ser humano, mono, conejo, cerdo, roedor, ratón, rata, hámster, jerbo, cánido, felino y derivados biológicamente activos de los mismos. También se incluyen las proteínas de VWF mutantes y variantes que tienen actividad, así como fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas de VWF. Además, el VWF para el uso de la invención puede comprender además marcadores que faciliten la purificación, detección o ambas. El VWF descrito en el presente documento puede modificarse además con una fracción terapéutica o una fracción adecuada para la obtención de imágenes in vitro o in vivo.

Como se utiliza en el presente documento, "VWF derivado de plasma (pdVWF)" incluye todas las formas de la proteína que se encuentran en la sangre, incluido el VWF maduro obtenido de un mamífero que tiene la propiedad de estabilizar in vivo, p. ej., unirse, a al menos una molécula de FVIII.

La expresión "VWF altamente multimérico" o "VWF de alto peso molecular" se refiere al VWF que comprende al menos 10 subunidades, o 12, 14 o 16 subunidades, hasta aproximadamente 20, 22, 24 o 26 subunidades o más. El término "subunidad" se refiere a un monómero de VWF. Como se sabe en la técnica, generalmente son los dímeros de VWF los que polimerizan para formar los multímeros de orden mayor (véase Turecek et al., Semin. *Thromb. Hemost.* 2010, 36(5): 510-521).

Como se utiliza en el presente documento, el término "factor VIII" o "FVIII" se refiere a cualquier forma de molécula de factor VIII con las características típicas del factor VIII de coagulación sanguínea, ya sea endógeno de un paciente, derivado del plasma sanguíneo o producido mediante el uso de técnicas de ADN recombinante, e incluyendo todas las formas modificadas del factor VIII. El factor VIII (FVIII) existe de forma natural y en preparaciones terapéuticas como una distribución heterogénea de polipéptidos que surgen de un único producto genético (véase, p. ej., Andersson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83:2979-2983 (1986)). Los ejemplos comercialmente disponibles de preparaciones terapéuticas que contienen Factor VIII incluyen las ventas bajo los nombres comerciales de HEMOFIL M, ADVATE y RECOMBINATE (disponibles de Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Ill., EE. UU.).

Como se utiliza en el presente documento, "actividad del FVIII plasmático" y "actividad in vivo del FVIII" se utilizan indistintamente. La actividad del FVIII in vivo medida mediante ensayos convencionales puede ser la actividad del FVIII endógeno, la actividad de un FVIII administrado terapéuticamente (recombinante o derivado del plasma) o la actividad del FVIII tanto endógeno como administrado. De manera similar, "FVIII plasmático" se refiere al FVIII endógeno o al FVIII recombinante o derivado del plasma administrado.

Como se utiliza en el presente documento, "enfermedad de von Willebrand" se refiere al grupo de enfermedades causadas por una deficiencia del factor de von Willebrand. El factor von Willebrand ayuda a que las plaquetas sanguíneas se agreguen entre sí y se adhieran a la pared de los vasos sanguíneos, lo cual es necesario para la coagulación sanguínea normal. Como se describe con más detalle en el presente documento, existen varios tipos de enfermedad de Von Willebrand, que incluyen los tipos 1, 2A, 2B, 2M y 3.

Los términos "aislado", "purificado" o "biológicamente puro" se refieren a un material que carece sustancial o esencialmente de los componentes que normalmente lo acompañan tal como se encuentra en su estado nativo. La pureza y la homogeneidad se determinan normalmente usando técnicas de química analítica tales como la electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. El VWF que es la especie predominante presente en una preparación está sustancialmente purificado. El término "purificado" en algunas realizaciones indica que un ácido nucleico o proteína dan lugar esencialmente a una banda en un gel electroforético. En otras realizaciones, significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos 50% puro, más preferiblemente al menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más puro. "Purificar" o "purificación", en otras realizaciones, significa separar al menos un contaminante de la composición que se va a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, p. ej., 100% puro.

Como se utiliza en el presente documento, "administrar" (y todos los equivalentes gramaticales) incluye administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea, administración oral, administración como un supositorio, contacto tópico, administración intraperitoneal, intralesional o intranasal, o la implantación de un dispositivo de liberación lenta, p. ej., una minibomba osmótica, a un sujeto. La administración es por cualquier vía, incluida la parenteral y transmucosa (p. ej., oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, p. ej., la administración intravenosa, intramuscular, intraarterial, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de administración incluyen, pero no se limitan al uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

Las expresiones "cantidad o dosis terapéuticamente efectiva" o "cantidad o dosis terapéuticamente suficiente" o "cantidad o dosis efectiva o suficiente" se refieren a una dosis que produce efectos terapéuticos para los cuales se administra. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para tratar la hemofilia puede ser la cantidad que es capaz de prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados con la hemofilia. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y podrá ser determinada por un experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, p. ej., Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Pickar, *Dosage Calculations* (1999); y Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 20.^a Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams y Wilkins).

Como se utilizan en el presente documento, los términos "paciente" y "sujeto" se utilizan indistintamente y se refieren a un mamífero (preferiblemente ser humano) que tiene una enfermedad o tiene el potencial de contraer una enfermedad.

Como se utiliza en el presente documento, el término "aproximadamente" indica un intervalo aproximado de más o menos 10% a partir de un valor especificado. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 20%" abarca un intervalo de 18-22%.

Como se utiliza en el presente documento, el término "semivida" se refiere al período de tiempo que tarda la cantidad de una sustancia que se está descomponiendo (o aclaramiento de una muestra o de un paciente) en disminuir a la mitad.

I. Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

La presente invención utiliza composiciones que comprenden el factor de von Willebrand (rVWF) para el pretratamiento de sujetos con VWD grave que se someten a un procedimiento quirúrgico, tal como, pero no limitado a, cirugía mayor, cirugía menor o cirugía oral como se define además en las reivindicaciones.

En ciertas realizaciones, las proteínas de VWF para el uso de la invención pueden comprender una construcción, por ejemplo, preparada como en la publicación internacional WO 1986/06096 publicada el 23 de octubre de 1986 y solicitud de patente de EE. UU. N.º Ser. 07/559,509, presentada el 23 de julio de 1990, a nombre de Ginsburg et al. El VWF útil para la presente invención incluye todas las formas potenciales, incluidas las formas monoméricas y multiméricas. Una forma particularmente útil de VWF son los homomultímeros de al menos dos VWF. Las proteínas de VWF pueden ser un derivado biológicamente activo o, cuando se utilizan únicamente como estabilizante del FVIII, el VWF puede ser de una forma no biológicamente activa. También debe entenderse que la presente invención abarca diferentes formas de VWF para utilizar en combinación. Por ejemplo, una composición útil para la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados y tanto derivados biológicamente activos como derivados no biológicamente activos.

En la hemostasia primaria, el VWF sirve como un puente entre las plaquetas y componentes específicos de la matriz extracelular, tales como el colágeno. La actividad biológica del VWF en este proceso se puede medir mediante diferentes ensayos in vitro (Turecek et al., *Semin. Thromb. Hemost.* 28: 149-160, 2002). El ensayo del cofactor ristocetina se basa en la aglutinación de plaquetas de nueva aportación o fijadas con formalina inducida por el antibiótico ristocetina en presencia de VWF.

El grado de aglutinación plaquetaria depende de la concentración de VWF y se puede medir mediante el método turbidimétrico, p. ej. mediante el uso de un agregómetro (Weiss et al., *J. Clin. Invest.* 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane et al., *Thromb. Diath. Haemorrh.* 34: 306-308, 1975). El segundo método es el ensayo de unión de colágeno, que se basa en la tecnología ELISA (Brown et Bosak, *Thromb. Res.* 43: 303-311, 1986; Favaloro, *Thromb. Haemost.* 83: 127-135, 2000). Una placa de microtitulación está recubierta con colágeno tipo I o III. Luego, el VWF se une a la superficie del colágeno y posteriormente se detecta con un anticuerpo policlonal marcado con enzima. La última etapa es la reacción del sustrato, que se puede vigilar fotométricamente con un lector de ELISA. Como se proporciona en el presente documento, la actividad específica del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCO) para el uso de la presente invención se describe generalmente en términos de mU/μg de VWF, medido utilizando ensayos in vitro.

Una ventaja de las composiciones de rVWF para el uso de la presente invención frente al pdVWF es que el rVWF presenta una actividad específica más alta que el pdVWF. En algunas realizaciones, el rVWF para el uso de la invención tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 o más mU/μg.

El rVWF para el uso de la presente invención es altamente multimérico comprendiendo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades. En otras realizaciones, el rVWF multimérico producido utilizando métodos de la presente memoria descriptiva comprende aproximadamente 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 subunidades. En otras realizaciones, el rVWF está presente en multímeros que varían en tamaño de dímeros a multímeros de más de 40 subunidades (>10 millones de Daltons). Los multímeros más grandes proporcionan múltiples sitios de unión que pueden interaccionar tanto con los receptores plaquetarios como con los sitios de lesión de la matriz subendotelial, y son la forma hemostáticamente más activa del VWF. La aplicación de ADAMTS13 escindiría los multímeros rVWF ultragrandes con el tiempo, pero durante la producción (generalmente a través de la expresión en cultivo celular), las composiciones de rVWF para el uso de la presente invención generalmente no están expuestas a ADAMTS13 y conservan su estructura altamente multimérica.

En una realización, una composición de rVWF como se usa en el presente documento tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada por que el 95% de los oligómeros tienen entre 6 subunidades y 20 subunidades. En otras realizaciones, la composición de rVWF tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada por que el 95% de los oligómeros tienen un intervalo de subunidades seleccionadas de variaciones de 458 a 641 que se encuentran en la Tabla 2 de la publicación internacional WO 2012/171031.

En una realización, una composición de rVWF se puede caracterizar según el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o un multímero más grande. Por ejemplo, en una realización, al menos el 20% de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF utilizada en los métodos descritos en el presente documento están presentes en un complejo oligomérico de al menos 10 subunidades. En otra realización, al menos el 20% de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF utilizada como se describe en el presente documento están presentes en un complejo oligomérico de al menos 12 subunidades. En otras realizaciones más, una composición de rVWF utilizada como se proporciona en el presente documento tiene un porcentaje mínimo (p. ej., tiene al menos X%) de moléculas de

rVWF presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande (p. ej., un multímero de al menos Y subunidades) según una cualquiera de las variaciones 134 a 457 que se encuentran en la Tabla 3 a la Tabla 5.

- 5 De acuerdo con lo anterior, la composición de rVWF administrada al sujeto (con o sin FVIII) generalmente comprende un porcentaje significativo de multímeros de rVWF de alto peso molecular (HMW). En otras realizaciones, la composición de multímeros de rVWF de HMW comprende al menos 10%-80% de decámeros de rVWF o multímeros de orden superior. En otras realizaciones, la composición comprende aproximadamente 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% de decámeros o multímeros de orden superior. En otras realizaciones, la composición de multímeros de rVWF de HMW comprende al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de decámeros o multímeros de orden superior.

- 15 La evaluación del número y porcentaje de multímeros de rVWF se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, métodos que utilizan electroforesis y cromatografía de exclusión por tamaño para separar los multímeros de VWF por tamaños, por ejemplo como comentan Cumming et al, (*J Clin Pathol.* mayo de 1993; 46(5): 470-473. Estas técnicas pueden incluir además técnicas de inmunotransferencia (tales como transferencia Western), en las que se lleva a cabo la inmunotransferencia en gel con un anticuerpo radiomarcado contra VWF seguido de detección quimioluminiscente (véase por ejemplo Wen et al., (1993), *J. Clin. Lab. Anal.*, 7: 317-323. Otros ensayos para el VWF incluyen el ensayo de actividad de unión VWF:Antígeno (VWF:Ag), VWF:Cofactor de ristocetina (VWF:RCof) y VWF:colágeno (VWF:CBA), que se utilizan a menudo para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de Von Willebrand. (véase por ejemplo Favaloro et al., *Pathology*, 1997, 29(4): 341-456.

- 25 En otras realizaciones, los multímeros de rVWF de orden superior para el uso de la invención son estables durante aproximadamente 1 a aproximadamente 90 horas después de la administración. En otras realizaciones más, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante aproximadamente 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 horas después de la administración. En otras realizaciones más, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante al menos 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 horas después de la administración. En ciertas realizaciones, la estabilidad de los multímeros de rVWF se evalúa in vitro.

- 30 En una realización, los multímeros de rVWF de orden superior utilizados en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento tienen una semivida de al menos 12 horas después de la administración. En otra realización, los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida de al menos 24 horas después de la administración. En otras realizaciones más, los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida seleccionada de variaciones de 642 a 1045 que se encuentran en la Tabla 6 de la publicación internacional WO 2012/171031.

- 40 En aspectos específicos, los rVWF (recombinantes o derivados del plasma) utilizados según la presente invención no se modifican con ninguna modificación de conjugación, postraduccion o covalente. En realizaciones particulares, el rVWF para el uso de la presente invención no está modificado con un polímero soluble en agua, incluyendo, sin limitación, un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol, un polioxialquileno, un poli(ácido siálico), hidroxietil-almidón, una fracción de policarbohidrato y similares.

- 45 En otros aspectos, el rVWF (recombinante o derivado de plasma) utilizado de acuerdo con la presente invención se modifica por medio de conjugación, modificación postraduccion o modificación covalente, incluyendo modificaciones de los restos N o C-terminales, así como modificaciones de cadenas laterales seleccionadas, por ejemplo, en grupos sulfhidrilo libres, aminas primarias y grupos hidroxilo. En una realización, un polímero soluble en agua está unido a la proteína (directamente o a través de un conector) mediante un grupo lisina u otra amina primaria. En una realización, las proteínas de rVWF para el uso de la presente invención pueden estar modificadas por conjugación con un polímero soluble en agua, incluyendo, sin limitación, un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol, un polioxialquileno, un poli(ácido siálico), hidroxietil-almidón, una fracción de policarbohidrato y similares.

- 55 Los polímeros solubles en agua que pueden usarse para modificar el rVWF y/o FVIII incluyen estructuras lineales y ramificadas. Los polímeros conjugados pueden unirse directamente a las proteínas de coagulación para el uso de la invención, o alternativamente pueden unirse a través de una fracción de enlace. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de conjugación de proteínas con polímeros solubles en agua en las patentes de EE. UU. N.º 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 y 4,179,337, así como en Abuchowski y Davis "Enzymes as Drugs," Holcenberg and Roberts, Eds., págs. 367-383, John Wiley and Sons, New York (1981), y Hermanson G., *Bioconjugate Techniques* 2.ª Ed., Academic Press, Inc. 2008.

- 65 La conjugación de proteínas se puede llevar a cabo mediante una serie de técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, véase Hermanson G., *Bioconjugate Techniques* 2.ª Ed., Academic Press, Inc. 2008. Los ejemplos incluyen la unión a través del enlace peptídico entre un grupo carboxilo en una de las fracciones de proteína de coagulación o polímero soluble en agua y un grupo amina de la otra, o una unión éster entre un grupo carboxilo de una y un grupo hidroxilo de la otra. Otra unión mediante la cual una proteína de coagulación

para el uso de la invención podría conjugarse con un compuesto polimérico soluble en agua es a través de una base de Schiff, entre un grupo amino libre en la fracción polimérica que se hace reaccionar con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polímero por oxidación con peryodato (Jennings y Lugowski, *J. Immunol.* 1981; 127:1011-8; Femandes y Gregonradis, *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1341; 26-34). La base de Schiff generada se puede estabilizar mediante reducción específica con NaCNBH₃ para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino libres terminales en el polímero mediante aminación reductora con NH₄Cl después de una oxidación previa. Se pueden utilizar reactivos bifuncionales para unir dos grupos amino o dos hidroxilo. Por ejemplo, un polímero que contiene un grupo amino se puede acoplar con un grupo amino de la proteína de coagulación con reactivos como BS3 (suberato de bis(sulfosuccinimidilo)/Pierce, Rockford, Ill.). Además, se pueden utilizar reactivos de reticulación heterobifuncionales como Sulfo-EMCS éster (N-epsilon-Maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida/Pierce), por ejemplo, para unir grupos amina y tiol. En otras realizaciones, se pueden utilizar un grupo reactivo de aldehído, tal como alcóxido de PEG más acetal dietílico de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, y cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres activos de succinimidilo, ditiocarbonato activado P.E.G., cloroformiato de 2,4,5-triclorofenilo y cloroformiato de P-nitrofenilo activado P.E.G., en la conjugación de una proteína de coagulación.

En algunos aspectos, el rVWF para el uso de la presente invención ha sido madurado in vitro con furina. En otras realizaciones, la furina es furina recombinante.

En otros aspectos, el rVWF para el uso de la presente invención se produce por expresión en un cultivo de células de mamíferos utilizando métodos conocidos en la técnica. En realizaciones particulares, el cultivo de mamíferos comprende células CHO. En una realización de ejemplo, el rVWF para el uso de la invención comprende proteína de rVWF aislada de un sistema de expresión de células CHO. En una realización adicional, la eliminación del propéptido es mediada in vitro a través de la exposición del pro-VWF a la furina, en otra realización más, la furina utilizada para la eliminación del propéptido es furina recombinante. En otra realización más, los glicanos del grupo sanguíneo ABO/totalmente glicosilados están ausentes.

En otras realizaciones adicionales, el rVWF se utiliza para la presente invención mediante expresión en un sistema hospedante eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2; células de insecto, p. ej., células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, p. ej., células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, el VWF se puede expresar en células de levadura, células de insecto, células aviares, células de mamífero y similares. Por ejemplo, en una línea celular humana, una línea celular de hámster o una línea celular murina. En una realización particular, la línea celular es una línea celular CHO, BHK o HEK. Normalmente, se pueden utilizar células de mamífero, p. ej., célula CHO de una línea celular continua, para expresar el VWF para el uso de la presente invención.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el VWF puede ser un vector. El vector puede ser suministrado por un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína puede ser un gen específico o una parte biológicamente funcional del mismo. En una realización, la proteína es al menos una parte biológicamente activa del VWF. Se puede utilizar una amplia variedad de vectores para la expresión del VWF y se pueden seleccionar de vectores de expresión eucariotas. Ejemplos de vectores para expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, utilizando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., utilizando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRC/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adeno-asociados, virus del herpes, retrovirus, etc., utilizando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV, y β -actina.

En algunas realizaciones de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico comprende además otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tales como secuencias promotoras, potenciadores, cajas TATA, sitios de inicio de la transcripción, policonectores, sitios de restricción, secuencias poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de selección y similares que son generalmente conocidos por un experto en la técnica.

En ciertas realizaciones, los métodos de cultivo celular de la memoria descriptiva pueden comprender el uso de un microportador. En algunas realizaciones, los cultivos celulares de las realizaciones se pueden realizar en biorreactores grandes en condiciones adecuadas para proporcionar superficies específicas de cultivo de alto volumen para lograr altas densidades celulares y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar dichas condiciones de crecimiento es utilizar microportadores para el cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. El concepto de crecimiento celular en microportadores fue descrito por primera vez por van Wezel (van Wezel, A.L., *Nature* 216:64-5 (1967)) y permite la adhesión de células a la superficie de pequeñas partículas sólidas suspendidas en el medio de crecimiento. Estos métodos proporcionan altas relaciones superficie-volumen y por lo tanto permiten una utilización eficiente de los nutrientes. Además, para la expresión

de proteínas secretadas en líneas celulares eucariotas, la mayor relación superficie-volumen permite mayores niveles de secreción y, por lo tanto, mayores rendimientos de proteínas en el líquido sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten aumentar fácilmente la escala de los cultivos de expresión eucariotas.

5 Las células que expresan VWF pueden unirse a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores basados en dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros como se describe en Butler (1988. En: Spier & Griffiths, *Animal Cell Biotechnology* 3:283-303). También es posible cultivar las células hasta una biomasa en microportadores esféricos y subcultivar las células cuando hayan alcanzado la biomasa final del fermentador y antes de la producción de la proteína expresada en un microportador poroso o viceversa. Los microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2 y Cytode™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

15 En ciertas realizaciones, el rVWF se expresa en células cultivadas en medios de cultivo celular que producen rVWF de alto peso molecular. Las expresiones "solución de cultivo celular", "medio o medios de cultivo celular" y "líquido sobrenadante de cultivo celular" se refieren a aspectos de los procedimientos de cultivo celular generalmente bien conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención, una solución de cultivo celular puede incluir medios de cultivo celular y líquido sobrenadante de cultivo celular. Los medios de cultivo celular se añaden externamente a la solución de cultivo celular, opcionalmente junto con complementos, para proporcionar nutrientes y otros componentes para cultivar las células que expresan VWF. El líquido sobrenadante de cultivo celular se refiere a una solución de cultivo celular que comprende los nutrientes y otros componentes del medio de cultivo celular, así como los productos liberados, metabolizados y/o excretados de las células durante el cultivo. En otras realizaciones, los medios pueden estar exentos de proteínas animales y definidos químicamente. Se conocen en la técnica métodos para preparar medios de cultivo exentos de proteínas animales y definidos químicamente, por ejemplo en los documentos US 2008/0009040 y US 2007/0212770. "Exento de proteínas" y expresiones relacionadas se refieren a proteínas que provienen de una fuente exógena o distinta a las células del cultivo, que liberan proteínas de forma natural durante el crecimiento. En otra realización, el medio de cultivo está exento de polipéptidos. En otra realización, el medio de cultivo está exento de suero. En otra realización, el medio de cultivo está exento de proteínas animales. En otra realización, el medio de cultivo está exento de componentes animales. En otra realización, el medio de cultivo contiene proteína, p. ej., proteína animal de suero, tal como suero bovino fetal. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes añadidas de forma exógena. En otra realización, las proteínas son de un animal certificado exento de patógenos. La expresión "químicamente definido" como se utiliza en el presente documento significa que el medio no comprende ningún complemento indefinido, tal como, por ejemplo, extractos de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levaduras. Por consiguiente, cada componente de un medio químicamente definido queda definido con precisión. En una realización preferida, los medios están exentos de componentes animales y exentos de proteínas.

40 En otras realizaciones, posteriormente a la purificación a partir de un cultivo de células de mamífero, el rFVIII se reconstituye antes de la administración. En otras realizaciones más, el rVWF se trata con furina antes o después de la reconstitución. En otras realizaciones, la furina es furina recombinante. En otras realizaciones más, el rVWF para el uso de la invención no se expone a ADAMTS13, con el resultado de que están presentes formas ultragrandes (es decir, que comprenden 10 o más subunidades) en las composiciones de rVWF para el uso de la invención.

En aspectos específicos, el rVWF utilizado en la presente invención está contenido en una formulación que contiene un tampón, un azúcar y/o un alcohol de azúcar (incluyendo sin limitación trehalosa y manitol), un estabilizante (tal como glicina) y un tensioactivo (tal como polisorbato 80). En otras realizaciones, para formulaciones que contienen rFVIII, la formulación puede incluir además sodio, histidina, calcio y glutatión.

En un aspecto, las formulaciones que comprenden rVWF se liofilizan antes de la administración. La liofilización se lleva a cabo utilizando técnicas comunes en la técnica y debe optimizarse para la composición que se está desarrollando [Tang et al., *Pharm Res.* 21:191-200. (2004) y Chang et al., *Pharm Res.* 13:243-9 (1996)].

55 Los métodos para preparar formulaciones farmacéuticas pueden incluir una o más de las siguientes etapas: añadir un agente estabilizante como se describe en el presente documento a dicha mezcla antes de liofilizar, añadir al menos un agente seleccionado de un agente de carga, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo, cada uno de los cuales como se describe en el presente documento, a dicha mezcla antes de liofilizar. Una formulación liofilizada está, en un aspecto, compuesta al menos por uno o más de un tampón, un agente de carga y un estabilizante. En este aspecto, se evalúa la utilidad de un tensioactivo y se selecciona en los casos en que la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución se convierte en un problema. Se incluye un agente de tamponamiento apropiado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización.

65 La práctica de reconstitución convencional para el material liofilizado es volver a añadir un volumen de agua

pura o agua estéril para inyección (WFI) (típicamente equivalente al volumen retirado durante la liofilización), aunque a veces se usan soluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para administración parenteral [Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18:1311-1354 (1992)]. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de VWF recombinante reconstituidas que comprenden la etapa de añadir un diluyente a una composición de VWF recombinante liofilizada para el uso de la invención.

El material liofilizado puede reconstituirse como una solución acuosa. Una variedad de vehículos acuosos, p. ej., agua estéril para inyección, agua con conservantes para uso en dosis múltiples o agua con cantidades apropiadas de tensioactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En varios aspectos, dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo y sin limitación, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes son un fosfátido de origen natural, por ejemplo y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo y sin limitación, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo y sin limitación, heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietilénico, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo y sin limitación, monooleato de sorbitán polietilénico. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más conservantes, por ejemplo y sin limitación, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo.

En ciertas realizaciones, las composiciones para el uso de la presente invención son formulaciones líquidas para administración con el uso de una jeringa u otro recipiente de almacenamiento. En otras realizaciones, estas formulaciones líquidas se producen a partir del material liofilizado descrito en el presente documento reconstituido como una solución acuosa.

En un aspecto adicional, las composiciones para el uso de la invención comprenden además uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente" aceptable se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tales como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran utilizando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares clínicamente útiles, incluidos los agentes descritos anteriormente.

II. Producción de VWF recombinante

El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) maduro libre para el uso de la presente invención se puede producir de forma recombinante. Un experto en la materia reconoce métodos útiles para expresar una proteína recombinante en una célula hospedante. En algunos casos, el método incluye expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica el rVWF en una célula hospedante, tal como una célula CHO, y cultivar la célula hospedante resultante en determinadas condiciones para producir rVWF, prepro-VWF, pro-VWF y similares.

En ciertas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el VWF puede ser un vector de expresión. El vector puede ser suministrado por un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína puede ser un gen específico o una parte biológicamente funcional del mismo. En una realización, la proteína es al menos una parte biológicamente activa del VWF. La secuencia de ácido nucleico puede comprender además otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína, tales como secuencias promotoras, potenciadores, cajas TATA, sitios de iniciación de la transcripción, policonectores, sitios de restricción, secuencias poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de selección y similares, que son generalmente conocidos por un experto en la técnica.

Se puede utilizar una amplia variedad de vectores para la expresión del VWF y se pueden seleccionar de vectores de expresión eucariotas. Ejemplos de vectores para expresión en eucariotas incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, utilizando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., utilizando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OplE2, gp64, polh, etc., y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como virus vaccinia, virus adeno-asociados, virus del herpes, retrovirus, etc., utilizando promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

En algunos aspectos, el rVWF para el uso de la presente invención se produce por expresión en un cultivo de células de mamíferos utilizando métodos conocidos en la técnica. En realizaciones particulares, el cultivo de mamífero comprende células CHO. En otras realizaciones, el rVWF se coexpresa con el factor VIII

recombinante (rFVIII) en el mismo cultivo. En dichas realizaciones, el rVWF y el rFVIII se purifican juntos (copurificados) o por separado utilizando métodos conocidos en la técnica. En otras realizaciones, el rVWF se expresa en un cultivo que no contiene rFVIII.

- 5 En algunas realizaciones, el rVWF se expresa y se aísla de un sistema hospedante eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitación, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2; células de insecto, p. ej., células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, p. ej., células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, el VWF se puede expresar en células de levadura, células de insecto, células aviares, células de mamífero y similares.
- 10 Por ejemplo, en una línea celular humana, una línea celular de hámster o una línea celular murina. En una realización particular, la línea celular es una línea celular CHO, BHK o HEK. Normalmente, se pueden utilizar células de mamífero, p. ej., célula CHO de una línea celular continua, para expresar el VWF para el uso de la presente invención. En ciertos casos, la proteína VWF se expresa y se aísla de un sistema de expresión de células CHO.

- 15 El VWF se puede producir en un sistema de cultivo celular o de acuerdo con cualquier método de cultivo celular reconocido por los expertos en la técnica. En algunas realizaciones, los cultivos celulares se pueden realizar en biorreactores grandes en condiciones adecuadas para proporcionar superficies específicas de cultivo-volumen grandes para lograr altas densidades celulares y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar dichas condiciones de crecimiento es utilizar microportadores para el cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. El concepto de crecimiento celular en microportadores fue descrito por primera vez por van Wezel (van Wezel, A.L., *Nature*, 1967, 216:64-5) y permite la adhesión de células a la superficie de pequeñas partículas sólidas suspendidas en el medio de crecimiento. Estos métodos proporcionan altas relaciones superficie-volumen y por lo tanto permiten una utilización eficiente de los nutrientes. Además, para la expresión
- 20 de proteínas secretadas en líneas celulares eucariotas, la mayor relación superficie-volumen permite mayores niveles de secreción y, por lo tanto, mayores rendimientos de proteínas en el líquido sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten aumentar fácilmente la escala de los cultivos de expresión eucariotas.

- 30 Las células que expresan VWF pueden unirse a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores basados en dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros como se describe en Butler (1988. En: Spier y Griffiths, *Animal Cell Biotechnology* 3:283-303). También es posible cultivar las células hasta una biomasa en microportadores esféricos y subcultivar las células cuando hayan alcanzado la biomasa final del fermentador y antes de la producción de la proteína expresada en un microportador poroso o viceversa. Los microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2 y Cytodex™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1 y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

- 40 En una realización adicional, el propéptido de VWF se escinde del VWF no maduro in vitro por medio de la exposición del pro-VWF a furina. En algunas realizaciones, la furina utilizada para la escisión del propéptido es furina recombinante.

- En ciertas realizaciones, el rVWF se expresa en células cultivadas en medios de cultivo celular que producen rVWF de alto peso molecular. Las expresiones "solución de cultivo celular", "medio o medios de cultivo celular" y "líquido sobrenadante de cultivo celular" se refieren a aspectos de los procedimientos de cultivo celular generalmente bien conocidos en la técnica. En el contexto de la presente invención, una solución de cultivo celular puede incluir medios de cultivo celular y líquido sobrenadante de cultivo celular. Los medios de cultivo celular se añaden externamente a la solución de cultivo celular, opcionalmente junto con complementos, para proporcionar nutrientes y otros componentes para cultivar las células que expresan VWF. El líquido sobrenadante de cultivo celular se refiere a una solución de cultivo celular que comprende los nutrientes y otros componentes del medio de cultivo celular, así como los productos liberados, metabolizados y/o excretados de las células durante el cultivo. En otras realizaciones, los medios pueden estar exentos de proteínas animales y definidos químicamente. Se conocen en la técnica métodos para preparar medios de cultivo exentos de proteínas animales y definidos químicamente, por ejemplo en los documentos US 2006/0094104, US 2007/0212770 y US 2008/0009040. "Exento de proteínas" y términos relacionados se refieren a proteínas que provienen de una fuente exógena o distinta a las células del cultivo, que liberan proteínas de forma natural durante el crecimiento. En otra realización, el medio de cultivo está exento de polipéptidos. En otra realización, el medio de cultivo está exento de suero. En otra realización, el medio de cultivo está exento de proteínas animales. En otra realización, el medio de cultivo está exento de componentes animales. En otra realización, el medio de cultivo contiene proteína, p. ej., proteína animal de suero, tal como suero bovino fetal. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes añadidas de forma exógena. En otra realización, las proteínas son de un animal certificado exento de patógenos. La expresión "químicamente definido" como se utiliza en el presente documento significa que el medio no comprende ningún complemento indefinido, tal como, por ejemplo, extractos de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levaduras. Por consiguiente,
- 60 cada componente de un medio químicamente definido queda definido con precisión. En una realización preferida, los medios están exentos de componentes animales y exentos de proteínas.

En ciertas realizaciones, el cultivo de células que expresan VWF se puede mantener durante al menos aproximadamente 7 días, o al menos aproximadamente 14 días, 21 días, 28 días, o al menos aproximadamente 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos aproximadamente 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. La densidad celular en la que se mantiene un cultivo celular para la producción de una proteína de VWF recombinante dependerá de las condiciones de cultivo y del medio utilizado para la expresión de la proteína. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la densidad celular óptima para un cultivo celular que produce un VWF. En una realización, el cultivo se mantiene a una densidad celular de entre aproximadamente $0,5 \times 10^6$ y 4×10^7 células/ml durante un período de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $1,0 \times 10^7$ células/ml durante un período de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un período de tiempo prolongado. En otras realizaciones, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un período de tiempo prolongado. En otras realizaciones más, la densidad celular se puede mantener a una concentración entre aproximadamente $2,0 \times 10^6$ y aproximadamente $4,0 \times 10^6$, o entre aproximadamente $1,0 \times 10^6$ y aproximadamente $2,5 \times 10^6$, o entre aproximadamente $1,5 \times 10^6$ y aproximadamente $3,5 \times 10^6$, o cualquier otro intervalo similar, durante un período de tiempo prolongado. Después de un tiempo apropiado en cultivo celular, el rVWF se puede aislar del sistema de expresión utilizando métodos conocidos en la técnica.

En una realización específica, la densidad celular del cultivo celular continuo para la producción de rVWF se mantiene a una concentración de no más de $2,5 \times 10^6$ células/ml durante un período prolongado. En otras realizaciones específicas, la densidad celular se mantiene a no más de $2,0 \times 10^6$ células/ml, $1,5 \times 10^6$ células/ml, $1,0 \times 10^6$ células/ml, $0,5 \times 10^6$ células/ml o menos. En una realización, la densidad celular se mantiene entre $1,5 \times 10^6$ células/ml y $2,5 \times 10^6$ células/ml.

En una realización de los cultivos celulares descritos anteriormente, la solución de cultivo celular comprende un complemento de medio que comprende cobre. Dichas soluciones de cultivo celular se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N.º 8,852,888 y la patente de EE.UU. n.º 9,409,971.

Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de prepro-VWF se exponen en la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, y están disponibles en los números de acceso de GenBank NM_000552 (ARNm del factor von Willebrand (VWF) de Homo sapiens) y NP_000543, respectivamente. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína de VWF madura se expone en la SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los aminoácidos 764-2813 de la secuencia de aminoácidos prepro-VWF de longitud completa). En algunas realizaciones, el VWF presenta al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3. En algunas realizaciones, el rVWF para el uso de la invención presenta al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99% o al menos 100% de identidad con la secuencia de SEQ ID NO: 3. Véase, por ejemplo, patente de EE. UU. N.º 8,597,910, publicación de patente de EE. UU. N.º 2016/0129090, así como la FIG. 6.

Una forma de rVWF útil tiene al menos la propiedad de estabilización in vivo, p. ej., por unión, de al menos una molécula de factor VIII (FVIII) y tiene opcionalmente un patrón de glicosilación que es farmacológicamente aceptable. Ejemplos específicos de esto incluyen VWF sin el dominio A2, por lo tanto resistente a la proteólisis (Lankhof et al., *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997), y un fragmento de VWF de Val 449 a Asn 730 que incluye el dominio de unión a la glicoproteína Ib y sitios de unión para colágeno y heparina (Pietu et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989). La determinación de la capacidad de un VWF para estabilizar al menos una molécula de FVIII se lleva a cabo, en un aspecto, en mamíferos deficientes en VWF según métodos conocidos en el estado de la técnica.

El rVWF para el uso de la presente invención se puede producir por cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se describe en la publicación internacional WO86/06096 publicada el 23 de octubre de 1986 y solicitud de patente de EE. UU. N.º 07/559,509, presentada el 23 de julio de 1990. Por lo tanto, en la técnica se conocen métodos para (i) la producción de ADN recombinante por ingeniería genética, p. ej., mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducción de ADN recombinante en células procariotas o eucariotas por transfección, p. ej. mediante electroporación o microinyección, (iii) cultivo de las células transformadas, p. ej. de manera continua o discontinua, (iv) expresión de VWF, p. ej. de manera constitutiva o por inducción, y (v) aislamiento del VWF, p. ej. del medio de cultivo o recolectando las células transformadas, con el fin de (vi) obtener el rVWF purificado, p. ej. mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. En un aspecto, un VWF recombinante se produce en células hospedantes transformadas utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias que codifican el polipéptido podrían escindirse del ADN utilizando enzimas de restricción adecuadas. Alternativamente, la molécula de ADN se sintetiza, en otro aspecto, utilizando técnicas de síntesis química, tales como el método del fosforamidato. Además, en otro aspecto más, se utiliza una combinación de estas técnicas.

La memoria descriptiva también proporciona vectores que codifican polipéptidos para el uso de la invención, en un hospedante apropiado. El vector comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido unido operativamente a secuencias de control de expresión apropiadas. Los métodos para efectuar esta unión operativa, ya sea antes o después de insertar el polinucleótido en el vector, son bien conocidos. Las secuencias de control de expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosómica, señales de inicio, señales de parada, señales de caperuza, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de la transcripción o traducción. El vector resultante que tiene el polinucleótido en el mismo se utiliza para transformar un hospedante apropiado. Esta transformación puede realizarse utilizando métodos bien conocidos en la técnica.

En la práctica de esta invención se utiliza cualquiera de un gran número de células hospedantes disponibles y bien conocidas. La selección de un hospedante particular depende de una serie de factores reconocidos por la técnica, que incluyen, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la velocidad de transformación, la facilidad de recuperación de los péptidos, las características de expresión, la bioseguridad y los costes. Se debe lograr un equilibrio de estos factores teniendo en cuenta que no todas las células hospedante son igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas pautas generales, las células hospedantes microbianas útiles incluyen, sin limitación, bacterias, levaduras y otros hongos, células de insecto, planta, mamífero (incluidas humanas) en cultivo u otros hospedantes conocidos en la técnica.

Las células hospedantes transformadas se cultivan en condiciones de fermentación convencionales para que se expresen los compuestos deseados. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Finalmente, los polipéptidos se purifican de medios de cultivo o de las propias células hospedantes por métodos bien conocidos en la técnica.

Dependiendo de la célula hospedante utilizada para expresar un compuesto para el uso de la invención, los grupos de carbohidratos (oligosacáridos) se unen opcionalmente a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, los oligosacáridos unidos por O se unen a restos de serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos unidos por N se unen a restos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos naturales sin contar la prolina. Las estructuras de oligosacáridos unidos por N y unidos por O y los restos de azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en oligosacáridos tanto unidos por N como unidos por O es el ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico normalmente es el resto terminal de oligosacáridos tanto unidos por N como unidos por O y, en virtud de su carga negativa, en un aspecto, confiere propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Dicho(s) sitio(s) pueden incorporarse en el conector de los compuestos para el uso de esta invención y son preferiblemente glicosilados por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (p. ej., en células de mamíferos tales como CHO, BHK, COS). En otros aspectos, dichos sitios se glicosilan mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, la sialización (también denominada sialilación) se puede realizar en la columna como parte de los procedimientos de purificación descritos en el presente documento (incluidos los métodos de intercambio aniónico, intercambio catiónico, exclusión por tamaño y/o inmunoafinidad). En algunas realizaciones, la sialilación da como resultado una mayor estabilidad del rVWF en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la sialilación da como resultado una mayor estabilidad del rVWF en la circulación sanguínea (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la mayor estabilidad del rVWF sialivado da como resultado un aumento de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la sialilación da como resultado una mayor semivida del rVWF en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la sialilación da como resultado una mayor semivida del rVWF en la circulación sanguínea (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la mayor semivida del rVWF sialilado da como resultado un aumento de 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o más en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la mayor semivida del rVWF sialilado da como resultado un rVWF que es estable durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas o más en la circulación sanguínea (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) en comparación con el rVWF que no ha sufrido sialilación. En algunas realizaciones, la sialilación aumenta el número de sialilación 2,3 y/o sialilación 2,6. En algunas realizaciones, la sialilación se aumenta mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y/o 2,6 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica del ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de tampón adicional. En algunas realizaciones, la sialilación se aumenta mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica del ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de tampón adicional. En algunas realizaciones, la sialilación 2,3 se aumenta mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica del ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de tampón adicional.

En algunas realizaciones, la sialilación 2,6 se aumenta mediante la adición de 2,6 sialiltransferasa CMP-NANA (sal sódica del ácido citidina-5/-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de tampón adicional. En algunas realizaciones, la sialilación 2,3 y/o sialilación 2,6 se aumentan mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y/o 2,6 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica del ácido citidina-5/-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de tampón adicional. En algunas realizaciones, la CMP-NANA está química o enzimáticamente modificada para transferir ácido siálico modificado a la posición libre potencial. En algunas realizaciones, la sialilación se lleva a cabo cargando rVWF en la resina, lavando con uno o más tampones como se describe en el presente documento para eliminar impurezas no deseadas, aplicando uno o más tampones que contienen sialiltransferasa y CMP-NANA en condiciones que permiten la sialilación adicional, y lavando con uno o más tampones para eliminar el exceso de reactivos de sialilación, y eluyendo con uno o más tampones el rVWF mejorado (p. ej., el rVWF con mayor sialilación). En algunas realizaciones, el procedimiento de sialilación se realiza como parte de un método de intercambio de cationes, un método de intercambio de aniones, un método de exclusión por tamaño o un método de purificación por inmunoafinidad, como se describe en el presente documento.

Alternativamente, los compuestos se preparan por métodos sintéticos utilizando, por ejemplo, técnicas de síntesis en fase sólida. Las técnicas adecuadas son bien conocidas en la técnica, e incluyen las descritas en Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, págs. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis et al. (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart y Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; patente de EE. UU. N.º 3,941,763; Finn et al. (1976), *The Proteins* (3.ª ed.) 2: 105-253; y Erickson et al. (1976), *The Proteins* (3.ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para preparar péptidos individuales, ya que es el método más rentable para preparar péptidos pequeños.

Los fragmentos, variantes y análogos del VWF se pueden producir de acuerdo con métodos que son bien conocidos en la técnica. Los fragmentos de un polipéptido se pueden preparar utilizando, sin limitación, escisión enzimática (p. ej., tripsina, quimotripsina) y también utilizando medios recombinantes para generar fragmentos de polipéptido que tengan una secuencia de aminoácidos específica. Se pueden generar fragmentos de polipéptidos que comprendan una región de la proteína que tenga una actividad particular, tal como un dominio de multimerización o cualquier otro dominio de VWF identificable conocido en la técnica.

También son bien conocidos los métodos para preparar análogos de polipéptidos. Los análogos de secuencia de aminoácidos de un polipéptido pueden ser análogos de sustitución, inserción, adición o delección. Los análogos de delección, incluidos los fragmentos de un polipéptido, carecen de uno o más restos de la proteína nativa que no son esenciales para la función o la actividad inmunogénica. Los análogos de inserción implican la adición de, p. ej., aminoácido(s) en un punto no terminal en el polipéptido. Este análogo puede incluir, por ejemplo y sin limitación, la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente un único resto. Los análogos de adición, incluidos los fragmentos de un polipéptido, incluyen la adición de uno o más aminoácidos en uno o ambos extremos de una proteína e incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión. También se contemplan combinaciones de los análogos antes mencionados.

Los análogos de sustitución típicamente intercambian un aminoácido del tipo natural por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden estar diseñados para modular una o más propiedades del polipéptido sin la pérdida completa de otras funciones o propiedades. En un aspecto, las sustituciones son sustituciones conservadoras. La "sustitución de aminoácido conservadora" es la sustitución de un aminoácido por un aminoácido que tiene una cadena lateral o un carácter químico similar. Los aminoácidos similares para hacer sustituciones conservadoras incluyen los que tienen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral de amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral alifática hidrófoba (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral de hidroxilo alifática (serina, treonina).

En un aspecto, los análogos son sustancialmente homólogos o sustancialmente idénticos al VWF recombinante del que se derivan. Los análogos incluyen los que conservan al menos parte de la actividad biológica del polipéptido de tipo natural, p. ej., la actividad de coagulación sanguínea.

Las variantes de polipéptidos contempladas incluyen, sin limitación, polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, glicosilación, incluyendo polisialilación (o polisialilación), conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcado, unión de polímero covalente tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no se encuentran en las proteínas humanas. Las variantes conservan las mismas o esencialmente las mismas propiedades de unión de las moléculas no modificadas para el uso de la invención. Dicha modificación química puede incluir la unión directa o indirecta (p. ej., a través de un conector) de un agente al polipéptido de VWF. En el caso de unión indirecta, se contempla que el conector pueda ser hidrolizable o no hidrolizable.

La preparación de análogos de polipéptidos pegilados comprenderá en un aspecto las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de PEG) en condiciones mediante las cuales el polipéptido de la construcción de unión se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el o los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinan basándose en los parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la relación PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto polipegilado. En algunas realizaciones, la construcción de unión tiene una única fracción de PEG en el extremo N. El polietilenglicol (PEG) se puede unir al factor de coagulación sanguínea para, por ejemplo, proporcionar una semivida más larga in vivo. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y ser lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG varía de aproximadamente 2 kiloDalton ("kD") a aproximadamente 100 kDa, de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 50 kDa, o de aproximadamente 5 kDa a aproximadamente 10 kDa. En ciertos aspectos, los grupos PEG se unen al factor de coagulación sanguínea por medio de acilación o alquilación reductora por un grupo reactivo natural o modificado en la fracción de PEG (p. ej., un grupo aldehído, amino, tiol o éster) a un grupo reactivo en el factor de coagulación sanguínea (p. ej., un grupo aldehído, amino o éster) o mediante cualquier otra técnica conocida en la técnica.

Los métodos para preparar el polipéptido polisialilado se describen en la publicación de patente de Estados Unidos 20060160948, Fernandes et Gregoriadis; *Biochim. Biophys. Acta* 1341: 26-34, 1997, y Saenko et al., *Haemophilia* 12:42-51, 2006. Brevemente, una solución de ácido colomínico (CA) que contiene NaIO₄ 0,1 M se agita en la oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. La solución de CA activada se dializa, p. ej., contra un tampón de fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,2, en la oscuridad y esta solución se añade a una solución de rVWF y se incuba durante 18 h a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Los reactivos libres se pueden separar opcionalmente del conjugado de rVWF-ácido polisialílico mediante, por ejemplo, ultrafiltración/diafiltración. La conjugación del rVWF con ácido polisialílico se logra utilizando glutaraldehído como reactivo de reticulación (Migneault et al., *Biotechniques* 37: 790-796, 2004).

También se contempla en otro aspecto que los polipéptidos prepro-VWF y pro-VWF proporcionarán un beneficio terapéutico en las formulaciones para el uso en la presente invención. Por ejemplo, la patente de EE. UU., N.º 7,005,502 describe una preparación farmacéutica que comprende cantidades sustanciales de pro-VWF que induce la generación de trombina in vitro. Además de fragmentos, variantes u otros análogos biológicamente activos recombinantes del VWF maduro de origen natural, la presente invención contempla el uso de fragmentos, variantes o análogos biológicamente activos recombinantes de los polipéptidos prepro-VWF (expuesto en la SEQ ID NO: 2) o pro-VWF (restos de aminoácidos 23 a 764 de SEQ ID NO: 2) en las formulaciones descritas en el presente documento.

Un trabajador experto puede generar fácilmente polinucleótidos que codifican fragmentos, variantes y análogos para codificar fragmentos, variantes o análogos biológicamente activos de la molécula natural que tienen la misma actividad biológica o una actividad biológica similar a la de la molécula natural. En varios aspectos, estos polinucleótidos se preparan utilizando técnicas de PCR, digestión/ligación de moléculas codificantes de ADN y similares. Por lo tanto, un experto en la técnica podrá generar cambios de una sola base en la cadena de ADN para dar como resultado un codón alterado y una mutación de sentido alterado, utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a la mutagénesis específica del sitio. Como se utiliza en el presente documento, la frase "condiciones de hibridación moderadamente restrictivas" significa, por ejemplo, hibridación a 42°C en formamida al 50% y lavado a 60°C en 0,1 × SSC, SDS al 0,1%. Los expertos en la técnica entienden que la variación de estas condiciones ocurre en función de la longitud y el contenido de bases de nucleótidos GC de las secuencias que se van a hibridar. Las fórmulas convencionales en la técnica son apropiadas para determinar las condiciones de hibridación exactas. Véase Sambrook et al., 9.47-9.51 en *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

A. Multímeros del VWF

La evaluación del número y porcentaje de multímeros de rVWF se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, métodos que utilizan electroforesis y cromatografía de exclusión por tamaño para separar los multímeros de VWF por tamaños, por ejemplo como comentan Cumming et al., (*J Clin Pathol.* mayo de 1993; 46(5): 470-473. Estas técnicas pueden incluir además técnicas de inmunotransferencia (tales como transferencia Western), en las que se lleva a cabo la inmunotransferencia en gel con un anticuerpo radiomarcado contra VWF seguido de detección quimioluminiscente (véase, por ejemplo, Wen et al., *J. Clin. Lab. Anal.*, 1993, 7: 317-323. Otros ensayos para el VWF incluyen el ensayo de actividad de unión VWF:Antígeno (VWF:Ag), VWF:Cofactor de ristocetina (VWF:RCof) y VWF:colágeno (VWF:CBA), que se utilizan a menudo para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de Von Willebrand (véase, por ejemplo, Favaloro et al., *Pathology*, 1997, 29(4): 341-456; Sadler, JE, *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:395-424; y Turecek et al., *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36:510-521. En algunas realizaciones, el rVWF obtenido utilizando los métodos presentes incluye cualquier patrón de multímeros presente en la muestra de carga del rVWF. En algunas realizaciones, el rVWF obtenido utilizando los métodos presentes incluye patrones de multímeros que se producen fisiológicamente, así como patrones de multímeros de VWF ultragrandes.

b. Ensayos de VWF

En la hemostasia primaria, el VWF sirve como un puente entre las plaquetas y componentes específicos de la matriz extracelular, tales como el colágeno. La actividad biológica del VWF en este proceso se puede medir mediante diferentes ensayos in vitro (Turecek et al., *Semin Thromb Hemost*, 2010, 36: 510-521).

El ensayo de VWF:cofactor de ristocetina (VWF:RCof) se basa en la aglutinación de plaquetas de nueva aportación o fijadas con formalina inducida por el antibiótico ristocetina en presencia de VWF. El grado de aglutinación de plaquetas depende de la concentración de VWF y se puede medir mediante el método turbidimétrico, p. ej. usando un agregómetro (Weiss et al., *J. Clin. Invest.*, 1973, 52: 2708-2716; Macfarlane et al., *Thromb. Diath. Haemorrh.*, 1975, 34: 306-308). Como se proporciona en el presente documento, la actividad específica del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo) para el uso de la presente invención se describe generalmente en términos de mU/μg de VWF, medido utilizando ensayos in vitro.

En algunas realizaciones, el rVWF purificado de acuerdo con los métodos de la presente memoria descriptiva tiene una actividad específica de al menos aproximadamente 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 o más mU/μg. En algunas realizaciones, el rVWF utilizado en los métodos descritos en el presente documento tiene una actividad específica de 20 mU/μg a 150 mU/μg. En algunas realizaciones, el rVWF tiene una actividad específica de 30 mU/μg a 120 mU/μg. En algunas realizaciones, el rVWF tiene una actividad específica de 40 mU/μg a 90 mU/μg. En algunas realizaciones, el rVWF tiene una actividad específica seleccionada de variaciones 1 a 133 que se encuentran en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Realizaciones de ejemplo para la actividad específica del rVWF encontrada en las composiciones y utilizada en los métodos proporcionados en el presente documento.

(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)	
20	Var. 1	110	Var. 35	40-150	Var. 68	70-120	Var. 101
22,5	Var. 2	115	Var. 36	40-140	Var. 69	70-110	Var. 102
25	Var. 3	120	Var. 37	40-130	Var. 70	70-100	Var. 103
27,5	Var. 4	125	Var. 38	40-120	Var. 71	70-90	Var. 104
30	Var. 5	130	Var. 39	40-110	Var. 72	70-80	Var. 105
32,5	Var. 6	135	Var. 40	40-100	Var. 73	80-150	Var. 106
35	Var. 7	140	Var. 41	40-90	Var. 74	80-140	Var. 107
37,5	Var. 8	145	Var. 42	40-80	Var. 75	80-130	Var. 108
40	Var. 9	150	Var. 43	40-70	Var. 76	80-120	Var. 109
42,5	Var. 10	20-150	Var. 44	40-60	Var. 77	80-110	Var. 110
45	Var. 11	20-140	Var. 45	40-50	Var. 78	80-100	Var. 111
47,5	Var. 12	20-130	Var. 46	50-150	Var. 79	80-90	Var. 112
50	Var. 13	20-120	Var. 47	50-140	Var. 80	90-150	Var. 113
52,5	Var. 14	20-110	Var. 48	50-130	Var. 81	90-140	Var. 114
55	Var. 15	20-100	Var. 49	50-120	Var. 82	90-130	Var. 115
57,5	Var. 16	20-90	Var. 50	50-110	Var. 83	90-120	Var. 116
60	Var. 17	20-80	Var. 51	50-100	Var. 84	90-110	Var. 117
62,5	Var. 18	20-70	Var. 52	50-90	Var. 85	90-100	Var. 118
65	Var. 19	20-60	Var. 53	50-80	Var. 86	100-150	Var. 119

ES 3 004 108 T3

(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)	
67,5	Var. 20	20-50	Var. 54	50-70	Var. 87	100-140	Var. 120
70	Var. 21	20-40	Var. 55	50-60	Var. 88	100-130	Var. 121
72,5	Var. 22	30-150	Var. 56	60-150	Var. 89	100-120	Var. 122
75	Var. 23	30-140	Var. 57	60-140	Var. 90	100-110	Var. 123
77,5	Var. 24	30-130	Var. 58	60-130	Var. 91	110-150	Var. 124
80	Var. 25	30-120	Var. 59	60-120	Var. 92	110-140	Var. 125
82,5	Var. 26	30-110	Var. 60	60-110	Var. 93	110-130	Var. 126
85	Var. 27	30-100	Var. 61	60-100	Var. 94	110-120	Var. 127
87,5	Var. 28	30-90	Var. 62	60-90	Var. 95	120-150	Var. 128
90	Var. 29	30-80	Var. 63	60-80	Var. 96	120-140	Var. 129
92,5	Var. 30	30-70	Var. 64	60-70	Var. 97	120-130	Var. 130
95	Var. 31	30-60	Var. 65	70-150	Var. 98	130-150	Var. 131
97,5	Var. 32	30-50	Var. 66	70-140	Var. 99	130-140	Var. 132
100	Var. 33	30-40	Var. 67	70-130	Var. 100	140-150	Var. 133
105	Var. 34						
Var. = Variación							

El rVWF para el uso de la presente invención es altamente multimérico comprendiendo de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 subunidades. En otras realizaciones, el rVWF multimérico producido utilizando métodos de la presente memoria descriptiva comprende aproximadamente 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 subunidades. En algunas realizaciones, el rVWF está presente en multímeros que varían en tamaño de dímeros a multímeros de más de 40 subunidades (>10 millones de Daltons). Los multímeros más grandes proporcionan múltiples sitios de unión que pueden interaccionar tanto con los receptores plaquetarios como con los sitios de lesión de la matriz subendotelial, y son la forma hemostáticamente más activa del VWF. En algunas realizaciones, el rVWF para el uso de la presente invención comprende multímeros ultragrandes (ULM). En general, se considera que los multímeros altos y ultragrandes son los más eficaces desde el punto de vista hemostático (véase, por ejemplo, Turecek, P., *Hämostaseologie*, (Vol. 37): Suplemento 1, páginas S15-S25 (2017)). En algunas realizaciones, el rVWF está entre 500 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, se puede obtener cualquier patrón de multímeros deseado utilizando los métodos descritos. En algunas realizaciones, cuando se emplean métodos de intercambio aniónico y/o de intercambio catiónico, el pH, la conductividad y/o la concentración de contraiones de los tampones en una o más etapas de lavado o los tampones de gradiente se pueden manipular para obtener el patrón de multímeros deseado. En algunas realizaciones, se emplean entonces métodos de cromatografía de exclusión por tamaño y se pueden emplear criterios de recolección para obtener el patrón de multímeros deseado. En algunas realizaciones, el patrón de multímeros descrito comprende multímeros ultragrandes. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen al menos de 10.000 kDa, al menos 11.000 kDa, al menos 12.000 kDa, al menos 13.000 kDa, al menos 14.000 kDa, al menos 15.000 kDa, al menos 16.000 kDa, al menos 17.000 kDa, al menos 18.000 kDa, al menos 19.000 kDa, al menos 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 10.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 11.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 12.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 13.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 14.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 15.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 16.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 17.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 18.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, los multímeros ultragrandes tienen entre aproximadamente 19.000 kDa y 20.000 kDa. En algunas realizaciones, el rVWF obtenido utilizando los métodos presentes incluye cualquier patrón de multímeros presente en la muestra de carga del rVWF. En algunas realizaciones, el rVWF obtenido

ES 3 004 108 T3

utilizando los métodos presentes incluye patrones de multímeros que se producen fisiológicamente, así como patrones de multímeros de VWF ultragrandes.

5 En algunas realizaciones, la composición de rVWF preparada mediante el método de purificación descrito en el presente documento tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada por que el 95% de los oligómeros tienen entre 6 subunidades y 20 subunidades. En algunas realizaciones, la composición de rVWF tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada por que el 95% de los oligómeros tienen un intervalo de subunidades seleccionadas de variaciones 458 a 641 que se encuentran en la Tabla 4.

10 Tabla 4. Realizaciones de ejemplo para la distribución de oligómeros de rVWF encontrados en las composiciones y utilizados en los métodos proporcionados en el presente documento.

Subunidades		Subunidades		Subunidades		Subunidades	
2-40	Var. 458	6-16	Var. 504	12-20	Var. 550	20-28	Var. 596
2-38	Var. 459	6-14	Var. 505	12-18	Var. 551	20-26	Var. 597
2-36	Var. 460	6-12	Var. 506	12-16	Var. 552	20-24	Var. 598
2-34	Var. 461	6-10	Var. 507	12-14	Var. 553	20-22	Var. 599
2-32	Var. 462	6-8	Var. 508	14-40	Var. 554	22-40	Var. 600
2-30	Var. 463	8-40	Var. 509	14-38	Var. 555	22-38	Var. 601
2-28	Var. 464	8-38	Var. 510	14-36	Var. 556	22-36	Var. 602
2-26	Var. 465	8-36	Var. 511	14-34	Var. 557	22-34	Var. 603
2-24	Var. 466	8-34	Var. 512	14-32	Var. 558	22-32	Var. 604
2-22	Var. 467	8-32	Var. 513	14-30	Var. 559	22-30	Var. 605
2-20	Var. 468	8-30	Var. 514	14-28	Var. 560	22-28	Var. 606
2-18	Var. 469	8-28	Var. 515	14-26	Var. 561	22-26	Var. 607
2-16	Var. 470	8-26	Var. 516	14-24	Var. 562	22-24	Var. 608
2-14	Var. 471	8-24	Var. 517	14-22	Var. 563	24-40	Var. 609
2-12	Var. 472	8-22	Var. 518	14-20	Var. 564	24-38	Var. 610
2-10	Var. 473	8-20	Var. 519	14-18	Var. 565	24-36	Var. 611
2-8	Var. 474	8-18	Var. 520	14-16	Var. 566	24-34	Var. 612
4-40	Var. 475	8-16	Var. 521	16-40	Var. 567	24-32	Var. 613
4-38	Var. 476	8-14	Var. 522	16-38	Var. 568	24-30	Var. 614
4-36	Var. 477	8-12	Var. 523	16-36	Var. 569	24-28	Var. 615
4-34	Var. 478	8-10	Var. 524	16-34	Var. 570	24-26	Var. 616
4-32	Var. 479	10-40	Var. 525	16-32	Var. 571	26-40	Var. 617
4-30	Var. 480	10-38	Var. 526	16-30	Var. 572	26-38	Var. 618
4-28	Var. 481	10-36	Var. 527	16-28	Var. 573	26-36	Var. 619
4-26	Var. 482	10-34	Var. 528	16-26	Var. 574	26-34	Var. 620
4-24	Var. 483	10-32	Var. 529	16-24	Var. 575	26-32	Var. 621
4-22	Var. 484	10-30	Var. 530	16-22	Var. 576	26-30	Var. 622
4-20	Var. 485	10-28	Var. 531	16-20	Var. 577	26-28	Var. 623

Subunidades		Subunidades		Subunidades		Subunidades	
4-18	Var. 486	10-26	Var. 532	16-18	Var. 578	28-40	Var. 624
4-16	Var. 487	10-24	Var. 533	18-40	Var. 579	28-38	Var. 625
4-14	Var. 488	10-22	Var. 534	18-38	Var. 580	28-36	Var. 626
4-12	Var. 489	10-20	Var. 535	18-36	Var. 581	28-34	Var. 627
4-10	Var. 490	10-18	Var. 536	18-34	Var. 582	28-32	Var. 628
4-8	Var. 491	10-16	Var. 537	18-32	Var. 583	28-30	Var. 629
6-40	Var. 492	10-14	Var. 538	18-30	Var. 584	30-40	Var. 630
6-38	Var. 493	10-12	Var. 539	18-28	Var. 585	30-38	Var. 631
6-36	Var. 494	12-40	Var. 540	18-26	Var. 586	30-36	Var. 632
6-34	Var. 495	12-38	Var. 541	18-24	Var. 587	30-34	Var. 633
6-32	Var. 496	12-36	Var. 542	18-22	Var. 588	30-32	Var. 634
6-30	Var. 497	12-34	Var. 543	18-20	Var. 589	32-40	Var. 635
6-28	Var. 498	12-32	Var. 544	20-40	Var. 590	32-38	Var. 636
6-26	Var. 499	12-30	Var. 545	20-38	Var. 591	32-36	Var. 637
6-24	Var. 500	12-28	Var. 546	20-36	Var. 592	32-34	Var. 638
6-22	Var. 501	12-26	Var. 547	20-34	Var. 593	34-40	Var. 639
6-20	Var. 502	12-24	Var. 548	20-32	Var. 594	36-38	Var. 640
6-18	Var. 503	12-22	Var. 549	20-30	Var. 595	38-40	Var. 641
Var. = Variación							

En algunas realizaciones, la composición de rVWF preparada mediante los métodos proporcionados en el presente documento se puede caracterizar de acuerdo con el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o un multímero más grande. Por ejemplo, en una realización, al menos el 20% de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF utilizada en los métodos descritos en el presente documento están presentes en un complejo oligomérico de al menos 10 subunidades. En otra realización, al menos 20% de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF utilizada en los métodos descritos en el presente documento están presentes en un complejo oligomérico de al menos 12 subunidades. En otras realizaciones más, una composición de rVWF utilizada en los métodos proporcionados en el presente documento tiene un porcentaje mínimo (p. ej., tiene al menos X%) de moléculas de rVWF presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande (p. ej., un multímero de al menos Y subunidades) según una cualquiera de las variaciones 134 a 457 que se encuentran en la Tabla 5 a la Tabla 7.

- 15 Tabla 5. Realizaciones de ejemplo para el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero mayor encontrado en las composiciones y usado en los métodos proporcionados en el presente documento.

		Número mínimo de subunidades en el multímero de rVWF					
		6	8	10	12	14	16
Porcentaje mínimo de moléculas de rVWF	10%	Var. 134	Var. 152	Var. 170	Var. 188	Var. 206	Var. 224
	15%	Var. 135	Var. 153	Var. 171	Var. 189	Var. 207	Var. 225
	20%	Var. 136	Var. 154	Var. 172	Var. 190	Var. 208	Var. 226
	25%	Var. 137	Var. 155	Var. 173	Var. 191	Var. 209	Var. 227
	30%	Var. 138	Var. 156	Var. 174	Var. 192	Var. 210	Var. 228
	35%	Var. 139	Var. 157	Var. 175	Var. 193	Var. 211	Var. 229
	40%	Var. 140	Var. 158	Var. 176	Var. 194	Var. 212	Var. 230
	45%	Var. 141	Var. 159	Var. 177	Var. 195	Var. 213	Var. 231
	50%	Var. 142	Var. 160	Var. 178	Var. 196	Var. 214	Var. 232
	55%	Var. 143	Var. 161	Var. 179	Var. 197	Var. 215	Var. 233
	60%	Var. 144	Var. 162	Var. 180	Var. 198	Var. 216	Var. 234
	65%	Var. 145	Var. 163	Var. 181	Var. 199	Var. 217	Var. 235
	70%	Var. 146	Var. 164	Var. 182	Var. 200	Var. 218	Var. 236
	75%	Var. 147	Var. 165	Var. 183	Var. 201	Var. 219	Var. 237
	80%	Var. 148	Var. 166	Var. 184	Var. 202	Var. 220	Var. 238
	85%	Var. 149	Var. 167	Var. 185	Var. 203	Var. 221	Var. 239
	90%	Var. 150	Var. 168	Var. 186	Var. 204	Var. 222	Var. 240
	95%	Var. 151	Var. 169	Var. 187	Var. 205	Var. 223	Var. 241

Var. = Variación

5

Tabla 6. Realizaciones de ejemplo para el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero mayor encontrado en las composiciones y usado en los métodos proporcionados en el presente documento.

		Número mínimo de subunidades en el multímero de rVWF					
		18	20	22	24	26	28
Porcentaje mínimo de moléculas de rVWF	10%	Var. 242	Var. 260	Var. 278	Var. 296	Var. 314	Var. 332
	15%	Var. 243	Var. 261	Var. 279	Var. 297	Var. 315	Var. 333
	20%	Var. 244	Var. 262	Var. 280	Var. 298	Var. 316	Var. 334
	25%	Var. 245	Var. 263	Var. 281	Var. 299	Var. 317	Var. 335
	30%	Var. 246	Var. 264	Var. 282	Var. 300	Var. 318	Var. 336
	35%	Var. 247	Var. 265	Var. 283	Var. 301	Var. 319	Var. 337
	40%	Var. 248	Var. 266	Var. 284	Var. 302	Var. 320	Var. 338
	45%	Var. 249	Var. 267	Var. 285	Var. 303	Var. 321	Var. 339
	50%	Var. 250	Var. 268	Var. 286	Var. 304	Var. 322	Var. 340
	55%	Var. 251	Var. 269	Var. 287	Var. 305	Var. 323	Var. 341
	60%	Var. 252	Var. 270	Var. 288	Var. 306	Var. 324	Var. 342
	65%	Var. 253	Var. 271	Var. 289	Var. 307	Var. 325	Var. 343
	70%	Var. 254	Var. 272	Var. 290	Var. 308	Var. 326	Var. 344
	75%	Var. 255	Var. 273	Var. 291	Var. 309	Var. 327	Var. 345
	80%	Var. 256	Var. 274	Var. 292	Var. 310	Var. 328	Var. 346
	85%	Var. 257	Var. 275	Var. 293	Var. 311	Var. 329	Var. 347
	90%	Var. 258	Var. 276	Var. 294	Var. 312	Var. 330	Var. 348
	95%	Var. 259	Var. 277	Var. 295	Var. 313	Var. 331	Var. 349

10

Var. = Variación

- 5 Tabla 7. Realizaciones de ejemplo para el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero mayor encontrado en las composiciones y usado en los métodos proporcionados en el presente documento.

		Número mínimo de subunidades en el multímero de rVWF					
		30	32	34	36	38	40
Mínimo	10%	Var. 350	Var. 368	Var. 386	Var. 404	Var. 422	Var. 440
	15%	Var. 351	Var. 369	Var. 387	Var. 405	Var. 423	Var. 441
	20%	Var. 352	Var. 370	Var. 388	Var. 406	Var. 424	Var. 442
	25%	Var. 353	Var. 371	Var. 389	Var. 407	Var. 425	Var. 443
	30%	Var. 354	Var. 372	Var. 390	Var. 408	Var. 426	Var. 444
	35%	Var. 355	Var. 373	Var. 391	Var. 409	Var. 427	Var. 445
	40%	Var. 356	Var. 374	Var. 392	Var. 410	Var. 428	Var. 446
	45%	Var. 357	Var. 375	Var. 393	Var. 411	Var. 429	Var. 447
	50%	Var. 358	Var. 376	Var. 394	Var. 412	Var. 430	Var. 448
	55%	Var. 359	Var. 377	Var. 395	Var. 413	Var. 431	Var. 449
	60%	Var. 360	Var. 378	Var. 396	Var. 414	Var. 432	Var. 450
	65%	Var. 361	Var. 379	Var. 397	Var. 415	Var. 433	Var. 451
	70%	Var. 362	Var. 380	Var. 398	Var. 416	Var. 434	Var. 452
	75%	Var. 363	Var. 381	Var. 399	Var. 417	Var. 435	Var. 453
	80%	Var. 364	Var. 382	Var. 400	Var. 418	Var. 436	Var. 454
	85%	Var. 365	Var. 383	Var. 401	Var. 419	Var. 437	Var. 455
	90%	Var. 366	Var. 384	Var. 402	Var. 420	Var. 438	Var. 456
	95%	Var. 367	Var. 385	Var. 403	Var. 421	Var. 439	Var. 457

10

Var. = Variación

- De acuerdo con lo anterior, el rVWF comprende un porcentaje significativo de multímeros de rVWF de alto peso molecular (HMW). En otras realizaciones, la composición de multímeros de rVWF de HMW comprende al menos 10%-80% de decámeros de rVWF o multímeros de orden superior. En otras realizaciones, la composición comprende aproximadamente 10-95%, 20-90%, 30-85%, 40-80%, 50-75%, 60-70% de decámeros o multímeros de orden superior. En otras realizaciones, la composición de multímeros de rVWF de HMW comprende al menos aproximadamente 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% de decámeros o multímeros de orden superior.

20

- La evaluación del número y porcentaje de multímeros de rVWF se puede llevar a cabo utilizando métodos conocidos en la técnica, que incluyen, sin limitación, métodos que utilizan electroforesis y cromatografía de exclusión por tamaño para separar los multímeros de rVWF por tamaños, por ejemplo como comentan Cumming et al, (*J Clin Pathol.* mayo de 1993; 46(5): 470-473. Estas técnicas pueden incluir además técnicas de inmunotransferencia (tales como transferencia Western), en las que se lleva a cabo la inmunotransferencia en gel con un anticuerpo radiomarcado contra VWF seguido de detección quimioluminiscente (véase por ejemplo Wen et al., (1993), *J. Clin. Lab. Anal.*, 7: 317-323. Otros ensayos para el VWF incluyen el ensayo de actividad de unión VWF:Antígeno (VWF:Ag), VWF:Cofactor de ristocetina (VWF:RCof) y VWF:colágeno (VWF:CBA), que se utilizan a menudo para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de Von Willebrand. (véase por ejemplo Favaloro et al., *Pathology*, 1997, 29(4): 341-456.

30

- En algunas realizaciones, la relación de la actividad procoagulante del rFVIII (UI rFVIII:C) a la actividad del cofactor de ristocetina del rVWF (UI rVWF:RCof) para el rVWF preparado según los métodos de la presente memoria descriptiva está entre 3:1 y 1:5. En otras realizaciones, la relación está entre 2:1 y 1:4. En otras realizaciones más, la relación está entre 5:2 y 1:4. En otras realizaciones, la relación está entre 3:2 y 1:3. En otras realizaciones más, la relación es aproximadamente 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4 o 3:5. En otras realizaciones, la relación está entre 1:1 y 1:2. En otras realizaciones más, la relación es 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1 o 2:1. En ciertas realizaciones, la relación de la actividad

35

procoagulante del rFVIII (UI rFVIII:C) a la actividad del cofactor de ristocetina del rVWF (UI rVWF:RCo) en una composición útil para un método descrito en el presente documento se selecciona de las variaciones 1988 a 2140 que se encuentran en la Tabla 8.

- 5 Tabla 8. Realizaciones de ejemplo para la relación de la actividad procoagulante del rFVIII (UI rFVIII:C) a la actividad del cofactor ristocetina del rVWF (UI rVWF:RCo) en composiciones y utilizadas en los métodos proporcionados en el presente documento.

(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)		(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)		(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)		(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)	
4:1	Var. 198 8	3:1-3:5	Var. 202 7	4:3-1:4	Var. 206 5	4:5-2:3	Var. 210 3
3:1	Var. 198 9	3:1-2:3	Var. 202 8	4:3-1:3	Var. 206 6	4:5-3:4	Var. 210 4
2:1	Var. 199 0	3:1-3:4	Var. 202 9	4:3-2:5	Var. 206 7	3:4-1:6	Var. 210 5
3:2	Var. 199 1	3:1-4:5	Var. 203 0	4:3-1:2	Var. 206 8	3:4-1:5	Var. 210 6
4:3	Var. 199 2	3:1-5:6	Var. 203 1	4:3-3:5	Var. 206 9	3:4-1:4	Var. 210 7
1:1	Var. 199 3	3:1-1:1	Var. 203 2	4:3-2:3	Var. 207 0	3:4-1:3	Var. 210 8
5:6	Var. 199 4	3:1-4:3	Var. 203 3	4:3-3:4	Var. 207 1	3:4-2:5	Var. 210 9
4:5	Var. 199 5	3:1-3:2	Var. 203 4	4:3-4:5	Var. 207 2	3:4-1:2	Var. 211 0
3:4	Var. 199 6	3:1-2:1	Var. 203 5	4:3-5:6	Var. 207 3	3:4-3:5	Var. 211 1
2:3	Var. 199 7	2:1-1:6	Var. 203 6	4:3-1:1	Var. 207 4	3:4-2:3	Var. 211 2
3:5	Var. 199 8	2:1-1:5	Var. 203 7	1:1-1:6	Var. 207 5	2:3-1:6	Var. 211 3
1:2	Var. 199 9	2:1-1:4	Var. 203 8	1:1-1:5	Var. 207 6	2:3-1:5	Var. 211 4
2:5	Var. 200 0	2:1-1:3	Var. 203 9	1:1-1:4	Var. 207 7	2:3-1:4	Var. 211 5
1:3	Var. 200 1	2:1-2:5	Var. 204 0	1:1-1:3	Var. 207 8	2:3-1:3	Var. 211 6
1:4	Var. 200 2	2:1-1:2	Var. 204 1	1:1-2:5	Var. 207 9	2:3-2:5	Var. 211 7
1:5	Var. 200 3	2:1-3:5	Var. 204 2	1:1-1:2	Var. 208 0	2:3-1:2	Var. 211 8
1:6	Var. 200 4	2:1-2:3	Var. 204 3	1:1-3:5	Var. 208 1	2:3-3:5	Var. 211 9
4:1-1:6	Var. 200 5	2:1-3:4	Var. 204 4	1:1-2:3	Var. 208 2	3:5-1:6	Var. 212 0

ES 3 004 108 T3

(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)		(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)		(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)		(UI rFVIII:C) a (UI rVWF:RCo)	
4:1-1:5	Var. 200 6	2:1-4:5	Var. 204 5	1:1-3:4	Var. 208 3	3:5-1:5	Var. 212 1
4:1-1:4	Var. 200 7	2:1-5:6	Var. 204 6	1:1-4:5	Var. 208 4	3:5-1:4	Var. 212 2
4:1-1:3	Var. 200 8	2:1-1:1	Var. 204 7	1:1-5:6	Var. 208 5	3:5-1:3	Var. 212 3
4:1-2:5	Var. 200 9	2:1-4:3	Var. 204 8	5:6-1:6	Var. 208 6	3:5-2:5	Var. 212 4
4:1-1:2	Var. 201 0	2:1-3:2	Var. 204 9	5:6-1:5	Var. 208 7	3:5-1:2	Var. 212 5
4:1-3:5	Var. 201 1	3:2-1:6	Var. 205 0	5:6-1:4	Var. 208 8	1:2-1:6	Var. 212 6
4:1-2:3	Var. 201 2	3:2-1:5	Var. 205 1	5:6-1:3	Var. 208 9	1:2-1:5	Var. 212 7
4:1-3:4	Var. 201 3	3:2-1:4	Var. 205 2	5:6-2:5	Var. 209 0	1:2-1:4	Var. 212 8
4:1-4:5	Var. 201 4	3:2-1:3	Var. 205 3	5:6-1:2	Var. 209 1	1:2-1:3	Var. 212 9
4:1-5:6	Var. 201 5	3:2-2:5	Var. 205 4	5:6-3:5	Var. 209 2	1:2-2:5	Var. 213 0
4:1-1:1	Var. 201 6	3:2-1:2	Var. 205 5	5:6-2:3	Var. 209 3	2:5-1:6	Var. 213 1
4:1-4:3	Var. 201 7	3:2-3:5	Var. 205 6	5:6-3:4	Var. 209 4	2:5-1:5	Var. 213 2
4:1-3:2	Var. 201 8	3:2-2:3	Var. 205 7	5:6-4:5	Var. 209 5	2:5-1:4	Var. 213 3
4:1-2:1	Var. 201 9	3:2-3:4	Var. 205 8	4:5-1:6	Var. 209 6	2:5-1:3	Var. 213 4
4:1-3:1	Var. 202 0	3:2-4:5	Var. 205 9	4:5-1:5	Var. 209 7	1:3-1:6	Var. 213 5
3:1-1:6	Var. 202 1	3:2-5:6	Var. 206 0	4:5-1:4	Var. 209 8	1:3-1:5	Var. 213 6
3:1-1:5	Var. 202 2	3:2-1:1	Var. 206 1	4:5-1:3	Var. 209 9	1:3-1:4	Var. 213 7
3:1-1:4	Var. 202 3	3:2-4:3	Var. 206 2	4:5-2:5	Var. 210 0	1:4-1:6	Var. 213 8
3:1-1:3	Var. 202 4	4:3-1:6	Var. 206 3	4:5-1:2	Var. 210 1	1:4-1:5	Var. 213 9
3:1-2:5	Var. 202 5	4:3-1:5	Var. 206 4	4:5-3:5	Var. 210 2	1:5-1:6	Var. 214 0
3:1-1:2	Var. 202 6						
Var. = Variación							

ES 3 004 108 T3

- En otras realizaciones, los multímeros de rVWF de orden superior para el uso de la invención son estables durante aproximadamente 1 a aproximadamente 90 horas después de la administración. En otras realizaciones más, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante aproximadamente 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 horas después de la administración. En otras realizaciones más, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante al menos 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48 y 72 horas después de la administración. En ciertas realizaciones, la estabilidad de los multímeros de rVWF se evalúa *in vitro*.
- En una realización, los multímeros de rVWF de orden superior utilizados en las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento tienen una semivida de al menos 12 horas después de la administración. En otra realización, los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida de al menos 24 horas después de la administración. En otras realizaciones más, los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida seleccionada de variaciones 642 a 1045 que se encuentran en la Tabla 9.
- Tabla 9. Realizaciones de ejemplo para la semivida de multímeros de rVWF de orden superior encontrados en las composiciones preparadas mediante los métodos proporcionados en el presente documento.

Horas		Horas		Horas		Horas	
al menos 1	Var. 642	4-22	Var. 743	14-78	Var. 844	24-30	Var. 945
al menos 2	Var. 643	4-20	Var. 744	14-72	Var. 845	24-27	Var. 946
al menos 3	Var. 644	4-18	Var. 745	14-66	Var. 846	27-90	Var. 947
al menos 4	Var. 645	4-16	Var. 746	14-60	Var. 847	27-84	Var. 948
al menos 5	Var. 646	4-14	Var. 747	14-54	Var. 848	27-78	Var. 949
al menos 6	Var. 647	4-12	Var. 748	14-48	Var. 849	27-72	Var. 950
al menos 7	Var. 648	4-10	Var. 749	14-45	Var. 850	27-66	Var. 951
al menos 8	Var. 649	4-8	Var. 750	14-42	Var. 851	27-60	Var. 952
al menos 9	Var. 650	4-6	Var. 751	14-39	Var. 852	27-54	Var. 953
al menos 10	Var. 651	6-90	Var. 752	14-36	Var. 853	27-48	Var. 954
al menos 11	Var. 652	6-84	Var. 753	14-33	Var. 854	30-90	Var. 955
al menos 12	Var. 653	6-78	Var. 754	14-30	Var. 855	30-84	Var. 956
al menos 14	Var. 654	6-72	Var. 755	14-27	Var. 856	30-78	Var. 957
al menos 16	Var. 655	6-66	Var. 756	14-24	Var. 857	30-72	Var. 958
al menos 18	Var. 656	6-60	Var. 757	14-22	Var. 858	30-66	Var. 959
al menos 20	Var. 657	6-54	Var. 758	14-20	Var. 859	30-60	Var. 960
al menos 22	Var. 658	6-48	Var. 759	14-18	Var. 860	30-54	Var. 961
al menos 24	Var. 659	6-45	Var. 760	14-16	Var. 861	30-48	Var. 962
al menos 27	Var. 660	6-42	Var. 761	16-90	Var. 862	30-45	Var. 963
al menos 30	Var. 661	6-39	Var. 762	16-84	Var. 863	30-42	Var. 964
al menos 33	Var. 662	6-36	Var. 763	16-78	Var. 864	30-39	Var. 965
al menos 36	Var. 663	6-33	Var. 764	16-72	Var. 865	30-36	Var. 966
al menos 39	Var. 664	6-30	Var. 765	16-66	Var. 866	30-33	Var. 967
al menos 42	Var. 665	6-27	Var. 766	16-60	Var. 867	33-90	Var. 968
al menos 45	Var. 666	6-24	Var. 767	16-54	Var. 868	33-84	Var. 969

ES 3 004 108 T3

Horas		Horas		Horas		Horas	
al menos 48	Var. 667	6-22	Var. 768	16-48	Var. 869	33-78	Var. 970
al menos 54	Var. 668	6-20	Var. 769	16-45	Var. 870	33-72	Var. 971
al menos 60	Var. 669	6-18	Var. 770	16-42	Var. 871	33-66	Var. 972
al menos 66	Var. 670	6-16	Var. 771	16-39	Var. 872	33-60	Var. 973
al menos 72	Var. 671	6-14	Var. 772	16-36	Var. 873	33-54	Var. 974
al menos 78	Var. 672	6-12	Var. 773	16-33	Var. 874	33-48	Var. 975
al menos 84	Var. 673	6-10	Var. 774	16-30	Var. 875	33-45	Var. 976
al menos 90	Var. 674	6-8	Var. 775	16-27	Var. 876	33-42	Var. 977
2-90	Var. 675	8-90	Var. 776	16-24	Var. 877	33-29	Var. 978
2-84	Var. 676	8-84	Var. 777	16-22	Var. 878	33-36	Var. 979
2-78	Var. 677	8-78	Var. 778	16-20	Var. 879	36-90	Var. 980
2-72	Var. 678	8-72	Var. 779	16-18	Var. 880	36-84	Var. 981
2-66	Var. 679	8-66	Var. 780	18-90	Var. 881	36-78	Var. 982
2-60	Var. 680	8-60	Var. 781	18-84	Var. 882	36-72	Var. 983
2-54	Var. 681	8-54	Var. 782	18-78	Var. 883	36-66	Var. 984
2-48	Var. 682	8-48	Var. 783	18-72	Var. 884	36-60	Var. 985
2-45	Var. 683	8-45	Var. 784	18-66	Var. 885	36-54	Var. 986
2-42	Var. 684	8-42	Var. 785	18-60	Var. 886	36-48	Var. 987
2-39	Var. 685	8-39	Var. 786	18-54	Var. 887	36-45	Var. 988
2-36	Var. 686	8-36	Var. 787	18-48	Var. 888	36-42	Var. 989
2-33	Var. 687	8-33	Var. 788	18-45	Var. 889	36-39	Var. 990
2-30	Var. 688	8-30	Var. 789	18-42	Var. 890	39-90	Var. 991
2-27	Var. 689	8-27	Var. 790	18-39	Var. 891	39-84	Var. 992
2-24	Var. 690	8-24	Var. 791	18-36	Var. 892	39-78	Var. 993
2-22	Var. 691	8-22	Var. 792	18-33	Var. 893	39-72	Var. 994
2-20	Var. 692	8-20	Var. 793	18-30	Var. 894	39-66	Var. 995
2-18	Var. 693	8-18	Var. 794	18-27	Var. 895	39-60	Var. 996
2-16	Var. 694	8-16	Var. 795	18-24	Var. 896	39-54	Var. 997
2-14	Var. 695	8-14	Var. 796	18-22	Var. 897	39-48	Var. 998
2-12	Var. 696	8-12	Var. 797	18-20	Var. 898	39-45	Var. 999
2-10	Var. 697	8-10	Var. 798	20-90	Var. 899	39-42	Var. 1000
2-8	Var. 698	10-90	Var. 799	20-84	Var. 900	42-90	Var. 1001
2-6	Var. 699	10-84	Var. 800	20-78	Var. 901	42-84	Var. 1002
2-4	Var. 700	10-78	Var. 801	20-72	Var. 902	42-78	Var. 1003

ES 3 004 108 T3

Horas		Horas		Horas		Horas	
3-90	Var. 701	10-72	Var. 802	20-66	Var. 903	42-72	Var. 1004
3-84	Var. 702	10-66	Var. 803	20-60	Var. 904	42-66	Var. 1005
3-78	Var. 703	10-60	Var. 804	20-54	Var. 905	42-60	Var. 1006
3-72	Var. 704	10-54	Var. 805	20-48	Var. 906	42-54	Var. 1007
3-66	Var. 705	10-48	Var. 806	20-45	Var. 907	42-48	Var. 1008
3-60	Var. 706	10-45	Var. 807	20-42	Var. 908	42-45	Var. 1009
3-54	Var. 707	10-42	Var. 808	20-39	Var. 909	45-90	Var. 1010
3-48	Var. 708	10-39	Var. 809	20-36	Var. 910	45-84	Var. 1011
3-45	Var. 709	10-36	Var. 810	20-33	Var. 911	45-78	Var. 1012
3-42	Var. 710	10-33	Var. 811	20-30	Var. 912	45-72	Var. 1013
3-39	Var. 711	10-30	Var. 812	20-27	Var. 913	45-66	Var. 1014
3-36	Var. 712	10-27	Var. 813	20-24	Var. 914	45-60	Var. 1015
3-33	Var. 713	10-24	Var. 814	20-22	Var. 915	45-54	Var. 1016
3-30	Var. 714	10-22	Var. 815	22-90	Var. 916	45-48	Var. 1017
3-27	Var. 715	10-20	Var. 816	22-84	Var. 917	48-90	Var. 1018
3-24	Var. 716	10-18	Var. 817	22-78	Var. 918	48-84	Var. 1019
3-22	Var. 717	10-16	Var. 818	22-72	Var. 919	48-78	Var. 1020
3-20	Var. 718	10-14	Var. 819	22-66	Var. 920	48-72	Var. 1021
3-18	Var. 719	10-12	Var. 820	22-60	Var. 921	48-66	Var. 1022
3-16	Var. 720	12-90	Var. 821	22-54	Var. 922	48-60	Var. 1023
3-14	Var. 721	12-84	Var. 822	22-48	Var. 923	48-54	Var. 1024
3-12	Var. 722	12-78	Var. 823	22-45	Var. 924	54-90	Var. 1025
3-10	Var. 723	12-72	Var. 824	22-42	Var. 925	54-84	Var. 1026
3-8	Var. 724	12-66	Var. 825	22-39	Var. 926	54-78	Var. 1027
3-6	Var. 725	12-60	Var. 826	22-36	Var. 927	54-72	Var. 1028
3-4	Var. 726	12-54	Var. 827	22-33	Var. 928	54-66	Var. 1029
4-90	Var. 727	12-48	Var. 828	22-30	Var. 929	54-60	Var. 1030
4-84	Var. 728	12-45	Var. 829	22-27	Var. 930	60-90	Var. 1031
4-78	Var. 729	12-42	Var. 830	22-24	Var. 931	60-84	Var. 1032
4-72	Var. 730	12-39	Var. 831	24-90	Var. 932	60-78	Var. 1033
4-66	Var. 731	12-36	Var. 832	24-84	Var. 933	60-72	Var. 1034
4-60	Var. 732	12-33	Var. 833	24-78	Var. 934	60-66	Var. 1035
4-54	Var. 733	12-30	Var. 834	24-72	Var. 935	66-90	Var. 1036
4-48	Var. 734	12-27	Var. 835	24-66	Var. 936	66-84	Var. 1037

Horas		Horas		Horas		Horas	
4-45	Var. 735	12-24	Var. 836	24-60	Var. 937	66-78	Var. 1038
4-42	Var. 736	12-22	Var. 837	24-54	Var. 938	66-72	Var. 1039
4-39	Var. 737	12-20	Var. 838	24-48	Var. 939	72-90	Var. 1040
4-36	Var. 738	12-18	Var. 839	24-45	Var. 940	72-84	Var. 1041
4-33	Var. 739	12-16	Var. 840	24-42	Var. 941	72-78	Var. 1042
4-30	Var. 740	12-14	Var. 841	24-39	Var. 942	78-90	Var. 1043
4-27	Var. 741	14-90	Var. 842	24-36	Var. 943	78-84	Var. 1044
4-24	Var. 742	14-84	Var. 843	24-33	Var. 944	84-90	Var. 1045
Var. = Variación							

En algunas realizaciones, el pro-VWF y/o el rVWF purificado según la presente memoria descriptiva no se modifica con ninguna modificación de conjugación, de postraducción o covalente. En realizaciones particulares, el pro-VWF y/o el rVWF purificado para el uso de la presente invención no está modificado con un polímero soluble en agua, incluyendo, sin limitación, un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol, un polioxialquileo, un poli(ácido siálico), hidroxietil-almidón, una fracción de policarbohidrato y similares.

En algunas realizaciones, el pro-VWF y/o el rVWF purificado según la presente memoria descriptiva se modifican por medio de conjugación, modificación postraduccional o modificación covalente, incluidas modificaciones de los restos N- o C-terminales, así como modificaciones de cadenas laterales seleccionadas, por ejemplo, en grupos sulfhidrilo libres, aminas primarias y grupos hidroxilo. En una realización, un polímero soluble en agua está unido a la proteína (directamente o a través de un conector) mediante un grupo lisina u otra amina primaria. En algunas realizaciones, el pro-VWF y/o el rVWF purificado para el uso de la presente invención pueden estar modificadas por conjugación con un polímero soluble en agua, incluyendo, sin limitación, un polietilenglicol (PEG), un polipropilenglicol, un polioxialquileo, un poli(ácido siálico), hidroxietil-almidón, una fracción de policarbohidrato y similares.

Los polímeros solubles en agua que pueden usarse para modificar el pro-VWF y/o el rVWF purificado incluyen estructuras lineales y ramificadas. Los polímeros conjugados pueden unirse directamente a las proteínas de coagulación para el uso de la invención, o alternativamente pueden unirse a través de una fracción de enlace. Se pueden encontrar ejemplos no limitantes de conjugación de proteínas con polímeros solubles en agua en las patentes de EE. UU. N.º 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 y 4,179,337, así como en Abuchowski y Davis "Enzymes as Drugs," Holcenberg y Roberts, Eds., págs. 367 383, John Wiley and Sons, New York (1981), y Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2.^a Ed., Academic Press, Inc. 2008.

La conjugación de proteínas se puede llevar a cabo mediante una serie de técnicas bien conocidas en la técnica, por ejemplo, véase Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2.^a Ed., Academic Press, Inc. 2008. Los ejemplos incluyen la unión a través del enlace peptídico entre un grupo carboxilo en una de las fracciones de proteína de coagulación o polímero soluble en agua y un grupo amina de la otra, o una unión éster entre un grupo carboxilo de una y un grupo hidroxilo de la otra. Otra unión mediante la cual una proteína de coagulación para el uso de la invención podría conjugarse con un compuesto polimérico soluble en agua es a través de una base de Schiff, entre un grupo amino libre en la fracción polimérica que se hace reaccionar con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polímero por oxidación con peryodato (Jennings y Lugowski, *J. Immunol.* 1981; 127:1011-8; Fernandes y Gregorradis, *Biochim Biophys Acta.* 1997; 1341; 26-34). La base de Schiff generada se puede estabilizar mediante reducción específica con NaCNBH₃ para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino libres terminales en el polímero mediante aminación reductora con NH₄Cl después de una oxidación previa. Se pueden utilizar reactivos bifuncionales para unir dos grupos amino o dos hidroxilo. Por ejemplo, un polímero que contiene un grupo amino se puede acoplar con un grupo amino de la proteína de coagulación con reactivos como BS3 (suberato de bis(sulfosuccinimidilo)/Pierce, Rockford, Ill.). Además, se pueden utilizar reactivos de reticulación heterobifuncionales como Sulfo-EMCS éster de (N-ε-Maleimidocaproiloxi)sulfosuccinimida/Pierce), por ejemplo, para unir grupos amina y tiol. En otras realizaciones, se pueden utilizar un grupo reactivo de aldehído, tal como alcóxido de PEG más acetal dietílico de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, y cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres activos de succinimidilo, ditiocarbonato activado PE.G., cloroformiato de 2,4,5-triclorofenilo y cloroformiato de P-nitrofenilo activado PE.G., en la conjugación de una proteína de coagulación.

Otro método para medir la actividad biológica del VWF es el ensayo de unión de colágeno, que se basa en la tecnología ELISA (Brown y Bosak, *Thromb. Res.*, 1986, 43:303-311; Favaloro, *Thromb. Haemost.*, 2000, 83:127-135). Una placa de microtitulación está recubierta con colágeno tipo I o III. Luego, el VWF se une a la superficie del colágeno y posteriormente se detecta con un anticuerpo policlonal marcado con enzima. La última etapa es la reacción de un sustrato, que se puede vigilar fotométricamente con un lector de ELISA.

Los ensayos inmunológicos de los factores de von Willebrand (VWF:Ag) son inmunoensayos que miden la concentración de la proteína de VWF en plasma. No dan ninguna indicación sobre la función del VWF. Existen varios métodos para medir VWF:Ag y estos incluyen tanto el ensayo de inmunoabsorción con enzimas ligadas (ELISA) como los inmunoensayos de látex automatizados (LIA). Muchos laboratorios utilizan ahora un inmunoensayo de látex totalmente automatizado. Históricamente, los laboratorios utilizaban una variedad de técnicas, incluido el electroinmunoensayo Laurell "Laurell Rockets", pero hoy en día rara vez se utilizan en la mayoría de los laboratorios.

III. Kits

Como un aspecto adicional que no es parte de la invención, la memoria descriptiva incluye kits que comprenden una o más composiciones liofilizadas envasadas de una manera que facilita su uso para la administración a sujetos. En una realización, dicho kit incluye la formulación farmacéutica descrita en el presente documento (p. ej., una composición que comprende una proteína o péptido terapéutico), envasada en un envase tal como un frasco o recipiente sellado, con una etiqueta fijada al envase o incluida en el paquete que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. En una realización, la formulación farmacéutica se envasa en el envase de tal manera que la cantidad de espacio de cabeza en el envase (p. ej., la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del envase) es muy pequeña. Preferiblemente, la cantidad de espacio de cabeza es insignificante (p. ej., casi nada). En una realización, el kit contiene un primer envase que tiene una composición de proteína o péptido terapéutico y un segundo envase que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición. En un aspecto, la formulación farmacéutica está envasada en forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la formulación farmacéutica según una vía de administración específica. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de las formulaciones farmacéuticas.

IV. rVWF para métodos de pretratamiento de sujetos con VWD que se someten a cirugía

Una de las ventajas de administrar el rVWF a sujetos con VWD grave como pretratamiento para la cirugía es que la mayor actividad específica del rVWF en comparación con el pdVWF permite flexibilidad en la cantidad de rVWF administrado y el número de veces que se le vuelve a administrar una dosis al sujeto. Como se apreciará y como se comenta con más detalle en el presente documento, el FVIII coadministrado puede ser recombinante o derivado del plasma.

Se llevan a cabo administraciones únicas o múltiples de rVWF y los niveles y el patrón de dosis los selecciona el médico tratante. Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosis adecuada depende del tipo de enfermedad que se va a tratar (p. ej., enfermedad de von Willebrand), la gravedad y el curso de la enfermedad, si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al fármaco, y la discreción del médico tratante.

En algunos aspectos, el rVWF se administra antes de un procedimiento quirúrgico a un sujeto en un intervalo de 20-60 UI/kg, p. ej., 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 20-60, 35-70, 20-40, 35-60, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60 o 50-55 UI/kg. En algunas realizaciones, el rVWF se administra entre 12 horas y 24 horas, p. ej., 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 12 horas y 24 horas, 14 horas y 24 horas, 16 y 24 horas, 18 horas y 24 horas, o 20 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunos aspectos, no se administra factor VIII (FVIII) con el rVWF antes del procedimiento quirúrgico.

En algunas realizaciones, se administra rVWF al sujeto en un intervalo de 5-90 UI/kg, p. ej., 5-90, 5-50, 10-90, 15-90, 20-90, 30-90, 40-90, 50-90, 60-90, 70-90, 80-90, 5-80, 10-70, 20-60, 30-50, 35-60, 5-50, 5-40, 5-30, 5-20, 10-90, 10-50 o 20-40 UI/kg 1 hora antes de la cirugía. En otras realizaciones, el rVWF se administra en una dosis de 70-200 UI/kg, p. ej., 70-200, 80-200, 90-200, 100-200, 110-200, 120-200, 130-200, 140-200, 150-200, 160-200, 170-200, 180-200, 190-200, 70-170, 80-180, 60-160, 50-150, 40-140, 30, 130, 20-120, 10-110, 70-100 o 70-90 UI/kg después de la cirugía. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico se selecciona de un grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto 35-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de cirugía mayor. En otras realizaciones, se administran al sujeto 15-90 UI/kg de rVWF 1 hora antes de cirugía mayor. En otra realización, se administran al sujeto 150-220 UI/kg de rVWF después de cirugía mayor. En algunos casos, se administra al sujeto que se somete a cirugía mayor una dosis total de 220-320 UI/kg.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto 50-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de cirugía menor. En otras realizaciones, se administran al sujeto 5-50 UI/kg de rVWF 1 hora antes de cirugía menor. En otra realización, se administran al sujeto 70-150 UI/kg de rVWF después de cirugía menor. En algunos casos, se administra al sujeto que se somete a cirugía menor una dosis total de 100-220 UI/kg.

En algunas realizaciones, se administran al sujeto 20-40 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de cirugía oral. En otras realizaciones, se administran al sujeto 20-50 UI/kg de rVWF 1 hora antes de cirugía oral. En otra realización, se administran al sujeto 10-50 UI/kg de rVWF durante la cirugía oral. En otra realización, se administran al sujeto 20-50 UI/kg de rVWF después de cirugía oral. En algunos casos, se administra al sujeto que se somete a cirugía oral una dosis total de 70-190 UI/kg.

Las composiciones de rVWF pueden estar contenidas en formulaciones farmacéuticas, como se describe en el presente documento. Dichas formulaciones pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante pulverización por inhalación, vía vaginal, rectal o mediante inyección intracaneal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular. Generalmente, las composiciones están esencialmente exentas de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser dañinas para el receptor.

En un aspecto, las formulaciones para el uso de la invención se administran mediante un bolo inicial seguido de una infusión continua para mantener niveles circulantes terapéuticos del medicamento. Como otro ejemplo, el compuesto de la invención se administra como una dosis de una sola vez. Los expertos en la técnica optimizarán fácilmente las dosis y las pautas de administración eficaces determinados por la buena práctica médica y la afección clínica del paciente individual. La vía de administración puede ser, pero no se limita a, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La frecuencia de la dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima la determina un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y dosis deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 páginas 1435-1712. Dichas formulaciones influyen en el estado físico, estabilidad, tasa de liberación in vivo y la tasa de depuración in vivo de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, se calcula una dosis adecuada según el peso corporal, la superficie específica del cuerpo o el tamaño del órgano. Las dosificaciones apropiadas se pueden determinar mediante el uso de ensayos establecidos para determinar los niveles en sangre de las dosificaciones junto con datos de respuesta a la dosis apropiados. El régimen de dosificación final lo determina el médico tratante, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, p. ej., la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, hora de administración y otros factores clínicos. A modo de ejemplo, una dosis típica de un VWF recombinante para el uso de la presente invención es de aproximadamente 50 UI/kg, equivalente a 500 µg/kg. A medida que se llevan a cabo estudios, surgirá información adicional con respecto a los niveles de dosificación adecuados y la duración del tratamiento para varias enfermedades y afecciones.

La práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales y descripciones de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (incluidas técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, que están dentro de la experiencia de la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen síntesis de matrices de polímeros, hibridación, ligación y detección de hibridación utilizando un marcador. Se pueden obtener ilustraciones específicas de técnicas adecuadas por referencia al ejemplo que aparece a continuación. Sin embargo, por supuesto también se pueden utilizar otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas técnicas y descripciones convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio convencionales tales como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, PCR Primer: A Laboratory Manual, y Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) Biochemistry (4.^a Ed.) Freeman, Highly stabilized York, Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" 1984, IRL Press, London, Nelson y Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3.^a Ed., W. H. Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y. y Berg et al. (2002) Biochemistry, 5.^a Ed., W. H. Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y.

Obsérvese que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un(una)" y "el(la)" incluye referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "una polimerasa" se refiere a un agente o mezclas de dichos agentes, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

Obsérvese que como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un(una)" y "el(la)" incluyen referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo

tanto, por ejemplo, la referencia a "una polimerasa" se refiere a un agente o mezclas de dichos agentes, y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

- 5 A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención.

- 10 Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior y el inferior de ese intervalo, y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, queda comprendido dentro de la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos más pequeños que también están comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo indicado. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, también están incluidos en la invención los intervalos que excluyen cualquiera de ambos de los límites incluidos.

- 20 En la descripción anterior, se exponen numerosos detalles específicos para proporcionar una comprensión más completa de la presente invención. Sin embargo, será evidente para el experto en la técnica que la presente invención se puede poner en práctica sin uno o más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito características y procedimientos bien conocidos por los expertos en la técnica para evitar ensombrecer la invención.

- 25 Aunque la presente invención se describe principalmente con referencia a realizaciones específicas, también se prevé que otras realizaciones se harán evidentes para los expertos en la técnica al leer la presente descripción, y se pretende que dichas realizaciones estén contenidas dentro del presente método de la invención.

30 a. Formulaciones de VWF liofilizadas

- El presente método también proporciona formulaciones de rVWF para usar en los métodos de tratamiento proporcionados en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición de rVWF se utiliza para la producción de una composición farmacéutica. En algunas realizaciones, el rVWF se puede formular en una formulación liofilizada.

- 35 En algunas realizaciones, las formulaciones que comprenden un polipéptido de VWF para el uso de la invención se liofilizan después de purificación y antes de la administración a un sujeto. La liofilización se lleva a cabo utilizando técnicas comunes en la técnica y debe optimizarse para la composición que se está desarrollando (Tang et al., *Pharm Res.* 21:191-200, (2004) y Chang et al., *Pharm Res.* 13:243-9 (1996)).

- 40 Un ciclo de liofilización se compone, en un aspecto, de tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario (A. P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)). En la etapa de congelación, la solución se enfría para iniciar la formación de hielo. Además, esta etapa induce la cristalización del agente de carga. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, que se lleva a cabo reduciendo la presión de la cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, utilizando vacío e introduciendo calor para promover la sublimación. Finalmente, el agua adsorbida o unida se elimina en la etapa de secado secundario a una presión de la cámara reducida y a una temperatura de anaquel elevada. El procedimiento produce un material conocido como torta liofilizada. Posteriormente, la torta se puede reconstituir con agua estéril o diluyente adecuado para inyección.

- 50 El ciclo de liofilización no sólo determina el estado físico final de los excipientes sino que también afecta a otros parámetros tales como el tiempo de reconstitución, apariencia, estabilidad y contenido de humedad final. La estructura de la composición en estado congelado pasa por varias transiciones (p. ej., transiciones vítreas, humectaciones y cristalizaciones) que ocurren a temperaturas específicas y la estructura puede usarse para comprender y optimizar el procedimiento de liofilización. La temperatura de transición vítrea (T_g y/o T_g') puede proporcionar información sobre el estado físico de un soluto y puede determinarse mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). T_g y T_g' son un parámetro importante que debe tenerse en cuenta al diseñar el ciclo de liofilización. Por ejemplo, T_g' es importante para el secado primario. Además, en estado seco, la temperatura de transición vítrea proporciona información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

60 b. Formulaciones farmacéuticas y excipientes en general

- Los excipientes son aditivos que imparten o mejoran la estabilidad y la administración de un medicamento (p. ej., proteína). Independientemente del motivo de su inclusión, los excipientes son un componente integral de una formulación y, por lo tanto, deben ser seguros y bien tolerados por los pacientes. En el caso de los fármacos

de proteínas, la elección de los excipientes es particularmente importante porque pueden afectar tanto a la eficacia como a la inmunogenicidad del fármaco. Por lo tanto, es necesario desarrollar formulaciones de proteínas con una selección adecuada de excipientes que proporcionen estabilidad, seguridad y comercialización adecuadas.

5

Una formulación liofilizada está, en un aspecto, compuesta al menos por uno o más de un tampón, un agente de carga y un estabilizante. En este aspecto, se evalúa la utilidad de un tensioactivo y se selecciona en los casos en que la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución se convierte en un problema. Se incluye un agente de tamponamiento apropiado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización. En la Tabla 10 se proporciona una comparación de los componentes excipientes contemplados para las formulaciones de proteínas líquidas y liofilizadas.

10

Tabla 1: Componentes excipientes de formulaciones de proteína liofilizadas

Componente excipiente	Función en la formulación liofilizada
Tampón	○ -Mantiene el pH de la formulación durante la liofilización y tras la reconstitución
Agente de tonicidad/estabilizante	○ Los estabilizantes incluyen crioprotectores ○ Los ejemplos incluyen polioles, azúcares y polímeros ○ Los crioprotectores protegen a las proteínas de las tensiones de la congelación ○ Los lioprotectores estabilizan proteínas en el estado liofilizado
Agente de carga	○ Usado para mejorar la elegancia del producto y evitar que se rompa ○ Proporciona fuerza estructural a la torta de liofilización ○ Los ejemplos incluyen manitol y glicina
Tensioactivo	○ Empleado si la agregación durante el procedimiento de liofilización es un problema ○ Puede servir para reducir los tiempos de reconstitución ○ Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80
Antioxidante	○ Normalmente no se emplea, las reacciones moleculares en la torta de liofilización se retardan mucho
Iones de metales/agente quelante	○ Se pueden incluir si se incluye un ion de metal específico solo como un cofactor o cuando se requiere el metal para la actividad de proteasa ○ Generalmente los agentes quelantes no son necesarios en las formulaciones de liofilización
Conservante	○ Solo para formulaciones de multidosis ○ Proporciona protección contra crecimiento microbiano en la formulación ○ Normalmente se incluye en el diluyente de reconstitución (p. ej., bWFI)

15

El principal desafío en el desarrollo de formulaciones para proteínas es estabilizar el producto frente a las tensiones de la fabricación, envío y almacenamiento. El papel de los excipientes de formulación es proporcionar estabilización frente a estas tensiones. También se pueden emplear excipientes para reducir la viscosidad de formulaciones de proteínas de alta concentración con el fin de permitir su administración y mejorar la comodidad del paciente. En general, los excipientes pueden clasificarse en función de los mecanismos mediante los cuales estabilizan las proteínas frente a diversas tensiones químicas y físicas. Algunos excipientes se utilizan para aliviar los efectos de una tensión específica o para regular una susceptibilidad particular de una proteína específica. Otros excipientes tienen efectos más generales sobre las estabilidades física y covalente de las proteínas. Los excipientes descritos en el presente documento están organizados ya sea por su tipo químico o por su papel funcional en las formulaciones. Se proporcionan breves descripciones de los modos de estabilización cuando se comenta cada tipo de excipiente.

20

25

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o intervalo de excipiente se puede incluir en cualquier formulación particular para lograr una formulación biofarmacéutica para el uso de la invención que promueva la retención en la estabilidad del producto biofarmacéutico (p. ej., una proteína). Por ejemplo, la cantidad y el tipo de una sal que se van a incluir en una formulación biofarmacéutica para el uso de la invención se selecciona en función de la osmolalidad deseada (p. ej., isotónica, hipotónica o hipertónica) de la solución final, así como de las cantidades y la osmolalidad de otros componentes que se incluirán en la formulación.

A modo de ejemplo, la inclusión de aproximadamente 5% de sorbitol puede lograr isotonicidad, mientras que se necesita aproximadamente 9% de un excipiente de sacarosa para lograr isotonicidad. La selección de la cantidad o intervalo de concentraciones de uno o más excipientes que pueden incluirse dentro de una formulación biofarmacéutica para el uso de la invención se ha ilustrado anteriormente con referencia a sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que las consideraciones descritas en el presente documento e ilustradas además por referencia a excipientes específicos son igualmente aplicables a todos los tipos y combinaciones de excipientes, incluidos, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizantes, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

Además, cuando se da un excipiente particular en concentración molar, los expertos en la técnica reconocerán que también se contempla el porcentaje equivalente (%) en p/v (p. ej. (gramos de sustancia en una muestra de solución/ml de solución) X 100%) de solución.

Por supuesto, un experto en la técnica reconocería que las concentraciones de los excipientes descritos en el presente documento comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A modo de ejemplo, la concentración de un agente de carga se puede reducir cuando, p. ej., hay una alta concentración de proteína o cuando, p. ej., hay una alta concentración de agente estabilizante. Además, un experto en la técnica reconocería que, con el fin de mantener la isotonicidad de una formulación particular en la que no hay agente de carga, la concentración de un agente estabilizante se ajustaría en consecuencia (p. ej., se utilizaría una cantidad "tonificante" de estabilizante). Los excipientes comunes son conocidos en la técnica y se pueden encontrar en Powell et al., *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), *PDA J. Pharm. Sci. Technology*, 52:238-311.

c. Tampones y agentes de tamponamiento farmacéuticos

Generalmente se observa que la estabilidad de una formulación de proteína farmacológicamente activa es máxima en un intervalo de pH estrecho. Este intervalo de pH de estabilidad óptima debe identificarse temprano durante los estudios de preformulación. Varios enfoques, tales como los estudios de estabilidad acelerada y los estudios de barrido calorimétrico, son útiles en este cometido (Remmele R.L. Jr., et al., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez finalizada una formulación, la proteína debe fabricarse y mantenerse durante toda su vida útil. Por lo tanto, casi siempre se emplean agentes de tamponamiento para controlar el pH en la formulación.

La capacidad de tampón de las especies de tamponamiento es máxima a un pH igual al pKa y disminuye a medida que el pH aumenta o disminuye alejándose de este valor. El noventa por ciento de la capacidad de tamponamiento existe dentro de una unidad de pH de su pKa. La capacidad de tampón también aumenta proporcionalmente al aumentar la concentración del tampón.

Hay varios factores que deben tenerse en cuenta al elegir un tampón. En primer lugar, es necesario definir la especie de tampón y su concentración basado en su pKa y del pH de la formulación deseado. Igualmente importante es garantizar que el tampón sea compatible con la proteína y otros excipientes de la formulación y que no catalice ninguna reacción de degradación. Un tercer aspecto importante a tener en cuenta es la sensación de picazón e irritación que puede inducir el tampón tras administrarlo. Por ejemplo, se sabe que el citrato causa picazón tras la inyección (Laursen T, et al., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). El potencial de picazón e irritación es mayor para los fármacos que se administran por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM), donde la solución del fármaco permanece en el sitio durante un período de tiempo relativamente más largo que cuando se administra por vía IV, donde la formulación se diluye rápidamente en la sangre tras la administración. Para formulaciones que se administran por infusión IV directa, es necesario controlar la cantidad total de tampón (y cualquier otro componente de la formulación). Hay que tener especial cuidado con los iones de potasio administrados en forma de tampón de fosfato de potasio, que pueden inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodriguez JC, et al., *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006)).

Los tampones para formulaciones liofilizadas necesitan consideración adicional. Algunos tampones, como el fosfato de sodio, pueden cristalizar fuera de la fase amorfa de la proteína durante la congelación, lo que produce cambios en el pH. Otros tampones comunes, tales como el acetato y el imidazol, pueden sublimar o evaporarse

durante el proceso de liofilización, cambiando el pH de la formulación durante la liofilización o después de la reconstitución.

5 El sistema de tampón presente en las composiciones se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado de la formulación farmacéutica. En una realización, el pH de la solución está entre pH 2,0 y pH 12,0. Por ejemplo, el pH de la solución puede ser 2,0, 2,3, 2,5, 2,7, 3,0, 3,3, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7, 9,0, 9,3, 9,5, 9,7, 10,0, 10,3, 10,5, 10,7, 11,0, 11,3, 11,5, 11,7 o 12,0.

10 El compuesto de tamponamiento de pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación a un nivel predeterminado. En una realización, la concentración para tamponamiento del pH es entre 0,1 mM y 500 mM (1 M). Por ejemplo, se contempla que el agente de tamponamiento del pH sea al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 500 mM.

15 Los agentes de tamponamiento del pH de ejemplo utilizados para tamponar la formulación como se expone en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, ácidos orgánicos, glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato, citrato, Tris, HEPES y aminoácidos o mezclas de aminoácidos, incluyendo, pero no limitados a, aspartato, histidina y glicina. En una realización del uso de la presente invención, el agente de tamponamiento es citrato.

d. Estabilizantes y agentes de carga farmacéuticos

25 En un aspecto de las presentes formulaciones farmacéuticas, se añade un estabilizante (o una combinación de estabilizantes) para prevenir o reducir la agregación y la degradación química inducidas por el almacenamiento. Una solución poco clara o turbia tras la reconstitución indica que la proteína ha precipitado o al menos se ha agregado. El término "estabilizante" significa un excipiente capaz de prevenir la agregación o degradación física, incluida la degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.) en estado acuoso. Los estabilizantes contemplados incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, arginina-HCl, compuestos polihidroxílicos, incluidos polisacáridos tales como dextrano, almidón, hidroxietilalmidón, ciclodextrinas, N-metilpirrolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio, (Carpenter et al., *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)). En las presentes formulaciones, el estabilizante se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 o 1000 mM. En una realización del uso de la presente invención, se utilizan manitol y trehalosa como agentes estabilizantes.

40 Si se desea, las formulaciones también incluyen cantidades apropiadas de agentes de carga y reguladores de osmolalidad. Los agentes de carga incluyen, por ejemplo y sin limitación, manitol, glicina, sacarosa, polímeros tales como dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En una realización, el agente de carga es manitol. El agente de carga se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 o 1000 mM.

e. Tensioactivos farmacéuticos

50 Las proteínas tienen una alta propensión a interactuar con superficies, lo que las hace susceptibles a la adsorción y desnaturalización en interfases aire-líquido, vial-líquido y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta ruta de degradación depende inversamente de la concentración de proteínas y da como resultado la formación de agregados de proteínas solubles e insolubles o la pérdida de proteínas de la solución a través de la adsorción a las superficies. Además de la adsorción en la superficie del envase, la degradación inducida por la superficie es agravada por la agitación física, como la que se experimentaría durante el envío y la manipulación del producto.

55 Los tensioactivos se utilizan comúnmente en formulaciones de proteínas para prevenir la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas anfipáticas con la capacidad de competir con las proteínas por posiciones interfaciales. Las partes hidrófobas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones interfaciales (p. ej., aire/líquido), mientras que las partes hidrófilas de las moléculas permanecen orientadas hacia el disolvente en masa. En concentraciones suficientes (normalmente aproximadamente a la concentración micelar crítica del detergente), una capa superficial de moléculas de tensioactivo sirve para evitar que las moléculas de proteína se adsorban en la interfase. De esta manera, se minimiza la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos contemplados en el presente documento incluyen, sin limitación, ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietoxilados, p. ej., polisorbato 20 y polisorbato 80. Ambos difieren únicamente en la longitud de la cadena alifática que imparte carácter hidrófobo a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. Por consiguiente, el polisorbato-80 es más tensioactivo y tiene una concentración micelar

crítica más baja que el polisorbato-20.

Los detergentes también pueden afectar a la estabilidad conformacional termodinámica de las proteínas. También aquí, los efectos de un excipiente detergente determinado serán específicos de la proteína. Por ejemplo, se ha mostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de proteínas por detergentes se puede racionalizar en términos de las colas hidrófobas de las moléculas de detergente que pueden participar en una unión específica con estados de la proteína parcial o totalmente desplegados. Este tipo de interacciones podrían producir un cambio en el equilibrio conformacional hacia estados de la proteína más expandidos (p. ej., aumentando la exposición de las partes hidrófobas de la molécula de proteína complementario a la unión del polisorbato). Alternativamente, si el estado nativo de la proteína presenta algunas superficies hidrófobas, la unión del detergente al estado nativo puede estabilizar esa conformación.

Otro aspecto de los polisorbatos es que son inherentemente susceptibles a la degradación oxidativa. A menudo, como materias primas, contienen cantidades suficientes de peróxidos para producir la oxidación de las cadenas laterales de los restos de las proteínas, especialmente la metionina. El potencial de daño oxidativo que surge de la adición de estabilizantes enfatiza el punto de que se deben utilizar las concentraciones efectivas más bajas de excipientes en las formulaciones. Para los tensioactivos, la concentración efectiva para una proteína determinada dependerá del mecanismo de estabilización.

También se añaden tensioactivos en cantidades apropiadas para evitar el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante la congelación y secado (Chang, B, *J. Pharm. Sci.* 85:1325, (1996)). Por lo tanto, los tensioactivos de ejemplo incluyen, sin limitación, tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, de ion híbrido y anfóteros, incluidos los tensioactivos derivados de aminoácidos naturales. Los tensioactivos aniónicos incluyen, pero no se limitan a, lauril-sulfato de sodio, dioctil-sulfosuccinato de sodio y dioctil-sulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil-sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, hidrato de colato de sodio, desoxicolato de sodio y sal sódica del ácido glicodesoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidrato y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos de ion híbrido incluyen, pero no se limitan a, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 y SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero no se limitan a, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 y TWEEN-80. Los tensioactivos también incluyen, pero no se limitan a, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado polioxi-etileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja y otros fosfolípidos tales como dioleilfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y (dioleilfosfatidilglicerol) DOPG; éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Por lo tanto, se proporcionan además composiciones que comprenden estos tensioactivos, ya sea individualmente o como una mezcla en diferentes relaciones. En una realización del uso de la presente invención, el tensioactivo es TWEEN-80. En las presentes formulaciones, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 g/l. En las formulaciones proporcionadas, la concentración de tensioactivo es de 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 g/l.

f. Sales farmacéuticas

A menudo se añaden sales para aumentar la fuerza iónica de la formulación, lo que puede ser importante para la solubilidad de las proteínas, la estabilidad física y la isotonicidad. Las sales pueden afectar a la estabilidad física de las proteínas de diversas maneras. Los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas uniéndose a los restos cargados en la superficie de la proteína. Alternativamente, las sales pueden estabilizar el estado desnaturalizado uniéndose a grupos peptídicos a lo largo de la cadena principal de la proteína (-CONH-). Las sales también pueden estabilizar la conformación nativa de la proteína al proteger las interacciones electrostáticas repulsivas entre restos dentro de una molécula de proteína. Las sales en las formulaciones de proteínas también pueden proteger las interacciones electrostáticas atractivas entre las moléculas de proteínas que pueden conducir a la agregación e insolubilidad de las proteínas. En las formulaciones proporcionadas, la concentración de sal está entre 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 y 500 mM.

g. Otros componentes excipientes comunes: aminoácidos farmacéuticos

Los aminoácidos han encontrado un uso versátil en formulaciones de proteínas como tampones, agentes de carga, estabilizantes y antioxidantes. Por lo tanto, en un aspecto, se emplean histidina y ácido glutámico para el tamponamiento de formulaciones de proteínas en el intervalo de pH de 5,5 - 6,5 y 4,0 - 5,5 respectivamente. El grupo imidazol de la histidina tiene un pKa = 6,0 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico tiene un pKa de 4,3, lo que hace que estos aminoácidos sean adecuados para el tamponamiento en sus respectivos intervalos de pH. El ácido glutámico es especialmente útil en dichos casos. La histidina se encuentra comúnmente en las formulaciones de proteínas comercializadas y este aminoácido proporciona una alternativa al citrato, un tampón que se sabe que produce picazón tras inyección. Curiosamente, también se

ha informado que la histidina tiene un efecto estabilizante con respecto a la agregación cuando se usa en altas concentraciones tanto en presentaciones líquidas como liofilizadas (Chen B, et al., *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)). Otros también observaron que la histidina reduce la viscosidad de una formulación con alta concentración de proteínas. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron un aumento de la agregación y la decoloración en las formulaciones que contenían histidina durante los estudios de congelación-descongelación del anticuerpo en recipientes de acero inoxidable. Otra nota de precaución con la histidina es que sufre fotooxidación en presencia de iones metálicos (Tomita M, et al., *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). El uso de metionina como un antioxidante en formulaciones parece prometedor; se ha observado que es eficaz contra una serie de estreses oxidativos (Lam XM, et al., *J Pharm Sci*, 86(11): 1250-5 (1997)).

En varios aspectos, se proporcionan formulaciones que incluyen uno o más de los aminoácidos glicina, prolina, serina, arginina y alanina y se ha mostrado que estabilizan las proteínas por el mecanismo de exclusión preferencial. La glicina también es un agente de carga comúnmente utilizado en formulaciones liofilizadas. Se ha mostrado que la arginina es un agente eficaz para inhibir la agregación y se ha utilizado en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas.

En las formulaciones proporcionadas, la concentración de aminoácido está entre 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 y 500 mM. En una realización del uso de la presente invención, el aminoácido es glicina.

h. Otros componentes excipientes comunes: antioxidantes farmacéuticos

La oxidación de restos de las proteínas procede de varias fuentes diferentes. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la prevención del daño oxidativo a las proteínas implica el control cuidadoso de una serie de factores durante todo el procedimiento de fabricación y el almacenamiento del producto, tales como el oxígeno atmosférico, temperatura, exposición a la luz y contaminación química. Por lo tanto, la invención contempla el uso de antioxidantes farmacéuticos que incluyen, sin limitación, agentes reductores, depuradores de oxígeno/radicales libres o agentes quelantes. Los antioxidantes en las formulaciones de proteínas terapéuticas son, en un aspecto, solubles en agua y permanecen activos durante toda la vida útil del producto. Los agentes reductores y depuradores de oxígeno/radicales libres funcionan eliminando las especies de oxígeno activo en solución. Los agentes quelantes como el EDTA son eficaces al unirse a los contaminantes metálicos residuales que promueven la formación de radicales libres. Por ejemplo, se utilizó EDTA en la formulación líquida del factor de crecimiento de fibroblastos ácido para inhibir la oxidación catalizada por iones metálicos de los restos cisteína.

Además de la eficacia de varios excipientes para prevenir la oxidación de proteínas, es preocupante el potencial de los propios antioxidantes para inducir otros cambios covalentes o físicos en la proteína. Por ejemplo, los agentes reductores pueden producir la rotura de enlaces disulfuro intramoleculares, lo que puede conducir al cambio de sitio de disulfuros. Se ha mostrado que, en presencia de iones de metales de transición, el ácido ascórbico y el EDTA promueven la oxidación de metionina en una serie de proteínas y péptidos (Akers MJ y Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral Solutions*. En: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editores. Pharmaceutical Science. Taylor y Francis, Reino Unido (1999)); Fransson JR, *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, et al., *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha informado que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de metionina inducida por luz y temperatura en rhuMab HER2; sin embargo, en este estudio también se informó de la formación de un aducto de tiosulfato-proteína (Lam XM, Yang JY, et al., *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997)). La selección de un antioxidante apropiado se hace según los estreses y sensibilidades específicos de la proteína. Los antioxidantes contemplados en ciertos aspectos incluyen, sin limitación, agentes reductores y depuradores de oxígeno/radicales libres, EDTA y tiosulfato de sodio.

i. Otros componentes excipientes comunes: iones de metales farmacéuticos

En general, los iones de metales de transición no son deseados en las formulaciones de proteínas porque pueden catalizar reacciones de degradación física y química en las proteínas. Sin embargo, se incluyen iones de metales específicos en las formulaciones cuando son cofactores de proteínas y en formulaciones de proteínas en suspensión donde forman complejos de coordinación (p. ej., suspensión de zinc de insulina). Recientemente, se ha propuesto el uso de iones de magnesio (10 - 120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico a ácido isoaspártico (WO 2004039337).

Dos ejemplos donde los iones de metales confieren estabilidad o mayor actividad en las proteínas son la desoxirribonucleasa humana (rhDNasa, Pulmozyme®) y el factor VIII. En el caso de la rhDNasa, los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima a través de un sitio de unión específico (Chen B, et al., *J Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)). De hecho, la eliminación de iones de calcio de la solución con EGTA producía un aumento de la desamidación y la agregación. Sin embargo, este efecto se observó sólo con iones Ca^{+2} ; se observó que otros cationes divalentes Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} desestabilizaban la rhDNasa. Se observaron efectos similares en el factor VIII. Los iones Ca^{+2} y Sr^{+2} estabilizaban la proteína mientras que otros como Mg^{+2} ,

Mn⁺² y Zn⁺², Cu⁺² y Fe⁺² desestabilizaban la enzima (Fatouros, A., et al., *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997). En un estudio separado con el factor VIII, se observó un aumento significativo en la tasa de agregación en presencia de iones Al⁺³ (Derrick TS, et al., *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004)). Los autores señalan que otros excipientes, como las sales tampón, a menudo están contaminados con iones Al⁺³ e ilustran la necesidad de utilizar excipientes de calidad adecuada en productos formulados.

j. Otros componentes excipientes comunes: conservantes farmacéuticos

Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de multiuso que implican más de una extracción del mismo envase. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante toda la vida útil o el período de uso del medicamento. Los conservantes comúnmente utilizados incluyen, sin limitación, alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Si bien los conservantes tienen una larga historia de uso, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante que limita su uso en formulaciones de proteínas multidosis (Roy S, et al., *J Pharm Sci*, 94(2): 382-96 (2005)).

Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos de proteínas se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones multidosis, tienen la ventaja adicional de permitir la conveniencia del paciente y mayor comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona de crecimiento humana (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones en forma de pluma de inyección de usos múltiples más convenientes. Actualmente se encuentran disponibles en el mercado al menos cuatro de dichos dispositivos de pluma que contienen formulaciones conservadas de hGH. Norditropin® (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquido, Genentech) y Genotropin (liofilizado - cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatrop® (Eli Lilly) está formulado con m-cresol.

Se deben considerar varios aspectos durante el desarrollo de la formulación de formas farmacéuticas conservadas. Se debe optimizar la concentración efectiva de conservante en el medicamento. Esto requiere ensayar un conservante determinado en la forma farmacéutica con intervalos de concentración que confieran eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, se evaluaron con éxito tres conservantes en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina-1 (tipo I), utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los conservantes se clasificaron según su impacto en la estabilidad en concentraciones comúnmente utilizadas en productos comercializados (Remmele RL Jr., et al., *Pharm Res.*, 15(2): 200-8 (1998)).

El desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más desafiante que el de las formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados se pueden liofilizar sin el conservante y reconstituir con un diluyente que contenga conservante en el momento de su uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y estabilidad del conservante deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (18 - 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

Algunos conservantes pueden producir reacciones en el sitio de inyección, lo cual es otro factor que hay que considerar cuando se elige un conservante. En ensayos clínicos que se centraron en la evaluación de conservantes y tampones en Norditropin, se observó que la percepción del dolor era menor en las formulaciones que contenían fenol y alcohol bencílico en comparación con una formulación que contenía m-cresol (Kappelgaard A.M., *Horm Res.* 62 Suppl 3:98-103 (2004)). Es interesante que, entre los conservantes comúnmente utilizados, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC y Sun DA., *Anesth Analg.*, 100(3): 683-6 (2005)). En varios aspectos, el uso de conservantes proporciona un beneficio que supera cualquier efecto secundario.

k. Métodos de preparación de formulaciones farmacéuticas

La presente memoria descriptiva contempla además métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas, aunque éstos no son parte de la invención.

Los presentes métodos comprenden además una o más de las siguientes etapas: añadir un agente estabilizante como se describe en el presente documento a dicha mezcla antes de liofilizar, añadir al menos un agente seleccionado de un agente de carga, un agente regulador de la osmolalidad y un tensioactivo, cada uno de los cuales como se describe en el presente documento, a dicha mezcla antes de liofilizar.

La práctica de reconstitución convencional para el material liofilizado es volver a añadir un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (típicamente equivalente al volumen retirado durante la liofilización),

aunque a veces se usan soluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para administración parenteral (Chen, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 18:1311-1354 (1992)). Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de rVWF reconstituidas que comprenden la etapa de añadir un diluyente a una composición de rVWF liofilizada para el uso de la invención.

El material liofilizado puede reconstituirse como una solución acuosa. Una variedad de vehículos acuosos, p. ej., agua estéril para inyección, agua con conservantes para uso en dosis múltiples o agua con cantidades apropiadas de tensioactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En varios aspectos, dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo y sin limitación, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes son un fosfátido de origen natural, por ejemplo y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileño con ácidos grasos, por ejemplo y sin limitación, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo y sin limitación, heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de sorbitol polioxietilénico, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo y sin limitación, monooleato de sorbitán polietilénico. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más conservantes, por ejemplo y sin limitación, p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo.

I. Formulación de rVWF de ejemplo para administración

En algunas realizaciones, los métodos presentes proporcionan una formulación mejorada que permite un producto final con alta potencia (alta concentración de rVWF y estabilidad mejorada a largo plazo) con el fin de reducir el volumen para el tratamiento (100 UI/ml a 10.000 UI/ml). En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 100 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 500 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 1000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 2000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 3000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 4000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 5000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 6000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 7000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 8000 UI/ml a 10.000 UI/ml. En algunas realizaciones, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de aproximadamente 9000 UI/ml a 10.000 UI/ml.

En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende uno o más compuestos de ion híbrido, incluidos, por ejemplo, aminoácidos como histidina, glicina, arginina. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende un componente con característica anfipática que tiene un mínimo de un grupo hidrófobo y uno hidrófilo, incluyendo por ejemplo polisorbato 80, octilpiranósido, dipéptidos y/o péptidos anfipáticos. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende un azúcar no reductor o alcohol de azúcar o disacáridos, incluidos, por ejemplo, sorbitol, manitol, sacarosa o trehalosa. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende una sal soluble en agua no tóxica, que incluye, por ejemplo, cloruro de sodio, que da como resultado una osmolaridad fisiológica. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende un pH en un intervalo de 6,0 a 8,0. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende un pH de aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,5, aproximadamente 7, aproximadamente 7,5 o aproximadamente 8,0. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende uno o más cationes bivalentes que estabilizan el rVWF, incluyendo, por ejemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y/o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la formulación para administración comprende glicina de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, histidina de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, cloruro de sodio de aproximadamente cero a aproximadamente 300 mM (p. ej., menos de 300 mM de sodio), polisorbato 20 (o polisorbato 80) de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,05% y sacarosa de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20% (p/p) con un pH de aproximadamente 7,0 y que tiene una osmolaridad fisiológica en el momento de la administración.

En algunas realizaciones, la formulación para administración se puede liofilizar. En algunas realizaciones, la formulación para administración es estable y puede almacenarse en estado líquido a de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C, así como de aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C. En algunas

realizaciones, la formulación para administración es estable y puede almacenarse en estado líquido a de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8°C. En algunas realizaciones, la formulación para administración es estable y puede almacenarse en estado líquido a de aproximadamente 18°C a aproximadamente 25°C.

5 m. Administración/dosificación

Para administrar composiciones a seres humanos o animales de ensayo, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente" aceptable se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tales como productos de agregación y escisión, y además no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran utilizando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluyen todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares clínicamente útiles, incluidos los agentes descritos anteriormente.

Las formulaciones farmacéuticas se administran por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante pulverización por inhalación, vía vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, inyección intravenosa, intramuscular, intracisternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por vía intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, y/o intrapulmonar en un sitio particular. Generalmente, las composiciones están esencialmente exentas de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser dañinas para el receptor.

Según el uso de la presente invención, el rVWF se administra en ausencia del Factor VIII (FVIII). En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

En algunas realizaciones, el rVWF se administra antes del procedimiento quirúrgico, como se comenta en el presente documento. En algunas realizaciones, el rVWF se administra al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

En algunas realizaciones, se administran 35-60 UI/kg de rVWF al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, se administran 50-60 UI/kg de rVWF al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, se administran 20-40 UI/kg de rVWF al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas o al menos 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 50-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, se administran 50-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 55-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 50-55 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 50 UI/kg, aproximadamente 52 UI/kg, aproximadamente 54 UI/kg, aproximadamente 56 UI/kg, aproximadamente 58 UI/kg o aproximadamente 60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 35-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 35-55 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 30-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y el procedimiento quirúrgico es un

oral. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

[illegible][illegible]

quirúrgico menor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 130 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 140 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 150 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis de rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis de rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

[illegible]

En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 20-50 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 25-50 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 30-50 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 25-40 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 30-40 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 40-50 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 45-50 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 20 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 25 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 30 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 35 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, se administran aproximadamente 40 UI/kg de rVWF después del procedimiento quirúrgico cuando el

[illegible][illegible]

procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

En algunas realizaciones, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales de rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, la dosificación es una dosificación como la indicada anteriormente. En algunas realizaciones, no se administra FVIII. En algunas realizaciones, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis de rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis de rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis. En algunas realizaciones, la dosificación es una dosificación como la indicada anteriormente. En algunas realizaciones, no se administra FVIII. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral y el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales de rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas realizaciones, la dosificación es una dosificación como la indicada anteriormente. En algunas realizaciones, no se administra FVIII.

Generalmente, la VWD tipo 1 se indica por la relación VWF:RCo <30 UI/dl, VWF:Ag <30 UI/dl, FVIII bajo o normal y VWF:RCo/VWF:Ag >0,5-0,7 UI/dl. La VWD tipo 2A se indica por la relación VWF:RCo <30 UI/dl, VWF:Ag <30-200 UI/dl, FVIII bajo o normal y VWF:RCo/VWF:Ag <0,5-0,7 UI/dl. La VWD tipo 2B se indica por la relación VWF:RCo <30-200 UI/dl, VWF:Ag <30 UI/dl, FVIII bajo o normal y VWF:RCo/VWF:Ag <0,5-0,7 UI/dl. La VWD tipo 2M se indica por la relación VWF:RCo <30 UI/dl, VWF:Ag <30-200 UI/dl, FVIII bajo o normal y VWF:RCo/VWF:Ag <0,5-0,7 UI/dl. La VWD tipo 2N se indica por la relación VWF:RCo 30-2000 UI/dl, VWF:Ag 30-200 UI/dl, FVIII muy bajo y VWF:RCo/VWF:Ag >0,5-0,7 UI/dl. La VWD tipo 3 se indica por la relación VWF:RCo <3 UI/dl, VWF:Ag <3 UI/dl, FVIII extremadamente bajo (<10 UI/dl) y la VWF:RCo/VWF:Ag no es aplicable. Lo normal se indica con la relación VWF:RCo 50-200 UI/dl, VWF:Ag 50-200 UI/dl, FVIII normal y VWF:RCo/VWF:Ag >0,5-0,7 UI/dl. En determinadas realizaciones, el sujeto tiene VWD tipo 3. En algunas realizaciones, el sujeto tiene VWD tipo 1 grave. En algunas realizaciones, el sujeto tiene VWD tipo 2 grave.

V. Procedimientos quirúrgicos

El procedimiento quirúrgico según el uso de la presente invención puede ser un procedimiento quirúrgico mayor o un procedimiento quirúrgico menor.

Generalmente, la cirugía mayor incluye cualquier procedimiento quirúrgico invasivo en el que se realiza una resección más extensa, p. ej., se entra en una cavidad corporal, se extraen órganos o se altera la anatomía normal. Generalmente, si se abre una barrera mesenquimal (por ejemplo, cavidad pleural, peritoneo, meninges), la cirugía se considera mayor. En algunas realizaciones, una cirugía mayor es aquella en la que se espera una pérdida de sangre mayor de 500 ml, cambios significativos de fluidos y, típicamente, al menos una noche en el hospital. Los procedimientos quirúrgicos mayores de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, cirugías bariátricas/derivación gástrica, miotomía septal, pancreatometomía, reparación de disección aórtica torácica, esofagectomía, cistectomía de vejiga, revascularización coronaria, cirugía de osteomielitis espinal, restauración ventricular quirúrgica, craneotomía, cirugía laparoscópica (excepto colecistectomía y ligadura de trompas), resección abierta de órganos, reemplazos de articulaciones grandes, mastectomía con reconstrucción y/o cirugía de columna, torácica, vascular y/o intracraneal. Otros ejemplos de cirugías mayores incluyen, pero no se limitan a, osteotomía maxilar o mandibular, laringectomía, resección de masas grandes benignas o malignas y/o disección de ganglios linfáticos que requieren una noche de hospitalización (con o sin cirugía reconstructiva), mastectomía con reconstrucción tisular inmediata (con o sin biopsia de ganglios linfáticos o disección axilar), reparación o resección laparoscópica o abierta (de, por ejemplo, estómago, intestino delgado, colon, hígado, páncreas, bazo, glándulas suprarrenales o hígado), colecistectomía abierta, reparaciones de hernias ventrales, epigástricas o incisionales grandes, resección o ablación histeroscópica, histerectomía y/o cirugía anexial, laparoscopia para endometriosis extensa, cirugía del suelo pélvico abdominal o transvaginal, cirugía intracraneal, laminectomía y/o fusión espinal, reemplazo de rodilla, reemplazo de cadera, reemplazo de hombro, reemplazo de articulación del codo, extracción o revisión de material de implante por infección o fallo, amputación, laminectomía y/o fusión espinal, reconstrucción con colgajo libre (cirugía plástica), paniclectomía, mediastinoscopia, resección pulmonar, resección de esófago, resección de masa mediastínica (toracoscópica o abierta), reparación de hernia hiatal (toracoscópica o abierta), resección de tumor de vejiga (transuretral o abierta), tumor de próstata (transuretral o abierta), resección de riñón (laparoscópica o abierta), resección ureteral (laparoscópica o abierta), resección de testículo (transescrotal o abdominal), amputación, cirugía de derivación arterial periférica, reparación de aneurisma aórtico (endovascular o abierta) y/o endarterectomía carotídea.

La cirugía menor es cualquier procedimiento quirúrgico invasivo en el que solo se reseca la piel o las membranas mucosas y tejido conectivo, p. ej., un corte vascular para la colocación de catéter o implantación de bombas en el tejido subcutáneo. Un procedimiento quirúrgico menor generalmente incluye cualquier procedimiento que pueda realizarse de forma segura en un entorno ambulatorio, sin el uso de anestesia general ni la necesidad de asistencia respiratoria. En algunas realizaciones, una cirugía menor es aquella en la que

hay una pérdida de sangre esperada de menos de 500 ml, cambios mínimos de líquidos y generalmente se realiza de forma ambulatoria (cirugía de día/alta el mismo día). Dichos procedimientos quirúrgicos ambulatorios pueden incluir, pero no se limitan a, cirugía de cataratas, cirugía de mama sin reconstrucción, colecistectomía laparoscópica y ligadura de trompas, y la mayoría de los procedimientos cutáneos, superficiales, endoscópicos y artroscópicos. Otros ejemplos de cirugías menores incluyen, pero no se limitan a, extracción de dientes, amigdalectomía, adenoidectomía, septoplastia, turbinectomía, rinoplastia, biopsia faríngea, biopsia laríngea, escisión menor por láser u otros medios, cirugía del oído medio, mastoidectomía, implantación coclear, cirugía endoscópica de los senos nasales, pequeñas resecciones de masas benignas y malignas (realizadas de forma ambulatoria; es decir, torus mandibulares, quistes de la hendidura braquial, cáncer de lengua pequeño), tiroidectomía, tumorectomía mamaria (con o sin biopsia de ganglios linfáticos o disección axilar), mastectomía (con o sin biopsia de ganglios linfáticos o disección axilar), reparación de hernia inguinal (abordaje laparoscópico o abierto), reparación de hernia umbilical (abordaje laparoscópico o abierto), colecistectomía laparoscópica, hemorroidectomía, dilatación, legrado, histeroscopia diagnóstica, laparoscopia, ablación endometrial con balón térmico, ligadura de trompas, laparoscopia - endometriosis limitada, inserción de cinta transvaginal, discectomía, extracción de cataratas, la mayoría de los procedimientos oftalmológicos, cirugía artroscópica (incluyendo reparación del ACL), extracción de material de implante de rutina (no por infección), cirugía de tendones, bunionectomía, discectomía, liberación del túnel carpiano, liberación de la contractura de Dupuytren, cirugía mayor de tendones, cirugía menor de tendones, pequeños colgajos rotacionales e injertos de piel, resección de carcinoma de células basales, escisión de lipoma, mamoplastia de reducción y otra cirugía para enfermedad mamaria benigna, cirugía mamaria cosmética, broncoscopia, cistoscopia, ureteroscopia, renoscopia para cálculos, renoscopia para estenosis, renoscopia para biopsia, escisión de hidrocele, escisión de varicocele, vasectomía, circuncisión y/o escisión de vena varicosa.

Los procedimientos quirúrgicos orales incluyen, pero no se limitan a, varios procedimientos dentales y cirugías orales, incluyendo, por ejemplo, extracciones de dientes.

En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas realizaciones, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.

Ejemplos

Ejemplo 1: Eficacia hemostática y seguridad de rVWF

Este estudio evaluaba la eficacia hemostática y la seguridad de rVWF con o sin ADVATE (factor antihemofílico [recombinante]), Baxalta US Inc., Westlake Village, CA (rFVIII) en pacientes con VWD grave que se sometían a cirugía electiva.

Métodos

Estudio de fase 3, abierto, no controlado, no aleatorizado en 14 sitios en 10 países (NCT02283268) en pacientes ≥ 18 años de edad que tenían VWD grave y estaban programados para someterse a una cirugía electiva. Los pacientes se vigilaron durante 14 días después de la cirugía.

Tratamiento

12-24 h antes de la cirugía, se administró rVWF 40-60 UI/kg rVWF:RCo por vía intravenosa para permitir que los niveles endógenos de FVIII:C aumentaran a ≥ 30 UI/dl (cirugía menor/oral) o ≥ 60 UI/dl (cirugía mayor). Los niveles de FVIII:C se evaluaron en el espacio de 3 h del inicio de la cirugía. Si se alcanzaban los niveles objetivo de FVIII:C, se administró rVWF solo 1 h antes de la cirugía para alcanzar los niveles máximos descritos en la Tabla 2. La dosificación intraoperatoria y posoperatoria se individualizó para mantener los niveles mínimos objetivo según los resultados farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD), así como la intensidad y duración del desafío hemostático.

Tabla 2. Niveles objetivo de VWF:RCo y FVIII:C: recomendaciones para la prevención del sangrado excesivo durante y después de la cirugía

Tipo de cirugía	Nivel plasmático máximo objetivo de VWF:RCo (UI/dl)	Nivel plasmático máximo objetivo de FVIII:C* (UI/dl)	Cálculo de la dosis de rVWF (UI de VWF:RCo requeridas)†
Menor/Oral	50-60	40-50	$\Delta\text{VWF:RCo} \times \text{BW (kg)}/\text{IR}\ddagger$
Mayor	100	80-100	$\Delta\text{VWF:RCo} \times \text{BW (kg)}/\text{IR}\ddagger$

BW=peso corporal; FVIII:C=actividad del factor VIII; IR=recuperación incremental;

rVWF=factor de von Willebrand recombinante; VWF:RCo=actividad del cofactor de ristocetina del factor de von Willebrand.

*Puede requerirse rFVIII adicional para alcanzar los niveles plasmáticos máximos objetivo de FVIII:C recomendados.

†Se administra en el espacio de 1 h antes de la cirugía.

‡Si no se dispone de IR, suponer una IR de 2,0 UI/dl por UI/kg.

$\Delta\text{VWF:RCo} = \text{VWF:RCo plasmático máximo objetivo} - \text{VWF:RCo plasmático inicial}$.

Evaluación

- 5 La eficacia hemostática general (resultado principal) fue evaluada por el investigador 24 horas después de la última infusión perioperatoria o al finalizar el estudio, lo que ocurriera primero (Tabla 3). El cirujano evaluó la eficacia hemostática intraoperatoria (Tabla 3), junto con la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a la prevista. Las evaluaciones de seguridad incluyeron acontecimientos adversos (AE) y anticuerpos contra rVWF, rFVIII, proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G murina (IgG) y rFurina.

- 10 Tabla 3. Escala de valoración de eficacia hemostática general* e intraoperatoria†

Valoración	Evaluación
Excelente	La hemostasia lograda con rVWF con o sin rFVIII era tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
Buena	La hemostasia lograda con rVWF con o sin rFVIII era probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
Moderada	La hemostasia con rVWF con o sin rFVIII era claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento realizado, pero se mantuvo sin necesidad de cambiar el concentrado de rVWF.
Ninguna	El paciente experimentó sangrado incontrolado que fue el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio de concentrado de rVWF.

rFVIII=factor VIII recombinante; rVWF=factor de von Willebrand recombinante.

*Evaluado por el investigador.

†Evaluado por el cirujano.

Estadística

- 15 Los análisis descriptivos incluían estimaciones puntuales e IC del 90% para el número de pacientes con eficacia hemostática valorada como "excelente/buena" utilizando una prueba de Clopper Pearson. La PK/PD y seguridad se resumieron usando estadísticos descriptivos.

Resultados

20

Pacientes

Tabla 4. Datos demográficos y características clínicas iniciales

Parámetro	N=15	
Sexo, n (%)	Hombre	7 (46,7)
	Mujer	8 (53,3)
Edad media (intervalo), años	40 (20-70)	

Parámetro	N=15	
Peso medio (intervalo), kg	73,5 (52,0-127,2)	
IMC mediano (intervalo), kg/m2	25,6 (17,1-38,0)	
Tipo de VWD, n (%)		
1	3 (20,0)	
2A	2 (13,3)	
2B	1 (6,7)	
2M	1 (6,7)	
3	8 (53,3)	
Clasificación de la cirugía, n (%)		
Mayor	10 (66,7)	
Menor	4 (26,7)	
Oral	1 (6,7)	
FVIII:C medio (DE), UI/dl		
Todos los tipos de VWD (n=11)	20,6 (23,7)	
VWD tipo 3 (n=5)	1,8 (1,1)	
VWF:RCo medio (DE), UI/dl		
Todos los tipos de VWD (n=11)	9,7 (11,0)	
VWD tipo 3 (n=5)	<8 (0,0)	
IMC=índice de masa corporal; FVIII:C=actividad del factor VIII; VWD=enfermedad de von Willebrand; VWF:RCo=actividad del cofactor de ristocetina del factor de von Willebrand.		

La eficacia hemostática general se valoró como "excelente" o "buena" para los 15 pacientes (IC del 90%: 81,9-100,0) (Figura 1).

5 Eficacia

La eficacia hemostática general se valoró como "excelente" o "buena" para los 15 pacientes (IC del 90%: 81,9-100,0) (Figura 1).

- 10 La eficacia hemostática intraoperatoria se valoró como "excelente" o "buena" para los 15 pacientes (IC del 90%: 81,9-100,0) (Figura 2). Entre los 8 pacientes con VWD tipo 3, tanto la eficacia hemostática general como la intraoperatoria se valoraron como "excelente" para 7 pacientes y "buena" para 1 paciente. La pérdida de sangre intraoperatoria real media $\pm$ DE en relación con la pérdida de sangre prevista fue de 70% $\pm$ 45% y se valoró como "excelente" para 13 pacientes y "buena" para 2 pacientes.

15 Exposición

- 20 Los pacientes recibieron un total de 104 infusiones de rVWF para prevenir o tratar el sangrado quirúrgico; la dosis quirúrgica general media de rVWF fue de 220,4 UI/kg (intervalo, 63,8-648,4 UI/kg) (Tabla 4). 93 (89,4%) infusiones de rVWF solo: 15 (12-24 h antes de la cirugía), 12 (1 h antes de la cirugía) y 66 (de forma postoperatoria). 11 (10,6%) infusiones de rVWF con rFVIII: 3 (1 h antes de la cirugía), 1 (de forma intraoperatoria) y 7 (de forma postoperatoria). 5 pacientes recibieron las 11 infusiones de rVWF con rFVIII, y 6 de las 7 infusiones postoperatorias de rVWF con rFVIII fueron en 1 paciente.

- 25 De los 10 pacientes que se sometían a cirugía mayor, 7 (70%) no requirieron coadministración de rFVIII.

Tabla 5. Exposición al rVWF mediana general y por clasificación quirúrgica

	Clasificación quirúrgica			
	Menor (n=4)	Mayor (n=10)	Oral (n=1)	General (N=15)
Número total de infusiones mediano* (intervalo)	3 (2-4)	7,5 (4-15)	5	6 (2-15)

	Clasificación quirúrgica			
	Menor (n=4)	Mayor (n=10)	Oral (n=1)	General (N=15)
Exposición mediana (intervalo), d	3 (2-4)	6,5 (4-15)	4	6 (2-15)
Dosis mediana 12-24 h antes de cirugía (intervalo), UI/kg	57,2 (55,0-59,9)	49,3 (37,4-57,6)	36,1 55,0	(36,1-59,9)
Dosis mediana 1 h antes de cirugía (intervalo), UI/kg	39,3 (8,0-46,4)	37,6 (15,7-82,7)	18,1	35,8 (8,0-82,7)
Dosis intraoperatoria mediana (intervalo), UI/kg	0	0	18,1	18,1
Dosis postoperatoria mediana (intervalo), UI/kg	79,3 (42,8-115,9)	214,8 (47,7-533,3)	36,1	189,8 (36,1-533,3)
Dosis quirúrgica total mediana (intervalo), UI/kg	119,9 (63,8-217,3)	307,6 (125,2-648,4)	108,4	220,4 (63,8-648,4)
rVWF=factor de von Willebrand recombinante.				
*Número total de infusiones de cebado preoperatorias, dosis de carga inicial preoperatoria, dosis de carga suplementarias preoperatorias, dosis intraoperatorias y dosis posoperatorias.				

Seguridad

6 pacientes informaron de 12 AE surgidos durante del tratamiento; ninguno se consideró relacionado con el tratamiento. pacientes tuvieron AE graves (diverticulitis y trombosis venosa profunda [DVP]; cada una ocurrió en 1 paciente); ninguno de los acontecimientos se consideró relacionado con el tratamiento de reemplazo de factor.

La DVP grave se produjo el día 8 después de la operación (inicialmente se informó como DVP no grave el día 4 después de la operación). El acontecimiento fue asintomático y se observó después de eco Doppler de rutina. El acontecimiento se evaluó como poco probable relacionado con rVWF y no relacionado con rFVIII o los procedimientos del estudio; causalmente asociado con la cirugía mayor del paciente (reemplazo total de cadera) y los antecedentes de obesidad en curso. Los niveles postoperatorios de FVIII:C nunca superaron 150 UI/dl. El acontecimiento produjo la colocación de un filtro cava y posteriormente se resolvió sin secuelas. Sin reacciones alérgicas graves; anticuerpos neutralizantes contra rFVIII, proteínas de CHO, IgG murina o rFurina.

Un paciente con VWD tipo 3 que recibió una transfusión intraoperatoria de glóbulos rojos empaquetados durante una cirugía mayor de reemplazo total de rodilla dio positivo para anticuerpos de unión a VWF el día 7 posoperatorio.

Los parámetros PK para VWF:RCo para los pacientes que se sometieron a análisis PK (n = 11) se muestran en la FIG. 4. Las concentraciones medias de VWF:RCo, VWF:Ag y actividad de unión al colágeno de VWF (VWF:CB) alcanzaron niveles máximos a los 30 min y disminuyeron gradualmente a lo largo de un período de 72 h después de la infusión (FIG. 4).

La administración de rVWF solo dio como resultado la estabilización rápida y sustancial de los niveles endógenos de FVIII:C 6-12 h después de infusión, con niveles máximos de FVIII:C alcanzados a las 24 h entre todos los pacientes evaluados (n = 11; FIG. 5A), así como en el subconjunto de pacientes con VWD tipo 3 (n = 5; FIG. 5B). En general, los pacientes alcanzaron FVIII:C medio >60 UI/dl a las 6 h posteriores a la infusión (FIG. 5A), y los pacientes con FVIII:C inicial más alto (p. ej., con VWD tipo 1 o tipo 2) pudieron alcanzar los niveles objetivo más rápidamente. A pesar de tener niveles medios de FVIII:C <2 UI/dl al inicio, la administración de rVWF solo permitió a los pacientes con VWD tipo 3 alcanzar los niveles objetivo de VWF:RCo y FVIII:C rápidamente, con FVIII:C >60 UI/dl alcanzado a las 12 h posteriores a la infusión (FIG. 5B).

Conclusiones

En este estudio quirúrgico, la eficacia hemostática general e intraoperatoria se valoró como "excelente" o "buena" para los 15 pacientes. Para cirugías mayores, la eficacia hemostática general fue "excelente" en 7 pacientes y "buena" en 3 pacientes, y la eficacia intraoperatoria fue "excelente" en 8 pacientes y "buena" en 2 pacientes. Casi el 90% de las infusiones para lograr la hemostasia intraoperatoria y posoperatoria fueron solo

con rVWF; el 70% de las cirugías mayores se manejaron solo con rVWF. El rVWF se dirige a la disfunción primaria de la VWD y permite a los médicos centrarse en lograr una eficacia óptima sin preocuparse por la acumulación de FVIII. Estos datos respaldan el uso seguro y eficaz de rVWF en cirugías mayores y menores.

- 5 Ejemplo 2: Factor de von Willebrand recombinante en sujetos con enfermedad de von Willebrand grave que se someten a cirugía

Este ejemplo proporciona los resultados del estudio de un estudio que examinaba el tratamiento de sujetos con enfermedad de von Willebrand (VWD) grave que se sometían a cirugía.

10

Criterios de valoración:

Criterios principales de valoración:

- 15 Eficacia hemostática general según la evaluación del investigador (médico especialista en hemofilia) [Marco de tiempo: 24 horas después de la última infusión perioperatoria o en la visita de finalización del día 14 ($\pm$ 2 días), lo que ocurra primero]. La eficacia hemostática se valoró en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna.

- 20 • Excelente: La hemostasia intra y posoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.

- 25 • Buena: La hemostasia intra y posoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.

- 30 • Moderada: La hemostasia intra y posoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento realizado, pero se mantuvo sin necesidad de cambiar el concentrado de rVWF.

- Ninguna: El participante experimentó sangrado incontrolado que era el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio de concentrado de rVWF.

- 35 Criterios secundarios de valoración:

- 40 n.º 1: Pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista según la evaluación del cirujano que opera [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]. La pérdida de sangre prevista fue estimada preoperatoriamente por el cirujano que operaba basándose en un individuo hemostáticamente normal del mismo sexo, edad, estatura y comorbilidades que el participante. Se evaluó la pérdida de sangre real que consistía en la pérdida de sangre estimada, que incluía hisopos, toallas y succión durante el procedimiento, según el registro del anestesiólogo.

- 45 n.º 2: Pérdida de sangre intraoperatoria real respecto a la pérdida de sangre prevista [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]. La pérdida de sangre real respecto a la pérdida de sangre prevista se calculó como [Pérdida de sangre real (ml)] dividida por [Pérdida de sangre prevista (ml) multiplicada por 100].

n.º 3: Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a la prevista según la evaluación del cirujano que opera [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)].

- 50 • La eficacia hemostática se valoró en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna.

- Excelente: La pérdida de sangre intraoperatoria era menor o igual a la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($\leq$ 100%).

- 55 • Buena: La pérdida de sangre intraoperatoria era hasta un 50% mayor que la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal (101-150%). Moderada: La pérdida de sangre intraoperatoria era más de 50% de la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($>$ 150%).

- 60 • Ninguna: Hemorragia no controlada que era el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio del régimen de reemplazo del factor de coagulación.

n.º 4: Puntuación de eficacia hemostática intraoperatoria según la evaluación del cirujano que opera [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

65

- La eficacia hemostática se valoró en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna.
 - Excelente: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
 - Buena: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
 - Moderada: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento realizado, pero se mantuvo sin necesidad de cambiar el concentrado de rVWF.
 - Ninguna: El participante experimentó sangrado incontrolado que era el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio de concentrado de rVWF.
- n.º 5: Dosis diaria intra y posoperatoria ajustada por peso de rVWF con o sin ADVATE [Marco de tiempo: diariamente, desde el día de la cirugía hasta el día 14 posoperatorio (± 2 días)]
- n.º 6: Aparición de acontecimientos adversos [Marco de tiempo: desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Se evaluaron los acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE) y los acontecimientos adversos graves surgidos durante el tratamiento (TESAE).
- n.º 7: Aparición de acontecimientos trombóticos [Marco de tiempo: desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Se evaluaron los acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE) y los acontecimientos adversos graves surgidos durante el tratamiento (TESAE).
- n.º 8: Aparición de reacciones alérgicas graves (p. ej., anafilaxis) [Marco de tiempo: desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Se evaluaron los acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE) y los acontecimientos adversos graves surgidos durante el tratamiento (TESAE) para las reacciones alérgicas graves.
- n.º 9: Número de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total contra el factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores contra el factor VIII (FVIII) [Marco de tiempo: los ensayos se realizaron durante todo el estudio en la selección, antes de la infusión PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 posoperatorio y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Los participantes se trataron con factor van Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.
- n.º 10: Número de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina) [Marco de tiempo: los ensayos se realizaron durante todo el estudio en la selección, antes de la infusión PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 posoperatorio y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Los participantes se trataron con factor de van Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.
- n.º 11: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo de 0 a 72 horas después de infusión (AUC 0-72 h/dosis) [Marco de tiempo: las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo era necesaria para los sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El área bajo la curva de concentración plasmática/tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión se calculó utilizando la regla trapezoidal lineal. Para el cálculo del AUC(0-72 h), los niveles a las 72 horas se interpolaron/extrapolaron linealmente desde los 2 puntos de tiempo de muestreo más cercanos. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación del FVIII (FVIII :C)
- n.º 12: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo 0 a infinito (AUC 0- ∞ /dosis) [Marco de tiempo: las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo era necesaria para los sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El área bajo la curva de concentración plasmática/tiempo desde el tiempo 0 a

infinito y el área bajo la curva del primer momento desde el tiempo 0 a infinito se calculó como la suma del AUC o AUMC desde el tiempo 0 hasta el tiempo de la última concentración cuantificable más una corrección del área de cola calculada como C_t/λ_z y $C_t/\lambda_z(t+1/\lambda_z)$, respectivamente, donde C_t era la última concentración cuantificable, t era el tiempo de la última concentración cuantificable y λ_z era la constante de velocidad terminal o de disposición. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación del FVIII (FVIII :C)

10 n.º 13: Farmacocinética: Tiempo medio de permanencia (MRT) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo era necesaria para los sujetos que se sometían a una cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El tiempo de permanencia
15 medio se calculó como el área bajo la curva del primer momento desde el tiempo 0 a infinito dividida por el área bajo la curva del tiempo 0 a infinito menos $T/2$, donde T era la duración de la infusión. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

20 n.º 14: Farmacocinética: Aclaramiento (CL) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo era necesaria para los sujetos que se sometían a una cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El aclaramiento se calculó como la dosis (UI/kg) dividida
25 por el área bajo la curva de tiempo de 0 a infinito. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

30 n.º 15: Farmacocinética: Recuperación incremental (IR) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo era necesaria para los sujetos que se sometían a una cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis
35 de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. La recuperación incremental se calculó como $(C_{\max} \text{ menos } C_{\text{preinfusión}})$ dividido por la dosis (UI/kg), donde kg se refiere al peso corporal en el momento de la dosificación y $C_{\max}$ era la concentración máxima observada antes de la corrección de los valores previos a la infusión. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

40 n.º 16: Farmacocinética: Semivida de fase de eliminación ($T_{1/2}$) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo era
45 necesaria para los sujetos que se sometían a una cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. La semivida terminal o de disposición ($T_{1/2}$) se calculó como $\ln 2/\lambda_z$, donde λ_z era la constante de velocidad de eliminación terminal calculada en WinNonlin NCA utilizando al menos tres concentraciones cuantificables. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante
50 el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

n.º 17: Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (V_{ss}) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta
55 evaluación solo es necesaria para los sujetos que se someten a una cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 ± 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El V_{ss} se calculó como el aclaramiento multiplicado por el tiempo de permanencia medio. Se realizó un análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el
60 ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

Criterios de elegibilidad:

65 Edades elegibles para el estudio: 18 años y mayores; Sexos elegibles para el estudio: Todos

Criterios de inclusión:

Diagnóstico de enfermedad de von Willebrand (VWD) grave según se detalla a continuación y procedimiento quirúrgico electivo planificado:

- 1. Tipo 1 (factor de von Willebrand: actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCO) <20 UI/dl), o
- 2. Tipo 2A (verificado por el patrón de multímeros), Tipo 2B (diagnosticado por genotipo), Tipo 2N (FVIII:C <10% y genética documentada históricamente), Tipo 2M, o
- 3. Tipo 3 (antígeno del factor von Willebrand (VWF:Ag) ≤ 3 UI/dl)

VWD con antecedentes de requerir terapia de sustitución con concentrado de factor von Willebrand (VWF) para controlar el sangrado.

Si es VWD tipo 3 (antígeno de VWF/VWF:Ag ≤ 3 UI/dl), el participante tiene historial médico de al menos 20 días de exposición a concentrados de factores de coagulación VWF/FVIII (incluido crioprecipitado o plasma fresco congelado).

Si es VWD tipo 1 o tipo 2, el participante tiene historial médico de 5 días de exposición o una cirugía mayor previa que requirió concentrados de factor de coagulación VWF/FVIII (incluido crioprecipitado o plasma fresco congelado).

El participante tenía al menos 18 años de edad.

Si es mujer en edad fértil, la participante presenta una prueba de embarazo negativa.

Si es aplicable, el participante acepta emplear medidas anticonceptivas adecuadas durante la duración del estudio.

El participante está dispuesto y es capaz de cumplir con los requisitos del protocolo.

Criterios de exclusión seleccionados:

Diagnóstico de pseudo VWD u otro trastorno de la coagulación hereditario o adquirido (p. ej., trastornos plaquetarios cualitativos y cuantitativos o tiempo de protrombina [PT] elevado / índice internacional normalizado [INR] > 1,4).

Historial o presencia de un inhibidor de VWF en la selección.

Historial o presencia de un inhibidor del factor VIII (FVIII) con un título ≥ 0,4 BU (ensayo Bethesda modificado por Nijmegen) o ≥ 0,6 BU (por ensayo Bethesda).

Hipersensibilidad conocida a cualquiera de los componentes de los fármacos del estudio, tales como proteínas de ratón o de hámster.

Historial médico de trastornos inmunológicos, excluyendo rinitis/conjuntivitis alérgica estacional, asma leve, alergias alimentarias o alergias a animales.

Historial médico de un acontecimiento tromboembólico.

VIH positivo con un recuento absoluto de CD4 < 200/mm³.

Recuento de plaquetas < 100.000/ml.

Diagnóstico de enfermedad hepática significativa, probado por, pero no limitados a, cualquiera de los siguientes: alanina aminotransferasa sérica (ALT) 5 veces el límite superior de lo normal; hipoalbuminemia; hipertensión de la vena porta (p. ej., presencia de esplenomegalia sin explicación, antecedentes de várices esofágicas) o cirrosis hepática clasificada como Child B o C.

Diagnóstico de enfermedad renal, con un nivel de creatinina sérica ≥ 2,5 mg/dl.

El participante había sido tratado con un fármaco inmunomodulador, excluyendo el tratamiento tópico (p. ej., pomadas, pulverizadores nasales), dentro de los 30 días anteriores a la firma del consentimiento informado.

La participante estaba embarazada o en período de lactancia en el momento en que se obtuvo el contenido informado.

- 5 El participante había participado en otro estudio clínico que involucraba un producto en investigación (IP), distinto de rVWF con o sin ADVATE, o un dispositivo en investigación dentro de los 30 días anteriores a la inscripción o estaba programado para participar en otro estudio clínico que involucraba un IP o un dispositivo en investigación durante el curso de este estudio. Sin embargo, podrán inscribirse pacientes elegibles que participen en el Estudio de profilaxis del rVWF (071301).

- 10 Enfermedad mortal progresiva y/o expectativa de vida menor a 3 meses.

Resultados:

- 15 La inscripción se llevó a cabo en 14 sitios de estudio en 10 países (EE. UU., Australia, Taiwán, Alemania, Rusia, España, Ucrania, Reino Unido, Italia, Turquía).

Tabla 6: Grupos de recogida de datos

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

- 20 Tabla 6: Participante: Estudio general

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Comenzaron	15
Completaron	14
No completaron	1
Retirada por el sujeto	1

Tabla 7: Medidas iniciales

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados generales	15
[Unidades: Participantes]	
Edad	40,0
[Unidades: Años]	
Mediana (Intervalo completo)	(20,0 a 70,0)
Sexo: Femenino, Masculino	
[Unidades: Participantes]	
Recuento de participantes	
Mujer	8 53,3%
Hombre	7 46,7%

- 25 Criterio principal de valoración: Criterio de valoración n.º 1

Tabla 8: Criterios de valoración

- 30 1. Principal: Eficacia hemostática general según la evaluación del investigador (médico especialista en hemofilia) [Marco de tiempo: 24 horas después de la última infusión perioperatoria o en la visita de finalización el día 14 ($\pm$ 2 días), lo que ocurra primero].

Tabla 9: Criterio principal de valoración n.º 1

Tipo de criterio de valoración	Principal
Título del criterio de valoración	Eficacia hemostática general según evaluación del investigador (médico especialista en hemofilia)
Descripción del criterio de valoración	La eficacia hemostática se valoró en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna. Excelente: La hemostasia intra y posoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Buena: La hemostasia intra y posoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Moderada: La hemostasia intra y posoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento realizado, pero se mantuvo sin necesidad de cambiar el concentrado de rVWF.
	Ninguna: El participante experimentó sangrado incontrolado que era el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio de concentrado de rVWF.
Marco de tiempo	24 horas después de la última infusión perioperatoria o en la visita de finalización el día 14 ($\pm$ 2 días), lo que ocurra primero

5 Descripción de la población Criterio de valoración n.º 1

El número de participantes con cirugía mayor, menor y oral y el número de participantes con Von Willebrand tipo 1, 2A, 2B, 2M y 3 se suman para dar el número total de participantes analizados. Para el análisis se utilizó el conjunto completo de datos de análisis, que incluían todos los participantes que recibieron el producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

10

Tabla 10: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 1

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía mayor.
Cirugía Oral	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 11: Valores medidos Criterio de valoración n.º 1

[illegible]

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 2

2. Secundario: Pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista según la evaluación del cirujano que opera [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)].

5 Tabla 12: Criterio principal de valoración n.º 2

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista según la evaluación del cirujano que opera
Descripción del criterio de valoración	La pérdida de sangre prevista fue estimada preoperatoriamente por el cirujano que operaba basándose en un individuo hemostáticamente normal del mismo sexo, edad, estatura y comorbilidades que el participante. Se evaluó la pérdida de sangre real que consistía en la pérdida de sangre estimada, que incluía hisopos, toallas y succión durante el procedimiento, según el registro del anestesiólogo.
Marco de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

Descripción de la población Criterio de valoración n.º 2

- 10 Para la pérdida de sangre prevista, el número de participantes analizados fue 14, ya que para un participante (incluido en el grupo de recogida de datos de cirugía mayor) no se recogió la pérdida de sangre prevista. Para el análisis se utilizó el conjunto completo de datos de análisis, que incluían todos los participantes que recibieron el producto en investigación y tuvieron al menos 1 evaluación hemostática.

15 Tabla 13: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 2

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía mayor.
Cirugía Oral	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 26: Valores medidos Criterio de valoración n.º 2

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía mayor	Cirugía Oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3
Participantes analizados	15	4	10	1	3	2	1	1	8
Pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista evaluado por el cirujano que opera									
[Unidades: ml]									
Media (Desviación estándar)									
Pérdida de sangre real									
Participantes analizados	15	4	10	1	3	2	1	1	8
Pérdida de sangre real	94,3 (177,88)	0,0 (0,00)	127,0 (209,27)	145,0 [1]	115,0 (103,32)	42,5 (53,03)	50,0 [1]	50,0 [1]	110,6 (240,87)
Pérdida de sangre prevista									
Participantes analizados	14	4	9	1	3	1	1	1	8
Pérdida de sangre prevista	106,1 (161,82)	2,5 (5,00)	152,8 (186,33)	100,0 [1]	100,0 (100,00)	10,0 [1]	50,0 [1]	50,0 [1]	134,4 (206,46)

[1] No es posible la desviación estándar ya que solo se analizó un participante.

No se proporcionó análisis estadístico para la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a la prevista según la evaluación del cirujano que opera.

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 3

3. Secundario: Pérdida de sangre intraoperatoria real respecto a la pérdida de sangre prevista [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)].

Tabla 14: Criterio de valoración n.º 3

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Pérdida de sangre intraoperatoria real respecto a la pérdida de sangre prevista
Descripción del criterio de valoración	La pérdida de sangre real respecto a la pérdida de sangre prevista se calculó como [Pérdida de sangre real (ml)] dividida por [Pérdida de sangre prevista (ml)] multiplicada por 100.
Marco de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

- 10 Descripción de la población Criterio de valoración n.º 3

El número de participantes analizados era 11, ya que para 3 participantes la pérdida de sangre real y prevista fue cero y para 1 participante no se recogió la pérdida de sangre prevista. Por lo tanto, no se pudo calcular la "pérdida de sangre real respecto a la pérdida de sangre prevista". Para el análisis de esta medida de criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos de análisis completo.

Tabla 15: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 3

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía mayor.
Cirugía Oral	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 16: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía mayor	Cirugía Oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3
Participantes analizados	11	1	9	1	2	1	1	1	6
Pérdida de sangre intraoperatoria real respecto a la pérdida de sangre prevista	69,6 (44,77)	0,0 ^[1]	68,9 (34,48)	145,0 { ^[1]	122,5 (31,82)	50,0 ^[1]	100,0 ^[1]	100,0 ^[1]	45,0 (38,92)
[Unidades: Porcentaje] Media (Desviación estándar)									
[1] No es posible la desviación estándar ya que solo se analizó un participante.									

No se proporcionó análisis estadístico para la pérdida de sangre intraoperatoria real respecto a la pérdida de sangre prevista

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 4

4. Secundario: Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista según la evaluación del cirujano que opera [Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)].

Tabla 17: Criterio de valoración n.º 4

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista según la evaluación del cirujano que opera
Descripción del criterio de valoración	La eficacia hemostática se valoró en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna. Excelente: La pérdida de sangre intraoperatoria era menor o igual a la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($\leq 100\%$). Buena: La pérdida de sangre intraoperatoria era hasta un 50% mayor que la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal (101-150%). Moderada: La pérdida de sangre intraoperatoria era más de 50% de la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($>150\%$). Ninguna: Hemorragia no controlada que era el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio del régimen de reemplazo del factor de coagulación.
Marco de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

- 10 Tabla 18: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 4

El número de participantes con cirugía mayor, menor y oral y el número de participantes con Von Willebrand tipo 1, 2A, 2B, 2M y 3 se suman para dar el número total de participantes analizados. Para el análisis se utilizó el conjunto completo de datos de análisis, que incluían todos los participantes que recibieron el producto en investigación y tuvieron al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 19: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 4

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía mayor.
Cirugía Oral	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 20: Valores medidos Criterio de valoración n.º 4

		Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía mayor	Cirugía Oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Enfermedad de von Willebrand tipo 8					
		15	4	10	1	3	2	1	1	1	8					
Participantes analizados																
Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a prevista según la evaluación del cirujano que opera																
[Unidades: Participantes]																
Recuento de participantes																
Excelente	13	86,7%	4	100,0%	1	100,0%	3	100,0%	1	50,0%	1	100,0%	7	87,5%		
Buena	2	13,3%	0	0,0%	2	20,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	1	12,5%
Moderada	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Ninguna	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

No se proporcionó análisis estadístico para la puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real frente a la prevista según la evaluación del cirujano que opera.

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 5

5. Secundario: Puntuación de eficacia hemostática intraoperatoria según la evaluación del cirujano que opera
[Marco de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

Tabla 21: Criterio de valoración n.º 5

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria evaluada por el cirujano que opera
Descripción del criterio de valoración	La eficacia hemostática se valoró en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna. Excelente: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Buena: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Moderada: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE era claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento realizado, pero se mantuvo sin necesidad de cambiar el concentrado de rVWF. Ninguna: El participante experimentó sangrado incontrolado que era el resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, necesitando un cambio de concentrado de rVWF.
Marco de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

- 10 Tabla 22: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 5

El número de participantes con cirugía mayor, menor y oral y el número de participantes con Von Willebrand tipo 1, 2A, 2B, 2M y 3 se suman para dar el número total de participantes analizados. Para el análisis se utilizó el conjunto completo de datos de análisis, que incluían todos los participantes que recibieron el producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 23: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 5

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía mayor.
Cirugía Oral	Todos los participantes que se sometieron a una cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 24: Valores medidos Criterio de valoración n.º 5

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)		Cirugía menor		Cirugía mayor		Cirugía Oral		Enfermedad de von Willebrand tipo 1		Enfermedad de von Willebrand tipo 2A		Enfermedad de von Willebrand tipo 2B		Enfermedad de von Willebrand tipo 2M		Enfermedad de von Willebrand tipo 3	
	15	4	10	1	3	2	1	1	3	100,0%	1	50,0%	1	100,0%	1	100,0%	7	87,5%
Participantes analizados																		
Puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria evaluada por el cirujano que opera [Unidades: Participantes]																		
Recuento de participantes	13	86,7%	4	100,0%	8	80,0%	1	100,0%	3	100,0%	1	50,0%	1	100,0%	1	100,0%	7	87,5%
Excelente	2	13,3%	0	0,0%	2	20,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	12,5%
Bueno	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Moderado	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Ninguno	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

No se proporcionó análisis estadístico para la puntuación de eficacia hemostática intraoperatoria evaluada por el cirujano que opera

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 6

6. Secundario: Dosis diaria intra y posoperatoria ajustada por peso de rVWF con o sin ADVATE [Marco de tiempo: diariamente, desde el día de la cirugía hasta el día 14 posoperatorio ($\pm$ 2 días)]

Tabla 25: Criterio de valoración n.º 6

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Dosis diaria intra y posoperatoria ajustada por peso de rVWF con o sin ADVATE
Descripción del criterio de valoración	No se ha introducido ningún texto.
Marco de tiempo	Diariamente, desde el día de la cirugía hasta el día 14 postoperatorio ($\pm$ 2 días)

- 10 Tabla 25: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 6

El número de participantes analizados fue diferente para los puntos temporales según el tratamiento individual. Para el análisis se utilizó el conjunto completo de datos de análisis, que incluían todos los participantes que recibieron el producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 40: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 6

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

- 15

Tabla 26: Valores medidos Criterio de valoración n.º 6

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Dosis diaria intra y posoperatoria ajustada por peso de rVWF con o sin ADVATE [Unidades: UI/kg] Mediana (intervalo intercuartil)	
intraoperatorio	
Participantes analizados intraoperatorio	1 18,1 (18,1 a 18,1)
día 1 posoperatorio	
Participantes analizados día 1 posoperatorio	3 23,5 (16,9 a 47,2)
día 2 posoperatorio	
Participantes analizados día 2 posoperatorio	11 42,3 (23,2 a 50,6)
día 3 posoperatorio	
Participantes analizados	12

ES 3 004 108 T3

		Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
	día 3 posoperatorio	28,6 (20,6 a 48,9)
día 4 posoperatorio		
	Participantes analizados	9
	día 4 posoperatorio	33,9 (23,2 a 44,3)
día 5 posoperatorio		
	Participantes analizados	7
	día 5 posoperatorio	31,5 (18,8 a 47,2)
día 6 posoperatorio		
	Participantes analizados	5
	día 6 posoperatorio	23,2 (18,8 a 23,6)
día 7 posoperatorio		
	Participantes analizados	5
	día 7 posoperatorio	23,8 (23,6 a 50,8)
día 8 posoperatorio		
	Participantes analizados	7
	día 8 posoperatorio	33,9 (23,6 a 53,6)
día 9 posoperatorio		
	Participantes analizados	3
	día 9 posoperatorio	23,6 (16,3 a 53,6)
día 10 posoperatorio		
	Participantes analizados	3
	día 10 posoperatorio	23,6 (16,3 a 34,8)
día 11 posoperatorio		
	Participantes analizados	3
	día 11 posoperatorio	23,6 (16,3 a 53,6)
día 12 posoperatorio		
	Participantes analizados	4
	día 12 posoperatorio	29,3 (20,1 a 44,2)
día 13 posoperatorio		
	Participantes analizados	1
	día 13 posoperatorio	16,3 (16,3 a 16,3)
día 14 posoperatorio		
	Participantes analizados	2
	día 14 posoperatorio	25,5 (16,3 a 34,8)
día 15 posoperatorio		
	Participantes analizados	1
	día 15 posoperatorio	16,3 (16,3 a 16,3)

No se proporcionó análisis estadístico para la dosis diaria ajustada por peso intra y posoperatoria de rVWF con o sin ADVATE

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 7

7. Secundario: Aparición de acontecimientos adversos [Marco de tiempo: desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

5

Tabla 27: Criterio de valoración n.º 7

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Aparición de acontecimientos adversos
Descripción del criterio de valoración	Se evaluaron los acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE) y los acontecimientos adversos graves surgidos durante el tratamiento (TESAE).
Marco de tiempo	Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)

Tabla 28: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 7

10

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, que incluía todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación.

Tabla 29: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 7

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

15

Tabla 30: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Aparición de acontecimientos adversos [Unidades: Acontecimientos adversos]	
Acontecimiento adverso surgido durante el tratamiento (TEAE)	12
TEAE graves	1
TEAE relacionados con rVWF	0
TEAE relacionados con ADVATE	0
TEAE relacionados tanto con rVWF como con ADVATE	0
Acontecimiento adverso grave surgido durante el tratamiento (TESAE)	2
TESAE relacionados con rVWF	0
TESAE relacionados con ADVATE	0
TESAE relacionados tanto con rVWF como con ADVATE	0
TEAE que conducen a la interrupción del rVWF	0

TEAE que conducen a la interrupción de ADVATE	0
TEAE que conducen a la interrupción del estudio	0
TEAE que conducen a la muerte	0
TEAE relacionados con el procedimiento de estudio	0
TESAE relacionados con el procedimiento de estudio	0

No se proporcionó análisis estadístico para la aparición de acontecimientos adversos

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 8

5

8. Secundario: Aparición de acontecimientos trombóticos [Marco de tiempo: desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

Tabla 31: Criterio de valoración n.º 8

10

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Aparición de acontecimientos trombóticos
Descripción del criterio de valoración	Se evaluaron los acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE) y los acontecimientos adversos graves surgidos durante el tratamiento (TESAE).
Marco de tiempo	Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)

Tabla 32: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 8

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, que incluía todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación.
--

15 Tabla 33: Grupos de recogida de datos

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 34: Valores medidos Criterio de valoración n.º 8

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Aparición de acontecimientos trombóticos [Unidades: Acontecimientos adversos]	
TEAE trombóticos	2
TESAE trombóticos	1

20

No se proporcionó análisis estadístico para la aparición de acontecimientos trombóticos

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 9

25 9. Secundario: Aparición de reacciones alérgicas graves (p. ej., anafilaxia) [Marco de tiempo: desde la primera

infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

Tabla 35: Criterio de valoración n.º 9

5

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Aparición de reacciones alérgicas graves (p. ej., anafilaxia)
Descripción del criterio de valoración	Se evaluaron los acontecimientos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAE) y los acontecimientos adversos graves surgidos durante el tratamiento (TESAE) para las reacciones alérgicas graves.
Marco de tiempo	Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)

Tabla 36: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 9

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, que incluía todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación.

10 Tabla 37: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 9

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 38: Valores medidos Criterio de valoración n.º 9

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Aparición de reacciones alérgicas graves (p. ej., anafilaxia) [Unidades: Acontecimientos adversos]	
Reacciones alérgicas graves TEAE	0
Reacciones alérgicas graves TESAE	0

15

No se proporcionó análisis estadístico para la aparición de reacciones alérgicas graves (p. ej., anafilaxia).

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 10

20 10. Secundario: Número de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total contra el factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores contra el factor VIII (FVIII) [Marco de tiempo: los ensayos se realizaron durante todo el estudio en la selección, antes de la infusión PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 posoperatorio y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

25

Tabla 39: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 10

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Número de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total contra el factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores contra el

	factor VIII (FVIII)
Descripción del criterio de valoración	Los participantes se trataron con factor van Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.
Marco de tiempo	Las ensayos se realizaron durante todo el estudio en la selección, antes de la infusión PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, en el día 7 posoperatorio y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía).

Tabla 40: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 10

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, que incluía todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación.

5 Tabla 41: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 10

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 55: Valores medidos Criterio de valoración n.º 10

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Número de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total contra el factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores contra el factor VIII (FVIII)	
[Unidades: Participantes]	
Recuento de participantes	
Desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el VWF	0
Desarrollo de anticuerpos de unión total contra el VWF	1
Desarrollo de anticuerpos inhibidores contra el FVIII	0

10

No se proporcionó análisis estadístico para el número de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total contra el factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores contra el factor VIII (FVIII)

15 Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 11

11. Secundario: Número de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina) [Marco de tiempo: los ensayos se realizaron durante todo el estudio en la selección, antes de la infusión PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 posoperatorio y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

20

Tabla 42: Criterio de valoración n.º 11

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Número de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante

	(rFurina)
Descripción del criterio de valoración	Los participantes se trataron con factor van Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.
Marco de tiempo	Las ensayos se realizaron durante todo el estudio en la selección, antes de la infusión PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, en el día 7 posoperatorio y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía).

Tabla 43: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 11

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, que incluía todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación.

5 Tabla 44: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 11

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 59: Valores medidos Criterio de valoración n.º 11

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Número de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina)	
[Unidades: Participantes]	0
Recuento de participantes	

10 No se proporcionó análisis estadístico para el número de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina)

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 12

15 12. Secundario: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo de 0 a 72 horas después de infusión (AUC 0-72 h/dosis) [Marco de tiempo: las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

20 Tabla 45: Resultado n.º 12

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo de 0 a 72 horas después de infusión (AUC 0-72 h/dosis)
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCO de 50 $\pm$ 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El área bajo la curva de concentración plasmática/tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión se calculó utilizando la regla trapezoidal lineal. Para el cálculo del AUC(0-72 h), los niveles a las 72 horas se interpolaron/extrapolaron linealmente desde los 2 puntos de tiempo de muestreo más cercanos.

	Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación del FVIII (FVIII :C)
Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.

Tabla 46: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 12

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

5 Tabla 47: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 12

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 48: Valores medidos Criterio de valoración n.º 12

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo de 0 a 72 horas después de infusión (AUC 0-72 h/dosis) [Unidades: horas*UI/dl] Media geométrica (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	
Participantes analizados	11 31,91
VWF:RCo	(37,5%)
VWF:Ag	
Participantes analizados	11
VWF:Ag	57,08 (25,6%)
VWF:CB	
Participantes analizados	11
VWF:CB	63,91 (29,4%)
VWF:Ac	
Participantes analizados	11
VWF:Ac	54,61 (28,1%)
FVIII: C	
Participantes analizados	5
F VIII: C	67,49 (31,1%)

No se proporcionó análisis estadístico para la farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo de 0 a 72 horas después de infusión (AUC 0-72 h/dosis)

5 Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 13

- 10 13. Secundario: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo 0 a infinito (AUC 0-∞/dosis) [Marco de tiempo: las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas].

Tabla 49: Criterio de valoración n.º 13

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo 0 a infinito (AUC 0-∞/dosis)
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de 50±5 UI/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El área bajo la curva de concentración plasmática/tiempo desde el tiempo 0 a infinito y el área bajo la curva del primer momento desde el tiempo 0 a infinito se calculó como la suma del AUC o AUMC desde el tiempo 0 hasta el tiempo de la última concentración cuantificable más una corrección del área de cola calculada como C_t/λ_z y $C_t/\lambda_z(t+1/\lambda_z)$, respectivamente, donde C_t era la última concentración cuantificable, t era el tiempo de la última concentración cuantificable y λ_z era la constante de velocidad terminal o de disposición. Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación del FVIII (FVIII :C)
Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

15 Tabla 50: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 13

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

Tabla 51: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 13

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

20

Tabla 52: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo 0 a infinito (AUC 0-∞/dosis)	

[Unidades: horas*UI/dl]		
Media geométrica (coeficiente geométrico de variación)		
VWF:RCo		
Participantes analizados	11	
VWF:RCo	34,43 (43,3%)	
VWF:Ag		
Participantes analizados	11	
VWF:Ag	68,87 (31,5%)	
VWF:CB		
Participantes analizados	11	
VWF:CB	71,82 (34,1%)	
VWF:Ac		
Participantes analizados	11	
VWF:Ac	61,90 (32,2%)	
F VIII: C		
Participantes analizados	3	
F VIII: C	75,00 (30,9%)	

No se proporcionó análisis estadístico para farmacocinética: área bajo la curva de concentración plasmática frente a tiempo desde tiempo 0 a infinito (AUC 0-∞ /dosis)

5 Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 14

14. Secundario: Farmacocinética: Tiempo medio de permanencia (MRT) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas].

10

Tabla 53: Criterio de valoración n.º 14

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: Tiempo medio de permanencia (MRT)
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50±5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El tiempo de permanencia medio se calculó como el área bajo la curva del primer momento desde el tiempo 0 a infinito dividida por el área bajo la curva del tiempo 0 a infinito menos T/2, donde T era la duración de la infusión. Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.
-----------------	--

Tabla 54: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 14

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

5 Tabla 55: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 14

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 56: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Tiempo medio de permanencia (MRT) [Unidades: Horas]	
Media geométrica (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	22,69 (41,3%)
VWF:Ag	37,92 (28,4%)
VWF:CB	29,35 (31,1%)
VWF:Ac	29,75 (28,6%)

10

No se proporcionó análisis estadístico para farmacocinética: tiempo medio de permanencia (MRT)

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 15

- 15 15. Secundario: Farmacocinética: Aclaramiento (CL) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

Tabla 57: Criterio de valoración n.º 15

20

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: Aclaramiento (CL)
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50$\pm$5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El aclaramiento se calculó como la dosis (UI/kg) dividida por el área bajo la curva de tiempo de 0 a infinito. Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.
-----------------	--

Tabla 58: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 15

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

5 Tabla 59: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 15

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 60: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Aclaramiento (CL) [Unidades: dl/hora/kg]	
Media geométrica (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	0,02904 (43,3%)
VWF:Ag	0,01452 (31,5%)
VWF:CB	0,01392 (34,1%)
VWF:Ac	0,01616 (32,2%)

10

No se proporciona análisis estadístico para farmacocinética: Aclaramiento (CL)

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 16

- 15 16. Secundario: Farmacocinética: Recuperación incremental (IR) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

Tabla 61: Criterio de valoración n.º 16

20

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: recuperación incremental (IR)
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50$\pm$5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. La recuperación incremental se calculó como (C_{máx} menos C_{preinfusión}) dividido por la dosis (UI/kg), donde kg se refiere al peso corporal en el momento de la dosificación y C_{máx} era la concentración máxima observada antes de la corrección de los valores previos a la infusión. Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del

	VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.

Tabla 77: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 16

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

5 Tabla 62: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 16

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 63: Valores medidos Criterio de valoración n.º 16

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: recuperación incremental (IR)	
[Unidades: UI/dl]	
Media (Desviación estándar)	
VWF:RCo	1,961 (0,45445)
VWF:Ag	1,991 (0,38395)
VWF:CB	2,780 (0,56640)
VWF:Ac	2,635 (0,38050)

10

No se proporcionó análisis estadístico para farmacocinética: Recuperación incremental (IR)

Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 17

15 17. Secundario: Farmacocinética: Semivida de fase de eliminación (T_{1/2}) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

Tabla 64: Criterio de valoración n.º 17

20

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: Semivida de fase de eliminación (T _{1/2})
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50$\pm$5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. La semivida terminal o de disposición (T_{1/2}) se calculó como $\ln 2/\lambda_z$, donde λ_z era la constante de velocidad de eliminación terminal calculada en WinNonlin NCA utilizando al menos tres concentraciones cuantificables. Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos:

	actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.

Tabla 65: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 17

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

5 Tabla 66: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 17

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Valores medidos	
	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Semivida de fase de eliminación (T1/2) [Unidades: Horas] Media geométrica (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	16,52 (42,7%)
VWF:Ag	26,88 (26,5%)
VWF:CB	21,07 (33,2%)
VWF:Ac	22,19 (28,5%)

No se proporciona análisis estadístico para la farmacocinética: Semivida de fase de eliminación (T1/2)

10 Criterio de valoración secundario: Criterio de valoración n.º 18

18. Secundario: Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss) [Marco de tiempo: Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

15

Tabla 67: Criterio de valoración n.º 18

Tipo de criterio de valoración	Secundario
Título del criterio de valoración	Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)
Descripción del criterio de valoración	Esta evaluación sólo era necesaria para sujetos que se sometían a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión PK con una dosis de rVWF:RCo de 50 $\pm$ 5 UI/kg dentro de los 42 días previos a la cirugía. El Vss se calculó como el aclaramiento multiplicado por el tiempo medio de permanencia.

	Se realizó el análisis PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCO), actividad del antígeno del VWF (VWF:Ag), actividad de unión al colágeno del VWF (VWF:CB), actividad del VWF medida mediante el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Marco de tiempo	Las mediciones PK se hicieron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.

Tabla 68: Descripción de la población Criterio de valoración n.º 18

Para el análisis de este criterio de valoración se utilizó el conjunto de datos del análisis PK, que incluye todos los participantes que se sometieron a evaluación PK con datos recogidos en los puntos temporales relevantes.

5 Tabla 69: Grupos de recogida de datos Criterio de valoración n.º 18

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Valores medidos Criterio de valoración n.º 18	
	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss) [Unidades: dl/kg]	
Media geométrica (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCO	0,6591 (28,8%)
VWF:Ag	0,5506 (18,4%)
VWF:CB	0,4086 (24,0%)
VWF:Ac	0,4806 (21,5%)

No se proporcionó análisis estadístico para farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)

10

Los ejemplos expuestos anteriormente se proporcionan para dar a los expertos en la técnica una descripción y divulgación completa de cómo hacer y utilizar las realizaciones de las composiciones para el uso de la presente invención y los sistemas y métodos descritos adicionalmente, y no pretenden limitar el alcance de lo que los autores de la invención consideran su invención. Las modificaciones de los modos descritos anteriormente para llevar a cabo la invención que sean obvias para los expertos en la técnica se pretende que estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones. Todas las patentes y las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva indican los niveles técnicos de los expertos en la técnica a la que pertenece la invención.

15

20

Todos los encabezados y designaciones de secciones se utilizan solo con fines de claridad y referencia y no deben considerarse limitantes de ningún modo. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán la utilidad de combinar varios aspectos de diferentes encabezados y secciones según sea apropiado de acuerdo con el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

25

Se pueden realizar muchas modificaciones y variaciones de esta solicitud sin apartarse del alcance de las reivindicaciones, como será evidente para los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para usar en un método para el pretratamiento de un sujeto con enfermedad de von Willebrand (VWD) grave antes de un procedimiento quirúrgico, en donde dicho pretratamiento comprende administrar 20-60 UI/kg de rVWF a dicho sujeto entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico y en donde no se administra factor VIII (FVIII) con el VWF antes del procedimiento quirúrgico.
2. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho pretratamiento comprende además administrar 5-90 UI/kg de rVWF a dicho sujeto 1 hora antes de dicho procedimiento quirúrgico.
3. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde no se administra FVIII después de dicho procedimiento quirúrgico.
4. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento quirúrgico se selecciona del grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.
5. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administran a dicho sujeto 50-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, o
en donde se administran a dicho sujeto 35-60 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor o
en donde se administran a dicho sujeto 20-40 UI/kg de rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.
6. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho pretratamiento comprende además administrar 5-50 UI/kg de rVWF a dicho sujeto 1 hora antes del procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor.
7. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administran además a dicho sujeto 15-90 UI/kg de rVWF 1 hora antes de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.
8. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administran además a dicho sujeto 20-50 UI/kg de rVWF 1 hora antes de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.
9. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administran a dicho sujeto 10-50 UI/kg de rVWF durante dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.
10. Factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administran además a dicho sujeto 70-220 UI/kg de rVWF después de dicho procedimiento quirúrgico.
11. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administran además a dicho sujeto 70-150 UI/kg de rVWF después de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor o
en donde se administran además a dicho sujeto 150-220 UI/kg de rVWF después de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor, o
o
en donde se administran además a dicho sujeto 20-50 UI/kg de rVWF después de dicho procedimiento quirúrgico y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.
12. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde se administra a dicho sujeto una dosis total de 100-220 UI/kg de rVWF y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, o
en donde se administra a dicho sujeto una dosis total de 220-320 UI/kg de rVWF y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor, o

en donde se administra a dicho sujeto una dosis total de 70-190 UI/kg de rVWF y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.

5 13. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor y dicho pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales de rVWF antes del procedimiento quirúrgico.

10 14. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor y dicho pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis de rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis.

15 15. El factor de von Willebrand recombinante (rVWF) para el uso de la reivindicación 1, en donde dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral y dicho pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales de rVWF antes del procedimiento quirúrgico.

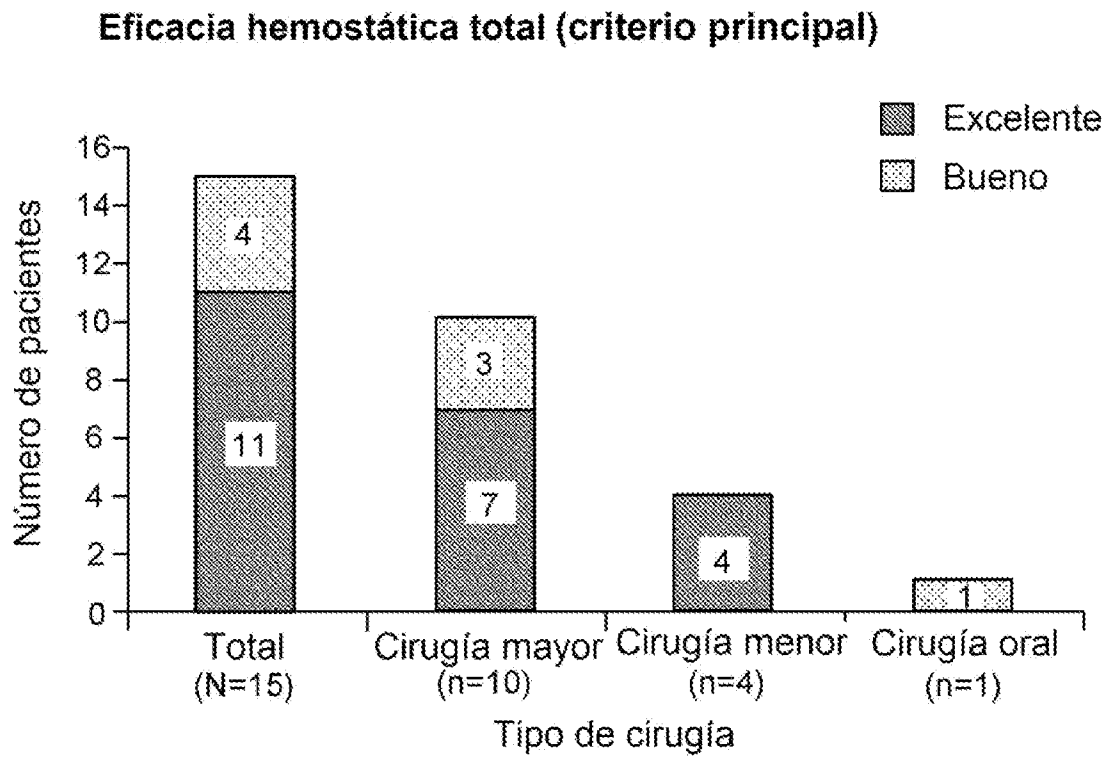


FIG. 1

Eficacia hemostática intraoperatoria (criterio secundario)

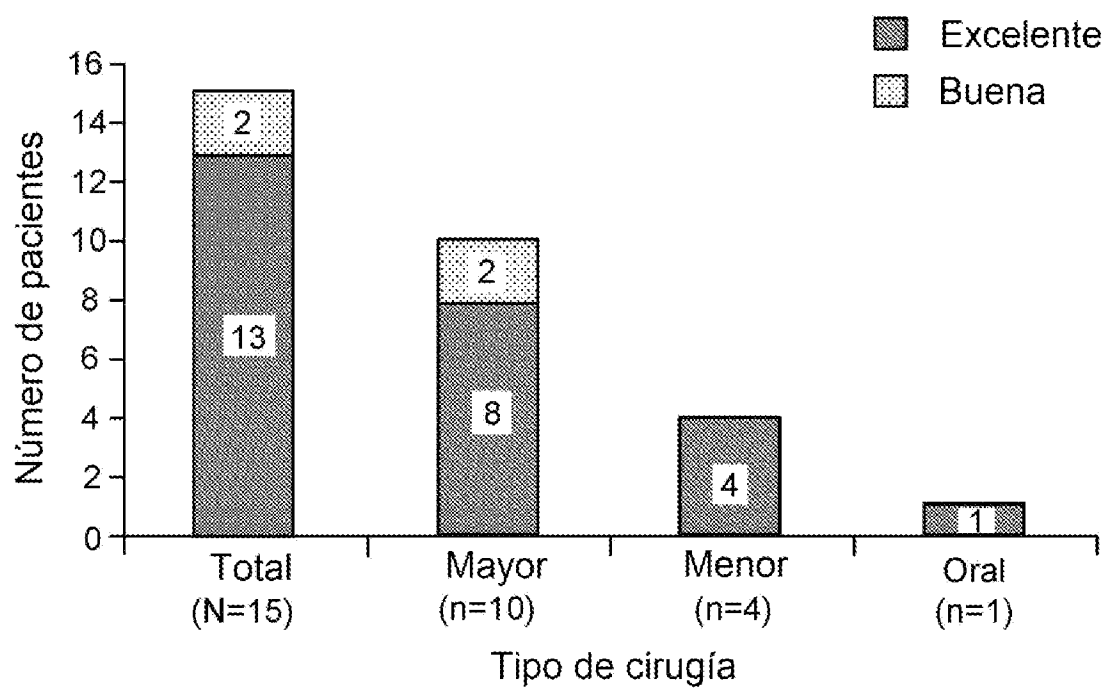


FIG. 2

Tabla 3. Demografía básica y características clínicas

Parámetro	N = 15
Sexo, n (%)	
Hombre	7 (46,7)
Mujer	8 (53,3)
Edad media (intervalo), años	40 (20-70)
Peso medio (intervalo), kg	D
IMC medio (intervalo), kg/m ²	D
Tipo de VWD, n (%)	
1	3 (20,0)
2A	2 (13,3)
2B	1 (6,7)
2M	1 (6,7)
3	8 (53,3)
Clasificación de cirugía, n (%)	
Mayor	10 (66,7)
Menor	4 (26,7)
Oral	1 (6,7)
FVIII:C media (DE), IU/dL	16,4 (19,9)
VWF:Rco media (DE), IU/dL	10,6 (13,3)

IMC= índice de masa corporal; FVIII:C = actividad del factor VIII; VWD = enfermedad de von Willebrand; VWF:RCo = actividad del factor de von Willebrand cofactor de ristocetina

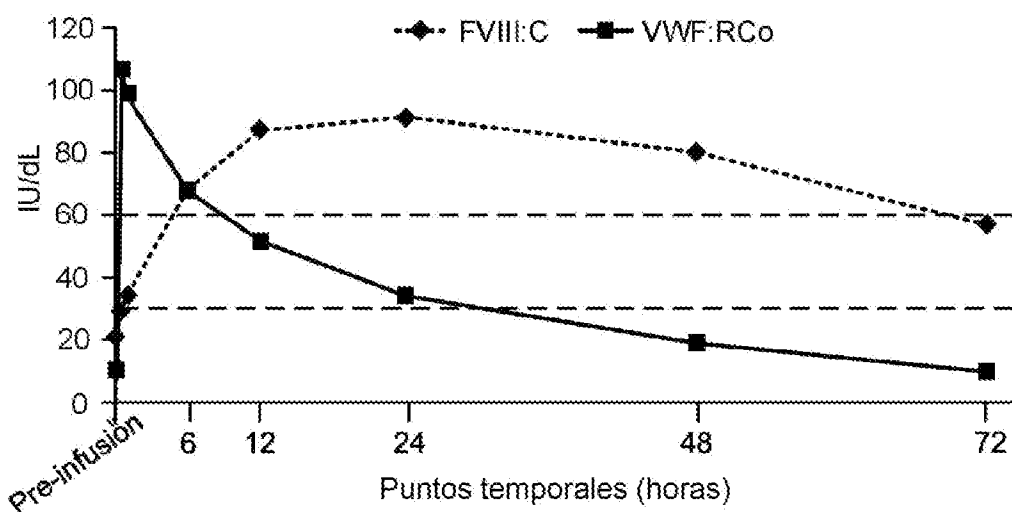
FIG. 3

Tabla 4. Parámetros PK para VWF:RCo (n=11)

Parámetro	Media	DE	Intervalo
$ABC_{0-\infty}/\text{dosis}, (h \cdot \text{IU/dL})/(\text{IU/kg})$	37,50	18,14	19,2–83,5
$ABC_{0-72h}/\text{dosis}, (h \cdot \text{IU/dL})/(\text{IU/kg})$	34,08	14,59	18,3–72,6
$C_{\text{máx}}, \text{IU/dL}$	96,27	22,01	49,0–118
$T_{1/2}, h$	17,83	7,34	9,08–31,6
$RG \text{ a } C_{\text{máx}}, (\text{IU/dL})/(\text{IU/kg})$	1,96	0,45	1,06–2,48

ABC = área bajo la curva; $C_{\text{máx}}$ = concentración máxima; RG = recuperación gradual; NC = no calculado; PK = farmacocinética; DE = desviación estándar; $T_{\text{máx}}$ = tiempo hasta la concentración máxima; $T_{1/2}$ = vida media terminal; VWF:RCo = actividad del factor de von Willebrand con cofactor de ristocetina

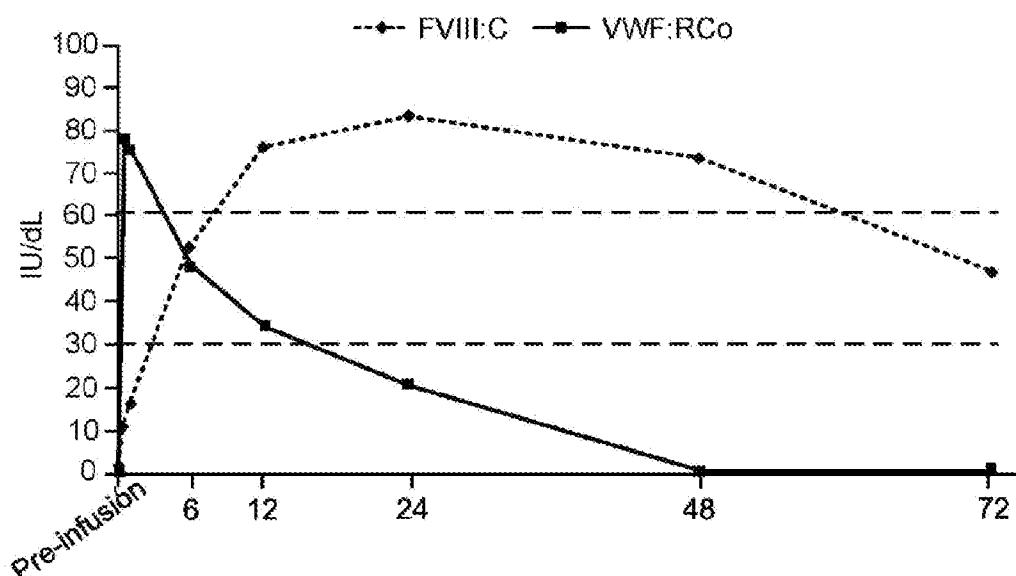
FIG. 4



FVIII:C = actividad de factor VIII; VWF:RCo = actividad del factor de von Willebrand con cofactor de ristocetina.

Los niveles de FVIII:C endógena diana (30 UI/dL para cirugía menor/oral o 60 UI/dL para cirugía mayor) se indican por las líneas horizontales discontinuas.

FIG. 5A



FVIII:C = actividad del factor VIII; VWF:RCo = actividad del factor de von Willebrand con cofactor de ristocetina

Los niveles de FVIII:C endógena diana (30 UI/dL para cirugía menor/oral o 60 UI/dL para cirugía mayor) se indican por las líneas horizontales discontinuas.

FIG. 5B

SEQ ID NO:1

```

agctcacagc tattgtgggtg ggaaagggag ggtgggttggg ggatgtcaca      50
gcttgggctt tatctccccc agcagtgggg actccacagc ccttgggcta      100
cataacagca agacagtccg gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc      150
agcagctgag agcatggcct aggggtgggcg gcacctattgt ccagcagctg      200
agtttcccag ggaaccttga gatagccgca gccctcattt gcaggggaag      250
atgattcctg ccagatttgc cgggggtgctg ctgtctctgg ccttcatttt      300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaactcg cggcagggtca tccacggccc      350
gatgcagcct tttcggaagt gacttcgtca acacctttga tgggagcatg      400
tacagctttg cgggatactg cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa      450
acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag agagtggacc      500
tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt tgtcaatggt      550
accgtgacac agggggacca aagagtcctc atgcccctatg cctccaaagg      600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct      650
atggcctttgt ggccaggatc gatggcagcg gcaaccttca agtcctgtctg      700
tcagacagat acttoaacaa gacctgcggg ctgtgtggca actttaaat      750
cttctgtgaa gatgacttta tgacctaaaga agggaccttg acctcggacc      800
cttatgaatt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg      850
gaacgggcat cctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat      900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg      950
ttgcccgctg ccacctctg gtggaccccg agccttttgt ggcctgtgt      1000
gagaagaatt tgttgtggtg tcttgggggg ctggagtgcg cctgccttgc      1050
cctcctggag taagcccgya cctgtgcccc ggagggaaat gtgtgtgacg      1100
gctggacoga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggtatggag      1150
tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgcaggg acctgccaga gcttgcacat      1200
caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga ttgctgcagc tgccctgagg      1250
gacagctcct ggaatgaaggc ctctgcgttg agagcaccga gtgtccctgc      1300
gtgcattccg gaaagcgcta cctcccgcg acctccctct ctcgagactg      1350
caacacctgc atttgccgaa acagccagtg gatctgcagc aatgaagaat      1400
gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa gagctttgac      1450
aacagatact tcaccttcag tgggactctg cagtacctgc tggcccggga      1500
ttgocaggac cactccttct ccaattgcat ttgagactgt cagtgtgtgt      1550
atgaccgcta cgtgtgtgtc acccgctccg tcaccgtccg gctgccttgc      1600
ctgcacaaca gcttgttgaa actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga      1650
tggccaggac gtccagctcc cctcctgaa aggtgacctc cgcctccagc      1700
atacagtga cggcctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg      1750
gactgggatg gcgcggggag gctgctgggt aagctgtccc cgtcttatgc      1800
cgggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg      1850
acttccttac cccctctggg ctggcggagc cccgggttga ggacttcggg      1900
aacgcctgga agctgcacgg ggactgcag gacctgcaga agcagcacag      1950
cgatccctgc gccctcaacc cgcgcagtag caggttctcc gaggaggcgt      2000
gcgcggctct gacgtccccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc      2050
ccgtgcctct acctgcggaa ctgcccctac gacgtgtgct cctgtctgga      2100
cggccgcgag tgcctgtgag ggcctctggc cagctatgcc gcggccttgc      2150
cggggagagg cgtgcgcgtc gcttggcgcg agccaggccg ctgtgagctg      2200
aactgcccga aaggccaggt gtacctgcag tgcgggaccc cctgcaacct      2250
gacctgcgcg tctctctctt acccggtatg ggaatgcaat gaggcctgcc      2300
tggagggctg cttctgcccc ccagggctct acatggatga gaggggggac      2350

```

FIG. 6

tgcgtgcccc	aggccccagt	ccccgtttac	tatgacgggtg	agatcttcca	2400
gccagaagac	atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggatg	2450
gcttcatgca	ctgtaccoatg	agtggagtc	ccggaagctt	gctgcctgac	2500
getgtcctca	gcagtcacct	gtctcatcgc	agcaaaagga	gcctatcctg	2550
tgggcccccc	atgggtcaagc	tgggtgtgtcc	cgctgacaac	ctgcgggctg	2600
aagggtctga	gtgtaccaaa	acgtgocaga	actatgacct	ggagtgcacg	2650
agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	cccccgggca	tgggtccggca	2700
tgagaacaga	tgtgtggccc	tggaaagggtg	tccctgcttc	catcagggca	2750
aggagtatgc	ccttgagaga	acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	2800
tgtcgggacc	ggaagtggaa	ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccacgtg	2850
ctccacgac	ggcatggccc	actacctcac	cttcgacggg	ctcaaatacc	2900
tgttccccgg	ggagtgcacg	tacgttctgg	tgcaggatta	ctgcggcagt	2950
aaacctggga	cctttcggat	cctagtgggg	aataagggat	gcagccaccc	3000
ctcagtgaag	tgcaagaaac	gggtcaccat	cctggtggag	ggaggagaga	3050
ttgagctgtt	tgacggggag	gtgaatgtga	agaggcccat	gaaggatgag	3100
actcactttg	aggtgggtga	gtctggccgg	tacatcattc	tgctgctggg	3150
caaagccctc	tccgtggtct	gggaccggca	cctgagcctc	tccgtggtcc	3200
tgaagcagac	ataccaggag	aaagtgtgtg	gcctgtgtgg	gaattttgat	3250
ggcatccaga	acaatgacct	caccagcagc	aacctccaag	tggagggaaga	3300
cctgtgtggc	tttgggaact	cctggaaagt	gagctcgacg	tgtgctgaca	3350
ccagaaaagt	gcctctggac	tcctcccttg	ccacctgcca	taacaacatc	3400
atgaagcaga	cgatgggtga	ttcctcctgt	agaatcctta	ccagtgaagt	3450
cttccaggac	tgcaacaagc	tgggtggacc	cgagccatat	ctggatgtct	3500
gcattttacg	cacctgctcc	tgtgagtcga	ttggggactg	cgctgcttc	3550
tgcgacacca	ttgctgccta	tgcccacgtg	tgtgcccagc	atggcaagggt	3600
ggtgacctgg	aggacggcca	catttgtccc	ccagagctgc	gaggagagga	3650
atctccggga	gaacgggtat	gagtggtgag	ggcgtataa	cagctgtgca	3700
cctgcctgtc	aagtcacgtg	tcagcacctc	gagccactgg	cctgcctgt	3750
gcagtgtgtg	gagggtctgc	atgccactg	ccctccaggg	aaaatcctgg	3800
atgagctttt	gcagacctgc	gttgaccttg	aagactgtcc	agtgtgtgag	3850
gtggctggcc	ggcgttttgc	ctcaggaaag	aaagtcacct	tgaatccag	3900
tgaccttgag	cactgccaga	tttgccactg	tgatgtttgc	aaacctcact	3950
gtgaagcctg	ccaggagccg	ggaggcctgg	tgggtgcctc	cacagatgcc	4000
ccggtgagcc	ccaccactct	gtatgtggag	gacatctcgg	aaccgcctt	4050
gcacgatttc	tactgcagca	ggctactgga	cctggtcttc	ctgctggatg	4100
gctcctccag	gctgtccgag	gctgagtttg	aagtgctgaa	ggcctttgtg	4150
gtggacatga	tggagcggct	gcgcactctc	cagaagtggg	tccgcgtggc	4200
cgtggtggag	taccacgacg	gctcccacgc	ctacatcggg	ctcaaggacc	4250
ggaagcgacc	gtcagagctg	cggcgcattg	ccagccaggt	gaagtatgag	4300
ggcagccagg	tggcctccac	cagcgaggtc	ttgaaataca	cactgttcca	4350
aatcttcagc	aagatcgacc	gcccctgaagc	ctcccgcctc	acctgtctcc	4400
tgatggcccg	ccaggagccc	caacggatgt	cccggaactt	tgtccgctac	4450
gtccagggcc	tgaagaagaa	gaaggtcatt	gtgatcccg	tgggcattgg	4500
gccccatgcc	aacctcaagc	agatccgcct	catcgagaag	caggcccttg	4550
agaacaaggc	cttcgtgctg	agcagtgtgg	atgagctgga	gcagcaaaagg	4600
gaagagatcg	ttagctacct	ctgtgacctt	gcccctgaag	ccccctctcc	4650
tactctgccc	cccagcatgg	cacaagtcac	tgtgggccc	gggctcttgg	4700
gggtttcgac	cctggggccc	aagaggaaact	ccatggttct	ggatgtggcg	4750

FIG. 6 (Cont.)

ttcgtcctgg	aaggatcggg	caaaaattggt	gaagccgact	tcaacaggag	4800
caaggagttc	atggaggagg	tgattcagcg	gatggatgtg	ggccaggaca	4850
gcattccacgt	cacggtgctg	cagtactcct	acatgggtgac	tgtggagtac	4900
cccttcagcg	aggcacagtc	caaaggggac	atcctgcagc	gggtgcgaga	4950
gatccgctac	caggggcgca	acaggaccac	cactgggctg	gccctgcggt	5000
acctctctga	ccacagcttc	ttggtcagcc	agggtgaccg	ggagcaggcg	5250
cccaacctgg	tctacatggt	caccggaaat	cctgcctctg	atgagatcaa	5100
gaggctgcct	ggagacatcc	aggtgggtgcc	cattggagtg	ggccctaattg	5150
ccaacgtgca	ggagctggag	aggattgggt	ggcccaatgc	ccctatcctc	5200
atccaggact	ttgagacgct	cccccgagag	gctcctgacc	tgggtgctgca	5250
gaggtgctgc	tccggagagg	ggctgcagat	ccccacctc	tccctgcac	5300
ctgactgcag	ccagccctg	gacgtgatcc	ttctcctgga	tggctcctcc	5350
agtttcccag	cttcttattt	tgatgaaatg	aagagtttcg	ccaaggcttt	5400
catttcacaa	gccaatatag	ggcctcgtct	cactcaggtg	tcagtgcctgc	5450
agtatggaag	catcaccacc	attgacgtgc	catggaacgt	ggtcccggag	5500
aaagcccatt	tgctgagcct	tgtggacgtc	atgcagcggg	agggaggccc	5550
cagccaaatc	ggggatgcct	tgggctttgc	tgtgcgatac	ttgaacttcag	5600
aatgcatgg	tgccaggcog	ggagcctcaa	aggcggtggt	catcctggtc	5650
acggacgtct	ctgtggaltc	agtggatgca	gcagctgatg	cgcacaggtc	5700
caacagagtg	acagtgttcc	ctattggaat	tggagatcgc	tacgatgcag	5750
cccagctacg	gatcttgaca	ggcccagcag	gcgactccaa	cgtgggtgaag	5800
ctccagcgaa	togaagacct	ccctaccatg	gtcaccttgg	gcaattcctt	5850
cctccacaaa	ctgtgctctg	gatttgttag	gatttgcattg	gatgaggatg	5900
ggaatgagaa	gaggccccgg	gacgtctgga	ccttgccaga	ccagtgccac	5950
accgtgactt	gccagccaga	tggccagacc	ttgctgaaga	gtcatcgggt	6000
caactgtgac	cgggggctga	ggccttcgtg	ccctaacagc	cagtcccttg	6050
ttaaagtggg	agagacctgt	ggctgccgct	ggacctgcc	ctgcgtgtgc	6100
acaggcagct	ccactcggca	categtgacc	tttgatgggc	agaatttcaa	6150
gctgactggc	agctgttctt	atgtcctatt	tcaaaacaag	gagcaggacc	6200
tggaggatgat	tctccataat	ggtgcctgca	gccctggagc	aaggcagggc	6250
tgcattgaaat	ccatcgaggt	gaagcacagt	gccctctccg	tccagctgca	6300
cagtgcacatg	gaggtgacgg	tgaatgggag	actgggtctct	gttccttacg	6350
tgggtgggaa	catggaagtc	aacgtttatg	gtgccatcat	gcattgaggtc	6400
agattcaatc	accttggtca	catcttcaca	ttcactccac	aaaacaatga	6450
gttccaactg	cagctcagcc	ccaagacttt	tgcttcaaag	acgtatgggtc	6500
tgtgtgggat	ctgtgatgag	aacggagcca	atgacttcat	gctgagggat	6550
ggcacagtca	ccacagactg	gaaaacactt	gttcagggaat	ggactgtgca	6600
gcggccaggg	cagacgtgcc	agcccatcct	ggaggagcag	tgtcttgtcc	6650
ccgacagctc	ccactgccag	gtcctcctct	taccactgtt	tgctgaatgc	6700
cacaagggtcc	tggctccagc	cacattctat	gccatctgcc	agcaggacag	6750
ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggatgat	cgcctcttat	gccacctctt	6800
gtcggaccac	cggggtctgc	gttgactgga	ggacacctga	tttctgtgct	6850
atgtcatgcc	caccatctct	ggtctacaac	cactgtgagc	atggctgtcc	6900
cgggcactgt	gatggcaacg	tgagctcctg	tggggaccat	ccctccgaag	6950
gctgtttctg	ccctccagat	aaagtcatgt	tggaaaggcag	ctgtgtcctt	7000
gaagaggcct	gcactcagtg	cattggtgag	gatggagtcc	agcaccagtt	7050
cctggaagcc	tgggtcccgg	accaccagcc	ctgtcagatc	tgcacatgcc	7100
tcagcgggcg	gaaggtcaac	tgcacaacgc	agcctgccc	cacggccaaa	7150

FIG. 6 (Cont.)

```

gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaattgcaga 7200
ccagtgcctgc cccgagtatg agtgtgtgtg tgacccagtg agctgtgacc 7250
tgccccacgt gctcactgt gaacgtggcc tcagcccac actgaccaac 7300
cctggcgagt gcagacccaa cttcacctgc gctgcagga aggaggagtg 7350
caaaagagtg tccccacct cctgcccccc gcacogtttg cccacacctc 7400
ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa ctgtgtcaac 7450
tccacagtga gctgtccctc tgggtacttg gctcaactg ccaccaatga 7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc 7550
gaagcaccat ctacctgtg ggccagttct gggaggaggg ctgcgatgtg 7600
tgcacctgca ccgacatgga ggatgcctg atgggcctcc gcgtggccca 7650
gtgctcccag aagcctgtg aggacagctg tcggtcgggc ttcacttaag 7700
ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaagg gtgcctcatc tgccctgtgag 7750
gtgggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt 7800
cggtcccag tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg 7850
tccgagtga gaggagggtc ttatacaaac aaaggaaagt ctccctgcccc 7900
cagctggagg tccctgtctg cccctcgggc ttccagctga gctgtaagac 7950
ctcagcgtgc tgcceaagct gtcgctgtga gcgcattggg gctgcattgc 8000
tcaatggcac tgtcatlggg cccgggaaga ctgtgatgat cgatgtgtgc 8050
acgacctgcc gctgcattgg gcagggtggg gtcattctct gattcaagct 8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaacccctg cccctgggt tacaaggaa 8150
aaaataacac aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcctac ggcttgcacc 8200
attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct 8250
ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa ggtcaatgag agaggagagt 8300
acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga tgaacacaag 8350
tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga 8400
cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg 8450
tcaagggtgg aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc 8500
cagggcaaat gtgccagcaa agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt 8550
gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac acggacggag cccatgcagg 8600
tgccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga ggctctcaat 8650
gccatggagt gcaaatgctc cccaggaag tgcagcaagt gaggtgctg 8700
cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca 8750
gagtgtctgc agtctctgct atgttctgct cttgtgcctc tctgagccca 8800
caataaaggc tgagctctta tcttgcaaaa ggc 8833

```

SEQ ID NO:2

```

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Leu Ile Leu Pro Gly
1           5           10          15

Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr Ala Arg Cys
          20          25          30

Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly Ser Met Tyr
          35          40          45

```

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

Ile	Asn	Glu	Met	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	305	310	315	320
Glu	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	325	330	335	
Pro	Cys	Val	His	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	340	345	350	
Arg	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser	355	360	365	
Asn	Glu	Glu	Cys	Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe	370	375	380	
Lys	Ser	Phe	Asp	Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr	385	390	395	400
Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu	405	410	415	
Thr	Val	Gln	Cys	Ala	Asp	Asp	Arg	Asp	Ala	Val	Cys	Thr	Arg	Ser	Val	420	425	430	
Thr	Val	Arg	Leu	Pro	Gly	Leu	His	Asn	Ser	Leu	Val	Lys	Leu	Lys	His	435	440	445	
Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Met	Asp	Gly	Gln	Asp	Val	Gln	Leu	Pro	Leu	Leu	450	455	460	
Lys	Gly	Asp	Leu	Arg	Ile	Gln	His	Thr	Val	Thr	Ala	Ser	Val	Arg	Leu	465	470	475	480
Ser	Tyr	Gly	Glu	Asp	Leu	Gln	Met	Asp	Trp	Asp	Gly	Arg	Gly	Arg	Leu	485	490	495	
Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Pro	Val	Tyr	Ala	Gly	Lys	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	500	505	510	
Gly	Asn	Tyr	Asn	Gly	Asn	Gln	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Thr	Pro	Ser	Gly	515	520	525	
Leu	Ala	Glu	Pro	Arg	Val	Glu	Asp	Phe	Gly	Asn	Ala	Trp	Lys	Leu	His	530	535	540	
Gly	Asp	Cys	Gln	Asp	Leu	Gln	Lys	Gln	His	Ser	Asp	Pro	Cys	Ala	Leu	545	550	555	560

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Cys	Arg	Asp		
			820					825					830				
Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	Asp	His	Val	Cys	Asp	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr		
		835					840					845					
Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe		
	850					855					860						
Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	Val	Leu	Val	Gln	Asp	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn		
865					870					875					880		
Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	Cys	Ser	His	Pro		
			885						890					895			
Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Glu		
		900						905					910				
Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Lys	Arg	Pro	Met	Lys	Asp		
	915						920					925					
Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Arg	Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu		
	930					935					940						
Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Trp	Asp	Arg	His	Leu	Ser	Ile	Ser		
945				950					955						960		
Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly		
			965					970					975				
Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln		
	980						985						990				
Val	Glu	Gln	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser		
	995					1000					1005						
Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro	Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala			
	1010					1015					1020						
Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln	Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser			
	1025					1030					1035						
Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe	Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu			
	1040					1045					1050						
Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val	Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys			
	1055					1060					1065						

FIG. 6 (Cont.)

Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala	Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile
1070						1075					1080			
Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln	His	Gly	Lys	Val	Val	Thr
1085						1090					1095			
Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln	Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn
1100						1105					1110			
Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu	Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys
1115						1120					1125			
Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln	His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala
1130						1135					1140			
Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys	His	Ala	His	Cys	Pro	Pro
1145						1150					1155			
Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln	Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu
1160						1165					1170			
Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly	Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly
1175						1180					1185			
Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp	Pro	Glu	His	Cys	Gln	Ile
1190						1195					1200			
Cys	His	Cys	Asp	Val	Val	Asn	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu
1205						1210					1215			
Pro	Gly	Gly	Leu	Val	Val	Pro	Pro	Thr	Asp	Ala	Pro	Val	Ser	Pro
1220						1225					1230			
Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu	Asp	Ile	Ser	Glu	Pro	Pro	Leu	His	Asp
1235						1240					1245			
Phe	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu	Leu	Asp	Leu	Val	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly
1250						1255					1260			
Ser	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Glu	Phe	Glu	Val	Leu	Lys	Ala	Phe
1265						1270					1275			
Val	Val	Asp	Met	Met	Glu	Arg	Leu	Arg	Ile	Ser	Gln	Lys	Trp	Val
1280						1285					1290			
Arg	Val	Ala	Val	Val	Glu	Tyr	His	Asp	Gly	Ser	His	Ala	Tyr	Ile
1295						1300					1305			

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile	Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln
2030						2035					2040			
Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser	Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser
2045						2050					2055			
Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys	Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn
2060						2065					2070			
Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr
2075						2080					2085			
Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln
2090						2095					2100			
Pro	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu
2105						2110					2115			
Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala
2120						2125					2130			
Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln
2135						2140					2145			
Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn
2150						2155					2160			
Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser
2165						2170					2175			
Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro
2180						2185					2190			
Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser
2195						2200					2205			
Gln	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser
2210						2215					2220			
Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly
2225						2230					2235			
Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro
2240						2245					2250			
Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr
2255						2260					2265			

FIG. 6 (Cont.)

Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys
2270						2275					2280			
Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu
2285						2290					2295			
Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val
2300						2305					2310			
Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly
2315						2320					2325			
Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys
2330						2335					2340			
Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr
2345						2350					2355			
Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn
2360						2365					2370			
Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser
2375						2380					2385			
Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro
2390						2395					2400			
Asp	Lys	Val	Cys	Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln
2405						2410					2415			
Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu
2420						2425					2430			
Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu	Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro
2435						2440					2445			
Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg	Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu
2450						2455					2460			
Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val
2465						2470					2475			
Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val
2480						2485					2490			
Gly	Ser	Gln	Trp	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg
2495						2500					2505			

FIG. 6 (Cont.)

Val	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro
2510						2515					2520			
Gln	Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys
2525						2530					2535			
Lys	Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Cys	Glu	Arg	Met	Glu
2540						2545					2550			
Ala	Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro	Gly	Lys	Thr	Val
2555						2560					2565			
Met	Ile	Asp	Val	Cys	Thr	Thr	Cys	Arg	Cys	Met	Val	Gln	Val	Gly
2570						2575					2580			
Val	Ile	Ser	Gly	Phe	Lys	Leu	Glu	Cys	Arg	Lys	Thr	Thr	Cys	Asn
2585						2590					2595			
Pro	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Lys	Glu	Glu	Asn	Asn	Thr	Gly	Glu	Cys
2600						2605					2610			
Cys	Gly	Arg	Cys	Leu	Pro	Thr	Ala	Cys	Thr	Ile	Gln	Leu	Arg	Gly
2615						2620					2625			
Gly	Gln	Ile	Met	Thr	Leu	Lys	Arg	Asp	Glu	Thr	Leu	Gln	Asp	Gly
2630						2635					2640			
Cys	Asp	Thr	His	Phe	Cys	Lys	Val	Asn	Glu	Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe
2645						2650					2655			
Trp	Glu	Lys	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys
2660						2665					2670			
Cys	Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys
2675						2680					2685			
Cys	Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg
2690						2695					2700			
Leu	Gln	Tyr	Val	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Val
2705						2710					2715			
Asp	Ile	His	Tyr	Cys	Gln	Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Met	Tyr
2720						2725					2730			
Ser	Ile	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser
2735						2740					2745			

FIG. 6 (Cont.)

ES 3 004 108 T3

Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln His Cys Thr Asn Gly Ser Val
 2750 2755 2760

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro
 2765 2770 2775

Arg Lys Cys Ser Lys
 2780

SEQ ID NO:3

Ser Leu Ser Cys Arg Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp
 1 5 10 15

Asn Leu Arg Ala Glu Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr
 20 25 30

Asp Leu Glu Cys Met Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro
 35 40 45

Pro Gly Met Val Arg His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys
 50 55 60

Pro Cys Phe His Gln Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys
 65 70 75 80

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr
 85 90 95

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr
 100 105 110

Leu Thr Phe Asp Gly Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr
 115 120 125

Val Leu Val Gln Asp Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile
 130 135 140

Leu Val Gly Asn Lys Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys
 145 150 155 160

Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly
 165 170 175

Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val
 180 185 190

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

Gly	Pro	Arg	Leu	Thr	Gln	Val	Ser	Val	Leu	Gln	Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr
				965					970					975	
Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro	Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu
			980					985					990		
Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly
		995					1000					1005			
Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	
	1010						1015					1020			
Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	
	1025					1030						1035			
Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	
	1040					1045						1050			
Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	
	1055					1060						1065			
Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	
	1070					1075						1080			
Asn	Val	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	
	1085					1090						1095			
Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	
	1100					1105						1110			
Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	
	1115					1120						1125			
Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	
	1130					1135						1140			
Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	
	1145					1150						1155			
Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	
	1160					1165						1170			
Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	
	1175					1180						1185			
Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	
	1190					1195						1200			

FIG. 6 (Cont.)

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

FIG. 6 (Cont.)

Leu Val	Tyr Asn His Cys Glu	His Gly Cys Pro Arg	His Cys Asp
1445	1450	1455	
Gly Asn	Val Ser Ser Cys Gly	Asp His Pro Ser Glu	Gly Cys Phe
1460	1465	1470	
Cys Pro	Pro Asp Lys Val Met	Leu Glu Gly Ser Cys	Val Pro Glu
1475	1480	1485	
Glu Ala	Cys Thr Gln Cys Ile	Gly Glu Asp Gly Val	Gln His Gln
1490	1495	1500	
Phe Leu	Glu Ala Trp Val Pro	Asp His Gln Pro Cys	Gln Ile Cys
1505	1510	1515	
Thr Cys	Leu Ser Gly Arg Lys	Val Asn Cys Thr Thr	Gln Pro Cys
1520	1525	1530	
Pro Thr	Ala Lys Ala Pro Thr	Cys Gly Leu Cys Glu	Val Ala Arg
1535	1540	1545	
Leu Arg	Gln Asn Ala Asp Gln	Cys Cys Pro Glu Tyr	Glu Cys Val
1550	1555	1560	
Cys Asp	Pro Val Ser Cys Asp	Leu Pro Pro Val Pro	His Cys Glu
1565	1570	1575	
Arg Gly	Leu Gln Pro Thr Leu	Thr Asn Pro Gly Glu	Cys Arg Pro
1580	1585	1590	
Asn Phe	Thr Cys Ala Cys Arg	Lys Glu Glu Cys Lys	Arg Val Ser
1595	1600	1605	
Pro Pro	Ser Cys Pro Pro His	Arg Leu Pro Thr Leu	Arg Lys Thr
1610	1615	1620	
Gln Cys	Cys Asp Glu Tyr Glu	Cys Ala Cys Asn Cys	Val Asn Ser
1625	1630	1635	
Thr Val	Ser Cys Pro Leu Gly	Tyr Leu Ala Ser Thr	Ala Thr Asn
1640	1645	1650	
Asp Cys	Gly Cys Thr Thr Thr	Thr Cys Leu Pro Asp	Lys Val Cys
1655	1660	1665	
Val His	Arg Ser Thr Ile Tyr	Pro Val Gly Gln Phe	Trp Glu Glu
1670	1675	1680	

FIG. 6 (Cont.)

Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met
		1695			
Cys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser
		1710			
His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys
		1725			
Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro
		1740			
Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp
		1755			
Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val
		1770			
Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln
		1785			
Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys
		1800			
Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala
		1815			
Pro	Gly	Lys	Thr	Val	Met
		1830			
Met	Val	Gln	Val	Gly	Val
		1845			
Cys	Thr	Thr	Cys	Asn	Pro
		1860			
Asn	Thr	Gly	Glu	Cys	Cys
		1875			
Phe	Gln	Leu	Arg	Gly	Gly
		1890			
Thr	Leu	Gln	Asp	Gly	Cys
		1905			
Arg	Gly	Glu	Tyr	Phe	Trp
		1920			

Glu	Lys	Arg	Val	Thr	Gly	Cys	Pro	Pro	Phe	Asp	Glu	His	Lys	Cys
1925						1930					1935			
Leu	Ala	Glu	Gly	Gly	Lys	Ile	Met	Lys	Ile	Pro	Gly	Thr	Cys	Cys
1940						1945					1950			
Asp	Thr	Cys	Glu	Glu	Pro	Glu	Cys	Asn	Asp	Ile	Thr	Ala	Arg	Leu
1955						1960					1965			
Gln	Tyr	Val	Lys	Val	Gly	Ser	Cys	Lys	Ser	Glu	Val	Glu	Val	Asp
1970						1975					1980			
Ile	His	Tyr	Cys	Gln	Gly	Lys	Cys	Ala	Ser	Lys	Ala	Met	Tyr	Ser
1985						1990					1995			
Ile	Asp	Ile	Asn	Asp	Val	Gln	Asp	Gln	Cys	Ser	Cys	Cys	Ser	Pro
2000						2005					2010			
Thr	Arg	Thr	Glu	Pro	Met	Gln	Val	Ala	Leu	His	Cys	Thr	Asn	Gly
2015						2020					2025			
Ser	Val	Val	Tyr	His	Glu	Val	Leu	Asn	Ala	Met	Glu	Cys	Lys	Cys
2030						2035					2040			
Ser	Pro	Arg	Lys	Cys	Ser	Lys								
2045						2050								

FIG. 6 (Cont.)