

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 887 187**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/08** (2006.01)

**B01D 61/22** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**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: **23.12.2008** **PCT/US2008/088201**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009** **WO09086400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008** **E 08866246 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021** **EP 2244814**

54 Título: **Formulaciones de VWF recombinante**

30 Prioridad:

**28.12.2007 US 1741807 P**

**31.12.2007 US 1788107 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**22.12.2021**

73 Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED**  
**(100.0%)**

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

72 Inventor/es:

**MATTHIESSEN, PETER;**  
**TURECEK, PETER;**  
**SCHWARZ, HANS-PETER y**  
**SCHNECKER, KURT**

74 Agente/Representante:

**BERTRÁN VALLS, Silvia**

ES 2 887 187 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

Formulaciones de VWF recombinante

- 5 Esta solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/017.418, presentada el 28 de diciembre de 2007, y de la solicitud provisional estadounidense n.º 61/017.881, presentada el 31 de diciembre de 2007.

**Campo de la invención**

- 10 En general, la invención se refiere a formulaciones de VWF recombinante y a métodos para elaborar una composición que comprende VWF recombinante.

**Antecedentes de la invención**

- 15 El factor de von Willebrand (VWF) es una glicoproteína que circula en el plasma como una serie de multímeros cuyo tamaño oscila desde aproximadamente 500 hasta 20.000 kD. Las formas multiméricas del VWF se componen de subunidades polipeptídicas de 250 kD unidas por enlaces disulfuro. El VWF interviene en la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio de la pared vascular dañada. Sólo los multímeros más grandes presentan actividad hemostática. Se supone que las células endoteliales secretan formas poliméricas grandes de VWF y que esas formas de VWF que tienen un peso molecular bajo (VWF de bajo peso molecular) surgen de la escisión proteolítica. Los multímeros de gran masa molecular se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y se liberan tras la estimulación.

- 25 El VWF es sintetizado por las células endoteliales y los megacariocitos como prepro-VWF que consiste en gran medida en dominios repetidos. Al escindir el péptido señal, el pro-VWF se dimeriza a través de enlaces disulfuro en su región C-terminal. Los dímeros sirven como protómeros para la multimerización, que se rige por los enlaces disulfuro entre los extremos libres. El ensamblaje a los multímeros es seguido por la eliminación proteolítica de la secuencia del propéptido (Leyte *et al.*, Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

- 30 El producto primario de traducción predicho a partir del ADNc clonado del VWF es un polipéptido precursor de 2813 residuos (prepro-VWF). El prepro-VWF consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 741 aminoácidos, y el VWF maduro comprende 2050 aminoácidos (Ruggeri Z.A., y Ware, J., FASEB J., 308-316 (1993)).

- 35 Los defectos en el VWF son la causa de la enfermedad de Von Willebrand (VWD), que se caracteriza por un fenotipo hemorrágico más o menos pronunciado. La VWD de tipo 3 es la forma más grave en la que el VWF falta por completo, y la VWD de tipo 1 se está relacionada con una pérdida cuantitativa del VWF y su fenotipo puede ser muy leve. La VWD de tipo 2 está relacionada con defectos cualitativos del VWF y puede ser tan grave como la VWD de tipo 3. La VWD de tipo 2 tiene muchas subformas, algunas de las cuales están asociadas con la pérdida o disminución de los multímeros de alto peso molecular. El síndrome de Von Willebrand de tipo 2a (VWS-2A) se caracteriza por una pérdida tanto de multímeros intermedios como grandes. El VWS-2B se caracteriza por una pérdida de los multímeros de mayor peso molecular. En la técnica se conocen otras enfermedades y trastornos relacionados con el VWF.

- 45 Las patentes estadounidenses n.ºs 6.531.577, 7.166.709 y la solicitud de patente europea n.º 04380188.5 describen formulaciones de VWF derivadas de plasma. Sin embargo, además de los problemas de cantidad y pureza con el VWF derivado de plasma, también existe el riesgo de patógenos de transmisión hemática (por ejemplo, virus y la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob variante (vCID). Los documentos WO9300107, US5900476, US6005077, EP1522312 describen diversas composiciones que comprenden VWF (factor de von Willebrand).

- 50 Por tanto, existe una necesidad en la técnica de desarrollar una formulación farmacéutica estable que comprenda VWF recombinante.

**Sumario de la invención**

- 55 La presente invención proporciona formulaciones útiles para las composiciones que comprenden VWF recombinante, dando como resultado una composición farmacéutica altamente estable. La composición farmacéutica estable es útil como agente terapéutico en el tratamiento de individuos que padecen trastornos o estados que pueden beneficiarse de la administración de VWF recombinante.

- 60 En una realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de un factor de von Willebrand recombinante (rVWF) que comprende: (a) un rVWF; (b) un agente de tamponamiento; (c) una o más sales; (d) opcionalmente un agente estabilizante; y (e) opcionalmente un tensioactivo; en la que el rVWF comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en: a) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; b) un análogo, fragmento o variante biológicamente activo de a); c) un polipéptido codificado por el polinucleótido expuesto en SEQ ID NO: 1; d) un análogo, fragmento o variante biológicamente activo de c); y e) un polipéptido codificado por un polinucleótido que se hibrida con el polinucleótido expuesto en SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridación

moderadamente estrictas; en la que el tampón está compuesto por un agente de tamponamiento de pH en un intervalo de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 500 mM y en la que el pH está en un intervalo de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 12,0; en la que la sal está a una concentración de aproximadamente 1 a 500 mM; en la que el agente estabilizante está a una concentración de aproximadamente 0,1 a 1000 mM; y en la que el tensioactivo está a una concentración de aproximadamente 0,01 g/l a 0,5 g/l según la reivindicación 1.

En otra realización, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que el rVWF comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, glicina, histidina, Tris y combinaciones de estos agentes. En aún otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el agente de tamponamiento es citrato. En todavía otra realización de la invención, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que el pH está en el intervalo de 6,0-8,0 ó 6,5-7,3. En una realización relacionada, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que el pH es 7,0. En otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el agente de tamponamiento es citrato y el pH es 7,0.

En todavía otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, cloruro de sodio y cloruro de magnesio. En otra realización, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que la sal está en un intervalo de concentración de 0,5 a 300 mM. En otra realización, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que la sal es cloruro de calcio a una concentración de 10 mM.

En otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el rVWF comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; en la que el agente de tamponamiento es citrato y el pH es 7,0; y en la que la sal es cloruro de calcio a una concentración de 10 mM. En otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el rVWF comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; en la que el agente de tamponamiento es citrato de sodio y el pH es 7,0; y en la que la sal es cloruro de calcio a una concentración de 10 mM y NaCl a una concentración de 100 mM.

La presente invención también contempla otras formulaciones. Por ejemplo, en una realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el uno o más agentes de tamponamiento son histidina y Tris a una concentración de 3,3 mM cada uno. En otra realización, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que el pH es 7,0. En aún otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que la primera sal es cloruro de sodio a una concentración de 30 mM y la segunda sal es cloruro de calcio a una concentración de 0,56 mM.

En todavía otra realización de la invención, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en manitol, lactosa, sorbitol, xilitol, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa y combinaciones de estos agentes estabilizantes. En otra realización, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de 7,8 mM y manitol a una concentración de 58,6 mM.

En otra realización, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en digitonina, Triton X-100 (octilfenil éter de polioxietileno), Triton X-114 (terc-octilfenil éter de polietilenglicol), TWEEN-20, TWEEN-80 (polisorbatos) y combinaciones de estos tensioactivos. En otra realización, se proporciona la formulación anteriormente mencionada en la que el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.

En una realización de la invención, se proporciona una formulación anteriormente mencionada en la que el rVWF comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3; en la que los agentes de tamponamiento son histidina a una concentración de 3,3 mM y Tris a una concentración de 3,3 mM a pH 7,0; en la que la primera sal es cloruro de sodio a una concentración de 30 mM y la segunda sal es cloruro de calcio a una concentración de 0,56 mM; en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de 7,8 mM y manitol a una concentración de 58,6 mM; y en la que el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.

#### Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra que el rVWF no es estable en tampón Advate después de 26 semanas, debido a la presencia de glutatión.

La figura 2 muestra que el rVWF es estable en tampón Advate 1:3 hasta 12 semanas a 4°C.

La figura 3 muestra que la estabilidad de una formulación a base de citrato es mejor que la formulación de tampón Advate 1:3 que contiene glutatión 0,1 M.

La figura 4 muestra que la concentración de rVWF es estable a lo largo de 26 semanas en tampón Advate.

La figura 5 muestra que la concentración de rVWF es estable a lo largo del tiempo en tampón Advate 1:3.

La figura 6 muestra que la concentración de rVWF es estable a lo largo del tiempo en el tampón a base de citrato.

La figura 7 muestra que la mayoría de los excipientes aumentan la temperatura de desplegamiento de rVWF en aproximadamente 1 ó 2°C.

La figura 8 muestra que  $\text{CaCl}_2$  10 mM aumenta la temperatura de desplegamiento de rVWF en de aproximadamente 8°C a aproximadamente 67°C.

La figura 9 muestra que el efecto de  $\text{CaCl}_2$  es similar a pH 7,3 y a pH 6,5.

## Descripción detallada de la invención

### Definición de términos

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Las siguientes referencias proporcionan a un experto una definición general de muchos de los términos usados en esta invención: Singleton, *et al.*, DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY (2ª ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5ª ED., R. Rieger, *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY (1991).

Cada publicación, solicitud de patente, patente y otra referencia citada en el presente documento se incorpora por referencia en su totalidad en la medida en que no sean inconsecuentes con la presente divulgación.

Cabe destacar que, tal como se usa en esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen una referencia plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Tal como se usa en el presente documento, los siguientes términos tienen el significado que se les atribuye, a menos que se especifique lo contrario.

El término “que comprende”, con respecto a un compuesto peptídico, significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales en uno o ambos extremos amino y carboxilo terminales de la secuencia dada. Por supuesto, estos aminoácidos adicionales no deben interferir significativamente con la actividad del compuesto. Con respecto a una composición de la presente invención, el término “que comprende” significa que una composición puede incluir componentes adicionales. Estos componentes adicionales no deben interferir significativamente con la actividad de la composición.

El término “farmacológicamente activo” significa que se determina que una sustancia así descrita tiene una actividad que afecta a un parámetro médico (por ejemplo, pero sin limitarse a, presión arterial, hemograma, nivel de colesterol) o a un estado patológico (por ejemplo, pero sin limitarse a, cáncer, trastornos autoinmunitarios).

Tal como se usan en el presente documento, los términos “expresar”, “que expresa” y “expresión” significan permitir o hacer que se manifieste la información en un gen o una secuencia de ADN, por ejemplo, produciendo una proteína mediante la activación de las funciones celulares implicadas en la transcripción y traducción de un gen o una secuencia de ADN correspondiente. Una secuencia de ADN se expresa en o por una célula para formar un “producto de expresión” tal como una proteína. También puede decirse que el producto de expresión en sí, por ejemplo, la proteína resultante, se “expresa”. Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. El término “intracelular” significa dentro de una célula. El término “extracelular” significa fuera de una célula, tal como una proteína transmembrana. Una sustancia es “secretada” por una célula si aparece en una medida significativa fuera de la célula, desde algún lugar sobre o dentro de la célula.

Tal como se usa en el presente documento, un “polipéptido” se refiere a un polímero que se compone de residuos de aminoácidos, variantes estructurales, variantes estructurales que se producen de manera natural relacionadas y análogos sintéticos que no se producen de manera natural de los mismos unidos mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos pueden prepararse, por ejemplo, usando un sintetizador automatizado de polipéptidos. El término “proteína” se refiere normalmente a polipéptidos grandes. El término “péptido” se refiere normalmente a polipéptidos cortos.

Tal como se usa en el presente documento, un “fragmento” de un polipéptido se refiere a cualquier porción de un polipéptido o una proteína más pequeña que el producto de expresión de un polipéptido o una proteína de longitud completa.

Tal como se usa en el presente documento, un "análogo" se refiere a cualquiera de dos o más polipéptidos sustancialmente similares en estructura y que tienen la misma actividad biológica, pero que pueden tener diferentes grados de actividad, o bien para la molécula completa o bien para un fragmento de la misma. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos basándose en una o más mutaciones que implican la sustitución de uno o más aminoácidos por otros aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras basándose en la relación fisicoquímica o funcional del aminoácido que se reemplaza y del aminoácido que lo reemplaza.

Tal como se usa en el presente documento, una "variante" se refiere a un polipéptido, una proteína o un análogo de los mismos que se modifica para comprender restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Tales restos pueden modular la solubilidad, la absorción, la semivida biológica, etc., de la molécula. Alternativamente, los restos pueden disminuir la toxicidad de la molécula y eliminar o atenuar cualquier efecto secundario indeseable de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar tales efectos se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences (1980). En la técnica se conocen bien procedimientos para acoplar tales restos a una molécula. Por ejemplo, la variante puede ser un factor de coagulación sanguínea que tiene una modificación química que confiere una semivida más larga *in vivo* a la proteína. En diversos aspectos, los polipéptidos se modifican por glicosilación, pegilación y/o polisialilación.

#### VWF recombinante

Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de prepro-VWF se exponen en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, respectivamente, y están disponibles en los números de registro de GenBank NM\_000552 y NP\_000543, respectivamente. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína VWF madura se expone en SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los aminoácidos 764-2813 de la secuencia de aminoácidos de prepro-VWF de longitud completa).

Una forma de rVWF útil tiene al menos la propiedad de estabilizar *in vivo*, por ejemplo, unir, al menos una molécula de factor VIII (FVIII) y tener opcionalmente un patrón de glicosilación que es farmacológicamente aceptable. Los ejemplos específicos del mismo incluyen VWF sin el dominio A2, por tanto, resistente a la proteólisis (Lankhof *et al.*, Thromb. Haemost. 77: 1008-1013, 1997), y el fragmento de VWF de Val 449 a Asn 730 que incluye el dominio de unión a la glicoproteína 1b y sitios de unión para el colágeno y la 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 puede llevarse a cabo en mamíferos deficientes en VWF según métodos conocidos en el estado de la técnica.

El rVWF de la presente invención puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se divulga en el documento WO86/06096, publicado el 23 de octubre de 1986, y en la solicitud de patente estadounidense n.º 07/559.509, presentada el 23 de julio de 1990, que se incorpora en el presente documento por referencia con respecto a los métodos de producción del VWF recombinante. Por tanto, en la técnica se conocen métodos para (i) producir ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células procariotas o eucariotas por transfección, por ejemplo, mediante electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, por ejemplo, de manera continua o discontinua, (iv) expresar el VWF, por ejemplo, de manera constitutiva o por inducción, y (v) aislar dicho VWF, por ejemplo, a partir del medio de cultivo o recogiendo las células transformadas, con el fin de (vi) obtener el rVWF purificado, por ejemplo, mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. Un VWF recombinante puede elaborarse en células huésped transformadas usando técnicas de ADN recombinante bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, las secuencias que codifican para el polipéptido pueden extraerse del ADN usando enzimas de restricción adecuadas.

Alternativamente, la molécula de ADN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis química, tales como el método del fosforamido. También podría usarse una combinación de estas técnicas.

La invención también proporciona vectores que codifican para polipéptidos de la invención en un huésped apropiado. El vector comprende el polinucleótido que codifica para el polipéptido unido operativamente a secuencias de control de la expresión apropiadas. Los métodos para llevar a cabo esta unión operativa, o bien antes o bien después de la inserción del polinucleótido en el vector, son bien conocidos. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión al ribosoma, señales de inicio, señales de parada, señales de cápside, señales de poliadenilación y otras señales relacionadas con el control de la transcripción o traducción. El vector resultante que contiene el polinucleótido se usa para transformar un huésped apropiado. Esta transformación puede realizarse mediante métodos bien conocidos en la técnica.

En la práctica de esta invención puede usarse cualquiera de un gran número de células huésped disponibles y bien conocidas. La selección de un huésped particular depende de varios factores reconocidos en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la tasa de transformación, la facilidad de recuperación de los péptidos, las características de expresión, la seguridad biológica y los costes. Hay que encontrar un equilibrio entre estos factores, teniendo en cuenta que no todas las células huésped son igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas directrices generales, las células huésped microbianas útiles incluyen bacterias, levaduras y otros

hongos, insectos, plantas, células de mamíferos (incluyendo humanos) en cultivo, u otros huéspedes conocidos en la técnica.

A continuación, se cultiva y purifica el huésped transformado. Las células huésped pueden cultivarse en condiciones de fermentación convencionales para que se expresen los compuestos deseados. Tales condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Por último, los polipéptidos se purifican a partir del cultivo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Dependiendo de la célula huésped usada para expresar un compuesto de la invención, los grupos de hidratos de carbono (oligosacáridos) pueden unirse convenientemente a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en las proteínas. Generalmente, los oligosacáridos ligados a O se unen a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos ligados a N se unen a residuos de asparagina (Asn) cuando forman parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos que se producen de manera natural sin contar la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos ligados a N y a O y los residuos de azúcar que se encuentran en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra habitualmente en ambos es el ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal tanto de los oligosacáridos ligados a N como de los ligados a O y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal(es) sitio(s) puede(n) incorporarse en el ligador de los compuestos de esta invención y preferiblemente se someten a glicosilación por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamíferos tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden someterse a glicosilación adicional mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

Alternativamente, los compuestos pueden elaborarse mediante métodos sintéticos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de síntesis en fase sólida. Las técnicas adecuadas son bien conocidas en la técnica, e incluyen las descritas en Merrifield (1973), *Chem. Polyptides*, págs. 335-61 (Katsoyannis and 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 estadounidense n.º 3.941.763; Finn *et al.* (1976), *The Proteins* (3ª ed.) 2: 105-253; y Erickson *et al.* (1976), *The Proteins* (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para elaborar péptidos individuales, ya que es el método más rentable para elaborar péptidos pequeños.

#### Fragmentos, variantes y análogos del VWF

En la técnica se conocen bien métodos para preparar fragmentos, variantes o análogos polipeptídicos.

Los fragmentos de un polipéptido se preparan usando, sin limitación, escisión enzimática (por ejemplo, tripsina, quimotripsina) y también usando medios recombinantes para generar un fragmento de polipéptido que tenga una secuencia de aminoácidos específica. Pueden generarse fragmentos polipeptídicos que comprenden una región de la proteína que tiene una actividad particular, tal como un dominio de multimerización o cualquier otro dominio identificable del VWF conocido en la técnica.

También se conocen bien métodos de elaboración de análogos polipeptídicos. Los análogos de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido pueden ser análogos de sustitución, inserción o delección. Los análogos de delección, incluyendo los fragmentos de un polipéptido, carecen de uno o más residuos de la proteína nativa que no son esenciales para la función o actividad inmunogénica. Los análogos de inserción implican la adición de, por ejemplo, aminoácidos en un punto no terminal del polipéptido. Este análogo puede incluir la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente un único residuo. Los análogos de adición, incluyendo los fragmentos de un polipéptido, incluyen la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera de los dos extremos de una proteína, e incluyen, por ejemplo, las proteínas de fusión.

Los análogos de sustitución normalmente intercambian un aminoácido de 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 de otras funciones o propiedades. En un aspecto, las sustituciones son sustituciones conservadoras. Por "sustitución conservadora de aminoácidos" se entiende la sustitución de un aminoácido por otro que tiene una cadena lateral de carácter químico similar. Los aminoácidos similares para realizar 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).

Los análogos pueden ser sustancialmente homólogos o sustancialmente idénticos al VWF recombinante del que derivan. Los análogos preferidos son aquellos que conservan al menos parte de la actividad biológica del polipéptido de tipo natural, por ejemplo, la actividad de coagulación sanguínea.

Las variantes polipeptídicas contempladas incluyen polipéptidos modificados químicamente por técnicas tales como ubiquitinación, glicosilación, incluyendo polisialación, conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcaje,

unión covalente de polímeros tal como pegilación (derivación con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que normalmente no se producen en las proteínas humanas. Las variantes conservan las mismas o esencialmente las mismas propiedades de unión de las moléculas no modificadas de la invención. Tal modificación química puede incluir la unión directa o indirecta (por ejemplo, mediante un ligador) de un agente al polipéptido VWF. En el caso de unión indirecta, se contempla que el ligador puede ser hidrolizable o no hidrolizable.

La preparación de análogos polipeptídicos pegilados comprenderá generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de PEG) en condiciones en las que el polipéptido del constructo de unión se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener el/los producto(s) de reacción. En general, las condiciones óptimas de reacción para las reacciones de acilación se determinarán basándose en los parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la razón de PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto polipegilado. En algunas realizaciones, el constructo de unión tendrá un único resto PEG en el extremo N-terminal. El polietilenglicol (PEG) puede unirse al factor de coagulación sanguínea para proporcionar una semivida más larga *in vivo*. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio del PEG oscila desde aproximadamente 2 kiloDalton ("kD") hasta aproximadamente 100 kDa, desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 50 kDa o desde aproximadamente 5 kDa hasta aproximadamente 10 kDa. Los grupos PEG se unen al factor de coagulación sanguínea mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo natural o modificado por ingeniería en el resto PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) a un grupo reactivo en el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, 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 estadounidense 20060160948, Fernandes y Gregoriadis; Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997, y Saenko *et al.*, Haemophilia 12:42-51, 2006. Brevemente, una disolución de ácido colomínico que contiene NaIO<sub>4</sub> 0,1 M se agita en la oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. La disolución de CA activado se dializa contra, por ejemplo, tampón fosfato de sodio 0,05 M, pH 7,2 en la oscuridad, y esta disolución se añadió a una disolución de rVWF y se incubó durante 18 h a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. A continuación, los reactivos libres pueden separarse del conjugado rVWF-poli(ácido siálico) mediante ultrafiltración/diafiltración. La conjugación de rVWF con el poli(ácido siálico) también puede lograrse usando glutaraldehído como reactivo de reticulación (Migneault *et al.*, Biotechniques 37: 790-796, 2004).

Se contempla además que un polipéptido de la invención puede ser una proteína de fusión con un segundo agente que es un polipéptido. En una realización, el segundo agente que es un polipéptido, sin limitación, es una enzima, un factor de crecimiento, un anticuerpo, una citocina, una quimiocina, un receptor de superficie celular, el dominio extracelular de un receptor de superficie celular, una molécula de adhesión celular o un fragmento o dominio activo de una proteína descrita anteriormente. En una realización relacionada, el segundo agente es un factor de coagulación sanguínea, tal como el factor VIII, el factor VII o el factor IX. La proteína de fusión contemplada se elabora mediante técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la técnica.

También se contempla que los polipéptidos prepro-VWF y pro-VWF pueden proporcionar un beneficio terapéutico en las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, la patente estadounidense 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 los fragmentos, variantes o análogos recombinantes y biológicamente activos del VWF maduro que se produce de manera natural, la presente invención contempla el uso de fragmentos, variantes o análogos recombinantes y biológicamente activos del prepro-VWF (expuesto en SEQ ID NO: 2) o de los polipéptidos pro-VWF (residuos de aminoácidos 23 a 764 de SEQ ID NO: 2) en las formulaciones descritas en el presente documento.

Los polinucleótidos que codifican para fragmentos, variantes y análogos pueden generarse fácilmente por un trabajador experto en codificar fragmentos, variantes o análogos biológicamente activos de la molécula que se produce de manera natural que poseen la misma actividad biológica o similar que la molécula que se produce de manera natural. Estos polinucleótidos pueden prepararse mediante técnicas de PCR, digestión/ligación de la molécula codificadora de ADN y similares. Por tanto, un experto en la técnica podrá generar cambios de una sola base en la cadena de ADN para dar lugar a un codón alterado y a una mutación de aminoácido, usando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo, pero sin limitarse a, mutagénesis específica de sitio. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones de hibridación moderadamente estrictas" significa, por ejemplo, hibridación a 42°C en formamida al 50% y lavado a 60°C en 0,1 x SSC, SDS al 0,1%. Los expertos en la técnica entienden que la variación de estas condiciones se produce basándose en la longitud y el contenido de bases de nucleótidos GC de las secuencias que van a hibridarse. Las fórmulas convencionales en la técnica son apropiadas para determinar las condiciones exactas de hibridación. Véase Sambrook *et al.*, 9.47-9.51 en Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

#### Formulaciones y excipientes en general

Los excipientes son aditivos que se incluyen en una formulación porque o bien imparten o bien potencian la estabilidad y la administración de un medicamento. Independientemente del motivo de su inclusión, los excipientes son un

componente integral de un medicamento y, por tanto, deben ser seguros y bien tolerados por los pacientes. En el caso de los fármacos proteicos, la elección de los excipientes es especialmente importante porque pueden afectar tanto a la eficacia como a la inmunogenicidad del fármaco. Por tanto, las formulaciones de proteínas deben desarrollarse con una selección adecuada de excipientes que ofrezcan estabilidad, seguridad y comerciabilidad adecuadas.

El principal reto en el desarrollo de formulaciones para proteínas terapéuticas es estabilizar el producto frente a las tensiones de la fabricación, el transporte y el almacenamiento. El papel de los excipientes en las formulaciones es proporcionar estabilización frente a estas tensiones. Los excipientes también pueden emplearse para reducir la viscosidad de las 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 basándose en los mecanismos por los que estabilizan las proteínas frente a diversas tensiones químicas y físicas. Algunos excipientes se usan 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 la estabilidad física y covalente de las proteínas. Los excipientes descritos en el presente documento se organizan por su tipo químico o por su papel funcional en las formulaciones. Al comentar cada tipo de excipiente, se describen brevemente los modos de estabilización.

Dadas las enseñanzas y la directriz proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o intervalo de excipiente puede incluirse en cualquier formulación particular para lograr una formulación biofarmacéutica de la invención que fomente la retención en la estabilidad del biofármaco (por ejemplo, un polipéptido). Por ejemplo, la cantidad y el tipo de una sal que debe incluirse en una formulación biofarmacéutica de la invención puede seleccionarse en función de la osmolalidad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la disolución final, así como de las cantidades y la osmolalidad de otros componentes que deben incluirse en la formulación. Del mismo modo, ejemplificando con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de un excipiente de este tipo dependerá de su osmolalidad.

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

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

Por supuesto, un experto habitual 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 puede reducirse cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de polipéptido o cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de agente estabilizante. Además, un experto habitual en la técnica reconocería que, para mantener la isotonicidad de una formulación particular en la que no hay agente de carga, la concentración de un agente estabilizante se ajustaría por consiguiente (es decir, se usaría una cantidad "tonificante" de estabilizador). En la técnica se conocen excipientes habituales y pueden encontrarse en Powell *et al.*, Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311.

#### Tampones y agentes de tamponamiento

Se observa habitualmente que la estabilidad de una formulación de polipéptido farmacológicamente activa es máxima en un estrecho intervalo de pH. Este intervalo de pH de estabilidad óptima debe identificarse pronto durante los estudios de preformulación. Varios enfoques, tales como los estudios de estabilidad en condiciones aceleradas y los estudios de cribado calorimétrico, han demostrado ser útiles en esta tarea (Remmele R.L. Jr., *et al.*, Biochemistry, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez finalizada la formulación, el medicamento debe fabricarse y mantenerse durante toda su vida útil. Por tanto, casi siempre se emplean agentes de tamponamiento para controlar el pH de la formulación.

Los ácidos orgánicos, los fosfatos y el Tris se han empleado habitualmente como tampones en las formulaciones de proteínas. La capacidad tampón de las especies de tamponamiento es máxima a un pH igual al pKa y disminuye a medida que el pH aumenta o se aleja de este valor. El noventa por ciento de la capacidad de tamponamiento existe dentro de una unidad de pH de su pKa. La capacidad tampón también aumenta proporcionalmente al aumentar la concentración del tampón.

Cuando se elige un tampón hay que tener en cuenta varios factores. En primer lugar, hay que definir la especie tampón y su concentración en función de su pKa y del pH deseado de la formulación. Igualmente importante es garantizar que el tampón sea compatible con el polipéptido 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 escozor e irritación que el tampón



puede inducir tras su administración. Por ejemplo, se sabe que el citrato provoca escozor tras su inyección (Laursen T, *et al.*, Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98(2): 218-21 (2006)). El potencial de escozor e irritación es mayor para los fármacos que se administran por vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM), donde la disolución del fármaco permanece en el lugar durante un periodo de tiempo relativamente más largo que cuando se administra por vía intravenosa (IV), donde la formulación se diluye rápidamente en la sangre tras su administración. En el caso de las 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 fosfato de potasio, que pueden inducir efectos cardiovasculares en el paciente (Hollander-Rodriguez JC, *et al.*, Am. Fam. Physician., 73(2): 283-90 (2006)).

El sistema 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 disolución está entre pH 2,0 y pH 12,0. Por ejemplo, el pH de la disolución 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 ó 12,0.

El compuesto de tamponamiento del pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación en un nivel predeterminado. En una realización, la concentración de tamponamiento del pH está 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, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500 mM.

Los agentes de tamponamiento de pH a modo de ejemplo usados para tamponar la formulación tal como se establece en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato, citrato, Tris y aminoácidos o mezclas de aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a, aspartato, histidina y glicina.

#### Sales

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

#### Estabilizadores y agentes de carga

En las presentes formulaciones farmacéuticas, puede añadirse un estabilizador (o una combinación de estabilizadores) para evitar o reducir la agregación y la degradación química inducidas por el almacenamiento. Una disolución turbia o nebulosa tras la reconstitución indica que la proteína ha precipitado o al menos se ha agregado. El término "estabilizador" significa un excipiente capaz de evitar la agregación u otra degradación física, así como la degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.) en estado acuoso. Los estabilizadores que se emplean convencionalmente en las composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, HCl de arginina, compuestos polihidroxilados, incluyendo polisacáridos tales como dextrano, almidón, hidroxietilalmidón, ciclodextrinas, N-metilpirrolidona, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio, [Carpenter *et al.*, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]. En las presentes formulaciones, el estabilizador se incorpora a 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 ó 1000 mM.

Si se desea, las formulaciones también incluyen cantidades apropiadas de agentes de carga y reguladores de la osmolaridad. Los agentes de carga incluyen, por ejemplo, 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 a 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 ó 1000 mM.

#### Tensioactivos

Las moléculas de proteínas tienen una alta propensión a interactuar con las superficies, lo que las hace susceptibles a adsorción y desnaturación en las superficies de contacto aire-líquido, vial-líquido y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta ruta de degradación es inversamente dependiente de la concentración de proteína

y da lugar o bien a la formación de agregados de proteínas solubles e insolubles o bien a la pérdida de la proteína a partir de la disolución mediante la adsorción a las superficies. Además de la adsorción a la superficie del recipiente, la degradación inducida por la superficie se agrava con la agitación física, tal como la que se experimentaría durante el transporte y la manipulación del producto.

Los tensioactivos se usan habitualmente en las formulaciones de proteínas para evitar la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas anfipáticas capaces de superar en la competencia a las proteínas por las posiciones interfaciales. Las porciones hidrófobas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones interfaciales (por ejemplo, aire/líquido), mientras que las porciones hidrófilas de las moléculas permanecen orientadas hacia el disolvente a granel. A concentraciones suficientes (normalmente en torno a la concentración micelar crítica del detergente), una capa superficial de moléculas de tensioactivo sirve para impedir que las moléculas de proteínas se adsorban en la superficie de contacto. De este modo, se minimiza la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos más habitualmente usados son los ésteres de ácidos grasos de los polietoxilatos de sorbitano, es decir, el polisorbato 20 y el polisorbato 80. Ambos difieren únicamente en la longitud de la cadena alifática que confiere 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 en este caso, los efectos de un determinado excipiente detergente serán específicos para cada proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la de otras. La desestabilización de las proteínas por parte de los detergentes puede racionalizarse en cuanto a las colas hidrófobas de las moléculas de detergente, que pueden participar en la unión específica con estados parcial o totalmente desplegados de la proteína. Este tipo de interacciones podría provocar un desplazamiento en el equilibrio conformacional hacia los estados más expandidos de la proteína (es decir, aumentar la exposición de las porciones hidrófobas de la molécula de proteína como complemento 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 provocar la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de proteínas, especialmente la metionina. El potencial de daño oxidativo derivado de la adición del estabilizador enfatiza el punto de que deben usarse las concentraciones eficaces más bajas de excipientes en las formulaciones. En el caso de los tensioactivos, la concentración eficaz para una proteína determinada dependerá del mecanismo de estabilización. Se ha postulado que si el mecanismo de estabilización del tensioactivo está relacionado con la evitación de la desnaturalización en la superficie, la concentración eficaz estará en torno a la concentración micelar crítica del detergente. Por el contrario, si el mecanismo de estabilización está asociado a interacciones específicas entre proteína y detergente, la concentración eficaz de tensioactivo estará relacionada con la concentración de proteína y la estequiometría de la interacción (Randolph T.W., *et al.*, Pharm Biotechnol., 13:159-75 (2002)).

También pueden añadirse tensioactivos en cantidades adecuadas para evitar el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante la congelación y el secado [Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y anfóteros, incluyendo tensioactivos derivados de aminoácidos que se producen de manera natural. Los tensioactivos aniónicos incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio, sulfosuccinato de dioctilo-sodio y sulfonato de dioctilo-sodio, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, sal de sodio del ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio y sal de sodio del ácido glicodesoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos zwitteriónicos 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 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 ácidos grasos de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Por tanto, se proporcionan composiciones que comprenden estos tensioactivos, o bien individualmente o bien como una mezcla en diferentes razones. En las presentes formulaciones, el tensioactivo se incorpora a una concentración de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,5 g/l.

#### Otros componentes excipientes habituales

##### Aminoácidos

Los aminoácidos han encontrado un uso versátil en las formulaciones de proteínas como tampones, agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes. La histidina y el ácido glutámico se emplean para tamponar las formulaciones de proteínas en el intervalo de pH de 5,5 a 6,5 y de 4,0 a 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 tamponar en sus intervalos de pH respectivos. El ácido glutámico es especialmente útil en estos casos (por ejemplo, Stemgen®). La histidina se encuentra habitualmente en las formulaciones de proteínas comercializadas (por ejemplo, Xolair®, Herceptin®, Recombinate®), y este aminoácido proporciona una alternativa al citrato, un tampón conocido por escocer tras su inyección. Curiosamente, también se ha informado de que la histidina tiene un efecto estabilizante, tal como se ha observado en formulaciones con ABX-IL8 (un anticuerpo IgG2), con respecto a la agregación cuando se usa a altas concentraciones tanto en presentaciones líquidas como liofilizadas (Chen B, *et al.*, Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). También se observó que la histidina (hasta 60 mM) reducía la viscosidad de una formulación de alta concentración de este anticuerpo. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron un aumento de la agregación y decoloración en las formulaciones que contenían histidina durante los estudios de congelación-descongelación del anticuerpo en recipientes de acero inoxidable. Los autores atribuyeron esto a un efecto de los iones de hierro lixiviados por la corrosión de los recipientes de acero. Otra nota de precaución con la histidina es que experimenta fotooxidación en presencia de iones metálicos (Tomita M, *et al.*, Biochemistry, 8(12): 5149-60 (1969)). El uso de la metionina como antioxidante en las formulaciones parece prometedor; se ha observado que es eficaz contra una serie de tensiones oxidativas (Lam XM, *et al.*, J Pharm Sci., 86(11): 1250-5 (1997)).

Se ha demostrado que los aminoácidos glicina, prolina, serina y alanina estabilizan las proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferente. La glicina es también un agente de carga habitualmente usado en formulaciones liofilizadas (por ejemplo, Neumega®, Genotropin®, Humatrope®). La arginina ha demostrado ser un agente eficaz para inhibir la agregación y se ha usado tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas (por ejemplo, Activase®, Avonex®, Enbrel® líquido). Además, se ha atribuido la eficacia potenciada de replegamiento de determinadas proteínas en presencia de arginina a su supresión de la reacción de agregación competitiva durante el replegamiento.

#### Antioxidantes

La oxidación de los residuos de las proteínas procede de varias fuentes diferentes. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la prevención del daño oxidativo de las proteínas implica el control cuidadoso de una serie de factores a lo largo del procedimiento de fabricación y almacenamiento del producto, tales como el oxígeno atmosférico, la temperatura, la exposición a la luz y la contaminación química. Los antioxidantes farmacéuticos más habitualmente usados son agentes reductores, eliminadores de oxígeno/radicales libres o agentes quelantes. Los antioxidantes en las formulaciones de proteínas terapéuticas son solubles en agua y permanecen activos durante toda la vida útil del producto. Los agentes reductores y los eliminadores de oxígeno/radicales libres actúan eliminando las especies activas de oxígeno en disolución. Los agentes quelantes, tales como el EDTA, son eficaces al unir trazas de contaminantes metálicos que fomentan la formación de radicales libres. Por ejemplo, el EDTA se usó en la formulación líquida del factor de crecimiento de fibroblastos ácido para inhibir la oxidación catalizada por iones metálicos de los residuos de cisteína. El EDTA se ha usado en productos comercializados como Kineret® y Ontak®.

Además de la eficacia de diversos excipientes para evitar la oxidación de las proteínas, es preocupante la posibilidad de que los propios antioxidantes induzcan otros cambios covalentes o físicos en la proteína. Por ejemplo, los agentes reductores pueden provocar la interrupción de los enlaces disulfuro intramoleculares, lo que puede conducir a un desprendimiento de disulfuro. En presencia de iones de metales de transición, se ha demostrado que el ácido ascórbico y el EDTA fomentan la oxidación de la 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 and Francis, RU (1999)); Fransson J.R., J. Pharm. Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, *et al.*, Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha informado de que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de metionina inducida por la luz y la 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 realiza según las tensiones y sensibilidades específicas de la proteína.

#### Iones metálicos

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, algunos iones metálicos específicos se incluyen en las formulaciones cuando son cofactores de las proteínas y en las formulaciones en suspensión de proteínas en las que forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión de zinc de la insulina). Recientemente, se ha propuesto el uso de iones de magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico para dar ácido isoaspártico (documento WO 2004039337).

Dos ejemplos en los que los iones metálicos confieren estabilidad o aumentan la actividad de las proteínas son la desoxirribonucleasa humana (ADNasarh, Pulmozyme®) y el factor VIII. En el caso de la ADNasarh, los iones  $\text{Ca}^{+2}$  (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 retirada de los iones de calcio a partir de la disolución con EGTA provocó un aumento de la desamidación y agregación. Sin embargo, este efecto sólo se observó con los iones  $\text{Ca}^{+2}$ ; se observó que otros cationes divalentes,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , desestabilizaban la ADNasarh. Se observaron efectos similares en el factor VIII. Los iones  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{Sr}^{+2}$  estabilizaron la proteína mientras que otros como  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  y  $\text{Fe}^{+2}$ .

desestabilizaron la enzima (Fatouros, A., *et al.*, Int. J. Pharm., 155, 121-131 (1997). En otro estudio con el factor VIII, se observó un aumento significativo de 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, tales como las sales tampón, están a menudo contaminados con iones  $Al^{+3}$  e ilustran la necesidad de usar excipientes de calidad apropiada en los productos formulados.

### Conservantes

Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales multiuso que implican más de una extracción a partir del mismo recipiente. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante toda la vida útil o el plazo de uso del medicamento. Los conservantes usados habitualmente incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyan conservantes puede ser un reto. 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 las formulaciones de proteínas multidosis (Roy S, *et al.*, J Pharm Sci., 94(2): 382-96 (2005)).

Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un único uso. Sin embargo, cuando las formulaciones multidosis son posibles, tienen la ventaja añadida de permitir la comodidad del paciente y una mayor comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona de crecimiento humana (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha conducido a la comercialización de presentaciones de pluma de inyección más convenientes y multiuso. En la actualidad existen en el mercado al menos cuatro 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.

Hay que tener en cuenta varios aspectos durante el desarrollo de la formulación de las formas de dosificación conservadas. La concentración eficaz del conservante en el medicamento debe optimizarse. Esto requiere someter a prueba un conservante determinado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieran eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina 1 (tipo I), se examinaron con éxito tres conservantes usando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los conservantes se clasificaron basándose en su impacto en la estabilidad a las concentraciones usadas habitualmente en los productos comercializados (Remmele RL Jr., *et al.*, Pharm Res., 15(2): 200-8 (1998)).

Algunos conservantes pueden provocar reacciones en el sitio de inyección, que es otro factor que debe tenerse en cuenta a la hora de elegir un conservante. En los 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 Supl. 3:98-103 (2004)). Curiosamente, entre los conservantes usados habitualmente, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC y Sun DA., Anesth Analg., 100(3): 683-6 (2005)).

### Liofilización

También se contempla que las formulaciones que comprenden un polipéptido de VWF de la invención pueden liofilizarse antes de su administración. La liofilización se lleva a cabo mediante técnicas habituales en la técnica y debe optimizarse para la composición que esté desarrollándose [Tang *et al.*, Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang *et al.*, Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

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 disolución 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, usando un vacío e introduciendo calor para fomentar la sublimación. Por último, el agua adsorbida o ligada se retira en la etapa de secado secundario a una presión de cámara reducida y a una temperatura de estante elevada. El procedimiento produce un material conocido como torta liofilizada. Posteriormente, la torta puede reconstituirse o bien con agua estéril o bien con un diluyente adecuado para inyección.

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, el aspecto, la estabilidad y el contenido final de humedad. La estructura de la composición en el estado congelado pasa por varias transiciones (por ejemplo, transiciones vítreas, humectaciones y cristalizaciones) que se producen a temperaturas específicas y pueden usarse para comprender y optimizar el proceso 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). La  $T_g$  y la  $T_g'$  son un parámetro importante que debe tenerse en cuenta al diseñar el ciclo de liofilización. Por ejemplo, la  $T_g'$  es importante para el secado primario. Además, en el estado seco, la temperatura de transición vítrea proporciona información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

### Métodos de preparación

La presente invención contempla además métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con conservantes para uso multidosis o agua con cantidades apropiadas de tensioactivos (por ejemplo, polisorbato-20), solución salina al 0,4%, glicina al 0,3% o suspensiones acuosas, pueden contener el compuesto activo en mezcla conjunta con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. En diversos aspectos, tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido que se produce de manera natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, tales como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietilensorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, p-hidroxibenzoato de etilo, o de n-propilo.

### Administración

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

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por pulverización inhalatoria, vaginal, rectal o por inyección intracraneal. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyecciones intracisternales o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar o la implantación quirúrgica en un lugar determinado. Por lo general, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían ser perjudiciales para el receptor.

Pueden llevarse a cabo administraciones únicas o múltiples de las composiciones, siendo el médico responsable quien seleccione los niveles de dosis y la pauta. Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, tal y como se ha definido anteriormente, de la gravedad y el transcurso de la enfermedad, de si el fármaco se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, de la anamnesis del paciente y de su respuesta al fármaco, así como del criterio del médico especialista.

### Kits

Como aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una o más formulaciones farmacéuticas envasadas de una manera que facilita su uso para la administración a los sujetos. En una realización, un kit de este tipo incluye la formulación farmacéutica descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o un péptido terapéutico), envasada en un recipiente tal como una botella o un frasco sellado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o la composición en la práctica del método. En una realización, la formulación farmacéutica se envasa en el recipiente de manera que la cantidad de espacio de cabeza en el recipiente (por ejemplo, la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del recipiente) es muy pequeña. Preferiblemente, la cantidad de espacio de cabeza es insignificante (es decir, casi inexistente). En una realización, el kit contiene un primer recipiente con una composición de proteínas o péptidos terapéuticos y un segundo recipiente con una disolución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición. En un aspecto, la formulación farmacéutica está envasada en una 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.

### Dosificaciones

La pauta posológica implicada en un método para tratar un estado descrito en el presente documento la determinará el médico especialista, teniendo en cuenta diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A modo de ejemplo, una dosis típica de un VWF recombinante de la presente

invención es de aproximadamente 50 U/kg, equivalente a 500 µg/kg.

Las formulaciones de la invención pueden administrarse mediante un bolo inicial seguido de una infusión continua para mantener los niveles terapéuticos circulantes del medicamento. Como otro ejemplo, el compuesto de la invención puede administrarse como una dosis única. Los expertos habituales en la técnica optimizarán fácilmente las dosis eficaces y las pautas de administración según la buena práctica médica y el estado clínico de cada paciente. La frecuencia de la administración de dosis dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y de la vía de administración. El experto en la técnica determinará la formulación farmacéutica óptima dependiendo de la vía de administración y de la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, la estabilidad, la tasa de liberación *in vivo* y la tasa de aclaramiento *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, puede calcularse una dosis adecuada en función del peso corporal, el área de superficie corporal o el tamaño de los órganos. Las dosis adecuadas pueden determinarse mediante el uso de ensayos establecidos para determinar las dosificaciones a nivel sanguíneo junto con los datos apropiados de respuesta a la dosis. La pauta posológica final la determinará el médico especialista, teniendo en cuenta diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, el estado, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se lleven a cabo estudios, surgirá más información sobre los niveles de dosificación y la duración del tratamiento adecuados para las distintas enfermedades y estados.

Los siguientes ejemplos no pretenden ser limitativos, sino sólo a modo de ejemplo de realizaciones específicas de la invención.

#### Ejemplo 1

##### Experimentos de agitación

Con el fin de determinar la cantidad de precipitación de rVWF en diversas formulaciones, se sometió a prueba el porcentaje de recuperación de rVWF tras la agitación turbulenta en diversas condiciones.

Se sometió rVWF en tampón Advate (NaCl 90 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,68 mM, L-histidina 10 mM, Tris 10 mM, glutatión 0,26 mM, trehalosa 23,4 mM, manitol 175,7 mM y TWEEN-80 0,1 g/l, pH 7,0) o tampón Advate 1:3 (tampón Advate diluido 3 veces en agua) a agitación turbulenta en un agitador a temperatura ambiente (TA) durante 0 minutos, 1 minuto, 2,5 horas o 4 días, y se midió el porcentaje de recuperación de rVWF en relación con el material de partida antes de la agitación. Tal como se muestra en la tabla 1, se observaron pérdidas de aproximadamente el 40-80% en tampón Advate, mientras que se observaron pérdidas de aproximadamente el 20-30% en tampón Advate 1:3. El antígeno de VWF, VWF:Ag, corresponde a la cantidad de VWF que puede detectarse en un ELISA específico de VWF usando un anticuerpo policlonal anti-VWF, mientras que VWF:RCo corresponde a la cantidad de VWF que provoca la aglutinación de plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina. En ambos casos, como patrón se usó plasma humano de referencia calibrado frente al patrón real de la OMS (1 ml de plasma de referencia contiene habitualmente 1 U de VWF).

Tabla 1. Influencia del tiempo de agitación turbulenta en la recuperación de rVWF

rVWF	Agitación turbulenta a TA	VWF:Ag [U/ml]	Recuperación [%]	VWF:RCo [U/ml]	Recuperación [%]	RCo/VWF:Ag [U/U]
Advate	0 minutos	213	100%	104	100%	0,49
	1 minuto	120	56%			
	2,5 horas	139	65%			
	4 d	37	17%	7	7%	0,19
Advate 1:3	0 minutos	206	100%	134	100%	0,65
	1 minuto	152	74%			
	2,5 horas	170	82%			
	4 d	138	67%	131	98%	0,95

También se sometió a prueba el efecto de la congelación/descongelación y la liofilización en los experimentos de agitación. La congelación se realizó a -20°C en una cámara frigorífica a -20°C o en hielo seco, la descongelación en ambos casos a TA y en ambos casos se partió de las formulaciones líquidas. En cuanto a la liofilización, las muestras de VWF formuladas descritas en el presente documento se congelaron dentro de un liofilizador a escala piloto a <=-40°C y se liofilizaron usando un programa de liofilización convencional. La agitación se realizó directamente con las formulaciones líquidas (2 ml en viales de 5 ml). Tal como se muestra en la tabla 2, el porcentaje de recuperación de

rVWF fue mayor en tampón Advate 1:3 en comparación con tampón Advate.

Tabla 2.

rVWF		VWF:Ag [U/ml]	Recuperación de VWF:Ag [%]	VWF:RCo [U/ml]	Recuperación de VWF:RCo [%]	RCo:Ag [U/U]
Advate	Congelado	213	100%	104	100%	0,49
	Congelado - 3x a -20°C	229	107%	84	81%	0,37
	Congelado - 3x con hielo seco	231	108%	72	69%	0,31
	Liofilizado	242	113%	61	59%	0,25
	Material de partida	213	100%	104	100%	0,49
	Muy agitado durante 4 días a TA	37,0	17%	7,2	6,9%	0,19
Advate 1:3	Congelado	206	100%	134	100%	0,65
	Congelado - 3x a -20°C	184	89%	132	99%	0,72
	Congelado - 3x con hielo seco	195	94%	128	96%	0,66
	Liofilizado	195	94%	107	80%	0,55
	Material de partida	206	100%	134	100%	0,65
	Muy agitado durante 4 días a TA	138	67%	131	98%	0,95

También se midió el porcentaje de recuperación en los experimentos de agitación con el rVWF almacenado en jeringas con espacio de cabeza y sin espacio de cabeza. Curiosamente, cuando el rVWF se almacena en jeringas sin espacio de cabeza y se agita tal como se describió anteriormente, no se observó ninguna precipitación de rVWF. En cambio, cuando el rVWF se almacena en jeringas con espacio de cabeza, se observó algo de precipitación.

En resumen, la agitación turbulenta dio lugar a una pérdida de al menos el 30% de rVWF en tampón Advate o en tampón Advate 1:3, y el tampón Advate mostró una mayor pérdida de recuperación en comparación con el tampón Advate 1:3. Curiosamente, los mismos precipitados observados en los experimentos de agitación turbulenta no se observaron cuando el rVWF se almacenó y transportó ~5000 km en un automóvil (que representa la agitación esperada durante el transporte). La precipitación de rVWF pudo eliminarse mediante el almacenamiento en jeringas sin espacio de cabeza.

## Ejemplo 2

### Estabilidad de VWF recombinante

Se sometió a prueba la estabilidad de rVWF evaluando el nivel de actividad de rVWF presente en diversas formulaciones.

Tal como se muestra en la figura 1, el rVWF no es estable en tampón Advate después de 26 semanas debido a la presencia de glutatión 0,3 mM. Sin embargo, tal como se muestra en la figura 2, el rVWF es más estable en tampón Advate 1:3 (por ejemplo, durante un máximo de 12 semanas a 4°C).

Tal como se muestra en la figura 3, la estabilidad de una formulación a base de citrato (citrato de sodio 15 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0) es mejor que la formulación en tampón Advate 1:3 que contiene glutatión 0,1 M.

Asimismo, se midió la concentración de rVWF a lo largo del tiempo en diversos tampones. Tal como se muestra en la figura 4, la figura 5 y la figura 6, la concentración de rVWF es estable a lo largo del tiempo en tampón Advate, tampón Advate 1:3 y tampón a base de citrato, respectivamente.

Ejemplo 4

## Caracterización de las formulaciones líquidas

- 5 Se usó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para evaluar el grado de desplegamiento de la proteína (rVWF) en diversos tampones. Tal como se muestra en la tabla 3, el tampón Advate, pH 7,0, es el óptimo para la estabilización.

10 La DSC es una técnica termoanalítica en la que se mide la diferencia en la cantidad de calor necesario para aumentar la temperatura de una muestra y las referencias en función de la temperatura. El resultado de un experimento de DSC es una curva de flujo de calor frente a la temperatura o frente al tiempo.

15 El calorímetro diferencial de barrido puede examinar a través de un intervalo de temperaturas mientras se calienta y se enfría y determina una transición de fase, es decir, la fusión, la cristalización o la transición vítrea, midiendo la cantidad de calor necesario para alcanzar una temperatura determinada. El calorímetro se calibró con un conjunto de metales puros (zinc, indio y estaño) que tienen una capacidad calorífica, Cp, y un punto de fusión, Tm, conocidos. El tampón de referencia respectivo se colocó en el capilar de referencia y la muestra de rVWF se colocó en el capilar de muestra del instrumento.

Tabla 3. Temperatura de desplegamiento en diversos tampones

20

Lote	Tampón	pH	T de desplegamiento [°C]
rVWF161A	Advate	7,0	66,0
rVWF161B	Immunate	6,8	64,5
rVWF161C	Citrato	6,8	61,2
rVWF161D	NovoSeven	6,8	64,9
rVWF158	Hepes	7,4	61,3

## Componentes y concentraciones del tampón:

A) Advate:	NaCl 5,26 g/l CaCl <sub>2</sub> 0,248 g/l D-Manitol 32 g/l Trehalosa 8 g/l L-Histidina 1,56 g/l Tris 1,2 g/l Glutación red. 0,08 g/l	pH = 7,0
B) Immunate:	Glicina 5,25 g/l NaCl 2,2 g/l NaCit3 5,25 g/l Lisina-HCl 5,25 g/l CaCl <sub>2</sub> 0,62 g/l	pH = 6,8
C) Citrato:	Glicina 3 g/l NaCl 2,92 g/l NaCit3 2,5 g/l D-Manitol 30 g/l Trehalosa 10 g/l	pH = 6,8
D) NovoSeven:	Glicina 0,75 g/l NaCl 2,92 g/l CaCl <sub>2</sub> 1,47 g/l D-Manitol 30 g/l	pH = 6,8

25 rVWF158: Hepes 20 mM, NaCl 150 mM, sacarosa 5 g/l, pH 7,4

30 Además, tal como se muestra en la figura 7, la mayoría de los excipientes de la formulación aumentan la temperatura de desplegamiento en aproximadamente 1-2°C. La figura 8 muestra que CaCl<sub>2</sub> 10 mM aumenta la temperatura de desplegamiento en de ~8°C hasta ~67°C, una temperatura de desplegamiento que también puede alcanzar el tampón Advate. Este efecto del CaCl<sub>2</sub> es similar a pH 7,3 y a pH 6,5, tal como se muestra en la figura 9. Por último, se analizó el efecto de la trehalosa y la sacarosa sobre la temperatura de desplegamiento. En comparación con el citrato solo, ni la trehalosa ni la sacarosa aumentaron la temperatura de desplegamiento de rVWF. En la tabla 4 se expone un resumen de los datos de la temperatura de desplegamiento (T<sub>máx</sub>) de rVWF en presencia de diversos excipientes.



Tabla 4.

Tampón citrato de sodio 15 mM	-	Tris 15 mM	Glicina 15 mM	NaCl 50 mM
$\Delta H$ [kJ/mol]	128494,3	656259,7	157352,2	124985,8
T de desplegamiento [°C] - Pico 1	58,6		59,1	61
Pico 2	65,2	68,5	65,5	
Pico 3	80,4		80,1	81
Pico 4				
Tampón citrato de sodio 15 mM	Histidina 15 mM	Manitol 20,52 g/l	Trehalosa 10,26 g/l	
$\Delta H$ [kJ/mol]	134044,5	1588590,1	612235,9	
T de desplegamiento [°C] - Pico 1	59,2	58,5	58,5	
Pico 2	65,2	65,5	71,3	
Pico 3	79,3	78,2	81,5	
Pico 4	88,5		92,7	
Tampón citrato de sodio 15 mM	CaCl <sub>2</sub> 1 mM	CaCl <sub>2</sub> 10 mM	Sacarosa 32 g/l	Sacarosa 0,25 mM
$\Delta H$ [kJ/mol]	266008,2	308171,3	115082,4	246904,6
T de desplegamiento [°C] - Pico 1	64,5	67,2	59,2	60
Pico 2			66	67
Pico 3	81	83,1	81,1	81,7
Pico 4	91,8	93		
Tampón citrato de sodio 15 mM	TWEEN-80 0,1 g/l	Rafinosa 32 g/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> /NaHPO <sub>4</sub>	Trehalosa 7,8 mM
$\Delta H$ [kJ/mol]	338792,7	127329,2	197967,5	135573,3
T de desplegamiento [°C] - Pico 1	58,7	60,1	61,4	58,4
Pico 2	64,4	65,8		65,4
Pico 3	81,6	80,3	80,4	80,4
Pico 4			89,2	

- 5 Además de los diversos tampones, se usó DSC para evaluar la temperatura de desplegamiento de rVWF a diversos valores de pH en tampón Advate. Los resultados se muestran en la tabla 5, a continuación. El tampón Advate, pH 7,0, es el óptimo para la estabilización (es decir, la temperatura de desplegamiento más alta; pico 1) de rVWF.

Tabla 5.

pH	Pico 1	Pico 2
5,0	59,5	62,0
6,0	65,2	75,4
7,0	67,2	82,8

8,0	66,6	85,6
9,0	65,0	84,9

Se evaluó el espectro de fluorescencia de rVWF en tampón Advate y en tampón Advate 1:3 después de su almacenamiento a diversas temperaturas durante diversos periodos de tiempo. No se observó ningún (o sólo un ligero) cambio en el espectro de fluorescencia después del almacenamiento a 40°C de desde 0 hasta 28 días en ninguno de los tampones Advate o Advate 1:3. No se observó ninguna diferencia a otras temperaturas.

Asimismo, se evaluó la degradación de rVWF mediante filtración en gel (Superose 6). Mientras que se observó algo de degradación después de 26 semanas a 4°C en tampón Advate, no se observó casi ninguna degradación de rVWF en tampón Advate 1:3 después de 26 semanas a 4°C. A 40°C, el glutatión aumentó la cantidad de degradación a lo largo del tiempo (aunque en un grado más lento en tampón Advate 1:3).

Basándose en los ejemplos anteriores, el tampón Advate 1:3 ofrece una ventaja con respecto a la congelación/descongelación y a la recuperación después de la liofilización en comparación con el tampón Advate sin diluir. Además, el tampón Advate 1:3 puede estabilizar la actividad (por ejemplo, mantener la actividad biológica) de rVWF durante la incubación a 40°C mejor que el tampón Advate. El rVWF en tampón Advate 1:3 es estable durante 4 semanas de incubación a 4°C. Por último, la DSC ha demostrado que el pH 7,0 es óptimo para evitar la degradación de rVWF (es decir, mostró la temperatura de desplegamiento más alta).

Por tanto, en vista de los datos presentados en el presente documento, se propuso una formulación para rVWF que incluye citrato 15 mM (o glicina o histidina), CaCl<sub>2</sub> 10 mM, pH 6,5-7,3, ajustada a la osmolaridad deseada mediante NaCl. Por ejemplo, en una realización, la fórmula a base de citrato es citrato de sodio 15 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,0.

Alternativamente, también se contempla un tampón Advate o Advate 1:3, sin glutatión: Advate: NaCl 90 mM, CaCl<sub>2</sub> 1,68 mM, L-histidina 10 mM, Tris 10 mM, glutatión 0,26 mM, trehalosa 23,4 mM, manitol 175,7 mM y TWEEN-80 0,1 g/l, pH 7,0; Advate 1:3: NaCl 30 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,56 mM, L-histidina 3,3 mM, Tris 3,3 mM, trehalosa 7,8 mM, manitol 58,6 mM y TWEEN-80 0,03 g/l, pH 7,0.

#### Lista de secuencias

<110> Matthiessen, *et al.*

<120> Formulaciones de VWF recombinante

<130> 31315/43550

<150> Documento 61/017.881

<151> 31-12-2007

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 8833

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polinucleótido sintético

<220>

<221> misc\_feature

<223> prepro-vWF

<400> 1

# ES 2 887 187 T3

agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctcccc agcagtgggg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg	120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtgggcg	180
gcaccattgt ccagcagctg agtttcccag ggaccttgga gatagccgca gccctcatth	240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcattht	300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct	360
tttcggaagt gacttcgtca acacctttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg	420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca	480
gaatggcaag agagttagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt	540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg	600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt	660
ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa	720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgcgtga gatgacttta tgaccaaga	780
agggaccttg acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga	840
acagtgggtg gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat	900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgtg	960
ccaccctctg gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg	1020

tgctgggggg	ctggagtgcg	cctgccctgc	cctcctggag	tacgcccgga	cctgtgcccc	1080
ggagggaaatg	gtgctgtacg	gctggaccga	ccacagcgcg	tgcagcccag	tgtgccctgc	1140
tggtatggag	tataggcagt	gtgtgtcccc	ttgcgccagg	acctgccaga	gcctgcacat	1200
caatgaaatg	tgtcaggagc	gatgcgtgga	tggtcgcagc	tgccttgagg	gacagctcct	1260
ggatgaaggc	ctctgcgtgg	agagcaccga	gtgtccctgc	gtgcattccg	gaaagcgcta	1320
ccctcccggc	acctccctct	ctcgagactg	caacacctgc	atttgccgaa	acagccagtg	1380
gatctgcagc	aatgaagaat	gtccagggga	gtgccttgtc	acaggtcaat	cacacttcaa	1440
gagctttgac	aacagatact	tcaccttcag	tgggatctgc	cagtacctgc	tggcccggga	1500
ttgccaggac	cactccttct	ccattgtcat	tgagactgtc	cagtgtgctg	atgaccgcga	1560
cgctgtgtgc	acccgctccg	tcaccgtccg	gctgcctggc	ctgcacaaca	gccttgtgaa	1620
actgaagcat	ggggcaggag	ttgccatgga	tggccaggac	gtccagctcc	ccctcctgaa	1680
aggtgacctc	cgcattccagc	atacagtgc	ggcctccgtg	cgcctcagct	acggggagga	1740
cctgcagatg	gactgggatg	gcgcggggag	gctgctggtg	aagctgtccc	ccgtctatgc	1800
cgggaagacc	tgcggcctgt	gtgggaatta	caatggcaac	cagggcgacg	acttccttac	1860
cccctctggg	ctggcggagc	cccggtgga	ggacttcggg	aacgcctgga	agctgcacgg	1920
ggactgccag	gacctgcaga	agcagcacag	cgatccctgc	gccctcaacc	cgcgcatgac	1980
caggttctcc	gaggaggcgt	gcgcggtcct	gacgtcccc	acattcgagg	cctgccatcg	2040
tgccgtcagc	ccgctgccct	acctgcggaa	ctgccgctac	gacgtgtgct	cctgctcgga	2100
cggccgcgag	tgcctgtgcg	gcgccctggc	cagctatgcc	gcggcctgcg	cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc	gcgtggcgcg	agccaggccg	ctgtgagctg	aactgcccga	aaggccaggt	2220
gtacctgcag	tgcgggaccc	cctgcaacct	gacctgccgc	tctctctctt	acccggatga	2280
ggaatgcaat	gaggcctgcc	tggagggtg	cttctgcccc	ccagggtct	acatggatga	2340
gaggggggac	tgcgtgcccc	aggcccagt	ccctgtttac	tatgacggtg	agatcttcca	2400
gccagaagac	atcttctcag	accatcacac	catgtgctac	tgtgaggatg	gcttcatgca	2460
ctgtaccatg	agtggagtcc	ccggaagctt	gctgcctgac	gctgtcctca	gcagtcccct	2520
gtctcatcgc	agcaaaagga	gcctatcctg	tcggcccccc	atggtcaagc	tggtgtgtcc	2580
cgctgacaac	ctgcgggctg	aagggtcga	gtgtaccaa	acgtgccaga	actatgacct	2640
ggagtgcattg	agcatgggct	gtgtctctgg	ctgcctctgc	cccccgggca	tggtccggca	2700
tgagaacaga	tgtgtggccc	tggaaagggtg	tccttgcttc	catcagggca	aggagtatgc	2760
ccctggagaa	acagtgaaga	ttggctgcaa	cacttgtgtc	tgtcgggacc	ggaagtggaa	2820
ctgcacagac	catgtgtgtg	atgccacgtg	ctccacgac	ggcatggccc	actacctcac	2880
cttcgacggg	ctcaaatacc	tgttcccccg	ggagtgccag	tacgttctgg	tgcaggatta	2940

ctgcggcagt aaccctggga cctttcggat cctagtggg aataagggat gcagccaccc	3000
ctcagtga aa tgcaagaaac gggtcacat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt	3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca	3180
cctgagcatc tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaattttgat ggcattccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac tttgggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgctgaca ccagaaaagt	3360
gcctctggac tcattcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga	3420
ttcctcctgt agaatcctta ccagtgcgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggaccc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg	3540
cgcctgcttc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgcccagc atggcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgtataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg	3720
tcagcaccct gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaag aaagtcacct tgaatcccag	3900
tgacctgag cactgccaga tttgccactg tgatgtgtc aacctacct gtgaagcctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tggcgctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct	4020
gtatgtggag gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga	4080
cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttt aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtggtggag taccacgacg gctccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcatg ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcatc accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
tgtccgctac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccg tgggcattgg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc	4560
cttcgtgctg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gccctgaag cccctcctcc tactctgcc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtgggcccg ggcctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccattggtct	4740
ggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800

caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860
cacggtgctg cagtactcct acatggtgac tgtggagtac cccttcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggctgcct ggagacatcc aggtgggtgcc cattggagtg ggccctaata ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct	5220
cccccgagag gctcctgacc tgggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctcctgga	5340
tggctcctcc agtttccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggctcgtct cactcaggtg tcagtgtctg agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct	5520
tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcggtggt	5640
catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatgcg tacgatgcag ccagctacg	5760
gatcttgga gccccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgttag	5880
gatttgcatg gatgaggatg ggaatgagaa gagggccggg gacgtctgga ccttgccaga	5940
ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtcccctg ttaaagtgga	6060
agagacctgt ggctgccgt ggacctgccc ctgctgtgac acaggcagct ccactcggca	6120
catcgtgacc tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240
aaggcagggc tgcataaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtgcacat gaggtgacgg tgaatgggag actggtctct gttccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcagtaggtc agattcaatc accttggtca	6420
catcttcaca ttactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggtc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agccatcct ggaggagcag tgtcttgtcc ccgacagctc	6660
ccactgccag gtcctcctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggctc tggctccagc	6720

cacattcttat	gccatctgcc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggtgat	6780
cgcctcttat	gccacacct	gtcggaccaa	cggggtctgc	gttgactgga	ggacacctga	6840
tttctgtgct	atgtcatgcc	caccatctct	ggtctacaac	cactgtgagc	atggctgtcc	6900
ccggcactgt	gatggcaacg	tgagctcctg	tggggaccat	ccctccgaag	gctgtttctg	6960
ccctccagat	aaagtcatgt	tggaggcag	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	7020
cattggtgag	gatggagtcc	agcaccagtt	cctggaagcc	tgggtcccgg	accaccagcc	7080
ctgtcagatc	tgacatgcc	tcagcgggcg	gaaggtcaac	tgcacaacgc	agccctgccc	7140
cacggccaaa	gtccccacgt	gtggcctgtg	tgaagtagcc	cgcctccgcc	agaatgcaga	7200
ccagtgtgct	cccagtatg	agtgtgtgtg	tgaccacagt	agctgtgacc	tgccccagt	7260
gcctcactgt	gaacgtggcc	tccagcccac	actgaccaac	cctggcgagt	gcagacccaa	7320
cttcacctgc	gcctgcagga	aggaggagt	caaaagagt	tccccaccct	cctgcccccc	7380
gcaccgtttg	cccacccttc	ggaagacca	gtgctgtgat	gagtatgagt	gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac	tccacagtga	gctgtcccct	tgggtacttg	gcctcaactg	ccaccaatga	7500
ctgtggctgt	accacaacca	cctgccttcc	cgacaagggt	tgtgtccacc	gaagcaccat	7560
ctaccctgtg	ggccagttct	gggaggagg	ctgcgatgtg	tgacacctga	ccgacatgga	7620
ggatgccgtg	atgggcctcc	gcgtggccca	gtgctcccag	aagccctgtg	aggacagctg	7680
tcggtcgggc	ttcacttacg	ttctgcatga	aggcgagtgc	tgtggaaggt	gcctgccatc	7740
tgctgtgag	gtggtgactg	gctcaccgcg	gggggactcc	cagtcttcct	ggaagagtgt	7800
cggctcccag	tgggcctccc	cggagaaccc	ctgcctcatc	aatgagtgtg	tccgagtgaa	7860
ggaggagggtc	tttataaca	aaaggaacgt	ctcctgcccc	cagctggagg	tccctgtctg	7920
cccctcgggc	tttcagctga	gctgtaagac	ctcagcgtgc	tgcccaagct	gtcgctgtga	7980
gcgcatggag	gcctgcatgc	tcaatggcac	tgtcattggg	cccgggaaga	ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc	acgacctgcc	gctgcatggt	gcagggtggg	gtcatctctg	gattcaagct	8100
ggagtgcagg	aagaccacct	gcaaccctg	ccccctgggt	tacaaggaag	aaaataacac	8160
aggtgaatgt	tgtgggagat	gtttgcctac	ggcttgacc	attcagctaa	gaggaggaca	8220
gatcatgaca	ctgaagcgtg	atgagacgct	ccaggatggc	tgtgatactc	acttctgcaa	8280
ggtcaatgag	agaggagagt	acttctggga	gaagagggtc	acaggctgcc	caccctttga	8340
tgaacacaag	tgtctggctg	agggaggtaa	aattatgaaa	attccaggca	cctgctgtga	8400
cacatgtgag	gagcctgagt	gcaacgacat	cactgccagg	ctgcagtatg	tcaaggtggg	8460
aagctgtaag	tctgaagtag	aggtggatat	ccactactgc	caggggcaat	tgccagcaa	8520
agccatgtac	tccattgaca	tcaacgatgt	gcaggaccag	tgctcctgct	gctctccgac	8580
acggacggag	cccatgcagg	tggccctgca	ctgcaccaat	ggctctgttg	tgtaccatga	8640
ggttctcaat	gcatggagt	gcaaatgctc	ccccaggaag	tgacgaagt	gaggctgctg	8700
cagctgcatg	ggtgcctgct	gctgcctgcc	ttggcctgat	ggccaggcca	gagtgtgctc	8760
agtcctctgc	atgttctgct	cttgtgccct	tctgagccca	caataaaggc	tgagctctta	8820
tcttgcaaaa	ggc					8833

<210> 2  
 <211> 2783  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Polipéptido sintético

10

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <223> prepro-vWF

<400> 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

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

15



# ES 2 887 187 T3

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
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
Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro						
		305		310		315
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

# ES 2 887 187 T3

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  
 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

# ES 2 887 187 T3

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  
 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

# ES 2 887 187 T3

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 Glu 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

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

# ES 2 887 187 T3

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
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

# ES 2 887 187 T3

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	
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			
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			

# ES 2 887 187 T3

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
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



# ES 2 887 187 T3

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		
Glu 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		
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		

# ES 2 887 187 T3

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	
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			
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														

<210> 3

<211> 2050

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Polipéptido sintético

10

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> vWF maduro

# ES 2 887 187 T3

<400> 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

Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser
195         200         205

```

# ES 2 887 187 T3

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr  
 210 215 220  
 Tyr Gln Glu 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  
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys

# ES 2 887 187 T3

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

# ES 2 887 187 T3

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

# ES 2 887 187 T3

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



# ES 2 887 187 T3

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	Glu	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

# ES 2 887 187 T3

1430		1435		1440
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

# ES 2 887 187 T3

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

# ES 2 887 187 T3

Asp Thr	His Phe Cys Lys	Val	Asn Glu Arg Gly Glu	Tyr Phe Trp
1910		1915		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		

## REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n farmac3utica l3quida estable de un factor de von Willebrand recombinante (rVWF) que comprende: (a) un rVWF; (b) un agente de tamponamiento; (c) una o m3s sales; (d) un agente estabilizante; y (e) opcionalmente un tensioactivo;  
 en la que el rVWF es capaz de provocar la aglutinaci3n de plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina;  
 en la que dicho rVWF comprende un polip3ptido seleccionado del grupo que consiste en:
  - a) la secuencia de amino3cidos expuesta en SEQ ID NO: 3;
  - b) un an3logo, fragmento o variante biol3gicamente activo de a);
  - c) un polip3ptido codificado por el polinucle3tido expuesto en SEQ ID NO: 1;
  - d) un an3logo, fragmento o variante biol3gicamente activo de c); y
  - e) un polip3ptido codificado por un polinucle3tido que se hibrida con el polinucle3tido expuesto en SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridaci3n moderadamente estrictas;
 en la que dicho tamp3n est3 compuesto por un agente de tamponamiento de pH en un intervalo de 0,1 mM a 500 mM y en la que el pH est3 en un intervalo de 2,0 a 12,0;  
 en la que dicha sal est3 a una concentraci3n de 1 a 500 mM;  
 en la que dicho agente estabilizante est3 a una concentraci3n de 0,1 a 1000 mM y se selecciona del grupo que consiste en manitol, lactosa, sorbitol, xilitol, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa y combinaciones de estos agentes estabilizantes; y  
 en la que dicho tensioactivo est3 a una concentraci3n de 0,01 g/l a 0,5 g/l.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el agente de tamponamiento se selecciona del grupo que consiste en citrato de sodio, glicina, histidina, Tris y combinaciones de estos agentes.
3. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 2, en la que el agente de tamponamiento es citrato de sodio a una concentraci3n de 15 mM.
4. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 3, en la que el pH est3 en el intervalo de 6,0-8,0, y preferiblemente el pH est3 en el intervalo de 6,5-7,3.
5. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 2 o la reivindicaci3n 3, en la que el pH es 7,0.
6. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el agente de tamponamiento es citrato y el pH es 7,0.
7. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, cloruro de sodio y cloruro de magnesio.
8. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el rVWF comprende la secuencia de amino3cidos expuesta en SEQ ID NO: 3; en la que el agente de tamponamiento es citrato y el pH es 7,0; y en la que la sal es cloruro de calcio a una concentraci3n de 10 mM.
9. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el rVWF comprende la secuencia de amino3cidos expuesta en SEQ ID NO: 3; en la que el agente de tamponamiento es citrato de sodio a una concentraci3n de 15 mM y el pH es 7,0; y en la que la sal es cloruro de calcio a una concentraci3n de 10 mM y cloruro de sodio de 100 mM.
10. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 2, en la que el uno o m3s agentes de tamponamiento son histidina y Tris a una concentraci3n de 3,3 mM cada uno.
11. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 7, en la que la una o m3s sales son cloruro de sodio a una concentraci3n de 30 mM y cloruro de calcio a una concentraci3n de 0,56 mM.
12. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentraci3n de 7,8 mM y manitol a una concentraci3n de 58,6 mM.

13. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en digitonina, Triton X-100 (octilfenil 3ter de polioxietileno), Triton X-114 (terc-octilfenil 3ter de polietilenglicol), TWEEN-20, TWEEN-80 (polisorbatos) y combinaciones de estos tensioactivos, y preferiblemente el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.
14. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el rVWF comprende la secuencia de amino3cidos expuesta en SEQ ID NO: 3; en la que los agentes de tamponamiento son histidina a una concentraci3n de 3,3 mM y Tris a una concentraci3n de 3,3 mM a pH 7,0; en la que la sal es cloruro de sodio a una concentraci3n de 30 mM y cloruro de calcio a una concentraci3n de 0,56 mM; en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentraci3n de 7,8 mM y manitol a una concentraci3n de 58,6 mM; en la que el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.
15. Formulaci3n farmac3utica l3quida estable de un factor de von Willebrand recombinante (rVWF) que comprende: (a) un rVWF; (b) un agente de tamponamiento; (c) una o m3s sales; (d) un agente estabilizante; y (e) opcionalmente un tensioactivo;  
en la que el rVWF es capaz de provocar la aglutinaci3n de plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina;  
en la que dicho rVWF comprende un polip3ptido seleccionado del grupo que consiste en:  
a) la secuencia de amino3cidos expuesta en SEQ ID NO: 3;  
b) un an3logo, fragmento o variante biol3gicamente activo de a);  
c) un polip3ptido codificado por el polinucle3tido expuesto en SEQ ID NO: 1;  
d) un an3logo, fragmento o variante biol3gicamente activo de c); y  
e) un polip3ptido codificado por un polinucle3tido que se hibrida con el polinucle3tido expuesto en SEQ ID NO: 1 en condiciones de hibridaci3n moderadamente estrictas;  
en la que dicho tamp3n est3 compuesto por un agente de tamponamiento de pH en un intervalo de 0,1 mM a 500 mM y en la que el pH est3 en un intervalo de 2,0 a 12,0;  
en la que dicho tamp3n comprende citrato de sodio a una concentraci3n de 15 mM;  
en la que dicha sal es CaCl<sub>2</sub> a una concentraci3n de 10 mM;  
en la que dicho agente estabilizante est3 a una concentraci3n de 0,1 a 1000 mM; y  
en la que dicho tensioactivo est3 a una concentraci3n de 0,01 g/l a 0,5 g/l.
16. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 15, en la que dicho agente de tamponamiento comprende adem3s glicina, histidina, Tris o combinaciones de estos agentes.
17. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 15 o la reivindicaci3n 16, en la que el pH est3 en el intervalo de 6,0-8,0, y preferiblemente el pH est3 en el intervalo de 6,5-7,3.
18. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 17, en la que el pH es 7,0.
19. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 15, en la que el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en manitol, lactosa, sorbitol, xilitol, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa y combinaciones de estos agentes estabilizantes.
20. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 15, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en digitonina, Triton X-100 (octilfenil 3ter de polioxietileno), Triton X-114 (terc-octilfenil 3ter de polietilenglicol), TWEEN-20, TWEEN-80 (polisorbatos) y combinaciones de estos tensioactivos, y preferiblemente el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.
21. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 19, en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentraci3n de 7,8 mM y manitol a una concentraci3n de 58,6 mM.

FIG. 1

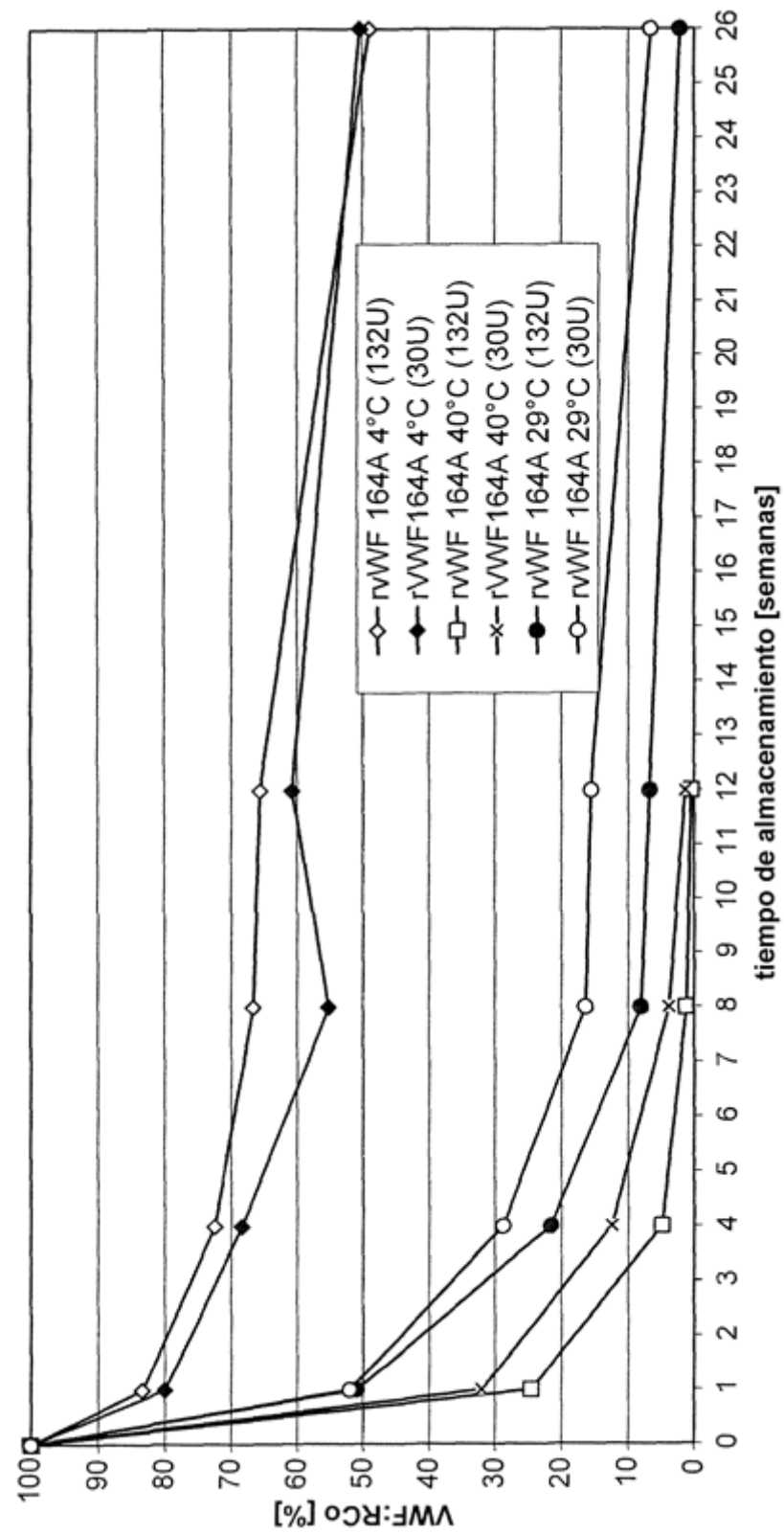


FIG. 2

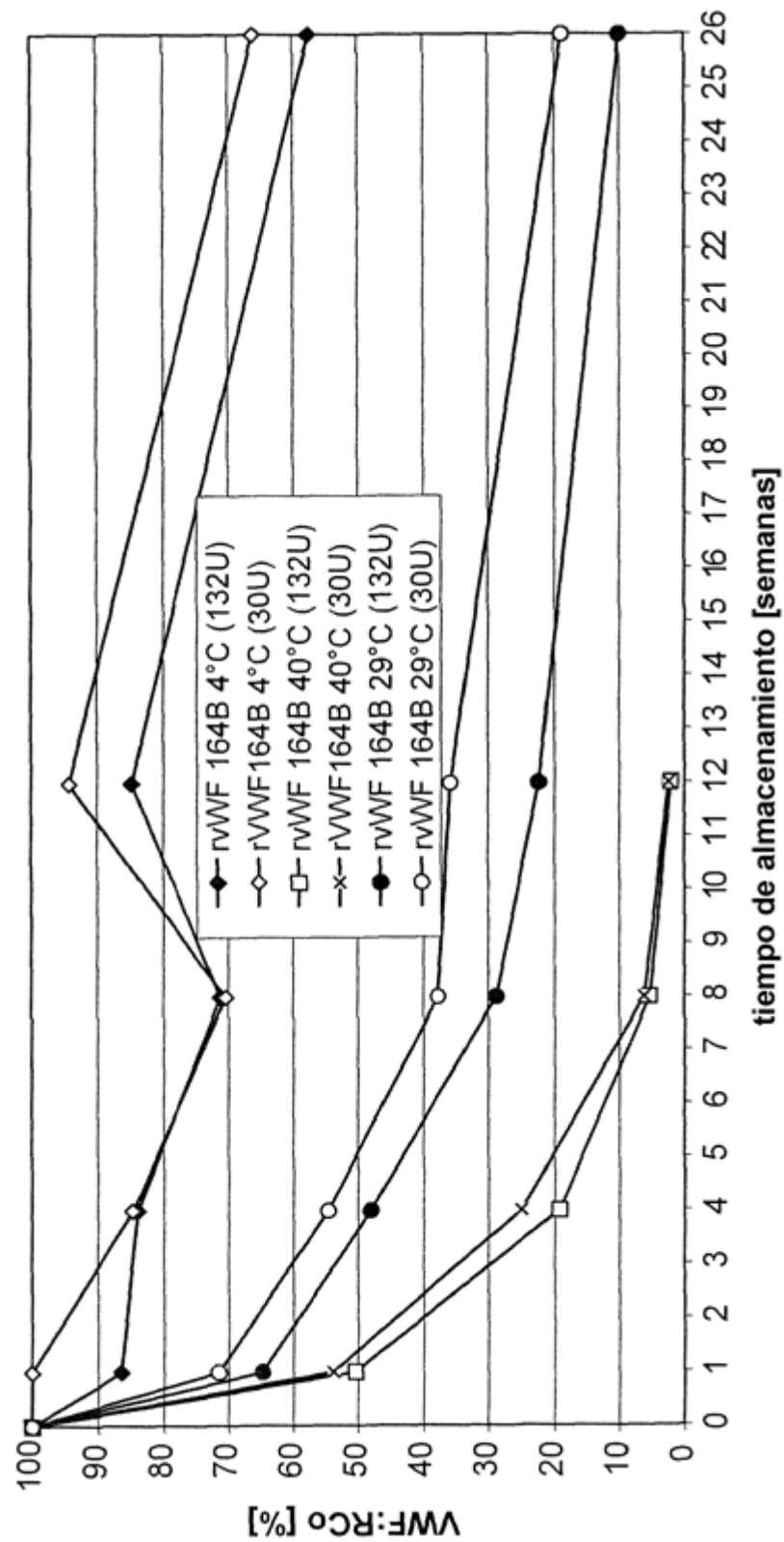




FIG. 3

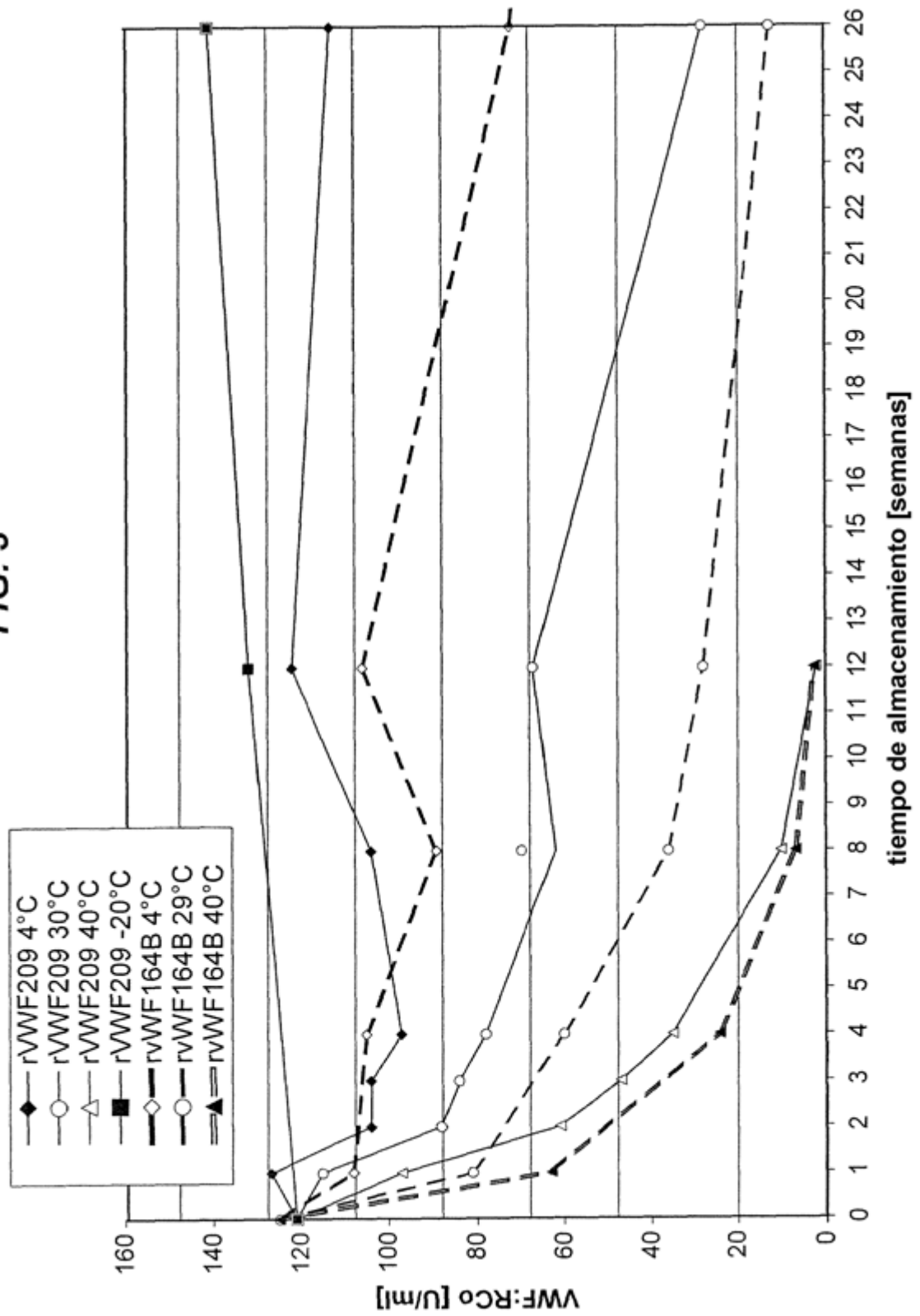


FIG. 4

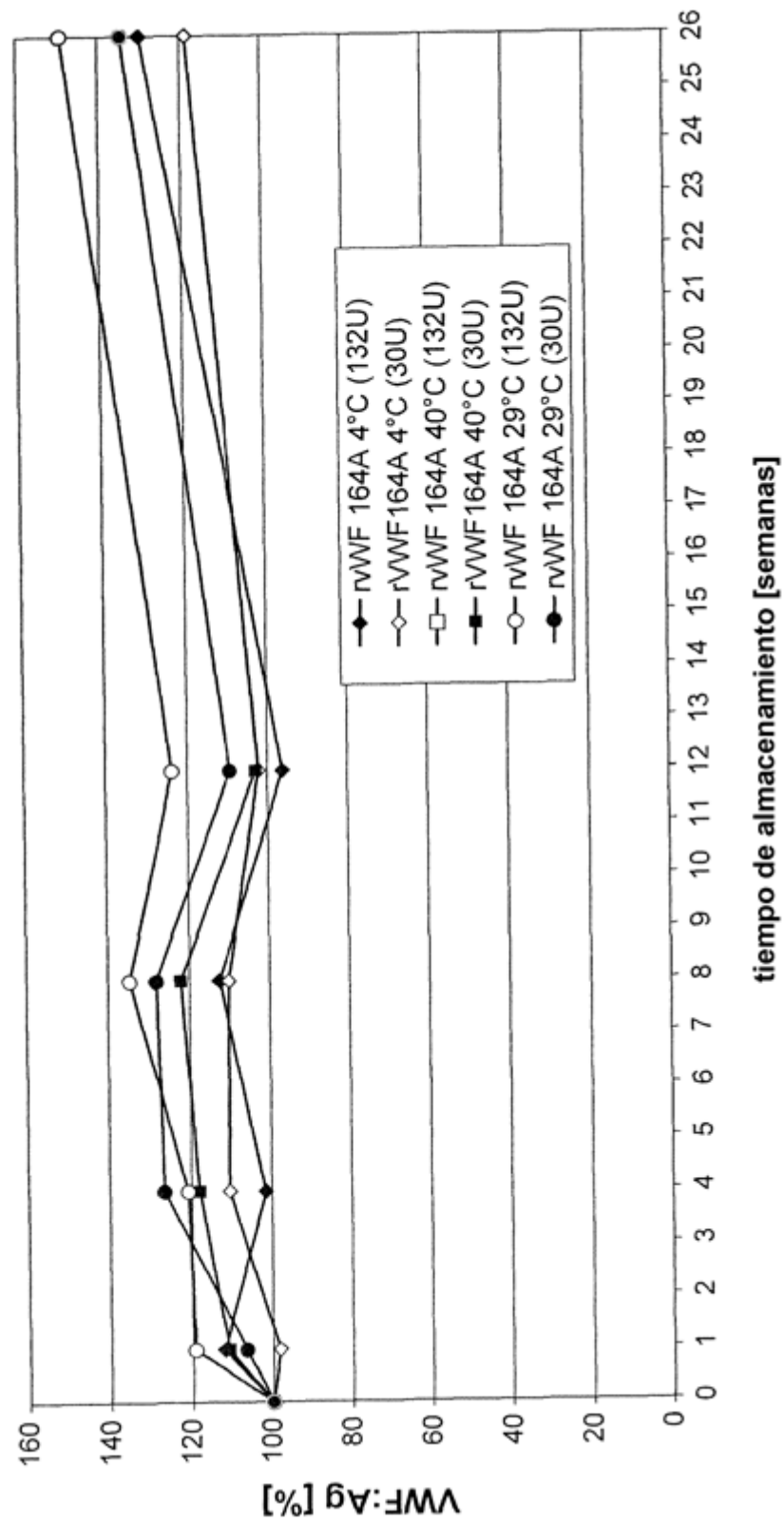


FIG. 5

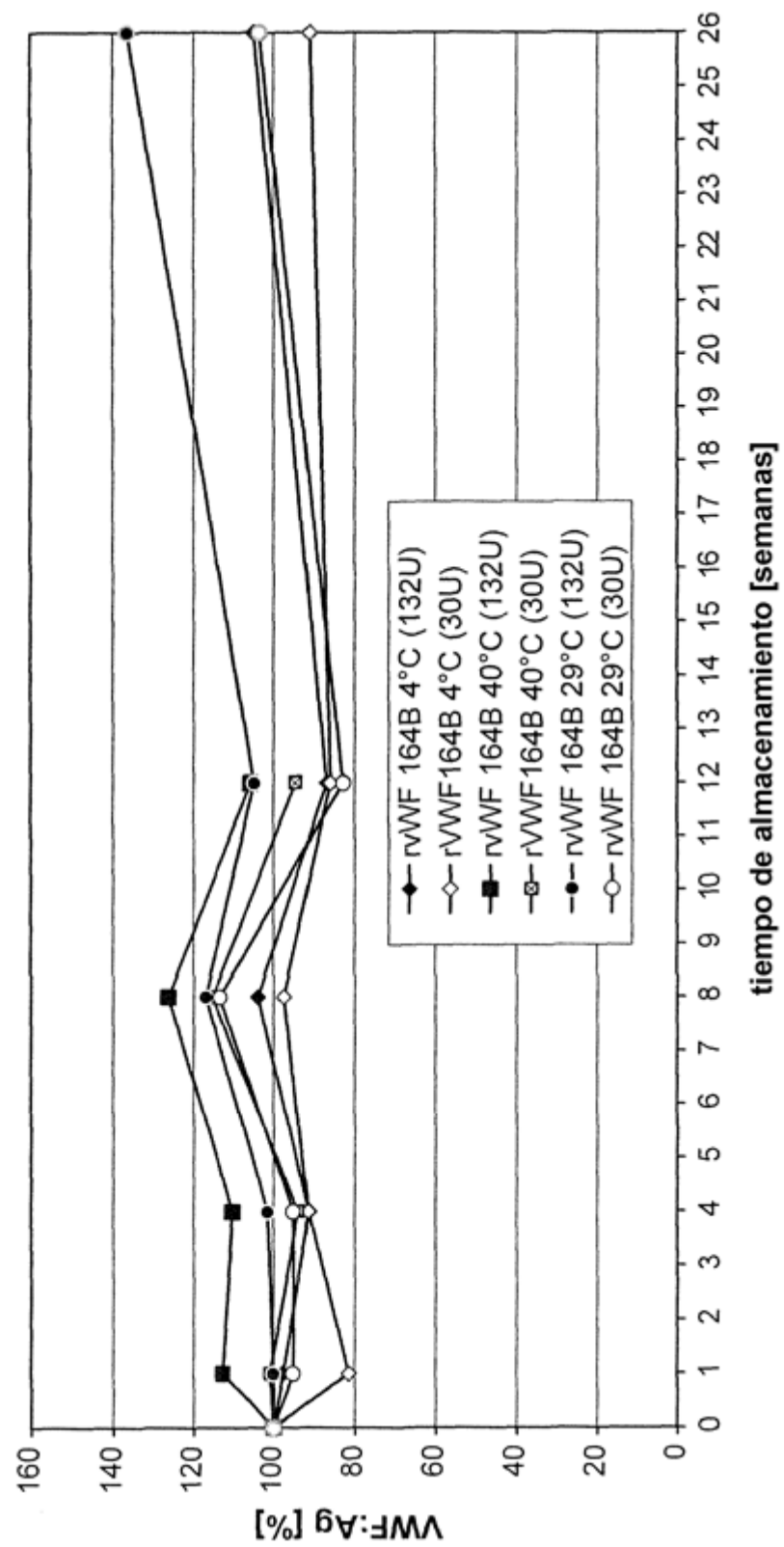


FIG. 6

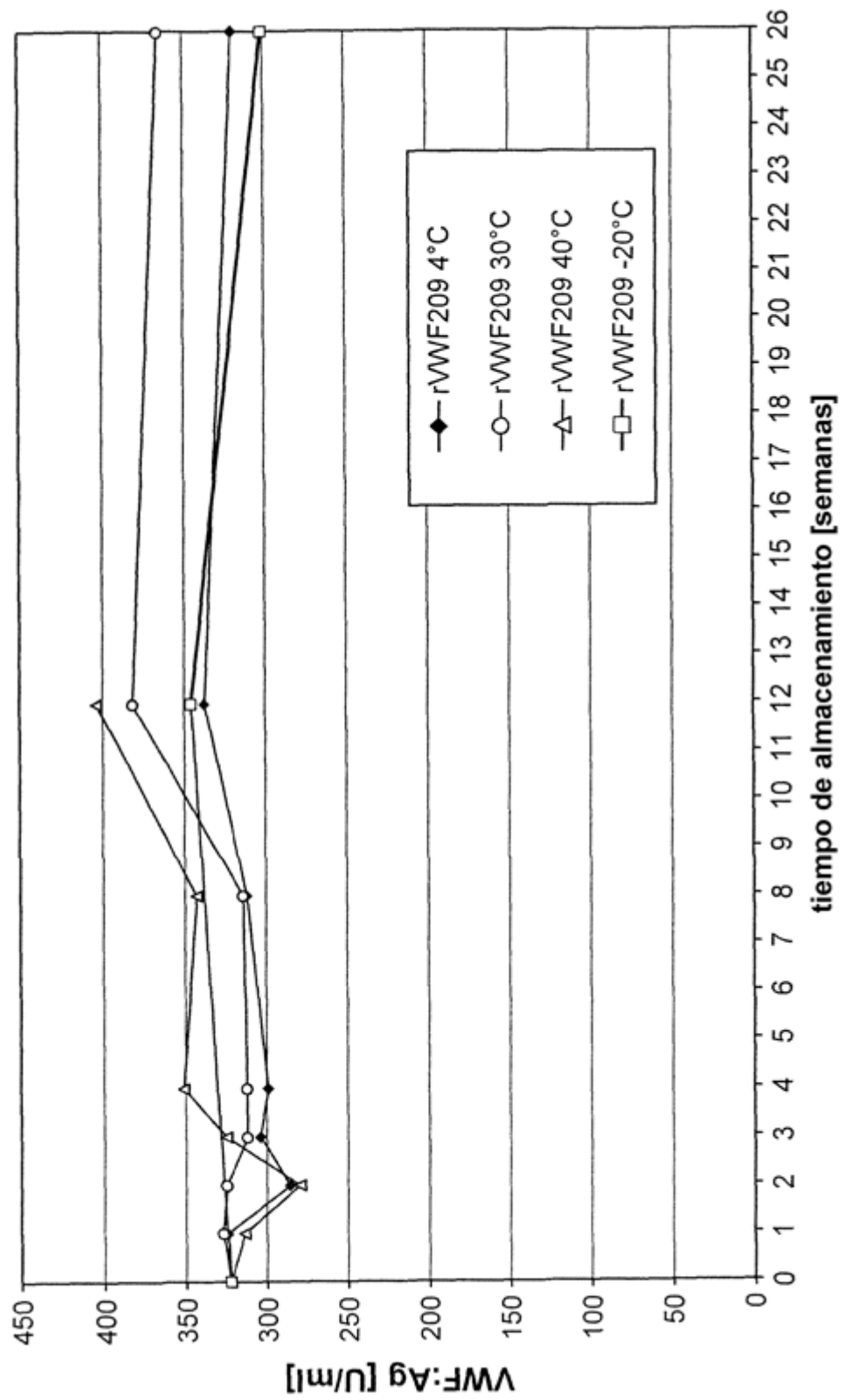


FIG. 7

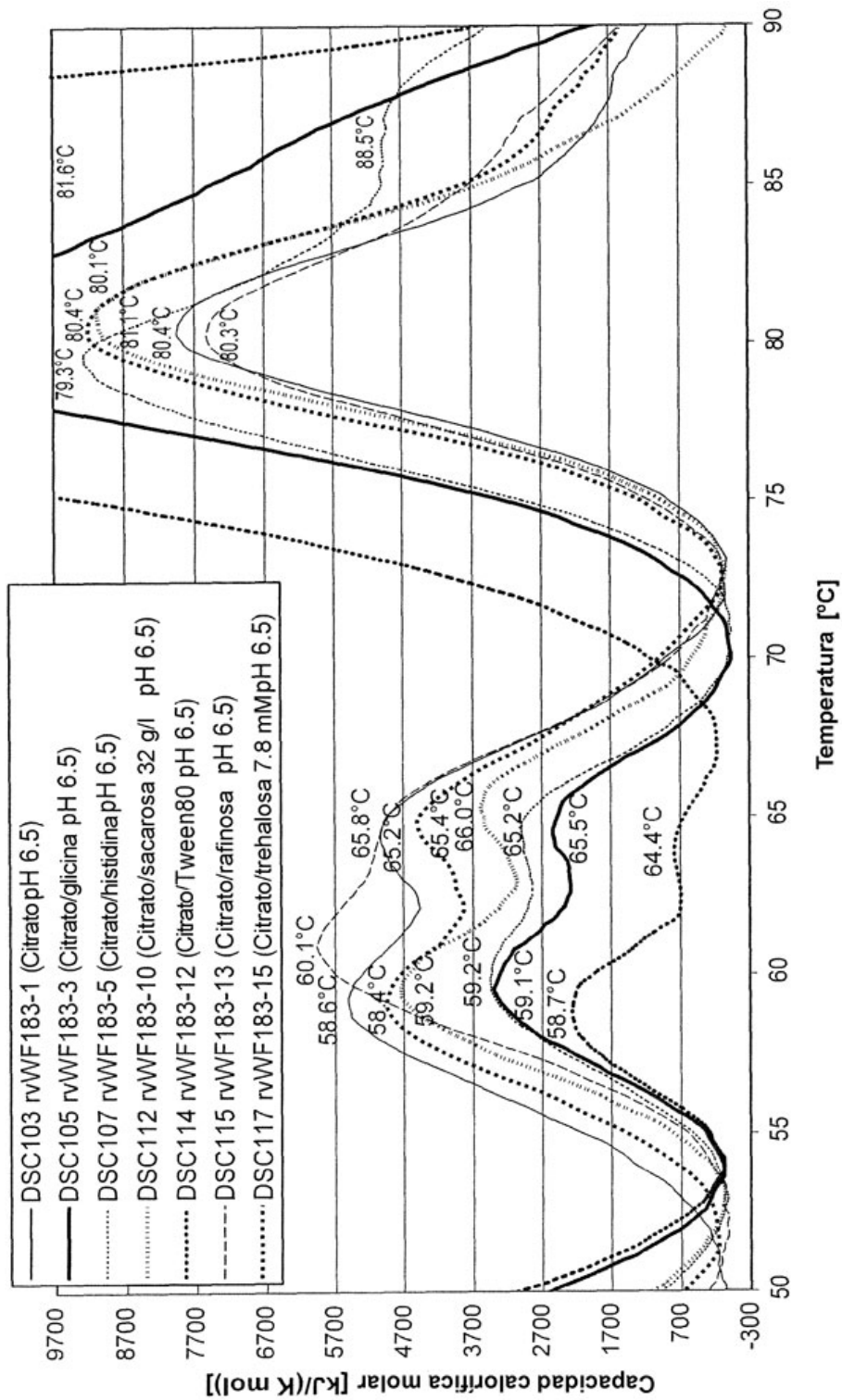


FIG. 8

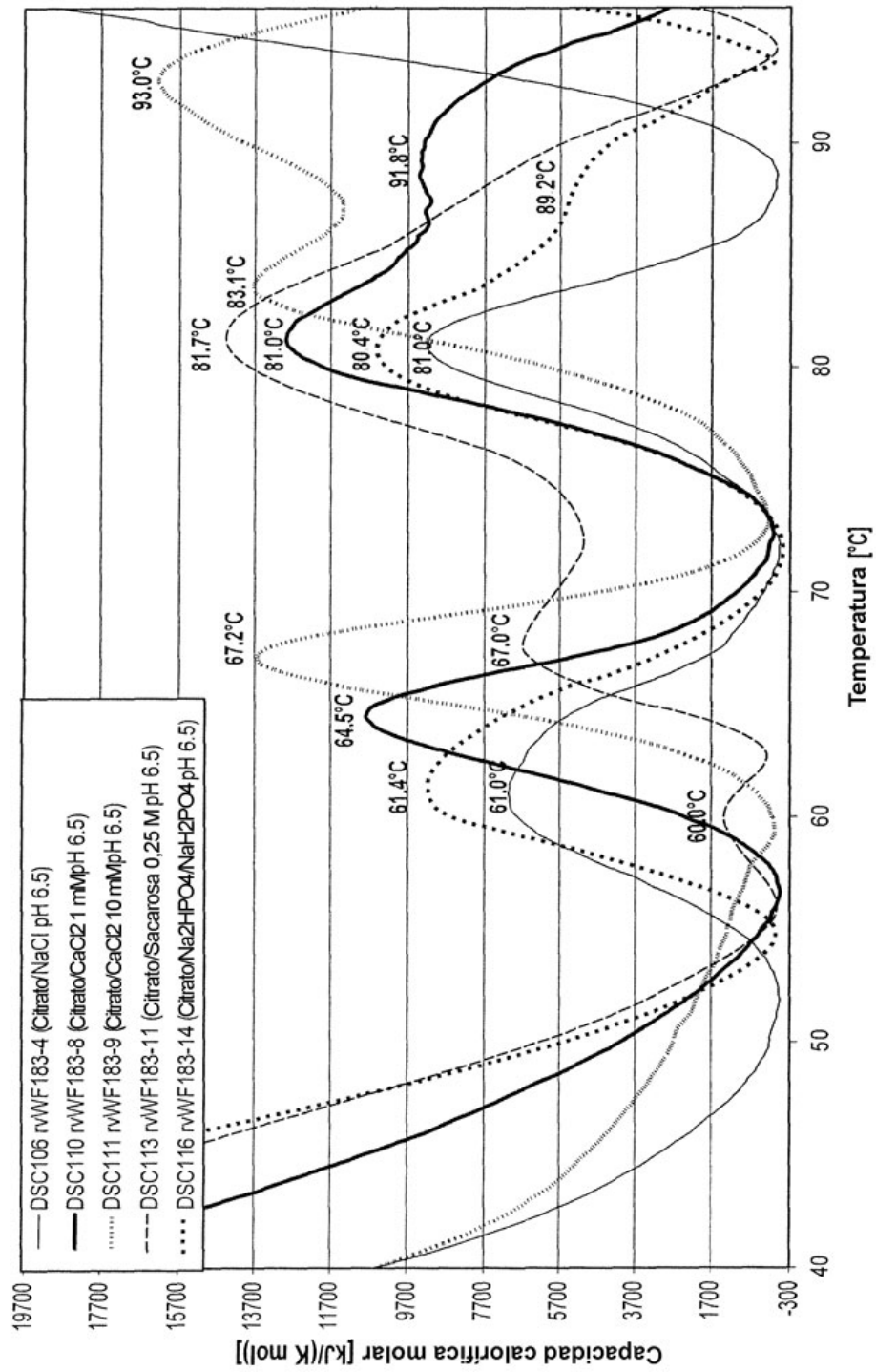


FIG. 9

