



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



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

⑮ 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

⑥ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.12.2008 PCT/US2008/088201**
⑦ Fecha y número de publicación internacional: **09.07.2009 WO09086400**
⑨ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.12.2008 E 08866246 (5)**
⑨ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.06.2021 EP 2244814**

④ Título: **Formulaciones de VWF recombinante**

⑩ Prioridad:

**28.12.2007 US 1741807 P
31.12.2007 US 1788107 P**

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
22.12.2021

⑦ Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (100.0%)
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku
Osaka-shi, Osaka, JP**

⑦ Inventor/es:

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

⑦ 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 (vCJD). 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, cellobiosa, 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.

55 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.

60 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.

65 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.

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

10 La figura 8 muestra que CaCl₂ 10 mM aumenta la temperatura de despliegamiento de rVWF en de aproximadamente 8°C a aproximadamente 67°C.

La figura 9 muestra que el efecto de CaCl₂ es similar a pH 7,3 y a pH 6,5.

15 **Descripción detallada de la invención**

15 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 20 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 (2^a ed. 1994); THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY (Walker ed., 1988); THE GLOSSARY OF GENETICS, 5^a ED., R. Rieger, *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale and Marham, THE HARPER COLLINS DICTIONARY 25 OF BIOLOGY (1991).

25 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 inconsistentes con la presente divulgación.

30 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.

35 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.

40 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.

45 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).

50 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.

55 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.

60 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.

5 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.

10 10 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 divultan 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.

20 VWF recombinante

25 20 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).

30 25 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.

35 30 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 40 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 45 (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.

50 50 Alternativamente, la molécula de ADN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis química, tales como el método del fosforamidato. También podría usarse una combinación de estas técnicas.

55 55 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.

60 60 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.

5 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.

10 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.

15 20 25 30 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. Polypeptides*, 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* (3^a ed.) 2: 105-253; y Erickson *et al.* (1976), *The Proteins* (3^a ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para elaborar péptidos individuales, ya que es el método más rentable para elaborar péptidos pequeños.

Fragmentos, variantes y análogos del VWF

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

40 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.

45 50 55 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, adición 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 epítopo 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.

60 65 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.

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

5 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.

10 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 15 parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la razón de PEG:proteína, mayor será el porcentaje de producto polipegulado. 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 20 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.

25 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 NaIO₄ 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 30 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).

35 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 40 técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la técnica.

45 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.

50 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 55 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 60 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

65 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.

5 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.

10 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, exemplificando con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de un excipiente de este tipo dependerá de su osmolalidad.

15 20 25 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.

30 35 40 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.

45 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

50 55 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.

60 65 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 desnaturalizado 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, autolisis, 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, cellobiosa, 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 interaccionar con las superficies, lo que las hace susceptibles a adsorción y desnaturalización 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

5 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.

10 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.

15 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.

20 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 25 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 estequiométría de la interacción (Randolph T.W., *et al.*, Pharm Biotechnol., 13:159-75 (2002)).

30 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, 35 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, 40 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, esteárate 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 dioleílfosfatidilcolina (DOPC), dimiristoílfosfatidilglicerol (DMPG), 45 dimiristoílfosfatidilcolina (DMPC) y dioleílfosfatidilglicerol (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

50 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 $pK_a = 6,0$ y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico tiene un pK_a 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®, Humatropo®). 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 Frokjær, 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 (ADNasrh, Pulmozyme®) y el factor VIII. En el caso de la ADNasrh, los iones Ca^{2+} (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima a través de un sitio de unión específico (Chen B, *et al.*, J Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999)). De hecho, la 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 Ca^{2+} ; se observó que otros cationes divalentes, Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , desestabilizaban la ADNasrh. Se observaron efectos similares en el factor VIII. Los iones Ca^{2+} y Sr^{2+} estabilizaron la proteína mientras que otros como Mg^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , Cu^{2+} y 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 Somatropin® (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 (Remmeli 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 enfriá 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 vítreo (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 vítreo proporciona información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

Métodos de preparación

5 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, hidroxipropilmethylcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátilo que se produce de manera natural, por ejemplo, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquíleno con ácidos grasos, por ejemplo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol, tales como monooleato de polioxietensorbitol, 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

20 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.

30 Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por pulverización inhalatoria, vaginal, rectal o por inyección intracranial. 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.

40 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

45 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

60 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, 18^a 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.

25 Ejemplo 1

Experimentos de agitación

30 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.

35 Se sometió rVWF en tampón Advate (NaCl 90 mM, CaCl₂ 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).

40 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

50 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

5 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.

10 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

20 Estabilidad de VWF recombinante

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

25 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).

30 Tal como se muestra en la figura 3, la estabilidad de una formulación a base de citrato (citrato de sodio 15 mM, CaCl₂ 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 despliegamiento 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 enfria 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, C_p , y un punto de fusión, T_m , 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.

20 Tabla 3. Temperatura de despliegamiento en diversos tampones

Lote	Tampón	pH	T de despliegamiento [°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 ₂ 0,248 g/l D-Manitol 32 g/l Trehalosa 8 g/l L-Histidina 1,56 g/l Tris 1,2 g/l Glutatión 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 ₂ 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 ₂ 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

Además, tal como se muestra en la figura 7, la mayoría de los excipientes de la formulación aumentan la temperatura de despliegamiento en aproximadamente 1-2°C. La figura 8 muestra que CaCl₂ 10 mM aumenta la temperatura de despliegamiento en de ~8°C hasta ~67°C, una temperatura de despliegamiento que también puede alcanzar el tampón Advate. Este efecto del CaCl₂ 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 despliegamiento. En comparación con el citrato solo, ni la trehalosa ni la sacarosa aumentaron la temperatura de despliegamiento de rVWF. En la tabla 4 se expone un resumen de los datos de la temperatura de despliegamiento ($T_{máx}$) de rVWF en presencia de diversos excipientes.

Tabla 4.

Tampón citrato de sodio 15 mM	-	Tris 15 mM	Glicina 15 mM	NaCl 50 mM
ΔH [kJ/mol]	128494,3	656259,7	157352,2	124985,8
T de despliegamiento [°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	
ΔH [kJ/mol]	134044,5	1588590,1	612235,9	
T de despliegamiento [°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 ₂ 1 mM	CaCl ₂ 10 mM	Sacarosa 32 g/l	Sacarosa 0,25 mM
ΔH [kJ/mol]	266008,2	308171,3	115082,4	246904,6
T de despliegamiento [°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 ₂ HPO ₄ /NaH PO ₄	Trehalosa 7,8 mM
ΔH [kJ/mol]	338792,7	127329,2	197967,5	135573,3
T de despliegamiento [°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 despliegamiento 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 despliegamiento más alta; pico 1) de rVWF.

Tabla 5.

10

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 períodos 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 despliegamiento 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), CaCl₂ 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, CaCl₂ 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, CaCl₂ 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, CaCl₂ 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

30 <110> Matthiessen, *et al.*

<120> Formulaciones de VWF recombinante

35 <130> 31315/43550

<150> Documento 61/017.881

<151> 31-12-2007

40 <160> 3

<170> Patenten versión 3.5

<210> 1

45 <211> 8833

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

50 <223> Polinucleótido sintético

<220>

<221> misc_feature

<223> prepro-vWF

55 <400> 1

ES 2 887 187 T3

agctcacagc tattgtggtg ggaaaggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctccccc agcagtgggg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg	120
gagctgttagc agacctgatt gagccttgc acgagctgag agcatggcct agggtggcg	180
gcaccattgt ccagcagctg agttcccag ggaccttggaa gatagccgca gccctcattt	240
gcaggggaag atgattcctg ccagattgc cgggtgctg cttgctctgg ccctcatttt	300
gccagggacc ctttgtcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct	360
tttcggaagt gacttcgtca acaccttga tgggagcatg tacagcttgc cgggatactg	420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattt gggacttcca	480
gaatggcaag agagtggacc tctccgtgtt tcttgggaa tttttgaca tccatttttt	540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgcctatg cctccaaagg	600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt	660
ggccaggatc gatggcagcg gcaacttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa	720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttgcgtt gatgacttta tgacccaaga	780
agggaccttg acctcgacc cttatgactt tgccaaactca tgggctctga gcagtggaga	840
acagtgggtt gaacgggcat ctcctccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat	900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgcctgact tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgtg	960
ccaccctctg gtggaccctcg agcctttgtt gcccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg	1020

tgctgggggg ctggagtgcg cctccctgc ctcctggag tacgccccga cctgtgcccc	1080
ggagggaaatg gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccaag tgcgcctgc	1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat	1200
caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgccctgagg gacagctcct	1260
ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta	1320
ccctcccgcc acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgcgaa acagccagtg	1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgc acaggtcaat cacacttcaa	1440
gagctttgac aacagatact tcacccctag tggatctgc cagtacctgc tggcccgga	1500
ttgccaggac cactcctct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga	1560
cgcgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgcgaa	1620
actgaagcat ggggcaggag ttgcatgga tggccaggac gtccagctcc ccctctgaa	1680
aggtgacctc cgcatccagc atacagtgac gcctccgtg cgccctcagct acggggagga	1740
cctgcagatg gactggatg gccgcggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc	1800
cggaaagacc tgccgcctgt gtggaaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac	1860
ccctctggg ctggcgagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gcctcaacc cgccatgac	1980
cagttctcc gaggaggcgt ggcgggtcct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg	2040
tgccgtcagc ccgctgcct acctgcggaa ctgcccgtac gacgtgtgct cctgctcgga	2100
cggccgcgag tgccgtgtcg ggcgcctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccaggt	2220
gtacctgcag tgccggaccc cctgcaacct gacctgcccgc tctctctctt acccgatga	2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggctg cttctgcccc ccagggtct acatggatga	2340
gaggggggac tgccgtccca aggcccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca	2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgtctac tgtgaggatg gcttcatgca	2460
ctgtaccatg agtggagtcc ccggaaagctt gctgcctgac gctgtccctca gcagtccct	2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtaaagc tgggtgttcc	2580
cgcgtacaac ctgcgggctg aagggtcgaa gtgtacccaa acgtgccaga actatgaccc	2640
ggagtgcgtc agcatgggt gtgtctctgg ctgcctctgc ccccccggca tggccggca	2700
tgagaacaga tggatggccc tggaaagggtg tccctgtttc catcaggggca aggagtatgc	2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgcgtc tgcgggacc ggaagtggaa	2820
ctgcacagac catgtgtgtc atgcacgtc ctccacgatc ggcacggccc actacccac	2880
cttcgacggg ctcaaataacc tggatggccc ggagtgccttac tacgttctgg tgcaggatta	2940

ctgcggcagt aaccctggga ccttcggat cctagtgggg aataaggat gcagccaccc	3000
ctcagtaaa tgcaagaaaac gggtaccat cctgggtggag ggaggagaga ttgagcttt	3060
tgacggggag gtgaatgtga agaggccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcatcc tgctgctggg caaagccctc tccgtgtct gggaccgcca	3180
cctgagcatc tccgtgtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaattttgat ggcatccaga acaatgaccc caccaggcgc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac tttgggaaact cctgaaaagt gagctcgac tgcgtgtaca ccagaaaaagt	3360
gcctctggac tcatcccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga	3420
ttcctcctgt agaattccta ccagtgcgt cttccaggac tgcaacaagc tggggaccc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcattacga cacctgctcc tgcgtgtcca ttggggactg	3540
cgcctgtttc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgcgtccagc atgcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgcgtgact ggcgtataaa cagctgtgca cctgcctgtc aagtgcacgt	3720
tcagcaccct gagccactgg cctgcctgt gcagtgtgtg gagggtgtcc atgcccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgaccctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgtttgc ctcaggaaag aaagtccaccc tgaatcccag	3900
tgaccctgag cactgccaga tttgccactg tgatgtgtc aacccaccc tgcgtccctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tggctgcctcc cacagatgcc ccgggtggcc ccaccactct	4020
gtatgtggag gacatctcg aaccggcggtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgg	4080
cctggcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccggag gctgagttt aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct ggcgtatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtgggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggt ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcattt ccagccaggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcatc accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggactt	4440
tgtccgctac gtccaggggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtatcccgg tggcattgg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggccctg agaacaaggc	4560
cttcgtgtcg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctaccc	4620
ctgtgacctt gcccctgaag cccctctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtggggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct	4740
ggatgtggcg ttctgttccgg aaggatcgga caaaaattggt gaagccgact tcaacaggag	4800

caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860
cacgggtctg cagtactcct acatgggtgac tggggagtac cccttcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc gggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa	4980
cactgggctg gcccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc aggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatt ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct	5220
ccccccgagag gtccttgacc tgggtctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tcccctgcac ctgactgcag ccagccccctg gacgtgatcc ttctcctgga	5340
tggctcctcc agtttccag cttcttattt tggatgaaatg aagagttcg ccaaggctt	5400
catttcaaaa gccaatatacg ggcctcgct cactcagggt tcagtgtc agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catgaaacgt ggtcccgag aaagccatt tgctgagcct	5520
tgtggacgta atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tggccttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatttgg tgccaggccc ggagcctcaa aggccgttgt	5640
catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccggcaggc	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgtgcag cccagctacg	5760
gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcacccctgg gcaattccctt cctccacaaa ctgtgtctg gatttggtag	5880
gatttgcattt gatgaggatg ggaatgagaa gaggccccggg gacgtgttgc cttgtccaga	5940
ccagtgcac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcatcggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagttccctg taaaagtgg	6060
agagacctgt ggctggcgt ggacactgccc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcgca	6120
catcgtgacc tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240
aaggcagggc tgcatttgcgat ccattcgaggta gaagcacagt gcccctccg tcgagctgca	6300
cagtgacatg gaggtgacgg tgaatgggag actgggtctct gttccttacg tgggtggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgcattcat gcatgaggc agattcaatc accttggtca	6420
catcttcaca ttcaactccac aaaacaatga gttccaaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcattcaaaag acgtatggtc tggggat ctgtgttag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
ggggccaggc cagacgtgcc agcccatcct ggaggagcag tgcattgtcc ccgacagctc	6660
ccactgcccag gtcctccctt taccactgtt tgctgaatgc cacaaggccc tggctccagc	6720

cacattctat	gccatctgcc	agcaggacag	ttgccaccag	gagcaagtgt	gtgaggtgat	6780
cgcctcttat	gcccacctct	gtcgaccaa	ccccgtctgc	gttgactgga	ggacacctga	6840
tttctgtgct	atgtcatgcc	caccatctct	gttctacaac	caactgtgagc	atggctgtcc	6900
ccggcactgt	gatggcaacg	tgagctcctg	tggggaccat	ccctccgaag	gctgtttctg	6960
ccctccagat	aaagtcatgt	tggaaggcag	ctgtgtccct	gaagaggcct	gcactcagtg	7020
cattggtgag	gatggagtcc	agcaccagtt	cctggaagcc	tgggtcccgg	accaccagcc	7080
ctgtcagatc	tgcacatgcc	tcagcggcg	gaaggtcaac	tgcacaacgc	agccctgccc	7140
cacggccaaa	gtccccacgt	gtggcctgtg	tgaagtagcc	cgccctccgcc	agaatgcaga	7200
ccagtgctgc	cccgagtgatg	agtgtgtgt	tgacccagtg	agctgtgacc	tgcccccaagt	7260
gcctcactgt	gaacgtggcc	tccagccac	actgaccaac	cctggcgagt	gcagacccaa	7320
cttcacctgc	gcctgcagga	aggaggagtg	caaaagagtg	tccccacccct	cctgcccccc	7380
gcaccgtttg	cccacccttc	ggaagaccca	gtgctgtgat	gagtagatgt	gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac	tccacagtga	gctgtccct	tgggtacttg	gcctcaactg	ccaccaatga	7500
ctgtggctgt	accacaacca	cctgccttcc	cgacaagggtg	tgtgtccacc	gaagcaccat	7560
ctaccctgtg	ggccagttct	gggaggaggg	ctgcgatgtg	tgcacctgca	ccgacatgga	7620
ggatgccgtg	atgggcctcc	gcgtggccca	gtgctccag	aagccctgtg	aggacagctg	7680
tcggtcgggc	ttcacttacg	ttctgcatga	aggcgagtgc	tgtggaaggt	gcctgccatc	7740
tgccctgtgag	gtggtactg	gctcaccgcg	gggggactcc	cagtcttcct	ggaagagtgt	7800
cggctccag	tgggcctccc	cggagaaccc	ctgcctcatac	aatgagtgtg	tccgagtgaa	7860
ggaggaggtc	tttataacaac	aaagaacgt	ctccctcccc	cagctggagg	tccctgtctg	7920
cccctcgggc	tttcagctga	gctgtaagac	ctcagcgtgc	tgccaagct	gtcgctgtga	7980
gcbcacatggag	gcctgcatgc	tcaatggcac	tgtcattggg	cccgaaaga	ctgtgatgat	8040
cgcatgtgc	acgacctgcc	gctgcattgt	gcaggtgggg	gtcatctctg	gattcaagct	8100
ggagtgcagg	aagaccacct	gcaacccctg	ccccctgggt	tacaagaag	aaaataaacac	8160
aggtgaatgt	tgtggagat	gttgcctac	ggcttgcacc	attcagctaa	gaggaggaca	8220
gatcatgaca	ctgaagcgtg	atgagacgct	ccaggatggc	tgtgataactc	acttctgcaa	8280
ggtaatgag	agaggagagt	acttctggg	gaagagggtc	acaggctgcc	caccctttga	8340
tgaacacaag	tgtctggctg	agggaggtaa	aattatgaaa	attccaggca	cctgctgtga	8400
cacatgtgag	gagcctgagt	gcaacgacat	caactgccagg	ctgcagtgatg	tcaaggtggg	8460
aagctgtaa	tctgaagtag	aggtggatat	ccactactgc	cagggcaa	gtgccagcaa	8520
agccatgtac	tccattgaca	tcaacgatgt	gcaggaccag	tgctcctgct	gctctccgac	8580
acggacggag	cccatgcagg	tggccctgca	ctgcaccaat	ggctctgttg	tgtaccatga	8640
ggttctcaat	gccatggagt	gcaaatgctc	ccccaggaag	tgcagcaagt	gaggctgctg	8700
cagctgcatg	ggtgcctgct	gctgcctgcc	ttggcctgat	ggccaggcca	gagtgcgtcc	8760
agtccctgtc	atgttctgct	cttgcctccct	tctgagccca	caataaaggc	ttagcttta	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	240
Thr Leu Cys Glu Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu			
245	250	255	
Leu Glu Tyr Ala Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly			
260	265	270	
Trp Thr Asp His Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu			
275	280	285	
Tyr Arg Gln Cys Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His			
290	295	300	
Ile Asn Glu Met Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro			
305	310	315	320
Glu Gly Gln Leu Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys			
325	330	335	
Pro Cys Val His Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser			
340	345	350	
Arg Asp Cys Asn Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser			
355	360	365	
Asn Glu Glu Cys Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe			
370	375	380	
Lys Ser Phe Asp Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr			
385	390	395	400

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

ES 2 887 187 T3

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 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

ES 2 887 187 T3

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 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 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 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. 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) un agente estabilizante; y (e) opcionalmente un tensioactivo;
- 5 en la que el rVWF es capaz de provocar la aglutinación de plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina;
- 10 en la que dicho rVWF comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 10 a) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3;
- 15 b) un análogo, fragmento o variante biológicamente activo de a);
- 15 c) un polipéptido codificado por el polinucleótido expuesto en SEQ ID NO: 1;
- 20 d) un análogo, fragmento o variante biológicamente activo de c); y
- 20 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;
- 25 en la que dicho tampón está compuesto por un agente de tamponamiento de pH en un intervalo de 0,1 mM a 500 mM y en la que el pH está en un intervalo de 2,0 a 12,0;
- 25 en la que dicha sal está a una concentración de 1 a 500 mM;
- 30 en la que dicho agente estabilizante está a una concentración 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
- 30 en la que dicho tensioactivo está a una concentración de 0,01 g/l a 0,5 g/l.
- 35 2. Formulación según la reivindicación 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.
- 35 3. Formulación según la reivindicación 2, en la que el agente de tamponamiento es citrato de sodio a una concentración de 15 mM.
- 40 4. Formulación según la reivindicación 3, en la que el pH está en el intervalo de 6,0-8,0, y preferiblemente el pH está en el intervalo de 6,5-7,3.
- 40 5. Formulación según la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que el pH es 7,0.
- 45 6. Formulación según la reivindicación 1, en la que el agente de tamponamiento es citrato y el pH es 7,0.
- 45 7. Formulación según la reivindicación 1, en la que la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de calcio, cloruro de sodio y cloruro de magnesio.
- 50 8. Formulación según la reivindicación 1, 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.
- 55 9. Formulación según la reivindicación 1, 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 a una concentración de 15 mM y el pH es 7,0; y en la que la sal es cloruro de calcio a una concentración de 10 mM y cloruro de sodio de 100 mM.
- 60 10. Formulación según la reivindicación 2, en la que el uno o más agentes de tamponamiento son histidina y Tris a una concentración de 3,3 mM cada uno.
- 60 11. Formulación según la reivindicación 7, en la que la una o más sales son cloruro de sodio a una concentración de 30 mM y cloruro de calcio a una concentración de 0,56 mM.
- 65 12. Formulación según la reivindicación 1, en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de 7,8 mM y manitol a una concentración de 58,6 mM.

13. Formulación según la reivindicación 1, 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, y preferiblemente el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.
- 5
14. Formulación según la reivindicación 1, 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 sal es cloruro de sodio a una concentración de 30 mM y 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; en la que el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.
- 10
15. 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) un agente estabilizante; y (e) opcionalmente un tensioactivo;
- 15
- en la que el rVWF es capaz de provocar la aglutinación de plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina;
- 20
- en la que dicho rVWF comprende un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en:
- 25
- 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
- 30
- 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;
- 35
- en la que dicho tampón está compuesto por un agente de tamponamiento de pH en un intervalo de 0,1 mM a 500 mM y en la que el pH está en un intervalo de 2,0 a 12,0;
- en la que dicho tampón comprende citrato de sodio a una concentración de 15 mM;
- 40
- en la que dicha sal es CaCl_2 a una concentración de 10 mM;
- en la que dicho agente estabilizante está a una concentración de 0,1 a 1000 mM; y
- en la que dicho tensioactivo está a una concentración de 0,01 g/l a 0,5 g/l.
- 45
16. Formulación según la reivindicación 15, en la que dicho agente de tamponamiento comprende además glicina, histidina, Tris o combinaciones de estos agentes.
17. Formulación según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en la que el pH está en el intervalo de 6,0-8,0, y preferiblemente el pH está en el intervalo de 6,5-7,3.
- 50
18. Formulación según la reivindicación 17, en la que el pH es 7,0.
19. Formulación según la reivindicación 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, cellobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa y combinaciones de estos agentes estabilizantes.
- 55
20. Formulación según la reivindicación 15, 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, y preferiblemente el tensioactivo es TWEEN-80 a 0,03 g/l.
- 60
21. Formulación según la reivindicación 19, en la que los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de 7,8 mM y manitol a una concentración de 58,6 mM.

FIG. 1

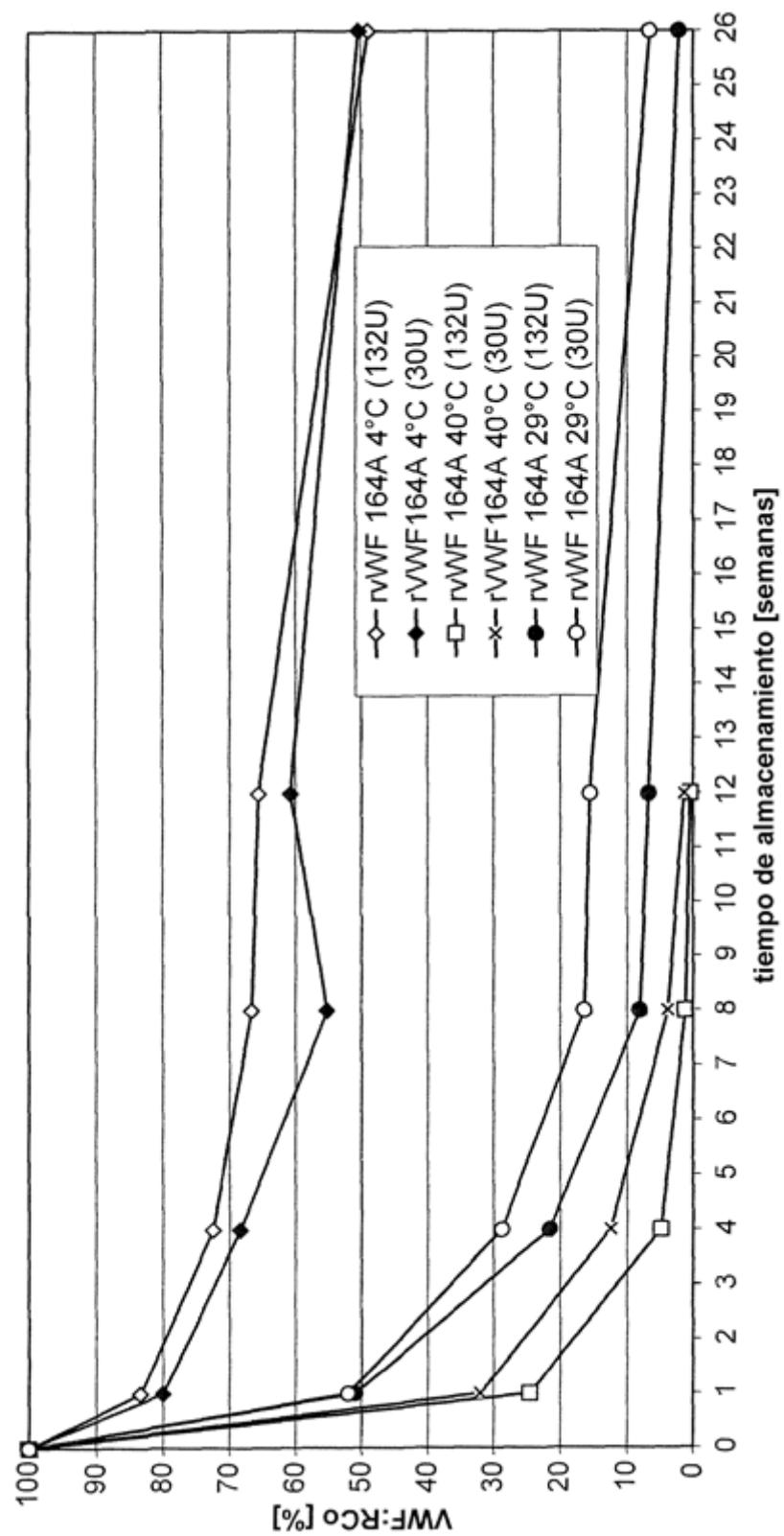


FIG. 2

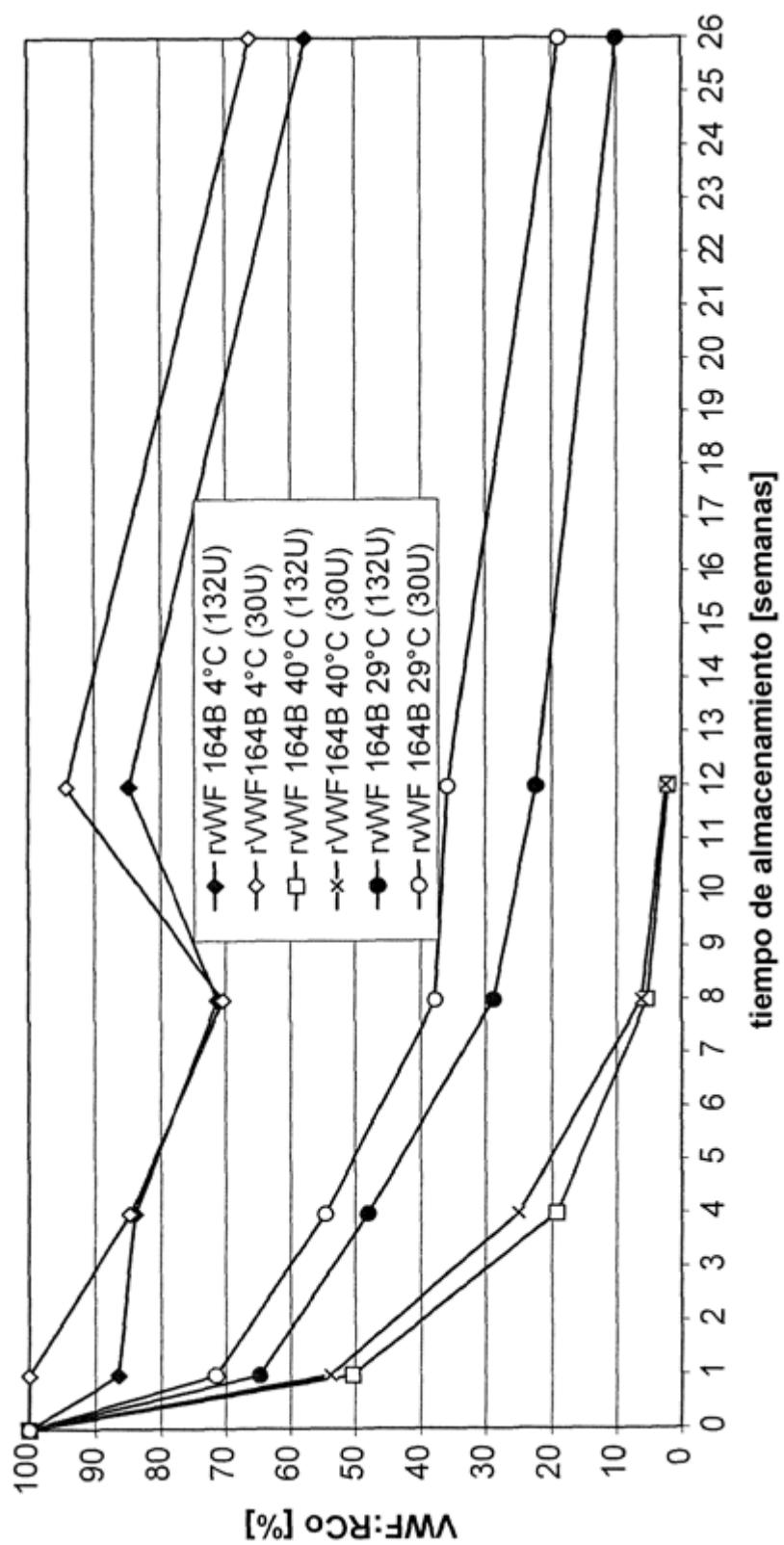


FIG. 3

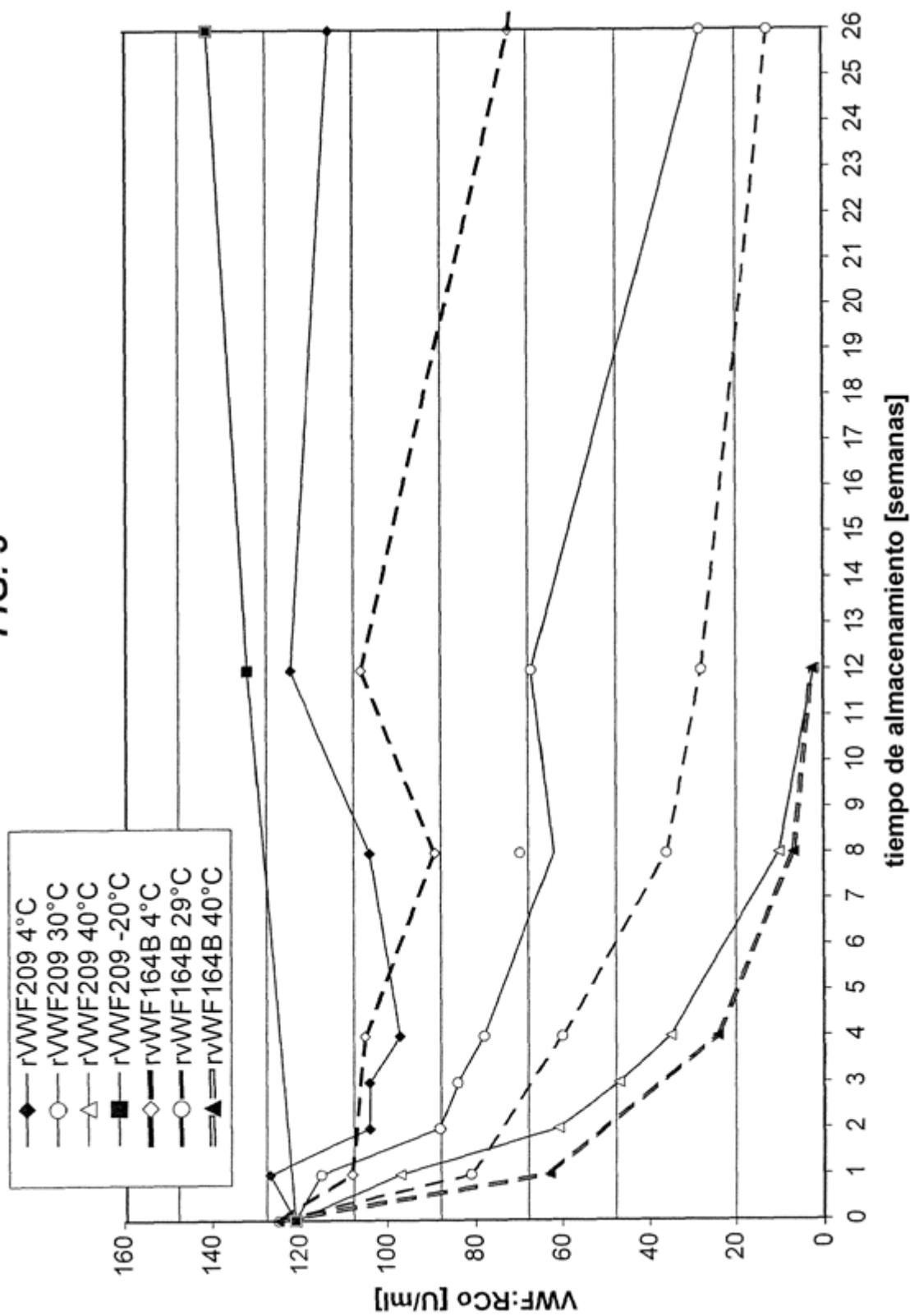


FIG. 4

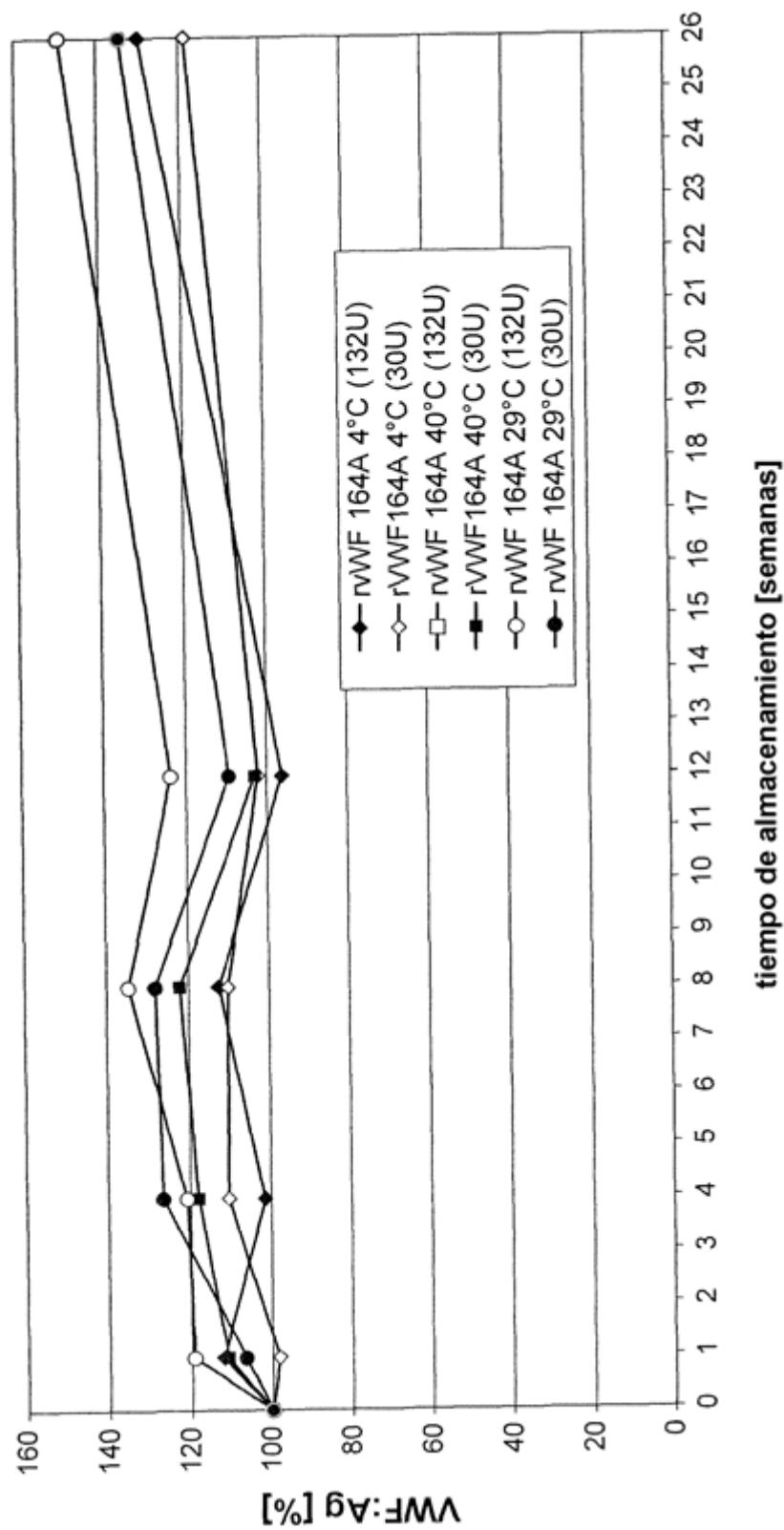


FIG. 5

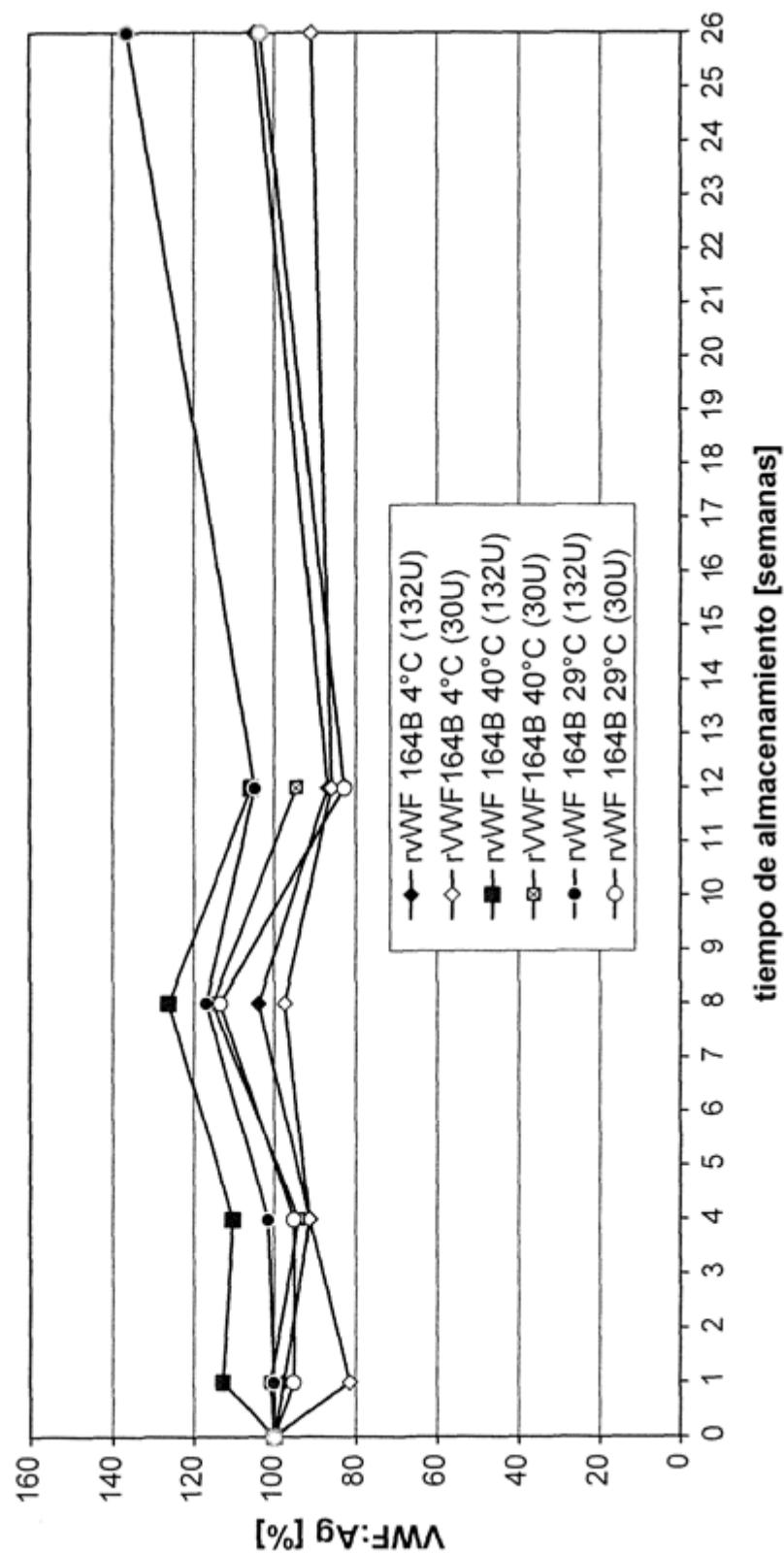


FIG. 6

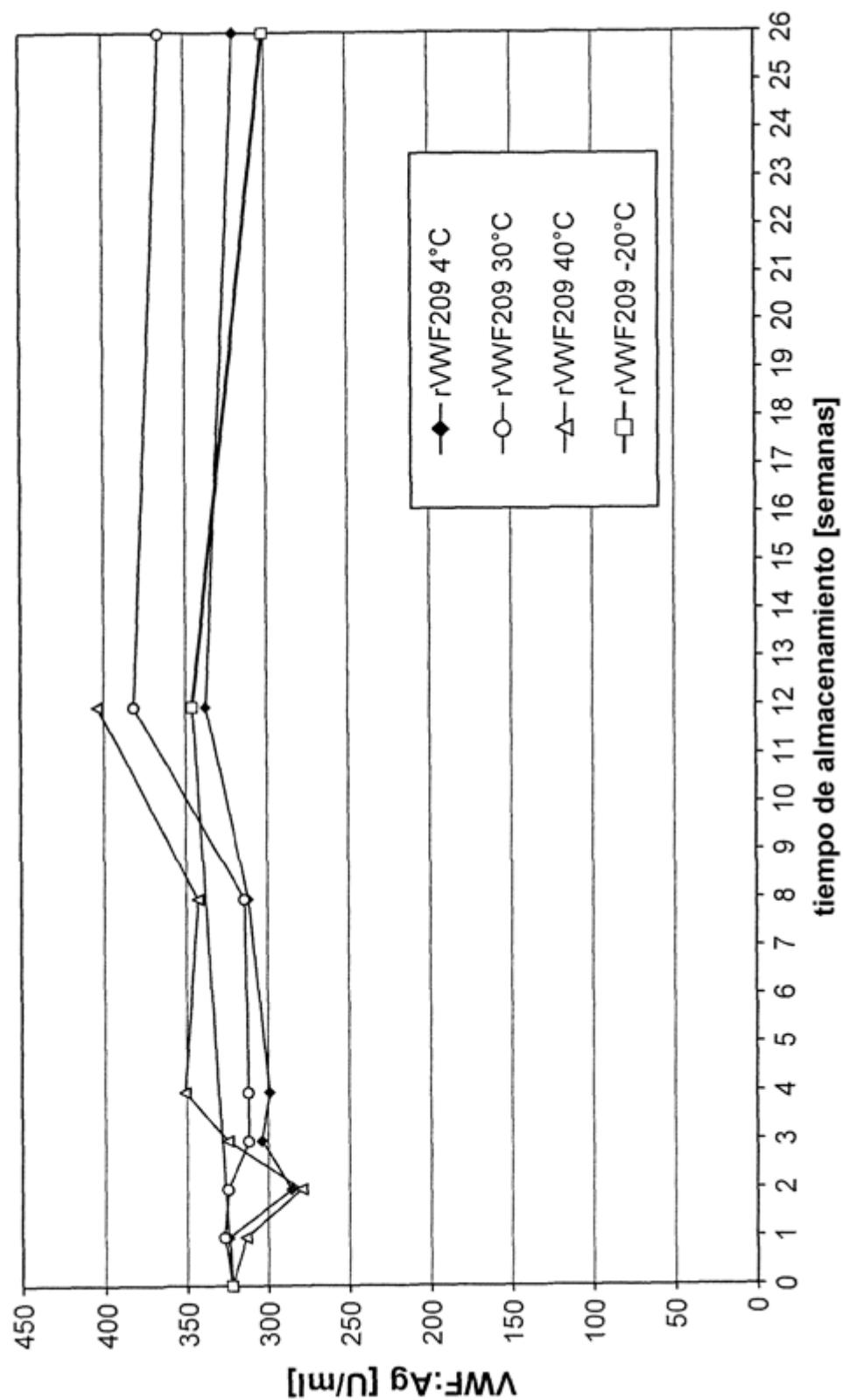


FIG. 7

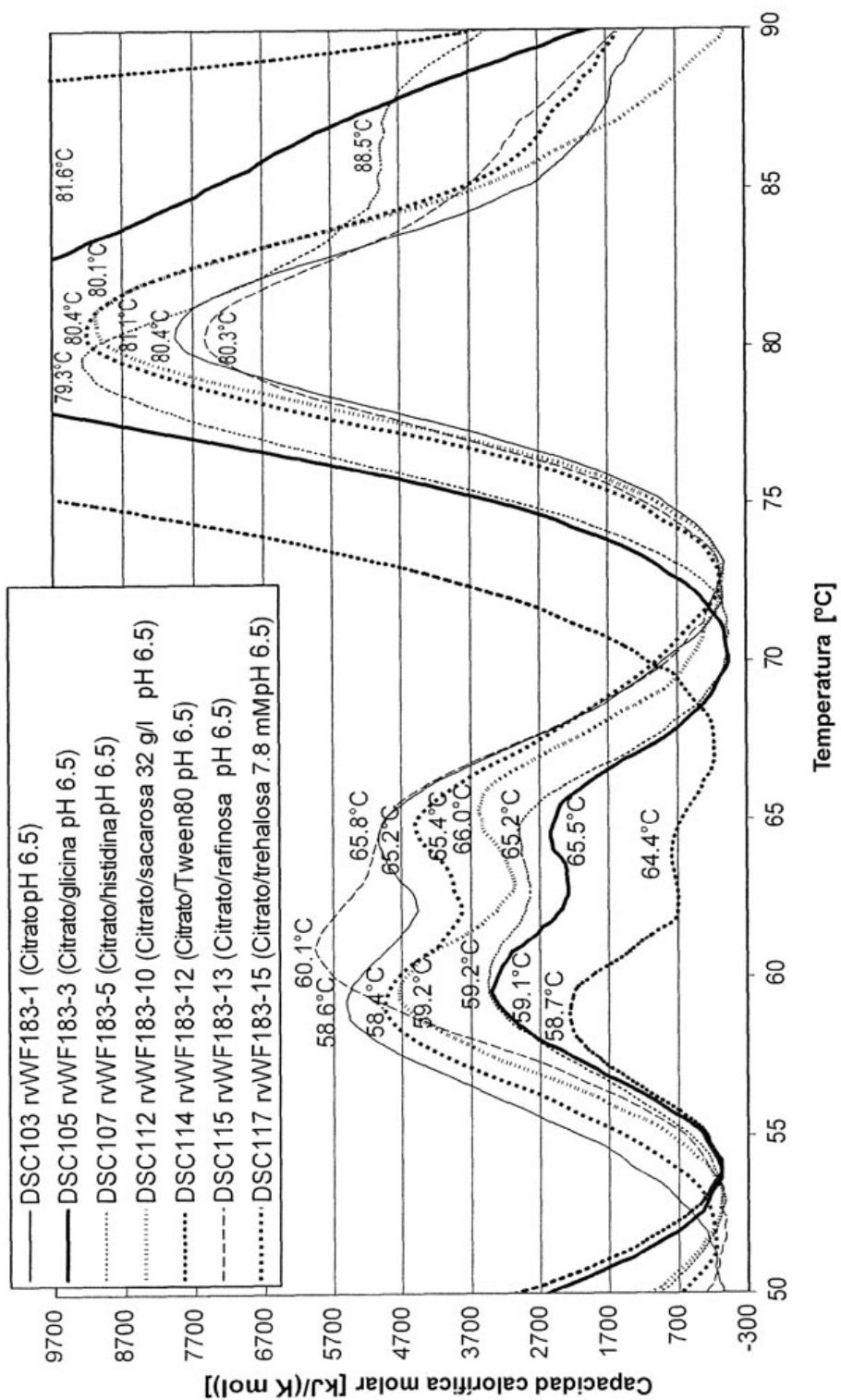


FIG. 8

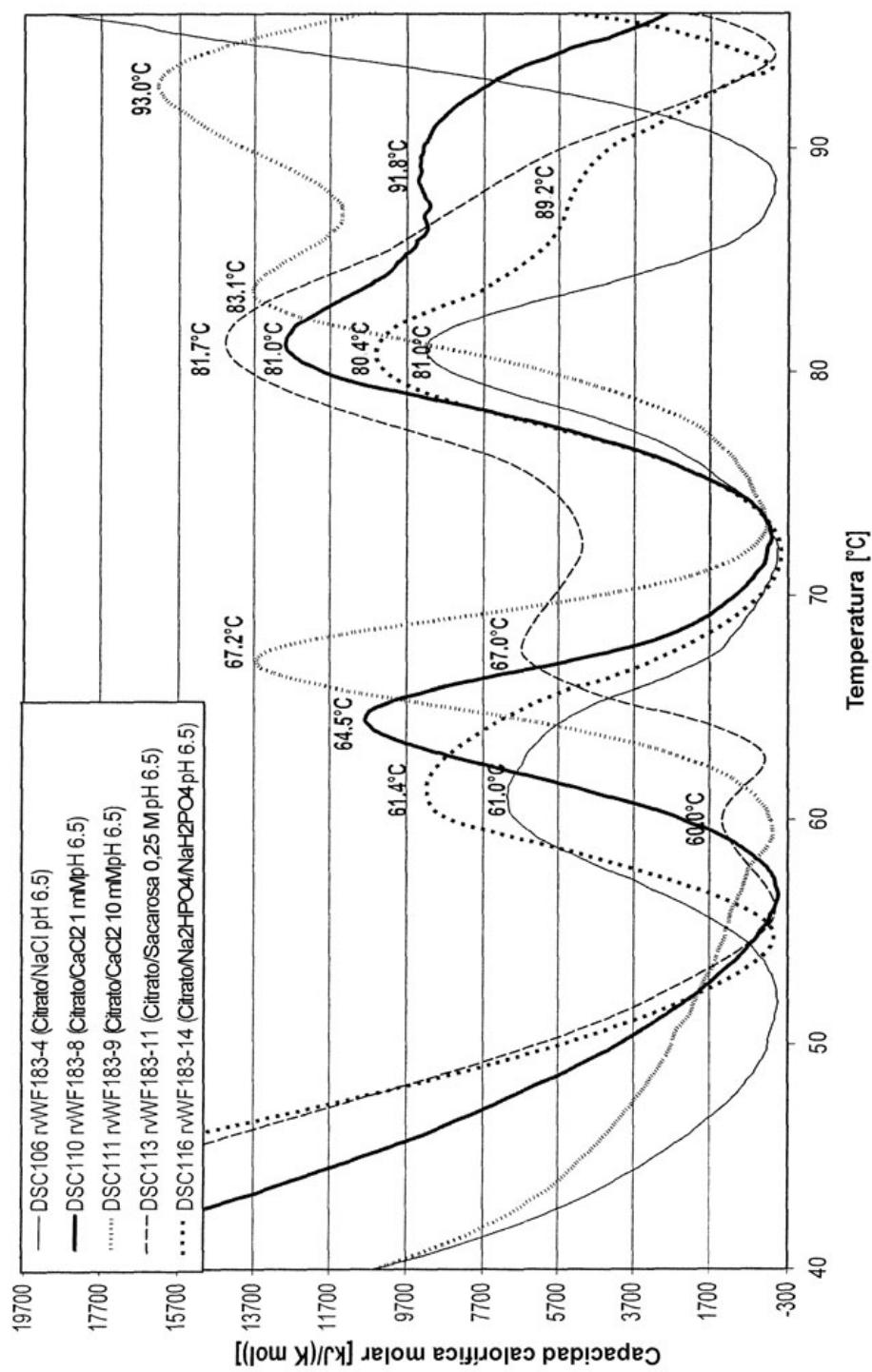


FIG. 9

