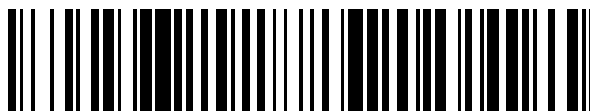


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 409 032**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)
A61K 38/36 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2009 E 09740822 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2013 EP 2349314**

54 Título: **Formulaciones liofilizadas de VWF recombinante**

30 Prioridad:

21.10.2008 US 107273 P

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

24.06.2013

73 Titular/es:

BAXTER INTERNATIONAL INC. (50.0%)
One Baxter Parkway
Deerfield, IL 60015-4633, US y
BAXTER HEALTHCARE S.A. (50.0%)

72 Inventor/es:

SCHNECKER, KURT;
HAIDWEGER, EVA y
TURECEK, PETER

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 409 032 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 liofilizadas de VWF recombinante

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 En general, la invención se refiere a formulaciones de VWF recombinante liofilizadas y a métodos para obtener una composición liofilizada que comprende VWF recombinante.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- 10 El factor Von Willebrand (VWF) es una glicoproteína circulante del plasma en forma de una serie de multímeros cuyas dimensiones varían entre unos 500 y 20.000 kD. Las formas multiméricas de VWF están compuestas por subunidades de polipeptídicas de 250 kD unidas entre sí por enlaces disulfuro. El VWF media en la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio de la pared del vaso dañado. Tan sólo los multímeros de mayor tamaño presentan actividad hemostática. Se asume que las células endoteliales secretan formas poliméricas de VWF de gran tamaño y que aquellas formas del VWF que tienen un menor peso molecular (VWF de bajo peso molecular) proceden de la escisión proteolítica. Los multímeros de mayor masa molecular se almacenan en los cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales, liberándose bajo estimulación.

- 15 El VWF es sintetizado por las células endoteliales y megacariocitos como prepro-VWF, que en gran medida consiste en dominios repetidos. Al producirse la escisión del péptido de señal, el pro-VWF se dimeriza a través de enlaces disulfuro en su terminal-C. Los dímeros sirven como protómeros para la multimerización, que está controlada por los enlaces disulfuro existentes entre los terminales libres de los extremos. La formación de los multímeros va seguida de la eliminación proteolítica de la secuencia del propéptido (Leyte y col., Biochem. J. 274 (1991), 257-261).

- 20 El producto de traducción primario predicho a partir del ADNc (cDNA) clonado de VWF es un polipéptido precursor de 2.813 residuos (prepro-VWF). El prepro-VWF consiste en un péptido señal de 22 aminoácidos y un propéptido de 741 aminoácidos, comprendiendo el VWF maduro 2.050 aminoácidos (Ruggeri Z.A. y Ware J., FASEB J., 308-316 (1993)).

- 25 Los defectos del VWF son la causa de la enfermedad de Von Willebrand (VWD), que se caracteriza por un fenotipo de sangrado más o menos pronunciado. La VWD de tipo 3 es la variedad más grave, en ella el VWF está completamente ausente, y la VWD de tipo 1 se refiere a una pérdida cuantitativa de VWF, pudiendo ser su fenotipo muy leve. La VWD tipo 2 se refiere a defectos cualitativos de la VWF y puede ser tan grave como la VWD tipo 3. La VWD tipo 2 presenta muchas sub-variedades, algunas de las cuales están asociadas a la pérdida o reducción de multímeros de alto peso molecular. El síndrome de Von Willebrand tipo 2a (VWS-2A) se caracteriza por una pérdida de multímeros de tamaño grande e intermedio. El VWS-2B se caracteriza por la pérdida de los multímeros de mayor peso molecular. En la técnica actual se conocen otras enfermedades y trastornos relacionados con el VWF.

- 30 Las patentes US Nº 6.531.577, 7.166.709, así como la Patente Europea EP 152 312 describen formulaciones de VWF obtenidas a partir de plasma. No obstante, además de las cuestiones relativas a la cantidad y la pureza del VWF obtenido a partir del plasma, también existe un riesgo de transmisión sanguínea de patógenos (por ejemplo virus, variantes de la Enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (vECJ)). También es sabido que el VWF forma agregados en condiciones de estrés.

Así, en la técnica existe la necesidad de desarrollar una formulación farmacéutica estable que comprenda VWF recombinante.

SUMARIO DE LA INVENCION

- 40 La presente invención proporciona formulaciones útiles para la liofilización de VWF recombinante, que resultan en una composición farmacéutica muy estable. La composición farmacéutica estable es útil como agente terapéutico para el tratamiento de pacientes que padecen trastornos o enfermedades que pueden beneficiarse de la administración de VWF recombinante.

- 45 En una realización, se proporciona una formulación farmacéutica estable liofilizada de un factor von Willebrand recombinante (rVWF) según la reivindicación 1.

- 50 En otra realización, el rVWF incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID Nº 3. En otra realización de la invención, el agente tampón se selecciona de entre el grupo consistente en citrato, glicina, histidina, HEPES, Tris y sus combinaciones. En otra realización, el agente tampón es citrato. En diversas realizaciones, el pH está en el rango de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 o es de aproximadamente 7,3. En otra realización, el pH está en torno a 7,3.

En otra realización, el aminoácido mencionado anteriormente se selecciona de entre el grupo consistente en glicina, histidina, prolina, serina, alanina y arginina. En otra realización, la concentración de aminoácido se sitúa entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 300 mM. En otra realización adicional, el aminoácido es glicina a una concentración de aproximadamente 15 mM.

- 5 En una realización de la invención, el rVWF comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N° 3, el agente tampón es citrato y el pH es de aproximadamente 7,3; siendo el aminoácido glicina a una concentración de aproximadamente 15 mM.

- 10 En otra realización adicional de la invención, el o los agentes estabilizantes anteriormente mencionados se seleccionan de entre el grupo consistente en manitol, lactosa, sorbitol, xilitol, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa y combinaciones de estos agentes estabilizantes. En una realización, los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentración de aproximadamente 10 g/l y manitol a una concentración de aproximadamente 20 g/l.

- 15 En otra realización adicional de la invención, el agente tensioactivo mencionado se selecciona de entre el grupo consistente en digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20, TWEEN-80 y combinaciones de los mismos. En otra realización, el agente tensioactivo es TWEEN-80 a aproximadamente 0,01 g/l.

- 20 En otra realización de la invención, el rVWF comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID N° 3, siendo el agente tampón citrato a una concentración de aproximadamente 15 mM y a un pH de aproximadamente 7,3; siendo el aminoácido glicina a una concentración de aproximadamente 15 mM; siendo los agentes estabilizadores trehalosa a una concentración de aproximadamente 10 g/l y manitol a una concentración de aproximadamente 20 g/l.; y siendo el agente tensioactivo TWEEN-80 a una concentración de aproximadamente 0,1 g/l.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

- Figura 1: análisis ANCOVA de la actividad del pool de VWF:RCo en lotes evaluador en cuanto a su estabilidad (almacenados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$).
 Figura 2: muestra el incremento de la humedad residual en el rVWF FDP almacenado a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.
 25 Figura 3: muestra el incremento de la humedad residual en el rVWF FDP almacenado a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Definición de términos

- 30 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en este documento tienen el significado normalmente entendido por el experto en el campo técnico al cual pertenece la presente invención. Las siguientes referencias facilitan al experto una definición general de muchos de los términos utilizados en esta invención: Singleton y col., *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY* (2d ed. 1994); *THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY* (Walker ed., 1988); *THE GLOSSARY OF GENETICS*, 5TH ED., R. Rieger y col. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, *THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF BIOLOGY* (1991).

- 35 Todas las publicaciones, solicitudes de patentes, patentes y otras referencias citadas en este documento quedan incorporadas al mismo en su totalidad por referencia, en la medida en que ello no se oponga a lo aquí descrito.

Debe tenerse en cuenta que, tal y como se utilizan en esta especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un," "una," y "el" incluyen las referencias al plural, a menos que el contexto lo exija claramente en otro sentido.

- 40 Tal y como se utilizan en el presente documento, los siguientes términos tendrán los significados que se les atribuyen, a menos que se especifique en otro sentido.

- El término "que comprende", en relación con un compuesto péptido, significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales tanto en el terminal amino de la secuencia dada como en el carboxilo o en ambos. Por supuesto, estos aminoácidos adicionales no deberían interferir de forma significativa con la actividad del compuesto.
 45 En lo que respecta a una composición de la presente invención, el término "que comprende" significa que una composición puede incluir componentes adicionales. Dichos componentes adicionales no deberían interferir significativamente con la actividad de la composición.

- El término "farmacológicamente activo" significa que se ha determinado que una sustancia descrita como tal tiene una actividad que afecta a un parámetro médico (por ejemplo, pero sin que ello constituya una limitación, sobre la presión sanguínea, el recuento de glóbulos rojos, los niveles de colesterol) o a una situación de enfermedad (por ejemplo, pero sin que ello constituya una limitación, cáncer, trastornos autoinmunes).
 50

En la forma utilizada en este documento, los términos "expresar," "que expresa" y "expresión" significan permitir o hacer que se manifieste la información que contiene un gen o secuencia de ADN, por ejemplo produciendo una proteína, mediante la activación de las funciones celulares que participan en la transcripción y traducción del correspondiente gen o secuencia de ADN. Una secuencia de ADN se expresa en o mediante una célula para formar un "producto de expresión, como una proteína" También puede decirse que el propio producto de expresión, por ejemplo la proteína resultante, está "expresado". Un producto de expresión puede caracterizarse como intracelular, extracelular o secretado. El término "intracelular" significa en el interior de una célula. El término "extracelular" significa en el exterior de una célula, como una proteína transmembrana. Una sustancia es "secretada" por una célula si aparece en cantidades significativas en el exterior de la célula procedente de algún punto situado sobre o en el interior de la misma.

Tal y como se utiliza en este documento, un "polipéptido" se refiere a un polímero compuesto por residuos aminoácidos, variantes estructurales, variantes estructurales relacionadas ocurrientes en estado natural y análogos sintéticos de los mismos no ocurrientes de forma natural, unidos mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos sintéticos se preparan, por ejemplo, utilizando un sintetizador de polipéptidos automatizado. El término "proteína" se refiere habitualmente a grandes polipéptidos. El término "péptido" suele referirse a polipéptidos cortos.

Tal y como se utiliza aquí, un "fragmento" de un polipéptido se refiere a cualquier porción de un polipéptido o proteína más pequeño que el producto completo de expresión del polipéptido o la proteína.

Tal y como se utiliza aquí, un "análogo" se refiere a cualesquiera dos o más polipéptidos con una estructura sustancialmente similar y que presentan la misma actividad biológica, pero con diversos grados de actividad, que la molécula completa o que un fragmento de la misma. Los análogos difieren en la composición de sus secuencias de aminoácidos en función de una o más mutaciones que implican la sustitución, delección, inserción y/o adición de uno o más aminoácidos, con otros aminoácidos. Las sustituciones pueden ser conservadoras o no conservadoras, en función de la afinidad físico-química o funcional del aminoácido que está siendo sustituido y del aminoácido que lo sustituye.

Tal y como se utiliza aquí, "variante" se refiere a un polipéptido, proteína o análogo de los mismos modificado de forma que incluya grupos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Dichos grupos pueden modular la solubilidad de la molécula, su absorción, vida media, etc. Alternativamente, los grupos pueden reducir la toxicidad de la molécula y eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseable de la misma, etc. Los grupos capaces de mediar dichos efectos se describen en la obra de Remington Pharmaceutical Sciences (1980). Los procedimientos para el acoplamiento de dichos grupos a una molécula son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, y sin limitación, en uno de los aspectos, la variante es un factor de coagulación sanguínea con una modificación química que confiere una vida media más prolongada *in vivo* a la proteína. En diversos aspectos, los polipéptidos están modificados por glicosilación, pegilación y/o polisialización.

VWF Recombinante

Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos del prepro-VWF se indican en las SEQ ID Nº 1 y 2 respectivamente, y están disponibles bajo los números de acceso del GenBank NM_000552 y NP_000543 respectivamente. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína madura del VWF se indica en la SEQ ID Nº 3 (correspondiente a los aminoácidos 764-2.813 de la secuencia de aminoácidos de longitud total del prepro-VWF).

Una forma de rVWF útil tiene al menos la propiedad de estabilizar *in vivo*, es decir de enlazar, al menos una molécula de Factor VIII (FVIII) y opcionalmente de presentar un patrón de glicosilación que resulta farmacológicamente aceptable. Ejemplos específicos de ello son el VWF sin el dominio A2, lo que le confiere mayor resistencia a la proteólisis (Lankhof y col., *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997) y un fragmento de VWF desde Val 449 a Asn 730 que incluye el dominio de enlace Ib de la glicoproteína, así como puntos de enlace de colágeno y heparina (Pietu y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989). En uno de sus aspectos, la determinación de la capacidad de un VWF para estabilizar al menos una molécula de FVIII en mamíferos con deficiencias de VWF se lleva a cabo mediante los métodos conocidos en la técnica.

El rVWF de la presente invención se obtiene por cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se describe en el documento WO86/06096, publicado el 23 de octubre de 1986, así como en la solicitud de patente US Nº 07/559.509, del 23 de julio de 1990, que queda incorporada por referencia al presente documento, en relación con los métodos de obtención de VWF recombinante. Así, se conocen en la técnica métodos para (i) producir ADN recombinante por ingeniería genética, es decir mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células eucarióticas o procarióticas por transfección, por ejemplo electroporación o microinyección, (iii) cultivar las células transformadas, por ejemplo de forma continua o en lotes, (iv) expresar el VWF, por ejemplo de forma constituyente o mediante inducción y (v) aislar el VWF, por ejemplo a partir del medio de cultivo o recolectando las células transformadas, a fin de (vi) obtener rVWF purificado, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio aniónico o de afinidad. En uno de los aspectos, se obtiene un VWF recombinante en células huésped transformadas utilizando técnicas de ADN recombinante bien conocidas. Por ejemplo, las

secuencias que codifican el polipéptido pueden ser escindidas del ADN utilizando las enzimas de restricción adecuadas. Alternativamente, la molécula de ADN se sintetiza, en otro de los aspectos, utilizando técnicas de síntesis química, como el método del fosforamido. Asimismo, en otro aspecto adicional de la invención, se utiliza una combinación de estas técnicas.

5 La invención también proporciona vectores que codifican los polipéptidos de la invención en un huésped adecuado. El vector comprende un nucleótido que codifica el polipéptido que se encuentra enlazado operativamente a las secuencias adecuadas de control de la expresión. Son bien conocidos diversos métodos para llevar a cabo este enlace operativo, tanto antes como después de la inserción del polinucleótido en el vector. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de enlace ribosomales, señales de inicio, señales de parada, señales de poliadenilación y otras señales relacionadas con el control de la transcripción de la traducción. El vector resultante que incluye el polinucleótido se utiliza para transformar un huésped adecuado. Esta transformación puede realizarse por métodos bien conocidos en la técnica.

15 Para la práctica de esta invención puede emplearse cualquiera de las muchas y bien conocidas células huésped. La selección de un huésped particular depende de diversos factores reconocidos por la técnica, entre ellos, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión seleccionado, 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 bio-seguridad y el coste. Debe conseguirse un equilibrio entre todos estos factores, quedando bien entendido que no todas las células huésped resultan igualmente efectivas para la expresión de una secuencia de ADN específica. Dentro de estas directrices generales, entre las células huésped microbianas útiles se encuentran, sin limitación, bacterias, levaduras y otras células de cultivos de hongos, insectos, plantas, mamíferos (incluyendo seres humanos) u otros organismos huéspedes bien conocidos en la técnica.

25 Las células huésped transformadas se cultivan en condiciones convencionales de fermentación de forma que se expresen los compuestos deseados. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Por último, los polipéptidos se purifican del medio de cultivo o de las propias células huésped a por métodos bien conocidos en la técnica.

Dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar un compuesto de la invención, opcionalmente se encuentran grupos carbohidrato (oligosacáridos) unidos a puntos conocidos como sitios de glicosilación en proteínas. En general, los oligosacáridos con enlaces tipo O- están unidos a residuos serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos con enlaces tipo N- se unen a residuos asparagina (Asn) cuando éstos forman parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, siendo X cualquier aminoácido excepto prolina. Preferentemente X es uno de los 19 aminoácidos naturales sin contar la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos con enlaces tipo N- y O- y los residuos de azúcar que se encuentran en cada uno de los tipos son diferentes. Un tipo de azúcar que suele encontrarse habitualmente en los oligosacáridos con enlaces tanto de tipo N- como O- es el ácido N-acetilneuramínico (ácido siálico). El ácido siálico suele ser el residuo terminal de los oligosacáridos con enlaces tipo N- y tipo O- y, debido a su carga negativa, en uno de los aspectos confiere propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Dichos sitios pueden estar incorporados en el enlazante de los compuestos de la presente invención, y son preferiblemente glicosilados por una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo en células mamíferas como CHO, BHK, COS). En otros aspectos, dichos sitios están glicosilados por procedimientos sintéticos o semi-sintéticos conocidos en la técnica.

40 Alternativamente, los compuestos se obtienen mediante métodos sintéticos utilizando, por ejemplo, técnicas de síntesis en fase sólida. En la técnica se conocen técnicas adecuadas, entre las que se incluyen las descritas en Merrifield (1973), Chem. Polypeptides, pp. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis y col. (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart y Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; US Pat. N° 3.941.763; Finn y col. (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 105-253; y Erickson y col. (1976), The Proteins (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la técnica preferida para la obtención de péptidos individuales, ya que resulta el método más rentable de obtención de péptidos individuales de tamaño reducido.

Fragmentos, variantes y análogos de VWF

En la técnica se conocen diversos métodos para la preparación de fragmentos de polipéptidos, variantes o análogos.

50 Los fragmentos de un polipéptido se preparan utilizando, sin limitación, técnicas de escisión enzimática (por ejemplo tripsina, quimotripsina) y también con medios recombinantes para generar fragmentos polipeptídicos con una secuencia de aminoácidos específica. Los fragmentos de polipéptido pueden generarse de forma que incluyan una región de la proteína con una actividad específica, tal como un dominio de multimerización o cualquier otro dominio de VWF identificable conocido en la técnica.

55 Se bien conocidos diversos métodos para la obtención de análogos de polipéptidos. Los análogos de secuencias de aminoácidos de un polipéptido pueden ser análogos de sustitución, de inserción, de adición o de delección. Los análogos de delección, incluyendo los fragmentos polipéptidos, carecen de uno o más residuos de la proteína nativa que no resultan esenciales para la función o actividad inmunogénica. Los análogos de inserción implican la adición

de aminoácidos, por ejemplo en un punto no terminal del polipéptido. Por ejemplo, este análogo puede incluir, sin limitación, la inserción de un epítipo inmunorreactivo o de simplemente un único residuo. Los análogos de adición, incluyendo los fragmentos polipéptidos, incluyen la adición de uno o más aminoácidos en cualquiera o en ambos extremos de una proteína, incluyendo por ejemplo proteínas de fusión. También se contemplan combinaciones de los análogos anteriormente mencionados.

En general, los análogos de sustitución intercambian un aminoácido del tipo que salvaje por otro, en uno o más puntos de la proteína, pudiendo diseñarse para que modulen una o más propiedades del polipéptido sin que se pierdan por completo otras funciones o propiedades. En uno de los aspectos, las sustituciones son conservadoras. "Sustitución conservadora de aminoácidos" es la sustitución de un aminoácido por un aminoácido que tenga una cadena lateral o carácter químico similar. Entre los aminoácidos similares para la realización de sustituciones conservadoras se incluyen aquellos que incluyen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral alifática e 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 hidroxilada alifática (serina, treonina).

En uno de los aspectos de la invención, los análogos son esencialmente homólogos o esencialmente idénticos al VWF recombinante del que proceden. Entre los análogos se incluyen aquellos que retienen al menos una parte de la actividad biológica del polipéptido natural, por ejemplo la actividad de coagulación sanguínea.

Entre las variantes de polipéptidos contempladas se incluyen, sin limitación, polipéptidos modificados químicamente por técnicas como ubiquinación, glicosilación, incluyendo polisialilación, conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, etiquetado, fijación al polímero covalente como pegilación (derivatización con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos como ornitina que no suelen encontrarse en las proteínas humanas. Las variantes conservan las mismas o esencialmente las mismas propiedades de enlace de las moléculas no modificadas de la invención. Dicha modificación química puede incluir el enlace directo o indirecto (por ejemplo, mediante un enlazante) de un agente al polipéptido de VWF. En caso de una fijación indirecta, se contempla la posibilidad de que el enlazante pueda ser hidrolizable o no hidrolizable.

En uno de los aspectos, la preparación de análogos polipeptídicos pegilados comprende las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (como éster reactivo o derivado aldehído de PEG) bajo condiciones que permitan que el polipéptido del constructo de enlace se fije a uno o más grupos PEG, y (b) obtener los productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinan en función de parámetros conocidos y del resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor sea la proporción PEG/proteína, mayor será el porcentaje de producto polipegilado. En algunas realizaciones, el constructo de enlace posee una sola variedad de PEG en el extremo N-. El polietilenglicol (PEG) puede fijarse al factor de coagulación sanguínea para, por ejemplo, facilitar una mayor vida media *in vivo*. El PEG puede tener cualquier peso molecular adecuado, pudiendo ser tipo lineal o ramificado. El peso molecular medio del PEG oscila entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aprox. 5 kDa a aprox. 50 kDa, o entre unos 5 kDa y unos 10 kDa. En ciertos aspectos, los grupos PEG se unen al factor de coagulación sanguínea vía acilación o alquilación reductora, a través de un grupo reactivo natural o modificado de la fracción PEG (por ejemplo un grupo aldehído, amino, tiol o éster) que se une a un grupo reactivo presente en el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo un grupo aldehído, amino o éster) o mediante cualquier otra técnica conocida.

En la Publicación de Patente US 20060160948, Fernandes y Gregoriadis; Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997 y en Saenko y col., Haemophilia 12:42-51, 2006 se describen métodos de preparación de polipéptidos polisialilados. Brevemente, se agita una solución de ácido colomínico (CA) que contiene NaIO₄ 0,1M en la oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. La solución activada de CA se dializa en oscuridad en una solución tampón de fosfato sódico 0,05M, por ejemplo con un pH de 7,2, y esta solución se añade a una solución de rVWF y se incuba durante 18 h en oscuridad a temperatura ambiente, agitando suavemente. Opcionalmente, los reactivos libres pueden separarse del conjugado de rVWF y ácido polisialílico, por ejemplo mediante ultrafiltrado/diafiltrado. La conjugación del rVWF con el ácido polisialílico se consigue utilizando glutaraldehído como reactivo de reticulación (Migneault y col., Biotechniques 37: 790-796, 2004).

En otro aspecto de la invención también se contempla que un polipéptido según la invención sea una proteína de fusión con un segundo agente que sea un polipéptido. En una realización, el segundo agente, que es un polipéptido, puede ser, sin limitación, una enzima, un factor de crecimiento, un anticuerpo, una citoquina, una quimioquina, 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 de las proteínas anteriormente descritas. En una realización relacionada, el segundo agente es un factor de coagulación sanguínea, como Factor VIII, Factor VII, Factor IX. La proteína de fusión que se contempla se obtiene por técnicas químicas o recombinantes bien conocidas en la técnica.

En otro de los aspectos también se contempla que los polipéptidos prepro-VWF y pro-VWF proporcionen beneficios terapéuticos a las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, la patente US N° 7.005.502 describe una

preparación farmacéutica que comprende cantidades sustanciales de pro-VWF, lo que induce a la generación de trombina *in vitro*. Además de fragmentos recombinantes y biológicamente activos, variantes u otros análogos del VWF maduro natural, la presente invención contempla el uso de fragmentos recombinantes y biológicamente activos, variantes o análogos de prepro-VWF (SEQ ID N° 2) o de polipéptidos de pro-VWF (residuos aminoácidos 23 a 764 de la SEQ ID N° 2) en las formulaciones aquí descritas.

El experto en la materia podrá generar con facilidad fragmentos de codificación de polinucleótidos, variantes y análogos de la molécula natural que posean la misma actividad biológica o una actividad biológica similar a la de la molécula natural. En diversos aspectos, estos polinucleótidos se preparan utilizando técnicas PCR, digestión/ligadura de la molécula de codificación del ADN y similares. De este modo, el experto en la técnica será capaz de generar modificaciones básicas únicas de la cadena de ADN para obtener un codón alterado y una mutación sustitutiva, utilizando cualquier método conocido en la técnica, incluyendo sin limitación, mutagénesis específica de sitio. Tal y como se utiliza aquí, la frase "condiciones de hibridación moderadamente rigurosas" significa, por ejemplo, hibridación a 42°C en formamida al 50% y lavado a 60°C en 0,1xSSC, 0,1% SDS. El experto comprenderá que la variación de dichas condiciones se produce en función de la longitud y del contenido base de nucleótido GC de las secuencias a hibridar. Las fórmulas habituales en la técnica son válidas para determinar las condiciones exactas de hibridación. Véase Sambrook y col., 9.47-9.51 en *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989).

Liofilización

En uno de los aspectos de la invención, las formulaciones que comprenden un polipéptido de VWF conforme a la invención se liofilizan antes de su administración. La liofilización se lleva a cabo mediante las técnicas habituales en la industria y debería optimizarse para la composición a desarrollar [Tang y col., *Pharm Res.* 21:191-200, (2004), y Chang y col., *Pharm Res.* 13:243-9 (1996)].

En uno de los aspectos, un ciclo de liofilización consta de tres fases: congelación, secado primario y secado secundario [A.P. Mackenzie, *Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol* 278:167 (1977)]. En la etapa de congelación, la solución se enfría para iniciar la formación de hielo. Igualmente, esta fase induce la cristalización del agente espesante. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, que se lleva a cabo reduciendo la presión de la cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, utilizando vacío, e introduciendo calor para fomentar la sublimación. Por último, se elimina el agua absorbida o aprisionada en la fase de secado secundario bajo presión reducida en la cámara y elevada temperatura del revestimiento. Con el proceso se obtiene un material conocido como torta liofilizada. Posteriormente, la torta puede reconstituirse con agua esterilizada o con un disolvente adecuado para su inyección.

El ciclo de liofilización no determina sólo la condición física final de los excipientes, sino que también afecta a otros parámetros, como el tiempo de reconstitución, el aspecto, la estabilidad y el contenido en humedad final. La estructura de la composición en el estado de congelación va evolucionando a través de diversas transiciones (por ejemplo, transiciones cristalinas, humectación y cristalizaciones) que se producen a temperaturas específicas, pudiendo utilizarse para comprender y optimizar el proceso de liofilización. La temperatura de transición vítrea (T_g y/o T_g') puede aportar información acerca del estado físico de un soluto, pudiendo determinarse mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). T_g y T_g' constituyen un importante parámetro a tener en cuenta a la hora de diseñar el ciclo de liofilización. Por ejemplo, la temperatura T_g' es un factor importante para el secado primario. Asimismo, en el estado seco, la temperatura de transición vítrea facilita información acerca de la temperatura de almacenamiento del producto final.

Formulaciones y excipientes en general

Los excipientes son aditivos que enriquecen o mejoran la estabilidad y la presentación de un producto farmacéutico (por ejemplo, una proteína). Independientemente del motivo de su inclusión, los excipientes constituyen un componente integrante de una formulación y, por tanto, deben ser seguros y bien tolerados por los pacientes. En el caso de los medicamentos proteínicos, la selección de los excipientes reviste especial importancia, ya que pueden afectar tanto a la eficacia como a la inmunogenicidad del medicamento. Por ello, deben desarrollarse formulaciones de proteínas con una selección adecuada de excipientes que aporten una estabilidad, seguridad y comerciabilidad adecuadas.

En uno de los aspectos, una formulación liofilizada comprende al menos una o más soluciones tampón, un agente espesante y un estabilizante. En este aspecto, se evalúa el uso de un tensioactivo, que se selecciona cuando la agregación durante la fase de liofilización o durante la reconstitución adquiere gran importancia. Se incluye un agente tampón adecuado para mantener la formulación dentro de unos rangos de pH estables durante la liofilización. En la Tabla A se muestra una comparación de los componentes excipientes contemplados para las formulaciones de proteína líquidas y liofilizadas.

Tabla A Componentes excipiente para formulaciones de proteína liofilizadas

Excipiente	Función en la formulación liofilizada
Amortiguador	Mantiene el pH de la formulación durante la liofilización y la reconstitución
Agente de tonicidad/ estabilizante	- Los estabilizadores incluyen crio- y líoprotectores. - Entre los ejemplos se incluyen polioles, azúcares y polímeros. - Los crioprotectores protegen las proteínas frente a las tensiones de la congelación. - Los líoprotectores estabilizan las proteínas en el estado de secado-congelación
Agente espesante	- Se utiliza para mejorar la elegancia del producto e impedir reventones. - Aporta resistencia estructural a la torta liofilizada. - Entre los ejemplos destacan manitol y glicina.
Tensioactivo	- Se utiliza si es importante la agregación durante el proceso de liofilización. - Puede servir para reducir los tiempos de reconstitución. - Entre los ejemplos se incluyen Polisorbato 20 y 80 - No suele utilizarse, ya que las reacciones moleculares de la torta lio se retrasan notablemente.
Iones metálicos/ quelantes	- Pueden incluirse si se incluye un ión metálico específico únicamente como co-factor, o en caso de que se precise el metal para la actividad de la proteasa. - En general no se precisan agentes quelantes en las formulaciones lio.
Conservante	- Únicamente para formulaciones multidosis - Aporta protección frente al crecimiento microbiano - Suele incluirse en el disolvente de reconstitución (por ejemplo, bWFI)

El principal problema planteado a la hora de desarrollar formulaciones proteínicas es estabilizar el producto frente a las tensiones producidas durante la fabricación, el transporte y el almacenamiento. La función de los excipientes de la formulación es aportar estabilización frente a dichas tensiones. Los excipientes también pueden utilizarse para reducir la viscosidad de las formulaciones de proteínas a alta concentración, a fin de permitir su administración y aumentar la comodidad del paciente. En general, los excipientes pueden clasificarse según los mecanismos con los que estabilizan las proteínas frente a las diversas tensiones físicas y químicas. Algunos excipientes se utilizan para mitigar los efectos de una tensión específica o para regular una sensibilidad concreta de una proteína específica. Otros presentan efectos más generales sobre la estabilidad física y covalente de las proteínas. Los excipientes que aquí se describen están organizados por su tipo químico o por su papel funcional en las formulaciones. Se facilitan breves descripciones de los modos de estabilización al comentar cada uno de ellos.

Teniendo en cuenta la información y las orientaciones aquí facilitadas, el experto en la materia sabrá qué cantidad o rango de excipiente puede incluirse en cualquier formulación específica para lograr una formulación biofarmacéutica según la invención que promueva la preservación de la estabilidad del producto biofarmacéutico (por ejemplo, una proteína). Por ejemplo, la cantidad y tipo de una sal a incluirse en una formulación biofarmacéutica de la invención se selecciona en función de la osmolalidad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la solución final, así como de la cantidad y la osmolalidad de otros componentes a ser incluidos en la formulación.

A modo de ejemplo, la isotonicidad puede conseguirse mediante la inclusión de aproximadamente un 5% de sorbitol, mientras que se precisa un 9% de un excipiente a base de sacarosa para conseguirla. La selección de la cantidad o rango de las concentraciones de uno o más excipientes que pueden incluirse en una formulación biofarmacéutica de la invención se ha ilustrado anteriormente al hacer referencia a las sales, polioles y azúcares. No obstante, el experto en la materia entenderá que las consideraciones que aquí se describen y que se ilustran en referencia a excipientes específicos son igualmente aplicables a todos los tipos de combinaciones de excipientes, incluyendo, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizantes, espesantes, crioprotectores, líoprotectores, antioxidantes, iones metálicos, quelantes y/o conservantes.

Igualmente, cuando se menciona un excipiente específico expresándolo en concentración molar, el experto en la materia entenderá que también se contempla el porcentaje equivalente (%) p/v (por ejemplo, gramos de sustancia en una muestra de solución/ml de solución) x 100%) de solución.

Por supuesto, el experto en la materia entenderá que las concentraciones de los excipientes que aquí se describen comparten interdependencia dentro de una formulación específica. A modo de ejemplo, la concentración de un espesante puede reducirse, por ejemplo, cuando se da una elevada concentración proteínica o cuando hay una elevada concentración de estabilizante. Además, el experto en la materia entenderá que, para mantener la isotonicidad de una formulación específica que carece de espesantes, la concentración de un estabilizantes se ajustaría en consecuencia (es decir, se utilizaría una cantidad “tonificante” de estabilizante). Los excipientes más habituales son bien conocidos en la técnica y pueden encontrarse en Powell y col., Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311.

Soluciones y agentes tampón

En general se observa que una formulación de proteína farmacológicamente activa muestra su máxima estabilidad en un estrecho rango de valores de pH. Este rango de pH de estabilidad óptima debe identificarse en una fase temprana, durante los estudios previos a la formulación. Para ello resultan útiles diversos métodos, como los estudios de estabilidad acelerada y los estudios de selección calorimétrica (Remmele R.L. Jr. Y col., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez finalizada una formulación, la proteína debe fabricarse y mantenerse durante todo el tiempo restante hasta su caducidad. Por ello, se utilizan casi siempre agentes tampón para controlar el pH de la formulación.

La capacidad de tamponar del agente tampón es máxima cuando el pH es equivalente al pKa y disminuye a medida que el pH aumenta o disminuye alejándose de dicho valor. El noventa por ciento de la capacidad tampón se encuentra a una unidad de pH de su pKa. La capacidad tampón también aumenta proporcionalmente con la concentración de la solución tampón.

Deben tenerse en cuenta diversos factores a la hora de seleccionar una solución tampón. En primer lugar, y lo más importante, debe definirse la especie tampón y su concentración en función de su pKa y del pH deseado de la formulación. También reviste igual importancia el asegurarse de que la solución tampón es compatible con la proteína y con los demás excipientes de la formulación y que no cataliza ninguna reacción de degradación. Un tercer e importante aspecto a tener en cuenta es la sensación de picor e irritación que puede provocar la solución tampón tras su administración. Por ejemplo, se sabe que el citrato causa irritación cuando se inyecta (Laursen T. y col., *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). El potencial de irritación es mayor en el caso de los medicamentos administrados vía subcutánea (SC) o intramuscular (IM), donde la solución con el medicamento permanece en el mismo lugar durante un período de tiempo relativamente más largo que si se administra vía iv, en la que la formulación se disuelve rápidamente en la sangre tras su administración. En el caso de las formulaciones administradas directamente por infusión iv, debe controlarse la cantidad total de solución tampón (y de cualquier otro componente de la formulación). Debe prestarse especial cuidado al hecho de que los iones potasio administrados en forma de solución tampón fosfato potásico pueden inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodríguez JC. Y col., *Am. Fam. Physician.*, 73(2): 283-90 (2006)).

Las soluciones tampón correspondientes a formulaciones liofilizadas requieren especial atención. Algunas soluciones tampón, como el fosfato sódico, pueden cristalizar fuera de la fase amorfa proteínica durante la congelación, con los consiguientes cambios de pH. Otras soluciones tampón comunes, como acetato e imidazol, pueden sublimarse o evaporarse durante el proceso de liofilización, alterando así el pH de la formulación durante la liofilización o tras la reconstitución.

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

El compuesto tampón 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 tampón de pH oscila entre 0,1 mM y 500 mM (1M). Por ejemplo, se prevé que el agente tampón del pH tenga una concentración de al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200 o 500 mM.

Entre los ejemplos de agentes tampón utilizados para tamponar la solución de acuerdo con lo aquí recogido se incluyen, sin limitación, ácidos orgánicos, glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, fosfato, citrato o Tris, HEPES y aminoácidos o mezclas de aminoácidos, incluyendo sin limitación aspartato, histidina y glicina. En una realización de la presente invención, el agente tampón es citrato.

Estabilizantes y espesantes

En un aspecto de las presentes formulaciones farmacéuticas, se añade un estabilizante (o una combinación de estabilizantes) para impedir o reducir la agregación y la degradación química inducidas por el almacenamiento. Una solución que aparece turbia u opaca tras su reconstitución indica que la proteína ha precipitado o que al menos se ha agregado. El término "estabilizante" se refiere a un excipiente capaz de impedir la agregación o degradación física (por ejemplo autólisis, deamidación, oxidación, etc.) en estado acuoso. Entre los estabilizantes contemplados se encuentran, sin limitación, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, arginina-HCl, compuestos polihidroxí, incluyendo polisacáridos como dextrano, almidón, hidroxietilalmidón, ciclodextrinas, N-metilpirolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro sódico [Carpenter y col., *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)]. En estas formulaciones, el estabilizante 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 o 1.000 mM. En una realización de la presente invención, como agentes estabilizantes se utilizan manitol y trehalosa.

Si se desea, las formulaciones también incluyen cantidades adecuadas de agentes reguladores del espesor y la osmolaridad. Los agentes espesantes incluyen, por ejemplo y sin limitación, manitol, glicina y sacarosa, polímeros como dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En una realización, el espesante utilizado es manitol. El agente espesante se incorpora en una concentración de aproximadamente 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900 o 1.000 mM.

Tensioactivos

Las proteínas tienen una elevada tendencia a interactuar con las superficies, lo que las hace susceptibles a la absorción y desnaturalización por contacto aire-líquido, vial-líquido y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha constatado que esta vía de degradación es inversamente dependiente de la concentración proteínica y tiene como resultado la formación de agregados proteínicos solubles e insolubles o la pérdida de proteína de la solución debido a la adsorción en las superficies. Además de la adsorción a la superficie del envase, la degradación inducida por la superficie se exagera por la agitación física, como sucedería durante el transporte y la manipulación del producto.

Los agentes tensioactivos suelen utilizarse en las formulaciones de proteínas para impedir la degradación inducida por la superficie. Los agentes tensioactivos son moléculas anfipáticas con la peculiaridad de competir ventajosamente con las proteínas por las posiciones de interacción. Las partes hidrófobas de las moléculas tensioactivas ocupan las posiciones de interacción (por ejemplo aire/líquido), mientras que las partes hidrófilas de las moléculas siguen estando orientadas hacia el disolvente. A una concentración suficiente (en general en torno a la concentración micelar crítica del detergente), la capa superficial de las moléculas tensioactivas impide la adsorción de las moléculas de proteína por interacción. Por tanto, se reduce al mínimo la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos aquí contemplados incluyen, sin limitación, ésteres de ácidos grasos polietoxilatos de sorbitano, es decir polisorbato 20 y polisorbato 80. Ambos sólo difieren en la longitud de la cadena alifática que aporta el carácter hidrófobo a las moléculas, C-12 y C-18 respectivamente. Así, el polisorbato-80 es más superficialmente activo y tiene una concentración micelar crítica inferior a la de los polisorbato-20.

Los detergentes también pueden afectar a la estabilidad conformacional termodinámica de las proteínas. Una vez más, los efectos de un excipiente detergente dado serán específicos de la proteína. Por ejemplo, se ha demostrado que los polisorbato reducen la estabilidad de ciertas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de las proteínas por detergente puede racionalizarse en términos de las colas hidrofóbicas de las moléculas de detergente, que pueden asumir un enlace específico con estados proteínicos parcial o totalmente desplegados. Este tipo de interacciones puede provocar un cambio en el equilibrio conformacional hacia estados proteínicos más expandidos (es decir aumentando la exposición de las partes hidrofóbicas de la molécula proteínica como complemento al polisorbato del enlace). Alternativamente, si el estado nativo de la proteína presenta algunas superficies hidrofóbicas, el enlace del detergente con el estado nativo puede estabilizar dicha conformación.

Otro aspecto de los polisorbato es que son inherentemente susceptibles de degradación oxidativa. A menudo, y como materias primas, contienen suficiente cantidad de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de los residuos proteínicos, especialmente de la metionina. La posibilidad de daños por oxidación derivados de la adición del estabilizante subraya el hecho de que en las formulaciones debe utilizarse la concentración efectiva más baja de excipiente. En el caso de los tensioactivos, la concentración efectiva para una proteína dada dependerá del mecanismo de estabilización.

También se añaden tensioactivos en cantidad adecuada para impedir fenómenos de agregación relacionados con la superficie durante la congelación y el secado [Chang B., J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]. Así, entre los ejemplos de tensioactivos se encuentran, sin limitación, tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y anfotéricos obtenidos de aminoácidos naturales. Entre los tensioactivos aniónicos se encuentran, sin limitación, laurilsulfato sódico, sulfosuccinato de dioctilo y sulfonato de dioctil-sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, sulfato de dodecil-litio, sal sódica de ácido 1-octanosulfónico, colato sódico hidratado, desoxicolato sódico y sal sódica de ácido glicodesoxicólico. Entre los tensioactivos catiónicos se encuentran, sin limitación, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidrato y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos zwitteriónicos incluyen, sin limitación, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 y SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, sin limitación, digitonina, Triton X-100, Triton X114, TWEEN-20, y TWEEN-80. Los tensioactivos también incluyen, sin limitación, lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino polietoxilado 10, 40, 50 y 60, glicerol monoestearato, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja y otros fosfolípidos, como dioleoil-fosfatidil-colina (DOPC), dimiristoil fosfatidilglicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) y dioleilfosfatidilglicerol (DOPG); ésteres de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa de ácidos grasos. Por tanto, también se facilitan composiciones que comprenden estos tensioactivos, tanto individualmente como en forma de mezcla en diferentes proporciones. En una realización de la presente invención, el tensioactivo es TWEEN-80. En las presentes formulaciones, el tensioactivo se incorpora en una concentración de entre 0,01 y 0,5 g/l. En las

formulaciones facilitadas, la concentración del tensioactivo es de 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 g/l.

Sales

Con frecuencia se añaden sales para aumentar la fuerza iónica de la formulación, que puede resultar importante para la solubilidad de la proteína, la estabilidad física y la isotonicidad. Las sales pueden afectar a la estabilidad física de las proteínas de muchas formas. Los iones pueden estabilizar el estado nativo de las proteínas uniéndose a los residuos cargados de la superficie de la proteína. Alternativamente, las sales pueden estabilizar el estado desnaturalizado uniéndose a grupos peptídicos a lo largo del esqueleto proteico (-CONH-). Las sales también pueden estabilizar la conformación nativa de la proteína blindando las interacciones electrostáticas repulsivas entre residuos de una molécula de proteína.

Las sales para las formulaciones de proteínas también pueden blindar las interacciones electrostáticas atractivas entre las moléculas de proteínas, que pueden provocar agregación e insolubilidad. En las formulaciones facilitadas, la concentración de sal oscila entre 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 y 500 mM.

Otros componentes excipientes comunes

Aminoácidos

Los aminoácidos se han utilizado ampliamente en formulaciones de proteínas como tampones, espesantes, estabilizantes y antioxidantes. Así, en un aspecto de la invención se utiliza histidina y ácido glutámico para tamponar las formulaciones proteicas en el rango de pH de 5,5 - 6,5 y 4,0 - 5,5 respectivamente. El grupo imidazol de la histidina tiene un pKa = 6,0 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico tiene un pKa de 4,3 lo que convierte a estos aminoácidos en adecuados para tamponar en sus respectivos rangos de pH. El ácido glutámico resulta en estos casos especialmente útil. La histidina suele encontrarse en las formulaciones proteicas comerciales, siendo este aminoácido una alternativa al citrato, un tampón que resulta irritante cuando se inyecta. Es interesante saber que la histidina tiene un efecto estabilizante con respecto a la agregación cuando se utiliza en concentraciones elevadas en presentaciones líquidas y liofilizadas (Chen B. y col., Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). También se ha observado que la histidina reduce la viscosidad de una formulación con elevada concentración proteica. No obstante, en el mismo estudio, los autores observaron una mayor agregación y decoloración en las formulaciones que contienen histidina durante los estudios de congelación/descongelación del anticuerpo en contenedores de acero inoxidable. Otra precaución que ha de tenerse en relación con la histidina es que sufre foto-oxidación en presencia de iones metálicos (Tomita M. y col., Biochemistry, 8(12): 5149-60 (1969)). La utilización de metionina como antioxidante en las formulaciones parece prometedora; se ha observado que resulta efectiva contra diversas causas de estrés oxidativo (Lam XM y col., J Pharm Sci., 86(11): 1250-5 (1997)).

En diversos aspectos se proporcionan formulaciones que incluyen uno o más de los aminoácidos glicina, prolina, serina, arginina y alanina, que se ha demostrado estabilizan las proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial. La glicina también se utiliza normalmente como agente espesante en formulaciones liofilizadas. La arginina ha demostrado ser un agente muy eficaz para inhibir la agregación, utilizándose en formulaciones líquidas y liofilizadas.

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

Antioxidantes

La oxidación de los residuos proteicos tiene diversas causas. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la prevención de daños oxidativos en la proteína implica un cuidadoso control de diversos factores durante el proceso de fabricación y almacenamiento del producto, por ejemplo el oxígeno atmosférico, la temperatura, la exposición a la luz y la contaminación química. Por tanto, la invención contempla el uso de antioxidantes farmacéuticos, incluyendo, sin limitación, agentes reductores, captadores de oxígeno/radicales libres o agentes quelantes. Los antioxidantes de las formulaciones de proteínas terapéuticas son, en uno de los aspectos, solubles en agua y permanecen activos durante toda la vida útil del producto. Los agentes reductores y captadores de oxígeno/radicales libres funcionan eliminando las especies de oxígeno activas de la solución. Los agentes quelantes, como EDTA, son efectivos por su unión a trazas metálicas contaminantes que promueven la formación de radicales libres. Por ejemplo, se utilizó EDTA en la formulación líquida de factor de crecimiento de fibroblasto ácido para inhibir la oxidación de los residuos cisteína catalizada por iones metálicos.

Además de la efectividad de numerosos excipientes a la hora de impedir la oxidación de la proteína, debe tenerse en cuenta el potencial de los propios antioxidantes para inducir otros cambios físicos o covalentes en la proteína. Por ejemplo, los agentes reductores pueden provocar la ruptura de los enlaces disulfuro intramoleculares, lo que puede provocar una mezcla de disulfuros. En presencia de iones metálicos de transición, se ha demostrado que el ácido ascórbico y el EDTA fomentan la oxidación de la metionina en diversas proteínas y péptidos (Akers MJ y Defelippis

MR., Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. En: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J.R., J. Pharm. Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, y col., Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha indicado que el tiosulfato sódico reduce los niveles de oxidación de la metionina inducida por la luz y la temperatura en rhuMab HER2; no obstante, en este estudio también se comunica la formación de un aducto de tiosulfato y proteína (Lam XM, Yang JY y col., J Pharm Sci. 86(11): 1250-5 (1997)). Se selecciona el antioxidante adecuado en función de las tensiones y sensibilidades específicas de la proteína. Los antioxidantes contemplados en ciertos aspectos de la invención incluyen, sin limitación, agentes reductores y captadores de oxígeno/radicales libres, EDTA y tiosulfato sódico.

10 Iones metálicos

En general, los iones metálicos de transición no resultan deseables en las formulaciones proteicas, ya que pueden catalizar las reacciones de degradación física y química de las proteínas. No obstante, se incluyen iones metálicos específicos en las formulaciones cuando son cofactores de las proteínas y en formulaciones proteicas en suspensión cuando forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión de insulina en zinc). Recientemente se ha propuesto la utilización de iones magnesio (10 -120 mM) para inhibir la isomerización del ácido aspártico, que se convierte en ácido isoaspártico (WO 2004039337).

Dos ejemplos donde los iones metálicos confieren estabilidad o mayor actividad a las proteínas son desoxirribonucleasa humana (rhDNAsa, Pulmozyme®) y Factor VIII. En el caso de la rhDNAsa, los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima mediante un sitio de enlace específico (Chen B. y col., J Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999)). De hecho, la eliminación de los iones calcio en la solución con EGTA provocó un aumento de la desamidación y la agregación. No obstante, este efecto se observó sólo con los iones Ca^{+2} ; se observó que otros cationes divalentes, Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} desestabilizaban la rhDNAsa. Se observaron efectos similares en el caso del Factor VIII. Los iones Ca^{+2} y Sr^{+2} estabilizaron la proteína, mientras otros, como Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} desestabilizaron la enzima (Fatouros A. y col., Int. J. Pharm., 155, 121-131 (1997)). En un estudio independiente realizado con Factor VIII, se observó un importante incremento de la tasa de agregación en presencia de iones Al^{+3} (Derrick TS y col., J. Pharm. Sci., 93(10): 2549-57 (2004)). Los autores señalan que otros excipientes, como las sales tampón, suelen contaminarse con iones Al^{+3} e ilustran la necesidad de utilizar excipientes de calidad adecuada en los productos formulados.

Conservantes

Los conservantes son necesarios cuando se utilizan formulaciones parenterales multiusos que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su principal función es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante toda la vida útil o período de validez del producto farmacéutico. Entre los conservantes más habitualmente utilizados se encuentran, sin limitación, alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes se utilizan desde hace mucho tiempo, el desarrollo de formulaciones proteicas que incluyen conservantes puede resultar un problema. Los conservantes presentan casi siempre un efecto desestabilizante (agregación) en las proteínas y esto ha pasado a ser uno de los principales factores que limitan su utilización en formulaciones proteicas multidosis (Roy S. y col., J Pharm Sci., 94(2): 382-96 (2005)).

Hasta ahora, la mayoría de los fármacos a base de proteínas se formulan para su uso tan sólo una vez. No obstante, cuando se da la posibilidad de formulaciones multidosis, éstas tienen la ventaja añadida de que permiten que el paciente se sienta cómodo y aumentan su comerciabilidad. Un buen ejemplo lo constituye la hormona del crecimiento humano (hGH), en la que el desarrollo de formulaciones que incluyen conservantes ha llevado a la comercialización de presentaciones en el formato más cómodo de plumas inyectables multiusos. Al menos cuatro de dichos dispositivos en forma de pluma y que contienen formulaciones de hGH que incluyen conservantes están actualmente disponibles en el mercado. Norditropin® (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquido, Genentech) y Genotropin (liofilizado – cartucho bicámara, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatrop® (Eli Lilly) se formula con m-cresol.

Deben tenerse en cuenta diversos aspectos durante el desarrollo de la formulación en formatos de dosificación con conservantes. Debe optimizarse la concentración efectiva del conservante en el producto farmacéutico. Esto requiere comprobar un conservante determinado en el formato de dosificación a unos rangos de concentración que confieran actividad antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, se comprobaron con éxito tres conservantes durante el desarrollo de una formulación líquida del receptor de interleucina-1 (Tipo I) utilizando la calorimetría de barrido diferencial (DSC). Los conservantes se ordenaron por rangos en función de su impacto sobre la estabilidad a las concentraciones normalmente utilizadas en los productos comerciales (Remmele RL Jr. Y col., Pharm Res., 15(2): 200-8 (1998)).

El desarrollo de formulaciones líquidas que incluyen conservantes resulta más problemático que el de las formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados pueden liofilizarse sin conservantes y reconstituirse con un disolvente que contenga el conservante cuando vayan a utilizarse. De este modo se reduce el período durante el cual el conservante está en contacto con la proteína, reduciendo significativamente los riesgos de estabilidad

asociados. En el caso de las formulaciones líquidas, han de mantenerse la estabilidad y la eficacia del conservante durante toda la vida útil del producto (18-24 meses). Un punto importante a destacar es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

- 5 Algunos conservantes pueden provocar reacciones en el punto de inyección, lo que constituye otro factor a tener en cuenta a la hora de elegir un conservante. En los ensayos clínicos centrados en la evaluación de los conservantes y los tampones en norditropina, se observó que la percepción del dolor era inferior en el caso de las formulaciones con fenol y alcohol bencílico en comparación con las formulaciones con m-cresol (Kappelgaard A.M., Horm Res. 62 Suppl 3:98-103 (2004)). Lo que resulta interesante es que, entre los conservantes utilizados con mayor frecuencia, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC. y Sun DA., Anesth Analg., 100(3): 683-6 (2005)). En diversos aspectos, el uso de conservantes aporta ciertos beneficios que compensan cualquier efecto secundario.

Métodos de preparación

La presente invención también contempla métodos de preparación de formulaciones farmacéuticas.

- 15 Los métodos actuales comprenden adicionalmente una o más de las etapas siguientes: añadir a la mezcla un agente estabilizante tal como se describe aquí antes de la liofilización y añadir a dicha mezcla al menos un agente seleccionado de entre un agente espesante, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo, cada uno de ellos de acuerdo con lo aquí descrito, antes de la liofilización.

- 20 La práctica habitual de reconstitución de los materiales liofilizados consiste en añadir nuevamente un volumen de agua pura o de agua esterilizada inyectable (WFI) (que normalmente equivale al volumen eliminado durante la liofilización), aunque a veces se utilizan soluciones disueltas de agentes antibacterianos en la producción de fármacos para su administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Así, se proporcionan diversos métodos para preparar composiciones reconstituidas de rVWF, que comprenden la fase de añadir un disolvente a una composición de rVWF liofilizado según la invención.

- 25 El material liofilizado puede reconstituirse como una solución acuosa. Pueden utilizarse diversos vehículos acuosos, por ejemplo agua esterilizada inyectable, agua con conservantes para su utilización multidosis o agua con la cantidad adecuada de tensioactivos (por ejemplo, una solución acuosa con el compuesto activo en un agregado en polvo, junto con excipientes adecuados para la obtención de suspensiones acuosas). En diversos aspectos, dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, y sin limitación, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato sódico, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; los dispersantes o humectantes son fosfolípidos de origen natural, por ejemplo, y sin limitación, lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, y sin limitación, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, y sin limitación, heptadecaetilenoxietanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos a partir de ácidos grasos y un hexitol, como monooleato de polioxietilensorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales obtenidos de anhídridos de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, y sin limitación, monooleato del polioxietilensorbitano. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más conservantes, por ejemplo, y sin limitación, p-hidroxibenzoato de etilo o de n-propilo.

Administración

- 40 En un aspecto, para la administración de las composiciones a seres humanos o animales de ensayo, las composiciones comprenden uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente" aceptables se refieren a entidades y composiciones moleculares que son estables, inhiben la degradación de la proteína, como la agregación y los productos de escisión, y además no provocan reacciones alérgicas o adversas de otro tipo cuando se administran utilizando vías bien conocidas en la técnica, como se describe a continuación. El término "vehículos farmacéuticamente aceptables" incluye todo tipo de disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, revestimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción y similares, incluyendo los agentes anteriormente descritos.

- 50 Las formulaciones farmacéuticas se administran vía oral, tópica, transdérmica o parenteral, mediante esprays inhaladores, vía vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral tal como se utiliza aquí incluye técnicas de inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular, intracisternal o de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar, y/o por implante quirúrgico en un emplazamiento específico. En general, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que podrían resultar peligrosas para el receptor.

- 55 La administración única o múltiple de las composiciones se lleva a cabo con los niveles de dosis y regímenes seleccionados por el facultativo. Para prevenir o tratar la enfermedad, la dosis adecuada depende del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido anteriormente, de la gravedad y del curso de la enfermedad, de si el

medicamento se administra con fines preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, del historial clínico del paciente y su respuesta al medicamento y del criterio del facultativo encargado.

Kits

5 Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una o más composiciones liofilizadas empaquetadas de forma que se facilite su utilización para su administración a los pacientes. En una realización, dicho kit incluye la formulación farmacéutica descrita en este documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o péptido terapéuticos), envasada en un recipiente tal como una botella o en un recipiente precintado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso de la composición a la hora de implementar el método. En una realización, la formulación farmacéutica está envasada en el recipiente de forma que la cantidad de espacio libre del recipiente (es decir, la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del envase) es muy pequeña. Preferiblemente, la cantidad de espacio libre es desdénable (es decir, prácticamente inexistente). En una realización, el kit consta de un primer envase que contiene una composición con una proteína o péptido terapéuticos y de un segundo envase que contiene una solución fisiológicamente aceptable para la reconstitución de la composición. En un aspecto, la formulación farmacéutica está envasada en forma de unidad monodosis. El kit puede incluir también un dispositivo adecuado para la administración de la formulación farmacéutica de acuerdo con una vía de administración específica. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe la utilización de las formulaciones farmacéuticas.

Dosis

20 El régimen de dosificación correspondiente a un método de tratamiento de uno de los trastornos aquí descritos será el determinado por el médico, teniendo en cuenta diversos factores que modifican la acción de los medicamentos, como la edad, condición, peso corporal, sexo y régimen alimenticio del paciente, gravedad de cualquier infección, duración de la administración y otros factores clínicos. A modo de ejemplo, una dosis típica de un VWF recombinante conforme a la presente invención es de aproximadamente 50 U/kg, lo que equivale a 500 µg/kg.

25 En un aspecto de la invención, las formulaciones de la invención se administran mediante un bolo inicial, seguido de una infusión continua para mantener los niveles terapéuticos circulantes del producto farmacéutico. En otro ejemplo, el compuesto de la invención se administra como dosis única. El experto en la materia optimizará rápidamente las dosificaciones efectivas y los regímenes de administración determinados por la práctica médica recomendada y la situación clínica de cada paciente concreto. La frecuencia de dosificación depende de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y la vía de administración. El experto en la materia determinará la formulación farmacéutica óptima en función de la vía de administración y de la dosis deseada (véase por ejemplo Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042, páginas 1435-1712, cuyos postulados quedan incorporados por referencia al presente documento). Dichas formulaciones influyen sobre el estado físico, la estabilidad y la frecuencia de administración *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, se calcula la dosis adecuada en función del peso corporal, de la superficie corporal o de las dimensiones del órgano. Pueden determinarse las dosis adecuadas mediante la utilización de ensayos conocidos para la determinación de las dosis a nivel sanguíneo junto con los datos dosis/respuesta adecuados. El régimen de dosificación definitivo viene determinado por el médico teniendo en cuenta los diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la gravedad de la lesión y la respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y régimen alimenticio del paciente, la gravedad de cualquier infección, duración de la administración y otros factores clínicos. A medida que se lleven a cabo los estudios, se dispondrá de información adicional relativa a los niveles de dosificación adecuados y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y condiciones.

Los siguientes ejemplos no pretenden ser limitativos, sino tan sólo ilustrar realizaciones específicas de la invención.

Ejemplo 1: Experimentos de agitación

45 Para determinar la cantidad de precipitación de rVWF en diversas formulaciones, se comprobó el alcance de la agregación del rVWF tras una agitación turbulenta bajo diversas condiciones.

50 Como se muestra en la Tabla 1 siguiente, se evaluaron diferentes formulaciones de rVWF en una solución tampón de citrato 20 mM con un pH 7,3. Los experimentos de agitación habían sido diseñados para simular condiciones de estrés mecánico. Se agitaron de 1 a 2 ml de cada formulación con un agitador de laboratorio durante 10 minutos a 1.200 rpm.

Tabla 1

Lio.25	Lisina	Histidina	Glicina	Serina	Manitol	PEG1500	Tween80	Sacarosa	Trehalosa	Rafinosa
18	30mM.				5 g/l					
19		30mM			5 g/l					

ES 2 409 032 T3

20			30mM		5 g/l					
21				30mM	5 g/l					
22	30mM					5 g/l				
23		30mM				5 g/l				
24			30mM			5 g/l				
25				30mM		5 g/l				
26	30mM						0,1 g/l			
27		30mM					0,1 g/l			
28			30mM				0,1 g/l			
29				30mM			0,1 g/l			
30	30mM				5 g/l	5 g/l				
31		30mM			5 g/l	5 g/l				
32			30mM		5 g/l	5 g/l				
33				30mM	5 g/l	5 g/l				
34	30mM				5 g/l		0,1 g/l			
35		30mM			5 g/l		0,1 g/l			
36			30mM		5 g/l		0,1 g/l			
37				30mM	5 g/l		0,1 g/l			
38	30mM				5 g/l	5 g/l	0,1 g/l			
39		30mM			5 g/l	5 g/l	0,1 g/l			
40			30mM		5 g/l	5 g/l	0,1 g/l			
41				30mM	5 g/l	5 g/l	0,1 g/l			
42					5 g/l					
43								5 g/l		
44									5 g/l	
45										5 g/l
46					5g/L	5 g/l				
47						5 g/l		5 g/l		
48						5 g/l			5 g/l	
49						5 g/l				5 g/l
50					5g/L		0,1 g/l			
51							0,1 g/l	5 g/l		
52							0,1 g/l		5 g/l	
53							0,1 g/l			5 g/l

La evaluación de los agregados visibles de VWF se llevó a cabo de acuerdo con el esquema que se muestra a continuación. Los “agregados visibles” en la mayoría de los casos consisten en fibras gelatinosas cuyas dimensiones oscilan entre 100 nm y 1-2 cm.

5

ESQUEMA

Partículas	
A	Sin partículas
B	Varias partículas, raramente visibles (puntos)

ES 2 409 032 T3

B1	Muchas partículas, raramente visibles (puntos)
C	Varias partículas, fácilmente visibles (fibras)
D	Muchas partículas, fácilmente visibles (fibras)
E	Partículas visibles (fibras >1mm)
E1	Esponjoso con precipitado (nadantes en la superficie)
E2	Gelatinoso

Los resultados de la prueba de agitación se muestran en la Tabla 2 siguiente:

Tabla 2

Muestras 25	Lisina	Histidina	Glicina	Serina	Manitol	PEG 1500	Tween 80	Agitado 1-2 ml a 1.200 rpm 30 min
18	30mM				5 g/l			E1
19		30mM			5 g/l			E1
20			30mM		5 g/l			E1
21				30 mM	5 g/l			E1
22	30mM					5 g/l		E1
23		30mM				5 g/l		E1
24			30mM			5 g/l		E1
25				30mM		5 g/l		E1
26	30mM.						0,1 g/l	E2 grande
27		30mM					0,1 g/l	E2 grande
28			30mM				0,1 g/l	E2 -6mm
29				30mM			0,1 g/l	E2 -3mm
30	30mM				5 g/l	5 g/l		E1
31		30mM			5 g/l	5 g/l		E1
32			30mM		5 g/l	5 g/l		E1
33				30mM	5 g/l	5 g/l		E1
34	30mM				5 g/l		0,1 g/l	B1
35		30mM			5 g/l		0,1 g/l	B
36			30mM		5 g/l		0,1 g/l	E2 grande
37				30mM	5 g/l		0,1 g/l	E2 grande
38	30mM				5 g/l	5 g/l	0,1 g/l	D
39		30mM			5 g/l	5 g/l	0,1 g/l	D
40			30mM		5 g/l	5 g/l	0,1 g/l	B
41				30mM	5 g/l	5 g/l	0,1 g/l	B

En resumen, los experimentos de agitación que se describen anteriormente indican que los mejores resultados son los aportados por las formulaciones que contienen Tween-80 y manitol (es decir, la menor cantidad de agregación).

Ejemplo 2: Experimentos de congelación y descongelación

Los experimentos de congelación y descongelación se diseñan para evaluar el impacto de las tensiones provocadas por congelaciones y descongelaciones repetidas. Además de las formulaciones descritas anteriormente para los experimentos de agitación (Tabla 1), se evaluaron las siguientes formulaciones (Tabla 3 y Tabla 4):

Tabla 3

Muestras de Lio. 25	Manitol	PEG 1500	Tween 80	Sacarosa	Trehalosa	Rafinosa
42	5 g/l					
43				5 g/l		
44					5 g/l	
45						5 g/l
46	5 g/l	5 g/l				
47		5 g/l				
48		5 g/l				
49		5 g/l				
50	5 g/l		0,1 g/l			
51			0,1 g/l	5 g/l		
52			0,1 g/l		5 g/l	
53			0,1 g/l			5 g/l

Tabla 4

Muestras Lio. 25	Lisina	Histidina	Glicina	Serina	Manitol	PEG 1500	Tween-80	Sacarosa	Trehalosa	Rafinosa
76					20 g/l		0,2 g/l	20 g/l		
77					20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
78					20 g/l		0,2 g/l			10 g/l
79		15mM			20 g/l		0,2 g/l	20 g/l		
80		15mM			20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
81		15mM			20 g/l		0,2 g/l			10 g/l
82		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l	20 g/l		
83		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
84		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l			10 g/l
85		15mM	15mM		20 g/l	5 g/l	0,2 g/l			
86		15mM	15mM		20 g/l	5 g/l	0,2 g/l		10 g/l	
87		15mM	15mM		20 g/l	15 g/l	0,2 g/l		10 g/l	
88		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l			5 g/l
89		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l			15 g/l
90		15mM			20 g/l		0,2 g/l			15 g/l
92		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
93	30mM				20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
94		30mM			20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
95			30mM		20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	

ES 2 409 032 T3

96				30mM	20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
97		15mM			20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
98		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
99		15mM	15mM		20 g/l		0,2 g/l		5 g/l	
100		15mM			20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	
		15mM			20 g/l		0,2 g/l		10 g/l	

Todas las formulaciones se congelaron a -20°C en un congelador durante aproximadamente 1 hora, descongelándose después a temperatura ambiente. Los resultados se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5

Muestras Lio 25	Lisina	Histidina	Glicina	Serina	Manitol	PEG 1500	Tween-80	Sacarosa	Trehalosa	Rafinosa	Cong./ descong. (4 veces)	Cong/ descong. (10 veces)
18	30mM				5 g/l						E1	15
19		30mM			5 g/l						E1	19
20			30mM		5 g/l						C	20
21				30mM	5 g/l						C	21
22	30mM					5 g/l					C	22
23		30mM				5 g/l					C/B 1	23
24			30mM			5 g/l					C	24
25				30mM		5 g/l					C	25
26	30mM						0,1g/l				B	26
27		30mM					0,1g/l				B-B 1	27
28			30mM				0,1g/l				B	28
29				30mM			0,1g/l				E	29
30	30mM				5 g/l	5 g/l					E	30
31		30mM			5 g/l	5 g/l					D	31
32			30mM		5 g/l	5 g/l					B1-C	32
33				30mM	5 g/l	5 g/l					C/D	33
34	30mM				5 g/l		0,1g/l				E2 (rest. B)	34
35		30mM			5 g/l		5 g/l				E	35
36			30mM		5 g/l		5 g/l				E	36
37				30mM	5 g/l		5 g/l				B	37
38	30mM				5 g/l	5 g/l	5 g/l				B	38
39		30mM			5 g/l	5 g/l	5 g/l				B	39
40			30mM		5 g/l	5 g/l	5 g/l				B	40
41				30mM	5 g/l	5 g/l	0,1g/l				A	41
42					5 g/l						D	42
43								5 g/l			D	43

Muestras Lio 25	Lisina	Histidina	Glicina	Serina	Manitol	PEG 1500	Tween-80	Sacarosa	Trehalosa	Rafinosa	Cong./ descong. (4 veces)	Cong/ descong. (10 veces)
44									5 g/l		E1	44
45										5 g/l	E1	45
46					5 g/l	5 g/l					D	46
47						5 g/l		5 g/l			D	47
48						5 g/l			5 g/l		D-E	48
49						5 g/l				5 g/l	E	49
50					5 g/l		0,1g/l				B1	50
51							0,1g/l	5 g/l			C-D	51
52							0,1 g/l		5 g/l		B1	52
53							0,1 g/l			5 g/l	B1	53

Como puede observarse de lo anterior, los mejores resultados (es decir, la menor cantidad de agregación) se consiguieron con trehalosa.

Ejemplo 3: Experimentos de liofilización

5 Los experimentos de liofilización se diseñan para evaluar la capacidad de las diferentes formulaciones para permitir la formación de una torta lio que se disuelva en menos de 10 minutos y tenga como resultado una solución transparente. También se llevó a cabo un estudio acelerado de estabilidad para demostrar que no se producían pérdidas significativas de actividad biológica.

10 Las formulaciones mostradas en la Tabla 6 siguiente se liofilizaron con un liofilizador de nitrógeno TS20002 siguiendo las instrucciones del fabricante. El tiempo total de liofilización fue de aproximadamente 72 horas. Cada una de las formulaciones que se muestran a continuación contenía igualmente 20 g/l de manitol y 0,1 g/l de Tween-80.

Tabla 6

Lio. 26	Citrato	HEPES	Glicina	Histidina	Acetato	Tris	Fosfato	Lisina	Histidina	Glicina	Trehalosa	Rafinosa
1	15mM										10 g/l	
2	15mM							15mM			10 g/l	
3	15mM								15mM		10 g/l	
4	15mM									15mM	10 g/l	
5	15mM							15mM		15mM	10 g/l	
6	15mM							30mM			10 g/l	
7	15mM											10 g/l
8	15mM								15mM			10 g/l
9		15mM									10 g/l	
10		15mM						15mM			10 g/l	
11		15mM							15mM		10 g/l	
12		15mM								15mM	10 g/l	
13		15mM						15mM		15mM	10 g/l	
14		15mM						15mM		15mM		10 g/l
15			15mM								10 g/l	
16			15mM						15mM		10 g/l	
17				15mM							10 g/l	
18				15mM				15mM			10 g/l	
19					15mM			15mM		15mM	10 g/l	
20						15mM		15mM		15mM	10 g/l	
21							15mM	15mM		15mM	10 g/l	

Los resultados de los experimentos de liofilización se muestran en la Tabla 7 siguiente.

Tabla 7

			Tampón							-	Excipientes	-	-	-
Lio. 26	Citrato	HEPES	Glicina	Histidina	Acetato	Tris	Fosfato	Lisina	Histidina	Glicina	Trehalosa	-	-	-
2	15mM							15mM			10 g/l			
3	15mM								15mM		10 g/l			
4	15mM									15mM	10 g/l			
5	15mM						15mM	15mM			10 g/l			
6	15mM							30mM			10 g/l			
7	15mM													10 g/l
8	15mM								15mM					10 g/l
9		15mM									10 g/l			
10		15mM						15mM			10 g/l			
11		15mM							15mM		10 g/l			
12		15mM								15mM	10 g/l			
13		15mM						15mM		15mM	10 g/l			
14		15mM						15mM		15mM				10 g/l
15			15mM								10 g/l			
16			15mM						15mM		10 g/l			
17				15mM							10 g/l			
18				15mM				15mM			10 g/l			
19					15mM			15mM		15mM	10 g/l			
20						15mM		15mM		15mM	10 g/l			
21							15mM	15mM		15mM	10 g/l			

Como se ha demostrado anteriormente, la solución más transparente se consigue con una solución tampón citrato o HEPES en combinación con un aminoácido.

Para evaluar la estabilidad del rVWF liofilizado reconstituido, se llevaron a cabo ensayos VWF:Ag y VWF:RCo. VWF:Ag corresponde a la cantidad de VWF que puede detectarse en una prueba ELISA específica de VWF- utilizando un anticuerpo anti-VWF, mientras que VWF:RCo corresponde a la cantidad de VWF que provoca la aglutinación de plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina. Las muestras se almacenaron a 40°C. Asumiendo la aplicabilidad de la ecuación de Arrhenius, la estabilidad a un mes a 40°C es equivalente a la de aproximadamente un año a 4°C. Los resultados de los experimentos de estabilidad se muestran en las Tablas 8 y 9 siguientes.

Tabla 8

formulación VWF:Ag	Semanas a 40°C			
	0	4	5	8
1	121,1	89,8	113,0	106,6
2	121,8	102,0	114,0	112,8
3	119,9	102,0	105,,0	112,7
4	117,3	100,0	108,0	114,4
5	121,2	98,2	117,0	114,9
6	123,8	96,6	107,0	-
7	135,2	96,6	112,0	112,4
8	130,6	82,2	108,0	115,7
9	112,0	89,5	109,0	107,0
10	122,4	87,1	106,0	107,7
11	119,3	97,5	115,0	114,2
12	124,2	109,0	109,0	103,4
13	110,2	92,3	106,0	112,4
14	108,9	107,0	103,0	109,0

Tabla 9

formulación rVWF:Ag	Semanas a 40°C			
	0	4	5	8
1	86	102	97,0	93,0
2	84	97	88,0	89,0
3	85	100	87,0	93,0
4		102	81,0	98,0
5	85	89	88,0	98,0
6	83	102	88,0	
7		92	97,0	95,0
8	88	94	90,0	104,0
9	93	91	97,0	100,0
10	95	87	87,0	87,0
11	86	93	89,0	99,0
12	84	91	89,0	95,0
13	88	87	96,0	89,0
14	90	91	86,0	92,0

La desviación estándar correspondiente al ensayo ELISA oscila entre un 10 y un 20%. Los resultados anteriores indican que todas las formulaciones sometidas al ensayo tienen una adecuada estabilidad durante 8 semanas a 40°C.

Se llevaron a cabo experimentos adicionales de estabilidad en los que se utilizaron diferentes aminoácidos en las formulaciones (por ejemplo, glicina, lisina o histidina a 15 mM o 20 mM) y donde se modificaba la solución tampón citrato (por ejemplo, 15, 20 o 25 mM). Como se ha descrito anteriormente, la estabilidad del rVWF se supervisó utilizando el ensayo de actividad VWF:RCo. Incluso al cabo de 13 meses no se observaron diferencias importantes para los valores de actividad VWF:RCo de las muestras de estabilidad rVWF almacenadas a 40°C. Se evaluó la importancia de las mediciones mediante un Test-t. La precisión intermedia del ensayo se determinó calculando el Coeficiente de Varianza. En todas las series de los datos de estabilidad el CV se mantuvo por debajo del 20% cumpliendo el criterio de validación de CV<20%. En función de cuanto antecede puede deducirse que el rVWF es estable en todos los sistemas con solución tampón citrato sometidos a ensayo, independientemente de la molaridad del tampón y de los aminoácidos añadidos. El rVWF sigue manteniendo la estabilidad al menos durante 13 meses,

incluso aunque se almacene a 40°C. La determinación de la potencia mediante el ensayo de actividad VWF:RCO muestra una adecuada precisión intermedia, con unos valores de CV por debajo de 20%.

Así, teniendo en cuenta los datos que se presentan en este documento, se ha propuesto una formulación de rVWF que incluye 15 mM de citrato (Na_3 Citrato $\times 2 \text{ H}_2\text{O}$), 15 mM de glicina, 10 g/l de trehalosa, 20 g/l de manitol y 0,1 g/l de Tween-80, con un pH de 7,3.

Ejemplo 4: Estabilidad a largo plazo

Pruebas aceleradas y de estabilidad a largo plazo

Se llevaron a cabo estudios de evaluación de la estabilidad del producto farmacéutico final rVWF (FDP) almacenado de acuerdo con las condiciones de almacenamiento recomendadas y restrictivas. Los datos de las condiciones de almacenamiento restrictivas garantizan que las desviaciones en materia de temperatura no afectarán a la calidad del FDP rVWF y se utilizarán para extrapolar la condición aceptable a la caducidad del material en ausencia de datos de estabilidad en tiempo y condiciones reales.

Las actuales especificaciones dictan una humedad residual $\leq 3,0\%$ (determinada mediante el Método de Karl Fischer). Los lotes rVWFF#4FC, rVWFF#5FC, rVWFF#6FC y rVWFF#7FC se lanzaron con unos niveles de humedad del 1,2%, 1,3%, 1,2%, y 1,5% respectivamente. En función de la experiencia anterior con otros productos con configuraciones de vial y tapón similares, se espera que cualquier lote de rVWF lanzado con una humedad residual de aproximadamente un 1,3% se atenga a los límites de la especificación de $\leq 3,0\%$ al término de la vida útil propuesta (es decir, 24 meses a la temperatura de almacenamiento prevista de $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$).

Los estudios de estabilidad a largo plazo en las condiciones de almacenamiento recomendadas (es decir, $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$) y a temperaturas elevadas (es decir, $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$) se llevaron a cabo con cuatro lotes FDP rVWF fabricados. Estos estudios han aportado datos suficientes para comparar la estabilidad de los lotes clínicos individuales.

El protocolo de estabilidad, incluyendo una descripción de los ensayos indicadores de estabilidad y los criterios de aceptación de estabilidad, pueden encontrarse en la Tabla 10, la cual también contiene información relacionada con los lotes de FDP rVWF evaluados en los estudios de estabilidad.

Tabla 10

Cond.almacenamiento (°C)	Nº de lote	Intervalos de prueba completados (y completos)
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#1 FC	0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses
30°C	rVWF#1 FC	0, 1, 3, 6 meses
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#2FC	0, 1, 2, 3, 6, meses
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#3FC	0, 2, 3, 6, 9, 12, 18, 24 meses
30°C	rVWF#3FC	0, 0.5, 1, 2, 3, 6 meses
40°C	rVWF#3FC	0, 0.5, 1, 2, 3 meses
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#4FC	0, 1, 6, 9, 12, 18, 24, (30) meses
40°C	rVWF#4FC	0, 1, 2, 3, 6, 9 meses
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#5FC	0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, 18, (24, 30) meses
40°C	rVWF#5FC	0, 1, 2, 3, 6, 9 meses
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#6FC	0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, (18, 24, 30) meses
40°C	rVWF#6FC	0, 1, 2, 3, 6, 9 meses
$5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$	rVWF#7FC	0, 1, 2, 3, 6, 9, 12, (18, 24, 30) meses
40°C	rVWF#7FC	0, 1, 2, 3, 6, 9 meses

Resumen y comentarios acerca de la estabilidad global (24 meses)

Los datos de estabilidad del FDP rVWF presentados constan de:

1. Datos de 24 meses de estudios a largo plazo a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ (ensayo completo) y datos intermedios de 6 meses a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (ensayo completo) del lote rVWF#1FC;
2. Datos de 6 meses a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ (ensayo completo) del lote rVWF#2FC;
3. Datos de 24 meses de estudios a largo plazo a 2°C - 8°C (ensayo completo), datos de 6 meses a $30^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ y datos de 3 meses a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ (ensayo completo) del lote rVWF#3FC;
4. Datos de estabilidad a 24 meses a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ y datos de 9 meses a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ del lote rVWFF#4FC;
5. Datos de estabilidad a 24 meses a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ y datos de 9 meses a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ del lote rVWFF#5FC;
6. Datos de estabilidad a 12 meses a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ y datos a 9 meses a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ del lote rVWFF#6FC; y
7. Datos de estabilidad a 12 meses a $5^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ y datos a 9 meses a $40^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ del lote rVWFF#7FC.

La variación observada en la humedad residual de los lotes rVWFF#4FC, rVWFF#5FC, rVWFF#6FC y rVWFF#7FC permaneció muy por debajo del criterio de aceptación de $\leq 3\%$, y no afecta a la actividad funcional (VWF:RCo). No se produjeron cambios reseñables en los resultados de estabilidad para las técnicas analíticas cualitativas (es decir, aspecto, análisis SDS-PAGE, etc.) para que los lotes fabricados fuesen adecuados para su uso en estudios clínicos y no clínicos. Igualmente, no se observó tendencia alguna en la disminución de la estabilidad para el análisis total de proteínas, el análisis VWF:Ag o el número observado de multímeros de VWF durante el almacenamiento.

Las variaciones en la proporción de actividad VWF:RCo frente a la actividad VWF:Ag y los datos VWF:RCo presentados en relación con los lotes rVWFF#1FC, rVWFF#2FC y rVWFF#3FC se debieron probablemente a la variación en el método de ensayo, al hecho de que los resultados de la prueba individual de estabilidad de VWF:RCo eran datos obtenidos a partir de una sola determinación de una muestra de estabilidad, y/o datos obtenidos con la metodología de ensayo no acorde con Ph. Eur. Todos los hitos de tiempo de ensayo correspondientes a los lotes no clínicos con posterioridad al cambio de la metodología del ensayo por una metodología de ensayo conforme a Ph.Eur. se sometieron a la prueba utilizando la nueva metodología de ensayo y la original.

El FDP rVWF fabricado a gran escala presentaba características similares a las de los lotes de FDP rVWF fabricados a escala experimental. Estos lotes FDP rVWF mantuvieron la actividad de VWF:RCo durante un período de hasta 24 meses de almacenamiento a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. No se produjeron cambios en el patrón del multímero VWF en las muestras de los lotes a gran escala actualmente estables, incluso al cabo de 6 meses de almacenamiento a $30^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ o de 9 meses de almacenamiento a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. La Tabla 11 muestra los resultados de VWF:RCo, VWF:Ag y del patrón del multímero de VWF de los lotes rVWFF#4FC, rVWFF#5FC, rVWFF#6FC y rVWFF#7FC almacenados en unas condiciones de estrés de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Los resultados indican su estabilidad en condiciones de almacenamiento a temperatura elevada durante 9 meses, lo que puede extrapolarse a una vida útil de más de 3 años a temperatura ambiente, o incluso más prolongada en condiciones de refrigeración.

Tabla 11

Datos de estabilidad de rVWFF#4FC a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$							
Atributo	Especificación	Resultados al cabo de (meses)					
		0	1	2	3	6	9
Act. VWF:RCo [U/ml]" 11	70-150	130	117	118	127	132	142
VWF:Ag ELISA (U/ml)	Resultado informe	86	87	79	81	79	86
Análisis multímero VWF	Resultado informe	21	20	20	20	21	18
Datos de estabilidad de rVWFF#5FC a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$							
Actividad VWF:RCo [U/ml]"	70-150	107	119	120	116	132	134
VWF:Ag ELISA (U/ml)	Resultado informe	94	86	84	91	90	79
Análisis multímero VWF	Resultado informe	20	20	18	19	20	19
Datos de estabilidad de rVWFF#6FC a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$							
Actividad VWF:RCo [U/ml]"	70-150	118	111	126	129	130	119
VWF:Ag ELISA (U/ml)	Resultado informe	85	95	86,3	73,5	80,8	70,3
Análisis multímero VWF	Resultado informe	20	19	20	20	20	n.t.
Datos de estabilidad de rVWFF#7FC a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$							
Actividad VWF:RCo [U/ml] ¹	70-150	111	115	122	105	99	112
VWF:Ag ELISA (U/ml)	Resultado informe	87,3	85,3	77,5	68,8	75	73,8
Análisis multímero VWF	Resultado informe	21	20	20	19	19	19

Un análisis de covarianza (análisis ANCOVA) demostró que la diferencia en las pendientes de las líneas de regresión (lotes rVWFF#4FC, rVWFF#5FC, rVWFF#6FC y rVWFF#7FC almacenados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$) no era significativa ($p = 0,906$), lo que permite agrupar los datos de actividad VWF:RCo como se describe en ICH Q1A (R2). La diferencia en la elevación de las líneas de tendencia de los lotes individuales tampoco es significativa. La extrapolación de la pendiente agrupada del caso menos favorable, como se muestra en la Figura 1, muestra que los intervalos de confianza se mantienen dentro de los criterios de aceptación para un mínimo de 24 meses. El intervalo de menor confianza para la curva media disminuye hasta el 80% de la actividad inicial a los 51 meses (80% es también la máxima diferencia entre la potencia estimada y la potencia establecida para el Factor Humano von Willebrand en Ph.Eur). La pendiente agrupada del caso menos favorable muestra una disminución mensual de 0,0344 U VWF:RCo. Esta comparación demuestra que las características de estabilidad de la FDP rVWF y específicamente que la actividad de VWF:RCo no experimentaron alteraciones como resultado de los cambios acaecidos en el proceso de producción. La extrapolación anterior respalda la ampliación de la vida útil provisional de la FDP rVWF a 24 meses cuando se almacena a la temperatura de almacenamiento recomendada.

La transferencia de humedad desde el tapón al producto liofilizado depende del material del tapón y se ve afectada por la humedad residual del tapón tras su esterilización, la humedad a la que se almacena la muestra y la tasa intrínseca de transferencia de la humedad del tapón. La humedad residual de los lotes rVWFF#4FC, rVWFF#5FC, rVWFF#6FC y rVWFF#7FC almacenados a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ alcanzó niveles comparables (sin que fuese significativa la

5 diferencia en la comparación de las pendientes, siendo $p = 0,734$), como se muestra en la Figura 2. Los lotes almacenados en condiciones de temperatura elevada, de $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ también mostraron un incremento comparable de la humedad residual a lo largo de 9 meses (Figura 3). El análisis ANCOVA demuestra en este caso que la diferencia en la pendiente de las líneas de regresión es comparable ($p = 0,546$). La Figura 3 muestra la extrapolación de las pendientes agrupadas del caso menos favorable hasta 24 meses.

Estos datos resultan suficientes para respaldar el uso de los lotes rVWFF#6FC y rVWFF#7FC durante el período correspondiente al período de caducidad descrito de 24 meses cuando se almacenan a $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$.

Condiciones de almacenamiento propuestas y vida útil

10 Las condiciones de almacenamiento recomendadas para la FDP rVWF son de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Por tanto, se propone una vida útil provisional de 24 meses para la FDP rVWF cuando se almacena en las condiciones de almacenamiento recomendadas. Probablemente, la vida útil de los lotes FDP rVWF puede ampliarse aún más, en función de los datos adicionales que han de generarse para períodos de almacenamiento más prolongados.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Schnecker y col.
<120> FORMULACIONES DE VWF RECOMBINANTE LIOFILIZADO

5 <130> 31315/44042A
<150> US-61/107,273
<151> 2008-10-21
<160> 3
<170> PatentIn version 3.5
10 <210> 1
<211> 8833 <212> DNA <213> Homo sapiens

<400> 1

agctcacagc tattgtggtg ggaaagggag ggtggttggg ggatgtcaca gcttgggctt	60
tatctcccc agcagtggg actccacagc ccctgggcta cataacagca agacagtccg	120
gagctgtagc agacctgatt gagcctttgc agcagctgag agcatggcct aggggtgggcg	180
gcaccattgt ccagcagctg agtttccag ggaccttga gatagccga gccctcattt	240
gcaggggaag atgattcctg ccagatttgc cggggtgctg cttgctctgg ccctcatttt	300
gccagggacc ctttgtgcag aaggaactcg cggcaggtca tccacggccc gatgcagcct	360
tttcggaagt gacttcgtca acaccttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg	420
cagttacctc ctggcagggg gctgccagaa acgtccttc tcgattattg gggacttcca	480
gaatggcaag agagtgagcc tctccgtgta tcttggggaa ttttttgaca tccatttgtt	540
tgtcaatggt accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg	600
gctgtatcta gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt	660
ggccaggatc gatggcagcg gcaactttca agtcctgctg tcagacagat acttcaacaa	720
gacctgcggg ctgtgtggca actttaacat ctttctgaa gatgacttta tgaccaaga	780
agggaccttg acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga	840
acagtgggtg gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat	900
gcagaagggc ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcggtgt ttgcccgctg	960
ccaccctctg gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagt	1020
tgtgtggggg ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccga cctgtgccca	1080
ggagggaaatg gtgtgttacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc	1140
tggtatggag tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat	1200

ES 2 409 032 T3

caatgaaatg tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tggcctgagg gacagctcct	1260
ggatgaaggc ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta	1320
ccctcccggc acctccctct ctcgagactg caacacctgc atttgccgaa acagccagtg	1380
gatctgcagc aatgaagaat gtccagggga gtgccttgtc acaggtcaat cacacttcaa	1440
gagctttgac aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga	1500
ttgccaggac cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgcga	1560
cgctgtgtgc acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtgaa	1620
actgaagcat ggggcaggag ttgccatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa	1680
aggtgacctc cgcattccagc atacagtac ggctccgtg cgcctcagct acggggagga	1740
cctgcagatg gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc	1800
cggaagacc tgcggcctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttccttac	1860
cccctctggg ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg	1920
ggactgccag gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcagac	1980
caggttctcc gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg	2040
tgcgctcagc ccgctgcctt acctgcgga ctgcgctac gacgtgtgct cctgctcgga	2100
cgcccgcgag tgctgtgctg gcgccctggc cagctatgcc gcggcctgcg cggggagagg	2160
cgtgcgcgtc gcgtggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccagg	2220
gtacctgcag tgcgggacct cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga	2280
ggaatgcaat gaggcctgcc tggagggtg cttctgcccc ccagggtctt acatggatga	2340
gaggggggac tgcgtgcccc agggccagtg cccctgttac tatgacggtg agatcttcca	2400
gccagaagac atcttctcag accatcacac catgtgctac tgtgaggatg gcttcatgca	2460
ctgtaccatg agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcccct	2520
gtctcatcgc agcaaaagga gcctatcctg tcggcccccc atggtcaagc tgggtgtgtcc	2580
cgctgacaac ctgcgggctg aagggtctga gtgtaccaa acgtgccaga actatgacct	2640
ggagtgcattg agcatgggtt gtgtctctgg ctgcctctgc cccccgggca tggtcggga	2700
tgagaacaga tgtgtggccc tggaaagggt tccctgcttc catcagggca aggagtatgc	2760
ccctggagaa acagtgaaga ttggctgcaa cacttgtgtc tgtcgggacc ggaagtggaa	2820
ctgcacagac catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac gccatggccc actacctcac	2880
cttcgacggg ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta	2940
ctgcggcagt aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc	3000
ctcagtgaat tgcaagaaac gggtcacat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt	3060

ES 2 409 032 T3

cacggtgctg cagtactcct acatggtgac tgtggagtag cccttcagcg aggcacagtc	4920
caaaggggac atcctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcgcca acaggaccaa	4980
cactgggctg gccctgcggt acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg	5040
ggagcaggcg cccaacctgg tctacatggt caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa	5100
gaggctgcct ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaag ccaacgtgca	5160
ggagctggag aggattggct ggcccaatgc ccctatcctc atccaggact ttgagacgct	5220
ccccgagag gctcctgacc tgggtgctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat	5280
ccccaccctc tcccctgcac ctgactgcag ccagccctg gacgtgatcc ttctcctgga	5340
tggctcctcc agtttccag cttcttattt tgatgaaatg aagagtttcg ccaaggcttt	5400
catttcaaaa gccaatatag ggctcgtct cactcaggtg tcagtgcctg agtatggaag	5460
catcaccacc attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct	5520
tgtggacgtc atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggctttgc	5580
tgtgcgatac ttgacttcag aaatgcatgg tgccaggccg ggagcctcaa aggcgggtgg	5640
catcctggtc acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc	5700
caacagagtg acagtgttcc ctattggaat tggagatcgc tacgatgcag ccagctacg	5760
gatcttggca ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct	5820
ccctaccatg gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgtag	5880
gatttgcatg gatgaggatg ggaatgagaa gagggccggg gacgtctgga ccttgccaga	5940
ccagtgccac accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgctgaaga gtcacgggt	6000
caactgtgac cgggggctga ggccctcgtg ccctaacagc cagtcccctg ttaaagtgga	6060
agagacctgt ggctgccgtt ggacctgcc ctgcgtgtgc acaggcagct ccaactcgga	6120
catcgtgacc tttgatgggc agaatttcaa gctgactggc agctgttctt atgtcctatt	6180
tcaaaacaag gagcaggacc tggaggtgat tctccataat ggtgcctgca gccctggagc	6240
aaggcagggc tgcatgaaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctccg tcgagctgca	6300
cagtgcacatg gaggtgacgg tgaatgggag actggctctt gtcccttacg tgggtgggaa	6360
catggaagtc aacgtttatg gtgccatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggtca	6420
catcttcaca ttcactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt	6480
tgcttcaaag acgtatggct tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat	6540
gctgagggat ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca	6600
gcggccaggg cagacgtgcc agccatcct ggaggagcag tgtcttgctc ccgacagctc	6660
ccactgccag gtccctctct taccactgtt tgctgaatgc cacaaggctc tggctccagc	6720

ES 2 409 032 T3

cacattctat gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggtgat	6780
cgcctcttat gccacacctt gtcggaccaaa cggggctctgc gttgactgga ggacacctga	6840
tttctgtgct atgtcatgcc caccatctct ggtctacaac cactgtgagc atggctgtcc	6900
ccggcactgt gatggcaacg tgagctcctg tggggaccat ccctccgaag gctgtttctg	6960
ccctccagat aaagtcattg tggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcaactcagt	7020
cattggtgag gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccgg accaccagcc	7080
ctgtcagatc tgcacatgcc tcagcgggag gaaggtcaac tgcacaacgc agccctgccc	7140
cacggccaaa gctcccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgcctccgcc agaattgcaga	7200
ccagtgtgct cccgagtatg agtgtgtgtg tgaccacagt agctgtgacc tgccccagt	7260
gcctcactgt gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa	7320
cttcacctgc gcctgcagga aggaggagt caaaagagt tccccacct cctgcccccc	7380
gcaccgtttg cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtattagt gtgcctgcaa	7440
ctgtgtcaac tccacagtga gctgtcccct tgggtacttg gcctcaactg ccaccaatga	7500
ctgtggctgt accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat	7560
ctaccctgtg ggccagttct gggaggagg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga	7620
ggatgccgtg atgggcctcc gcgtggccca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg	7680
tcggtcgggc ttactttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaagg gcctgccatc	7740
tgctgtgag gtggtgactg gctcaccgag gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt	7800
cggctcccag tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga	7860
ggaggagggtc ttatataaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg	7920
cccctcgggc ttctcagctga gctgtaagac ctcagcgtgc tgcccaagct gtcgctgtga	7980
gcgcatggag gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat	8040
cgatgtgtgc acgacctgcc gctgcatggt gcagggtggg gtcattctct gattcaagct	8100
ggagtgcagg aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataacac	8160
aggtgaatgt tgtgggagat gtttgcttac ggcttgacc attcagctaa gaggaggaca	8220
gatcatgaca ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa	8280
ggtcaatgag agaggagagt acttctggga gaagagggtc acaggctgcc caccctttga	8340
tgaacacaag tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga	8400
cacatgtgag gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaagggtgg	8460
aagctgtaag tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaaat gtgccagcaa	8520

ES 2 409 032 T3

tgacggggag gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga	3120
gtctggccgg tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca	3180
cctgagcatc tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg	3240
gaatTTTgat ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga	3300
ccctgtggac tttgggaact cctggaaagt gagctcgag tgtgctgaca ccagaaaagt	3360
gcctctggac tcacccctg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga	3420
ttcctcctgt agaatectta ccagtacgt cttccaggac tgcaacaagc tgggtggacc	3480
cgagccatat ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg	3540
cgctgtctc tgcgacacca ttgctgccta tgcccacgtg tgtgccagc atggcaaggt	3600
ggtgacctgg aggacggcca cattgtgcc ccagagctgc gaggagagga atctccggga	3660
gaacgggtat gagtgtgagt ggcgtataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg	3720
tcagcaccct gagccactgg cctgccctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgccactg	3780
ccctccaggg aaaatcctgg atgagctttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc	3840
agtgtgtgag gtggctggcc ggcgttttgc ctcaggaaag aaagtcacct tgaatccag	3900
tgacctgag cactgccaga tttgccactg tgatgttgc aacctcacct gtgaagcctg	3960
ccaggagccg ggaggcctgg tggcgctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct	4020
gtatgtggag gacatctcgg aaccgccgtt gcacgatttc tactgcagca ggctactgga	4080
cctggtcttc ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttt aagtgtgaa	4140
ggcctttgtg gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc	4200
cgtggtggag taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc	4260
gtcagagctg cggcgcattg ccagccagggt gaagtatgcg ggcagccagg tggcctccac	4320
cagcgaggtc ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc	4380
ctcccgcatc accctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt	4440
tgtccgctac gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccg tgggcattgg	4500
gccccatgcc aacctcaagc agatccgct catcgagaag caggcccctg agaacaaggc	4560
cttcgtgctg agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct	4620
ctgtgacctt gcccctgaag cccctcctcc tactctgccc cccgacatgg cacaagtcac	4680
tgtgggcccg gggctcttgg gggtttcgac cctggggccc aagaggaaact ccatggttct	4740
ggatgtggcg ttcgtcctgg aaggatcgga caaatttgt gaagccgact tcaacaggag	4800
caaggagttc atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt	4860

ES 2 409 032 T3

```

agccatgtac tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctcctgct gctctccgac      8580
acggacggag cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtaccatga      8640
ggtttctcaat gccatggagt gcaaatgctc ccccaggaag tgcagcaagt gaggctgctg      8700
cagctgcatg ggtgcctgct gctgcctgcc ttggcctgat ggccaggcca gagtgcctgcc      8760
agtcctctgc atgttctgct cttgtgccct tctgagccca caataaaggc tgagctctta      8820
tcttgcaaaa ggc                                                         8833

```

<210> 2

<211> 2783

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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
145             150            155            160

Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln Glu Gly Thr Leu Thr Ser

```

ES 2 409 032 T3

165										170					175					
Asp	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Trp	Ala	Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln					
			180						185						190					
Trp	Cys	Glu	Arg	Pro	Ser	Ser	Ser	Cys	Asn	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Met					
			195						200						205					
Gln	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Gln	Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val					
		210						215						220						
Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Cys	Glu	Lys					
		225						230						235						
Thr	Leu	Cys	Glu	Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu					
								245						250						
Leu	Glu	Tyr	Ala	Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly					
								260						265						
Trp	Thr	Asp	His	Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu					
								275						280						
Tyr	Arg	Gln	Cys	Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His					
		290						295						300						
Ile	Asn	Glu	Met	Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro					
		305						310						315						
Glu	Gly	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys					
								325						330						
Pro	Cys	Val	His	Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser					
								340						345						
Arg	Asp	Cys	Asn	Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser					
								355						360						
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						
Leu	Leu	Ala	Arg	Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu					
								405						410						
													415							

ES 2 409 032 T3

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 2 409 032 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

ES 2 409 032 T3

Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu Val Glu Gly Gly Glu
 900 905 910
 Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys Arg Pro Met Lys Asp
 915 920 925
 Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg Tyr Ile Ile Leu Leu
 930 935 940
 Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser
 945 950 955 960
 Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly
 965 970 975
 Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln
 980 985 990
 Val Glu 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

ES 2 409 032 T3

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

ES 2 409 032 T3

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

ES 2 409 032 T3

Glu	Ile	Lys	Arg	Leu	Pro	Gly	Asp	Ile	Gln	Val	Val	Pro	Ile	Gly
1595						1600					1605			
Val	Gly	Pro	Asn	Ala	Asn	Val	Gln	Glu	Leu	Glu	Arg	Ile	Gly	Trp
1610						1615					1620			
Pro	Asn	Ala	Pro	Ile	Leu	Ile	Gln	Asp	Phe	Glu	Thr	Leu	Pro	Arg
1625						1630					1635			
Glu	Ala	Pro	Asp	Leu	Val	Leu	Gln	Arg	Cys	Cys	Ser	Gly	Glu	Gly
1640						1645					1650			
Leu	Gln	Ile	Pro	Thr	Leu	Ser	Pro	Ala	Pro	Asp	Cys	Ser	Gln	Pro
1655						1660					1665			
Leu	Asp	Val	Ile	Leu	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser	Ser	Ser	Phe	Pro	Ala
1670						1675					1680			
Ser	Tyr	Phe	Asp	Glu	Met	Lys	Ser	Phe	Ala	Lys	Ala	Phe	Ile	Ser
1685						1690					1695			
Lys	Ala	Asn	Ile	Gly	Pro	Arg	Leu	Thr	Gln	Val	Ser	Val	Leu	Gln
1700						1705					1710			
Tyr	Gly	Ser	Ile	Thr	Thr	Ile	Asp	Val	Pro	Trp	Asn	Val	Val	Pro
1715						1720					1725			
Glu	Lys	Ala	His	Leu	Leu	Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu
1730						1735					1740			
Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly	Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg
1745						1750					1755			
Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys
1760						1765					1770			
Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp
1775						1780					1785			
Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro
1790						1795					1800			
Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu
1805						1810					1815			

ES 2 409 032 T3

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

ES 2 409 032 T3

2045		2050		2055
Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn				
2060		2065		2070
Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr				
2075		2080		2085
Leu Val Gln Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln				
2090		2095		2100
Pro Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu				
2105		2110		2115
Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala				
2120		2125		2130
Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln				
2135		2140		2145
Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn				
2150		2155		2160
Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser				
2165		2170		2175
Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro				
2180		2185		2190
Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser				
2195		2200		2205
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

ES 2 409 032 T3

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

ES 2 409 032 T3

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

ES 2 409 032 T3

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

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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

ES 2 409 032 T3

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

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

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

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

ES 2 409 032 T3

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
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

ES 2 409 032 T3

Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655
 Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 660 665 670
 Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
 675 680 685
 Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
 690 695 700
 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

ES 2 409 032 T3

	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
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				

ES 2 409 032 T3

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	
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	

ES 2 409 032 T3

Gln Arg	Pro Gly Gln Thr Cys	Gln Pro Ile Leu Glu	Glu Gln Cys
1355	1360	1365	
Leu Val	Pro Asp Ser Ser His	Cys Gln Val Leu Leu	Leu Pro Leu
1370	1375	1380	
Phe Ala	Glu Cys His Lys Val	Leu Ala Pro Ala Thr	Phe Tyr Ala
1385	1390	1395	
Ile Cys	Gln Gln Asp Ser Cys	His Gln Glu Gln Val	Cys Glu Val
1400	1405	1410	
Ile Ala	Ser Tyr Ala His Leu	Cys Arg Thr Asn Gly	Val Cys Val
1415	1420	1425	
Asp Trp	Arg Thr Pro Asp Phe	Cys Ala Met Ser Cys	Pro Pro Ser
1430	1435	1440	
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	

ES 2 409 032 T3

Arg	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Glu	Cys	Arg	Pro
1580						1585					1590			
Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val	Ser
1595						1600					1605			
Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	Lys	Thr
1610						1615					1620			
Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Asn	Ser
1625						1630					1635			
Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn
1640						1645					1650			
Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys
1655						1660					1665			
Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu
1670						1675					1680			
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

ES 2 409 032 T3

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		
Asp Thr His Phe Cys Lys Val	Asn Glu Arg Gly Glu	Tyr Phe Trp		
1910	1915	1920		
Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys	Pro Pro Phe Asp Glu	His Lys Cys		
1925	1930	1935		
Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile	Met Lys Ile Pro Gly	Thr Cys Cys		
1940	1945	1950		
Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu	Cys Asn Asp Ile Thr	Ala Arg Leu		
1955	1960	1965		
Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser	Cys Lys Ser Glu Val	Glu Val Asp		
1970	1975	1980		
Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys	Cys Ala Ser Lys Ala	Met Tyr Ser		
1985	1990	1995		
Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln	Asp Gln Cys Ser Cys	Cys Ser Pro		
2000	2005	2010		
Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln	Val Ala Leu His Cys	Thr Asn Gly		
2015	2020	2025		
Ser Val Val Tyr His Glu Val	Leu Asn Ala Met Glu	Cys Lys Cys		
2030	2035	2040		
	Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys			
	2045	2050		

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n farmac3utica estable liofilizada de un factor von Willebrand recombinante (rVWF) que comprende: (a) un rVWF; (b) uno o m3s agentes tamp3n; (c) uno o m3s amino3cidos; (d) uno o m3s agentes estabilizantes; y (e) uno o m3s tensioactivos, prepar3ndose dicha formulaci3n mediante la liofilizaci3n de una soluci3n que comprende:
5 (a) dicho rVWF, comprendiendo un polip3ptido seleccionado de entre el grupo consistente en:
a) la secuencia de amino3cidos de SEQ ID N3 3;
b) un an3logo, fragmento o variante de a) capaz de causar la aglutinaci3n de las plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina o de unirse al Factor VIII;
10 c) un polip3ptido codificado por el nucle3tido de SEQ ID N3 1;
d) un an3logo, fragmento o variante de c) capaz de causar la aglutinaci3n de las plaquetas estabilizadas en presencia de ristocetina o de unirse al Factor VIII; y
e) un polip3ptido codificado por un nucle3tido que se hibrida con el polinucle3tido de SEQ ID N3 1 bajo condiciones de hibridaci3n moderadamente restrictivas;
15 (b) comprendiendo dicho tamp3n un agente tamp3n del pH en un rango de aproximadamente 0,1 mM y aproximadamente 500 mM y con un pH de aproximadamente 2,0 a aproximadamente 12,0;
(c) estando presente dicho amino3cido a una concentraci3n de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM;
20 (d) estando presente dicho agente estabilizante a una concentraci3n de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1.000 mM; y
(e) estando presente dicho tensioactivo a una concentraci3n de aproximadamente 0,01 g/l a 0,5 g/l.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el rVWF comprende la secuencia de amino3cidos de SEQ ID N3 3.
3. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el agente tamp3n se selecciona de entre el grupo consistente en citrato, glicina, histidina, HEPES, Tris y combinaciones de los mismos.
25 4. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el pH de la soluci3n est3 en el rango de aproximadamente 6,0 a aproximadamente 8,0, por ejemplo aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5, tal como 7,3.
5. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el agente tamp3n de la soluci3n es citrato y el pH es aproximadamente 7,3.
30 6. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el amino3cido se selecciona de entre el grupo consistente en glicina, histidina, prolina, serina, alanina y arginina.
7. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 6, caracterizada porque el amino3cido est3 presente en un rango de concentraci3n de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 300 mM en la soluci3n.
35 8. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 7, caracterizada porque el amino3cido es glicina a una concentraci3n de aproximadamente 15 mM en la soluci3n.
9. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el rVWF comprende la secuencia de amino3cidos de SEQ ID N3 3, el agente tamp3n de la soluci3n es citrato y el pH es aproximadamente 7,3; y porque el amino3cido es glicina a una concentraci3n de aproximadamente 15 mM en la soluci3n.
40 10. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el o los agentes estabilizantes se seleccionan de entre el grupo consistente en manitol, lactosa, sorbitol, xilitol, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa y combinaciones de los mismos.

11. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10, caracterizada porque los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentraci3n de aproximadamente 10 g/l en la soluci3n y manitol a una concentraci3n de aproximadamente 20 g/l en la soluci3n.
- 5 12. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el tensioactivo se selecciona de entre el grupo consistente en digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20, TWEEN-80 y combinaciones de los mismos.
13. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 12, caracterizada porque el tensioactivo es TWEEN-80 a una concentraci3n de aproximadamente 0,01 g/l en la soluci3n.
- 10 14. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, caracterizada porque el rVWF comprende la secuencia de amino3cidos de SEQ ID N3 3, el agente tamp3n de la soluci3n es citrato a una concentraci3n aproximadamente 15 mM con un pH de aproximadamente 7,3, el amino3cido es glicina a una concentraci3n aproximadamente 15 mM en la soluci3n, los agentes estabilizantes son trehalosa a una concentraci3n en soluci3n de aproximadamente 10 g/l y manitol a una concentraci3n en soluci3n de aproximadamente 20 g/l y el tensioactivo es TWEEN-80 a aproximadamente 0,1 g/l en la soluci3n.
- 15

Figura 1

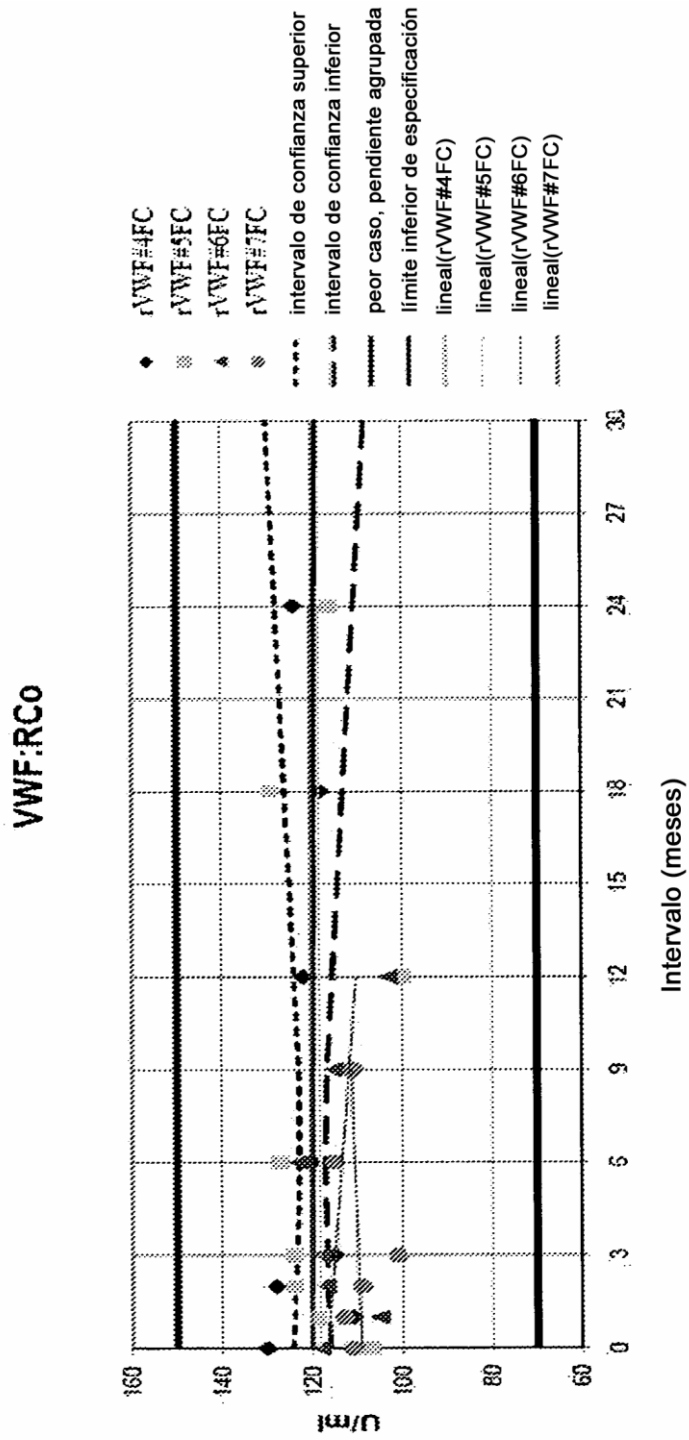


Figura 2

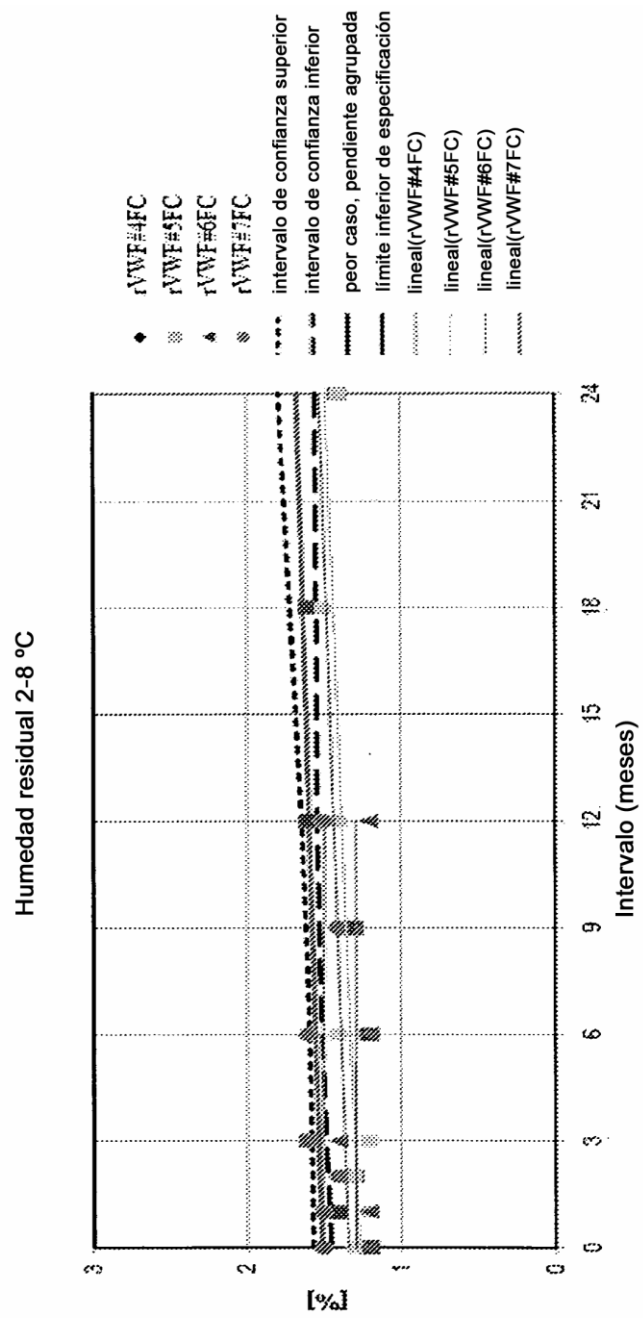


Figura 3

