

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 270**

51 Int. Cl.:

**C12N 15/85** (2006.01)

**A01K 67/027** (2006.01)

**A61K 49/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2009 PCT/US2009/062228**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.06.2010 WO10062604**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 09752581 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.12.2018 EP 2350294**

54 Título: **Modelos de ratón de púrpura trombocitopénica trombótica y métodos para su uso**

30 Prioridad:

**27.10.2008 US 108781 P**  
**02.03.2009 US 156768 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**20.05.2019**

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)**  
**Zählerweg 4**  
**6300 Zug, CH y**  
**BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SCHWARZ, HANS-PETER;**  
**MUCHITSCH, EVA-MARIA y**  
**TURECEK, PETER**

74 Agente/Representante:

**MARTÍN BADAJOZ, Irene**

**Observaciones :**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 713 270 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**

Modelos de ratón de púrpura trombocitopénica trombótica y métodos para su uso.

## 5 Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. de serie 61/108,781, presentada el 27 de octubre de 2008, y de la solicitud de patente provisional de Estados Unidos núm. de serie 61/156,768, presentada el 2 de marzo de 2009.

## 10 Campo de la invención

La invención se refiere generalmente al desarrollo de un modelo de ratón de púrpura trombocitopénica trombótica (TTP). Más específicamente, la invención hace uso de multímeros de peso molecular ultragrande del factor von Willebrand (VWF) en varias cepas de ratón para inducir síntomas parecidos a TTP para el desarrollo de un modelo de ratón de la TTP. La descripción también proporciona los métodos para generar tales modelos animales de enfermedad y métodos de selección para identificar compuestos biológicamente activos que son efectivos en el tratamiento de la TTP.

## 20 Antecedentes de la invención

La púrpura trombocitopénica trombótica ("TTP" o la enfermedad de Moschcowitz) es un trastorno severo y raro del sistema de coagulación sanguínea, que causa la formación de coágulos de sangre microscópicos en los pequeños vasos sanguíneos de todo el cuerpo. La mayoría de los casos de la TTP surgen de la deficiencia o inhibición de la enzima ADAMTS13 (desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13). ADAMTS13 es la enzima proteolítica responsable de la escisión de multímeros grandes del factor von Willebrand (VWF) y se conoce también como proteasa de escisión del VWF. Por lo tanto, existe una relación entre la función biológica de ADAMTS13 y la existencia de multímeros de peso molecular ultragrande del VWF y la aparición de la TTP o síntomas similares a TTP. La TTP también puede relacionarse con el cáncer, quimioterapia, infección de VIH, terapia de sustitución hormonal y estrógenos, y una serie de medicamentos usados comúnmente (que incluye ticlopidina, clopidogrel, y ciclosporina A).

Un nivel bajo de ADAMTS13 causa que las sustancias de coagulación (plaquetas) se aglutinen en la sangre. A medida que las plaquetas se aglutinan juntas, hay menos plaquetas disponibles en el torrente sanguíneo. Esta aglutinación, o agregación, puede conducir a sangrados bajo la piel y manchas de color morado denominadas púrpura. También puede causar que se rompan los glóbulos rojos (se produzca hemólisis) puesto que se someten a tensión por cizallamiento a medida que pasan los coágulos microscópicos de plaquetas. Los glóbulos rojos se destruyen así prematuramente. El flujo de sangre reducido y la lesión celular resulta en el daño del órgano terminal. La terapia actual se basa en el soporte y la plasmaféresis para reducir los anticuerpos circulantes contra ADAMTS13, y la reposición de los niveles en sangre de ADAMTS13.

El desarrollo de anticuerpos para la terapia de proteínas es un problema persistente cuando se usan los biofármacos para el tratamiento de trastornos similares a la TTP y la hemofilia. Estos anticuerpos a menudo inhiben la actividad de la proteína terapéutica de esta manera se reduce la eficacia del tratamiento o se requiere aumentar las dosis del fármaco para mantener los niveles terapéuticos. Debido a que estos trastornos de la sangre a menudo son afecciones de por vida, la aparición de anticuerpos específicos para los factores terapéuticos de coagulación sanguínea es particularmente difícil para los pacientes que reciben el tratamiento y es un desafío para los médicos que tratan a estos pacientes.

El papel que desempeñan los modelos preclínicos en la evaluación de la eficacia de los fármacos y la optimización de los compuestos guías es esencial en las compañías farmacéuticas. Sin un modelo animal robusto y confiable de enfermedad humana, el diseño de mejores moléculas se convierte en una tarea desalentadora. Para este objetivo, los modelos de ratones y ratas transgénicos y genéticamente deficientes son muy prometedores, pero aún no se han utilizado mucho en la industria farmacéutica. El uso limitado de tales modelos se debe probablemente en parte al fracaso de muchos modelos actuales transgénicos y knockouts para presentar cualidades esenciales de los modelos preclínicos de detección; validez, fiabilidad, y utilidad.

En un esfuerzo para comprender mejor la TTP y el potencial para la terapia, se ha buscado un modelo animal para el trastorno. Los primeros intentos para recrear un modelo de la TTP se basaron en la inducción química mediante el uso de, por ejemplo, factor de veneno botrocetina o 2-butoxietanol (BE). La botrocetina actúa a través de causar la unión y multimerización del VWF, lo que resulta en la agregación plaquetaria. Los animales tratados con el factor presentan trombocitopenia transiente, pero no todos los síntomas asociados con TTP (Sanders y otros, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15:793-800, 2005; Brinkhous y otros, *Mayo Clin. Proc.* 66:733-42, 1991). De manera similar, los animales tratados con BE desarrollaron ciertos síntomas de la TTP, que incluyen hemólisis y trombosis (Ezov y otros, *Cardiovasc. Toxicol.* 2:181-93, 2002). Sin embargo, el modelo falla en presentar todos los síntomas distintivos

de la TTP. Los últimos intentos involucraron la generación de ratones deficientes de ADAMTS13. En la mayoría de los trasfondos genéticos, sin embargo, el fenotipo es mínimo, lo que indica que la deficiencia de ADAMTS13 no es suficiente para causar TTP (Banno y otros, Blood 107:3161-66, 2006; Desch y otros, Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 27:1901-08, 2007).

5 Chauhan y otros, J Exp Med. 2006 Mar 20; 203(3):767-76, se refieren a ratones Adams13<sup>-/-</sup> y menciona la formación de trombos espontáneos en microvénulas activadas de estos ratones.

10 Chauhan y otros, Blood. 2008 Apr 1; 111(7):3452-7, se refieren a ratones deficientes de ADAMTS13 que fueron haploinsuficientes (Vwf<sup>+/-</sup>) o completamente deficientes (Vwf<sup>-/-</sup>) en el VWF.

15 Actualmente, no hay disponible un modelo animal para evaluar terapias para el tratamiento de la TTP. Las terapias son limitadas, e incluyen procedimientos como tratamiento del plasma, intercambio del plasma, y esplenectomía. Por tanto, existe una necesidad en la técnica de desarrollar un modelo y desarrollar métodos para estudiar los efectos de varias terapias para la TTP *in vivo* sin estudio en pacientes humanos. Además, permanece una necesidad en la técnica de determinar si la administración de proteína terapéutica exógena a un paciente resultará en la producción de anticuerpos específicos a antígeno que inhiben la actividad de la proteína *in vivo*.

20 Sumario de la invención

25 La invención es como se define por las reivindicaciones adjuntas. La invención aborda una o más necesidades en la técnica que se relacionan con el tratamiento de los trastornos de la coagulación sanguínea por proporcionar varios modelos animales, en donde VWF humana recombinante, que contiene multímeros de peso molecular ultragrande y alto, se administra a ratones para inducir los síntomas clínicos de la TTP y se asocia con trombocitopenia y microtrombosis.

30 En un aspecto, la invención incluye ratones normales, ratones deficientes en el VWF, y ratones knockouts en ADAMTS13. Por lo tanto, la invención proporciona una variedad de modelos de ratones que pueden usarse para evaluar *in vivo* la eficacia de fármacos para tratar TTP. La descripción contempla que las terapias combinatorias se usan mediante la administración de un agente de interés con un compuesto tal como, pero sin limitar a, preparaciones que contienen ADAMTS13 purificado o recombinante.

35 La invención se refiere a modelos de ratones adecuados para evaluar la eficacia de un agente terapéutico en el tratamiento de un trastorno en la coagulación sanguínea como se define en las reivindicaciones adjuntas. Tales modelos de ratones generalmente comprenden una incapacidad para romper el polipéptido del VWF humano recombinante.

40 El polipéptido del VWF recombinante es humano. El modelo es un ratón. En un aspecto, el trastorno es la púrpura trombocitopénica trombótica. En un aspecto adicional, el ratón es deficiente en el polipéptido ADAMTS13. En aún otro aspecto, el ratón es deficiente en el polipéptido del VWF. En aún otro aspecto, el modelo de ratón es de una cepa C57BL/6J.

45 También se describe en la presente descripción métodos para probar la capacidad de un agente de reducir la coagulación sanguínea en un mamífero administrado con el factor von Willebrand recombinante en una cantidad efectiva para causar mortalidad. Tales métodos generalmente comprenden comparar las tasas de mortalidad en un modelo animal en presencia y ausencia de un agente de prueba en donde la mortalidad disminuida en presencia del agente de prueba indica que el agente de prueba tiene la capacidad de reducir la coagulación sanguínea. En un aspecto, el modelo animal es deficiente en el polipéptido ADAMTS13. En varios aspectos, la cantidad del VWF recombinante es mayor que 1000 RCoU/kg, mayor que 2000 RCoU/kg, o mayor que 4000 RCoU/kg.

50 También se describe en la presente descripción métodos para probar la capacidad de un agente de reducir la coagulación sanguínea en un mamífero, administrado el polipéptido del VWF recombinante en una cantidad efectiva para causar una patología. Tales métodos generalmente comprenden comparar la patología en un modelo animal en presencia y ausencia de un agente de prueba en donde la incidencia o gravedad de la patología disminuida en presencia del agente de prueba indica que el agente de prueba tiene la capacidad de reducir la coagulación sanguínea. En varios aspectos, los métodos comprenden además administrar el agente de prueba en un intervalo de dosificaciones. En algunos aspectos, el polipéptido del VWF recombinante es humano. En varios aspectos, la cantidad de polipéptido del VWF recombinante es mayor que 250 RCoU/kg, mayor que 500 RCoU/kg, mayor que 1000 RCoU/kg, mayor que 2000 RCoU/kg, o mayor que 4000 RCoU/kg. En varios aspectos, el modelo animal es deficiente en un polipéptido ADAMTS13 o un polipéptido del VWF. En algunos aspectos, el modelo animal es un ratón. En aspectos adicionales, el ratón es de una cepa C57BL/6J.

65 En varios aspectos, la patología es una patología clínica, histológica, o conductual. Tal patología clínica puede ser evidente por uno o más cambios en el nivel de lactato deshidrogenasa, nivel de la creatinina cinasa, hematocrito, concentración de la hemoglobulina, conteo de eritrocitos, conteo de reticulocitos, conteo total de leucocitos, conteo diferencial de leucocitos, anomalías en la morfología de la sangre, conteo plaquetario, volumen medio de las células,

concentración media de la hemoglobulina celular, o nivel de células de la sangre en la orina. En otros aspectos, la patología es una patología histológica. Tal patología histológica puede ser evidente por una o más de las siguientes manifestaciones que incluyen, pero sin limitar a, microtrombos, necrosis del miocardio, perivasculitis coronaria aumentada, degeneración del miocardio, infarto del miocardio, reparación del miocardio, focos de células gliales, necrosis cortical, hemorragia, incidencia aumentada o gravedad media de un microtrombos, una coagulopatía intravascular diseminada (DIC), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), cardiopatía isquémica, un cambio tromboembólico, perivasculitis coronaria reactiva, inflamación, fibrosis, necrosis, deposición de hemosiderina, calcificación, infarto renal o una reducción de la masa corporal. Tal patología conductual puede ser evidente por una o más de las siguientes manifestaciones que incluyen, pero sin limitar a, depresión conductual, posición corporal propensa, posición lateral del cuerpo, posición corporal anormal, disnea, ataxia, inmovilidad, convulsiones, calambres o piloerección.

Esta invención se basa en el hallazgo que el VWF humano recombinante (rVWF), que comprende multímeros de peso molecular ultragrande y alto, puede inducir síntomas clínicos de la TTP en ratones. Se observó que la administración del rVWF causa trombocitopenia y microtrombosis en ratones. El modelo de ratón que se describe en la presente descripción puede usarse para diseñar terapias profilácticas y paliativas para la TTP.

La descripción proporciona métodos para inducir los síntomas de la TTP en un mamífero, dicho método que comprende la etapa de administrar al mamífero una composición que comprende el VWF humano recombinante (rVWF), en donde la composición del rVWF forma multímeros de alto peso molecular, y en donde la administración resulta en al menos un síntoma de la TTP en el mamífero. En algunas modalidades de la descripción, el rVWF no se escinde significativamente por ADAMTS13. En algunas modalidades de la descripción, el mamífero se selecciona del grupo que consiste en un ratón, una rata, un conejo, un roedor, y un primate no humano. En algunas modalidades de la descripción, el síntoma de la TTP se selecciona del grupo que consiste en: niveles disminuidos de plaquetas, anemia, efectos histopatológicos, niveles aumentados en sangre de creatinina cinasa, niveles aumentados en sangre de creatinina, microtrombos aumentados, y niveles aumentados en sangre de lactato deshidrogenasa.

De acuerdo con la invención, el mamífero es un ratón. En algunas modalidades, tienes niveles normales del VWF endógeno. En algunas modalidades, el ratón tiene niveles deficientes del VWF endógeno (por ejemplo, un ratón knockout en el VWF). En algunas modalidades, el ratón tiene niveles deficientes en ADAMTS13 endógena (por ejemplo, un ratón knockout en ADAMTS13). En algunas modalidades, el ratón carece de ADAMTS13 y VWF endógenos. El ratón puede humanizarse. El ratón puede ser inmunodeficiente.

El rVWF puede administrarse una vez, por ejemplo, para provocar una respuesta aguda en el ratón. El rVWF se administra a las dosis que se definen en las reivindicaciones adjuntas.

El rVWF puede administrarse más de una vez, por ejemplo, crónicamente, para provocar una respuesta de nivel más bajo en el ratón. El rVWF puede administrarse periódicamente, por ejemplo, una vez cada 24, 48, o 72 horas, o semanalmente. La administración periódica puede ser durante al menos una semana, un mes, o durante dos o tres meses. En tales modalidades, el rVWF se administra generalmente a una dosis más baja que para el modelo agudo.

En algunas modalidades, el rVWF se administra aproximadamente 500, 600, 700, 800, o 1000 RCoU/ kg de peso corporal del ratón.

El Factor Recombinante VIII (rFVIII) puede administrarse además al mamífero. El rFVIII puede administrarse a la misma vez, por ejemplo, en una composición única con, rVWF. El rVWF y el rFVIII pueden administrarse de manera separada, por ejemplo, consecutivamente.

El rVWF y el rFVIII pueden administrarse en una relación de dosis que es similar a la relación encontrada en el plasma normal. El rFVIII puede administrarse a una dosis de al menos aproximadamente 500 IU/ kg de peso corporal del mamífero, por ejemplo, al menos 750, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 3500, 4000, o 5000 IU/ kg de peso corporal.

De acuerdo con la invención, el rVWF se administra de manera intravenosa. En la descripción, el rVWF puede también administrarse a través de inyección, por ejemplo, de manera subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, y similares. En la descripción, el rVWF puede también administrarse por inhalación.

También se proporciona un modelo de ratón de la TTP, dicho modelo que comprende un ratón inyectado con una composición que comprende el rVWF, en donde la composición del rVWF forma multímeros de alto peso molecular, y en donde la administración resulta en al menos un síntoma de la TTP en el ratón.

El síntoma de la TTP puede seleccionarse del grupo de: niveles disminuidos de plaquetas, anemia, efectos histopatológicos, niveles aumentados en sangre de creatinina cinasa, niveles aumentados en sangre de creatinina, microtrombos aumentados, y niveles aumentados en sangre de lactato deshidrogenasa.

- 5 También se describe en la presente descripción un modelo de mamífero de la TTP que comprende un mamífero transgénico, en donde el mamífero transgénico expresa el factor humano recombinante von Willebrand (rVWF) de un transgén que comprende un polinucleótido que codifica el rVWF, en donde dicho rVWF forma multímeros de alto peso molecular, y en donde la inyección resulta en la formación de al menos un síntoma de la TTP. El mamífero puede seleccionarse del grupo que consiste en un ratón, rata, conejo, un roedor, o primate no humano. El síntoma de la TTP puede seleccionarse del grupo que consiste en: niveles disminuidos de plaquetas, anemia, efectos histopatológicos, niveles aumentados en sangre de creatinina cinasa, niveles aumentados en sangre de creatinina, microtrombos aumentados, y niveles aumentados en sangre de lactato deshidrogenasa.
- 10 En algunas modalidades, el modelo de ratón es un modelo para la TTP aguda. En algunas modalidades, el rVWF se administra sólo una vez. En tales modalidades, el rVWF se inyecta a una dosis de al menos 1000 RCoU/ kg de peso corporal del ratón. En algunas modalidades, la dosis es al menos 1500 RCoU/ kg, por ejemplo, 2000, 2500, 3000, 4000, o 5000 RCoU/ kg de peso corporal del ratón.
- 15 En algunas modalidades, el modelo de ratón es un modelo para la TTP crónica. En algunas modalidades, el rVWF se administra más de una vez. Por ejemplo, el rVWF puede administrarse periódicamente, por ejemplo, cada 24, 48, o 72 horas, o semanalmente.
- 20 En algunas modalidades, el rVWF se administra a 500, 600, 700, 800, o 1000 RCoU/ kg de peso corporal del ratón.
- 25 También se describe en la presente descripción los métodos para evaluar el efecto de una composición de prueba en síntomas de la TTP, el método que comprende las etapas de: (a) administrar a un mamífero una composición que comprende el rVWF, en donde el rVWF forma multímeros de alto peso molecular, y en donde la administración resulta en la formación de al menos un síntoma de la TTP; (b) administrar la composición de prueba al mamífero; y (c) determinar los efectos de la composición de prueba en al menos un síntoma de la TTP.
- 30 El mamífero de acuerdo con la descripción puede seleccionarse del grupo que consiste en: un ratón, rata, conejo, un roedor, o primate no humano. El síntoma de la TTP puede seleccionarse del grupo que consiste en: niveles disminuidos de plaquetas, anemia, efectos histopatológicos, niveles aumentados en sangre de creatinina cinasa, niveles aumentados en sangre de creatinina, microtrombos aumentados, y niveles aumentados en sangre de lactato deshidrogenasa.
- 35 El efecto de la composición de prueba puede evaluarse en un modelo agudo de mamífero para la TTP. El efecto de la composición de prueba puede evaluarse también en un modelo crónico de mamífero para la TTP.
- 40 La composición de prueba y la composición que comprende el rVWF pueden administrarse a la misma vez. La composición de prueba puede también administrarse antes de la composición que comprende el rVWF, por ejemplo, para prevenir, retardar la aparición, o reducir la gravedad de al menos un síntoma de la TTP.
- 45 La composición de prueba puede administrarse al menos una hora después de la administración de la composición del rVWF. La composición de prueba puede también administrarse al menos 3 horas después de la administración de la composición del rVWF, por ejemplo, al menos 5, 6, 8, 12, 18, 24, o 48 horas después de la administración de la composición del rVWF. La composición de prueba puede también administrarse al menos 1 o 2 semanas después de la administración de la composición del rVWF.
- 50 El efecto de la composición de prueba puede evaluarse por comparación de un mamífero control que no recibe la composición de prueba, y/o uno que no recibe la composición que comprende el rVWF. El efecto de la composición de prueba puede evaluarse por comparación del mismo mamífero antes de la administración de la composición que comprende el rVWF.
- 55 La composición de prueba puede ser una proteasa recombinante, por ejemplo, ADAMTS13 recombinante. La composición de prueba puede ser también un producto derivado del plasma, por ejemplo, plasma fresco congelado o una fracción purificada de plasma. La composición de prueba puede ser también un terapéutico no proteico. El terapéutico no proteico puede ser un terapéutico molecular pequeño. La molécula pequeña puede ser un glucocorticoide; o un medicamento antiplaquetario (por ejemplo, aspirina, dipiridamol) o azatioprina, ciclofosfamida, prostaciclina, o similares.
- 60 Otras características y ventajas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción detallada. Se debe entender, sin embargo, que la descripción detallada y los ejemplos específicos, si bien indican modalidades específicas de la invención, se dan solamente en forma de ilustración.

Breve descripción de las figuras

- 65 La Figura 1 es una electroforesis en gel del VWF de varias fuentes que demuestra los tamaños de las formas del VWF en cada medio. El carril 1 es plasma de humano normal; carril 2 es plasma de ratón C57BL/6J; carriles 5 y 6 son también de ratones C57BL/6J; carriles 3 y 4 son de ratones deficientes en ADAMTS13.

Las Figuras 2-4 ilustran los cambios en la masa corporal durante el término del estudio para ratones C57BL/6J. Los detalles de los análisis se describen en más detalle en los Ejemplos.

5 Las Figuras 5-12 muestran los datos para el hematocrito, el conteo plaquetario, creatinina cinasa (CK), y lactosa deshidrogenasa (LDH) durante el término del estudio para ratones C57BL/6J. Los detalles de los análisis se describen en más detalle en los Ejemplos.

Las Figuras 13-15 ilustran los cambios en la masa corporal durante el término del estudio para ratones deficientes en el VWF. Los detalles de los análisis se describen en más detalle en los Ejemplos.

10 Las Figuras 16-23 muestran los datos para el hematocrito, el conteo plaquetario, creatinina cinasa (CK), y lactosa deshidrogenasa (LDH) durante el término del estudio para ratones deficientes en el VWF. Los detalles de los análisis se describen en más detalle en los Ejemplos.

15 Las Figuras 24-26 ilustran los cambios en la masa corporal durante el término del estudio para ratones deficientes en ADAMTS13. Los detalles de los análisis se describen en más detalle en los Ejemplos.

Las Figuras 27-32 muestran los datos para el hematocrito, conteo plaquetario, y lactosa deshidrogenasa (LDH) durante el término del estudio para ratones deficientes en ADAMTS13. Los detalles de los análisis se describen en más detalle en los Ejemplos.

20

Descripción detallada de la invención

25 La presente invención proporciona un modelo de la TTP, basado en el hallazgo que un VWF humano recombinante (referido como "rVWF"), que contiene multímeros de peso molecular ultragrande y alto, puede inducir síntomas clínicos de la TTP y se asocia con trombocitopenia y microtrombosis cuando se administra a ratones. Estos efectos fueron vistos en ratones normales, ratones deficientes en el VWF, y lo más prominente en ratones deficientes en ADAMTS13 que también carecen de ADAMTS13 humano. En experimentos controles, los datos demostraron que el VWF humano que carece de multímeros de peso molecular ultragrande, como se puede purificar a partir de plasma humano, no fue capaz de inducir los síntomas similares a TTP. Los datos también demostraron que el tratamiento con ADAMTS13 de ratones con síntomas similares a la TTP inducidos por la aplicación del rVWF pudiera prevenir la aparición de los síntomas similares a la TTP inducidos de otra manera por el rVWF. La invención por lo tanto proporciona un modelo que puede usarse para probar la eficacia *in vivo* de varios agentes en el tratamiento de la TTP. Los métodos descritos proporcionados conducen a la necesidad en la técnica de métodos mejorados para probar la efectividad de las nuevas terapias en el tratamiento de la TTP.

35

Por consiguiente, los modelos de ratones se proporcionan para probar la eficacia de un agente terapéutico en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea, en donde el trastorno se caracteriza por la presencia de coágulos de sangre en los vasos sanguíneos de todo el cuerpo como se define en las reivindicaciones adjuntas.

40

En un aspecto de la descripción, los métodos se proporcionan para probar la capacidad de un agente para reducir la coagulación sanguínea en un mamífero que comprende las etapas de: administrar a un modelo animal una cantidad efectiva del VWF recombinante para causar mortalidad en combinación con cantidades diferentes del agente; examinar el modelo para una reducción en la mortalidad en comparación con el modelo no expuesto al agente; y seleccionar el agente por su capacidad para reducir la mortalidad en el modelo. Dicho de manera simple, los métodos se proporcionan para probar la capacidad de un agente para reducir la coagulación sanguínea en un mamífero administrado con el VWF recombinante en una cantidad efectiva para causar mortalidad que comprende comparar las tasas de mortalidad en un modelo animal en presencia y ausencia de un agente de prueba en donde la mortalidad disminuida en presencia del agente de prueba indica que el agente de prueba tiene la capacidad de reducir la coagulación sanguínea.

50

Los métodos también se proporcionan para probar la capacidad de un agente para reducir la coagulación sanguínea en un mamífero que comprende las etapas de: administrar a un modelo animal una cantidad efectiva del VWF recombinante para causar una patología en el modelo animal en combinación con varias cantidades del agente; examinar el modelo para una mejoría en la patología en comparación con el modelo no expuesto al agente; y seleccionar el agente por su capacidad para mejorar la patología en el modelo. De nuevo y de manera más simple, los métodos se proporcionan para probar la capacidad de un agente para reducir la coagulación sanguínea en un mamífero al que se le administra el factor recombinante von Willebrand en una cantidad efectiva para causar una patología que comprende comparar la patología en un modelo animal en presencia y ausencia de un agente de prueba, en donde la gravedad o incidencia disminuida de la patología en presencia del agente de prueba indica que el agente de prueba tiene la capacidad para reducir la coagulación sanguínea. De acuerdo con la invención, el VWF humano recombinante es para administrarse como se define en las reivindicaciones adjuntas.

60

De acuerdo con la presente descripción, el VWF recombinante se administra al modelo animal a una dosis de al menos aproximadamente 10 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 20 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 30 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 40 RCoU/kg de BW, de al menos

65

aproximadamente 50 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 60 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 70 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 80 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 90 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 100 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 150 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 200 RCoU/kg de BW, de al menos  
5 aproximadamente 250 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 300 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 350 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 400 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 450 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 500 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 550 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 600 RCoU/kg de BW, de al menos  
10 aproximadamente 650 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 700 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 750 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 800 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 850 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 900 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 950 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 1000 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 1200 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 1400 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 1600 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 1800 RCoU/kg de BW, de al menos  
15 aproximadamente 2000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 2500 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 3000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 3500 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 4000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 4500 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 5000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 6000 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 7000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 8000 RCoU/kg de BW, de al menos  
20 aproximadamente 9000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 10 000 RCoU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 20 000 RCoU/kg de BW, de al menos aproximadamente 50 000 RCoU/kg de BW, y de al menos  
aproximadamente 100 000 RCoU/kg de BW, y hasta más de 100 000 RCoU/kg de BW.

En ciertos aspectos de los métodos proporcionados, el FVIII recombinante se administra opcionalmente al modelo  
25 animal a una dosis de al menos aproximadamente 10 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 20 IU/kg de BW,  
de al menos aproximadamente 30 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 40 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 50 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 60 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente  
70 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 80 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 90 IU/kg de BW, de  
al menos aproximadamente 100 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 150 IU/kg de BW, de al menos  
30 aproximadamente 200 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 250 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 300 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 350 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 400 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 450 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 500 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 550 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 600 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 650 IU/kg de BW, de al menos  
35 aproximadamente 700 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 750 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 800 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 850 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 900 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 950 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 1000 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 1200 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 1400 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 1600 IU/kg de BW, de al menos  
40 aproximadamente 1800 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 2000 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 2500 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 3000 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 3500 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 4000 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 4500 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 5000 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 6000 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 7000 IU/kg de BW, de al menos  
45 aproximadamente 8000 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 9000 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 10 000 IU/kg de BW, de al menos aproximadamente 20 000 IU/kg de BW, de al menos  
aproximadamente 50 000 IU/kg de BW, y de al menos aproximadamente 100 000 IU/kg de BW, y hasta más de 100  
000 IU/kg de BW.

50 En los métodos proporcionados, el agente de prueba se administra al modelo animal a cualquier dosis, que incluye  
una variedad de dosis. La dosificación puede basarse en el peso corporal, actividad del agente, vía de  
administración, condición del receptor animal, y varios factores conocidos por expertos en la técnica.

#### Definiciones

55 A menos que se especifique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción  
tienen el mismo significado que el conocido comúnmente por el experto en la técnica a la que pertenece esta  
invención. Las siguientes referencias proporcionan al experto una definición general de muchos de los términos  
usados en esta invención: Singleton y otros, Dictionary of Microbiology and Molecular Biology (2da edición, 1994);  
60 The Cambridge Dictionary of Science and Technology (Ediciones Walker, 1988); The Glossary of Genetics, 5ta  
Edición, R. Rieger, y otros. (eds.), Springer Verlag (1991); y Hale y Marham, The Harper Collins dictionary of Biology  
(1991).

Las siguientes abreviaturas se usan a través de todo el documento.

65

	ADAMTS13 - una desintegrina y metalopeptidasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13
	BW - peso corporal
5	IU - unidades internacionales
	n.a. - no aplica
	IV - intravenosa
10	CV - Coeficiente de variación
	NOAEL - Nivel de Efecto Adverso No Observado
	SEM - Error estándar de la media
15	SOP - Procedimiento de Operación Estándar
	mEq - miliequivalente
	RCo - cofactor de ristocetina
20	VWF - factor von Willebrand
	rVWF - factor recombinante von Willebrand
	rFVIII - factor ocho recombinante
	WFI - agua para inyección
25	STADS - conjunto de datos de análisis a corto plazo
	LTADS - conjunto de datos de análisis a largo plazo

30 Cabe señalar aquí que, como se usa en esta descripción y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "uno", y "el" incluyen referencias en plural a menos que el contexto dicte claramente lo contrario.

Como se usa en la presente, los siguientes términos tienen los significados atribuidos a éstos, a menos que se especifique lo contrario.

35 El término "gen" se refiere a una secuencia de ADN que codifica una secuencia de aminoácidos que comprende todo o parte de uno o más polipéptidos, proteínas o enzimas, y puede o no incluir intrones, y secuencias de ADN reguladoras, tales como las secuencias del promotor o el potenciador, la región 5'- no traducida, o la región 3'-no traducida que afectan, por ejemplo, las condiciones en las que el gen se expresa. Algunos genes, que no son genes estructurales, pueden transcribirse de ADN a ARN, pero no se traducen a una secuencia de aminoácidos. Otros genes pueden funcionar como reguladores de los genes estructurales o como reguladores de la transcripción del ADN.

45 "Ácido nucleico" se refiere a los desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos y sus polímeros ya sea en forma de cadena doble o simple. El término abarca ácidos nucleicos que contienen análogos de nucleótidos conocidos o residuos del esqueleto o enlaces modificados, los cuales son sintéticos, de origen natural, y de origen no natural, los cuales tienen propiedades de unión similares a las del ácido nucleico de referencia, y que se metabolizan de una manera similar a los nucleótidos de referencia. Los ejemplos de tales análogos incluyen, sin limitarse a, fosforotioatos, fosforamidatos, fosfonatos de metilo, fosfonatos de metilo quirales, 2-O-metil ribonucleótidos, péptido-ácidos nucleicos (PNA).

50 A menos que se indique lo contrario, una secuencia de ácido nucleico particular también abarca implícitamente las variantes modificadas de estos (por ejemplo, las sustituciones de codones degenerados) y las secuencias complementarias, así como también la secuencia que se indica explícitamente. Específicamente, las sustituciones de codones degenerados pueden lograrse mediante la generación de secuencias en las cuales la tercera posición de uno o más (o todos) los codones seleccionados se sustituye con residuos con base mezclada y/o desoxiinosina (Batzer y otros, Nucleic Acid Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka y otros, J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985); Rossolini y otros, Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)). El término ácido nucleico se usa indistintamente con gen, ADNc, ARNm, oligonucleótido, y polinucleótido.

60 Los términos "polipéptido," "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en la presente descripción para referirse a un polímero de residuos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Los términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más residuos de aminoácido es un mimético químico artificial de un correspondiente aminoácido de origen natural, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural y polímeros de aminoácidos de origen no natural. El término "proteína" típicamente se refiere a polipéptidos grandes. El término "péptido" típicamente se refiere a polipéptidos cortos. Los polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, por medio del uso de un sintetizador de polipéptidos automático.

El término "variantes modificadas de manera conservadora" se aplica tanto a las secuencias de aminoácidos como de ácidos nucleicos. Con respecto a las secuencias particulares de ácidos nucleicos, las variantes modificadas de manera conservadora se refiere a aquellos ácidos nucleicos que codifican secuencias de aminoácidos idénticas o esencialmente idénticas, o cuando el ácido nucleico no codifica una secuencia de aminoácidos, a secuencias esencialmente idénticas. Debido a la degeneración del código genético, un gran número de ácidos nucleicos funcionalmente idénticos codifican cualquier proteína dada. Por ejemplo, los codones GCA, GCC, GCG y GCU codifican el aminoácido alanina. Por lo tanto, en cada posición donde se especifica una alanina mediante un codón, el codón se puede alterar a cualquiera de los codones correspondientes descritos sin alterar el polipéptido codificado. Tales variaciones de ácidos nucleicos son "variaciones silenciosas", que son una especie de variaciones modificadas de forma conservadora. Cada secuencia de ácido nucleico en la presente descripción que codifica un polipéptido además describe cada posible variación silenciosa del ácido nucleico. Alguien con experiencia reconocerá que cada codón en un ácido nucleico (excepto AUG, que es ordinariamente el único codón para metionina, y TGG, que es ordinariamente el único codón para triptófano) se puede modificar para producir una molécula funcionalmente idéntica. Por consiguiente, cada variación silenciosa de un ácido nucleico que codifica un polipéptido está implícita en cada secuencia descrita.

En cuanto a las secuencias de aminoácidos, alguien con experiencia reconocerá que las sustituciones individuales, supresiones o adiciones a una secuencia de ácido nucleico, péptido, polipéptido, o proteína que altera, añade o suprime un único aminoácido o un pequeño porcentaje de aminoácidos en la secuencia codificada es una "variante modificada de forma conservadora" donde la alteración resulta en la sustitución de un aminoácido con un aminoácido químicamente similar. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares se conocen en la materia. Tales variantes modificadas de manera conservadora son además de y no excluyen las variantes polimórficas, homólogos interespecies, y alelos.

Los siguientes ocho grupos contienen cada uno aminoácidos que son sustituciones conservadoras entre sí:

- 1) Alanina (A), Glicina (G);
- 2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E);
- 3) Asparagina (N), Glutamina (Q);
- 4) Arginina (R), Lisina (K);
- 5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V);
- 6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W);
- 7) Serina (S), Treonina (T); y
- 8) Cisteína (C), Metionina (M) (ver, por ejemplo, Creighton, Proteins (1984)).

El término "recombinante" cuando se usa con referencia, por ejemplo, a una célula, o ácido nucleico, proteína, o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector, se ha modificado por la introducción de un ácido nucleico o proteína heteróloga o la alteración de un ácido nucleico o proteína nativa, o que la célula se deriva a partir de una célula también modificada. De este modo, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma nativa de la célula (no recombinante) o expresan genes nativos que de cualquier otra forma se expresan anormalmente, se expresan por debajo o no se expresan en absoluto.

El término "heterólogo" cuando se usa con referencia a las porciones de un ácido nucleico indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la naturaleza en igual relación entre sí. Por ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce por vía recombinante, con dos o más secuencias a partir de genes no relacionados dispuestos para preparar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor a partir de una fuente y una región de codificación a partir de otra fuente. Del mismo modo, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la naturaleza en igual relación entre sí (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un "promotor" se define como un arreglo de secuencias controles de ácidos nucleicos que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Como se usa en la presente descripción, un promotor incluye las secuencias de ácidos nucleicos necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tal como, en el caso de un promotor de polimerasa tipo II, un elemento TATA. Un promotor además incluye opcionalmente los elementos potenciadores o represores distales, que se pueden localizar hasta diversos miles de pares de bases a partir del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que se activa bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que se activa bajo la regulación ambiental o de desarrollo. El término "enlazado operativamente" se refiere a un enlace funcional entre una secuencia de ácido nucleico control para la expresión (tales como, un promotor, o un arreglo de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, donde la secuencia control para la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente con la segunda secuencia.

Un "vector de expresión" es un constructo de ácido nucleico, generado por vía recombinante o sintética, con un número de elementos específicos de ácido nucleico que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus, o un fragmento de ácido nucleico.

Típicamente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se transcribe enlazado operativamente a un promotor.

5 Los términos "idéntico" o por ciento de "identidad" en el contexto de dos o más secuencias de ácidos nucleicos o de polipéptidos, se refieren a dos o más secuencias o subsecuencias que son iguales o tienen un porcentaje especificado de residuos de aminoácidos o nucleótidos que son iguales, cuando se comparan y alinean para una correspondencia máxima, en una ventana de comparación, región designada medida mediante el uso de uno de los siguientes algoritmos de comparación de secuencias o mediante alineamiento manual e inspección visual. "Identidad sustancial" se refiere a secuencias con al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, o 99 % de identidad sobre una  
10 secuencia especificada. La identidad generalmente existe en una región que es al menos aproximadamente de 50-100 aminoácidos o nucleótidos de longitud.

15 El término "endógeno" se refiere a un polipéptido o polinucleótido u otro compuesto que se expresa de forma natural en el organismo huésped, o se origina dentro de una célula, tejido u organismo. "Exógeno" se refiere a un polipéptido, polinucleótido u otro compuesto que se origina fuera de una célula, tejido u organismo.

El término "agente" o "compuesto" describe cualquier molécula, por ejemplo, proteína o farmacéutico, con la capacidad de afectar la coagulación sanguínea o a otro parámetro biológico en el modelo animal de la invención.

20 El término "NOAEL" o "nivel de efecto adverso no observado" indica el nivel de exposición de un organismo, encontrado por el experimento o la observación, en el que no existe un aumento significativa biológica o estadísticamente (por ejemplo alteración de la morfología, capacidad funcional, crecimiento, desarrollo o duración de la vida) en la frecuencia o gravedad de cualquier efecto adverso en la población expuesta en comparación con su control apropiado. En toxicología, NOAEL es específicamente la dosis o concentración de prueba más alta de una  
25 sustancia (es decir, un químico) o agente (por ejemplo, radiación), a la cual no se produce tal efecto adverso en los organismos de prueba expuestos donde dosis o concentraciones más altas resultaron en un efecto adverso. Este nivel puede usarse en el proceso de establecer una relación dosis-respuesta, una etapa fundamental en la mayoría de las metodologías de evaluación de riesgos.

30 Como se usa en la presente descripción, la TTP o enfermedad de Moschcowitz, se refiere a la anemia hemolítica microangiopática y los síntomas asociados. Los síntomas de la TTP incluyen: síntomas neurológicos (cambios conductuales, estado mental alterado, accidente cerebrovascular, dolores de cabeza); insuficiencia renal; fiebre; trombocitopenia (conteo plaquetario bajo); moretones; púrpura; anemia; e ictericia. La TTP se caracteriza por niveles anormalmente altos de agregación plaquetaria y coagulación sanguínea, que resulta en la cizalladura de los glóbulos  
35 rojos. Los síntomas adicionales se describen en la presente descripción.

La TTP es causada generalmente por una deficiencia en ADAMTS13. El síndrome puede dividirse ampliamente en dos categorías, adquirido y familiar. En la primera, los síntomas de la TTP resultan debido a autoanticuerpos dirigidos contra ADAMTS13. La TTP familiar es causada generalmente por una mutación (por ejemplo, sin sentido, desplazamiento del marco de lectura, o sin sentido invertida) en el gen de ADAMTS13 (ver, por ejemplo, Desch y otros, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:1901-08, 2007).

40 Como se usa en la presente descripción, "efectos histopatológicos" generalmente incluyen los efectos observados en la estructura del tejido, micro o macroscópicamente. Los efectos histopatológicos de la TTP incluyen microtrombosis (especialmente en el corazón y otros órganos), necrosis del miocardio, degeneración del miocardio, y perivasculitis coronaria aumentada. Los efectos histopatológicos adicionales de la TTP se describen en la sección de Ejemplos.

50 Del mismo modo, el término "patología" se refiere a una condición fisiológica anómala. Como se usa en la presente descripción, la patología puede ser clínica, histológica, o conductual, y esta se refiere a una desviación de un estado normal asumido. Si la patología es una "patología clínica," se refleja en una anomalía en un fluido corporal, tal como, pero sin limitar a, sangre y orina. La patología clínica puede observarse mediante el uso de química, microbiología, hematología o patología molecular. Si la patología es una "patología histológica," puede observarse mediante el uso de la examinación general, microscópica, o molecular de órganos, tejidos, o cuerpos completos (autopsia o  
55 necropsia), que incluye medir las diferencias en la masa corporal. Si la patología es una "patología conductual," puede observarse mediante el monitoreo de los cambios en la apariencia y conducta del animal.

60 El factor von Willebrand, o VWF, es una glicoproteína grande, multimérica que se une al Factor VIII (FVIII) para ayudar en la coagulación sanguínea. La trombina libera FVIII a partir del VWF, que conduce a la degradación rápida de FVIII. Bajo condiciones normales, el monómero del VWF se ensambla en multímeros en el retículo endoplásmico y el Golgi antes de la secreción. Los multímeros del VWF pueden ser extremadamente grandes, >20 000 kD, y consisten en más de 80 subunidades de monómeros, cada una de 250 kD. ADAMTS13 (Una similar a desintegrina y metaloproteasa con trombospondina de tipo 1, motivo 13) escinde el VWF entre Y1605 y M1606, que conduce a su degradación por otras proteasas.

65

El VWF humano recombinante, o "rVWF," como se usa en la presente descripción, se refiere al VWF recombinante que forma multímeros de alto peso molecular. A diferencia del VWF derivado del plasma, el rVWF no se ha expuesto a ADAMTS13 endógena y por tanto no se ha escindido en Y1605-M1606. A menos que se indique de otra manera el "rVWF" se refiere a la secuencia humana y a sus variantes sustancialmente idénticas.

5 El "Factor VIII" (FVIII) se refiere al factor de la coagulación sanguínea que se asocia con el VWF en circulación. Esta asociación evita la degradación del FVIII. Después de la activación por trombina, el FVIII se disocia y entra a la cascada de coagulación.

10 "ADAMTS13" (Una similar a desintegrina y metaloproteasa con trombospondina de tipo 1, motivo núm. 13) se refiere a una metaloproteasa que escinde el VWF en la sangre, y disminuye su actividad (por ejemplo, como una unión adhesiva entre las plaquetas y el, subendotelio). Para una revisión del papel de ADAMTS13 en la TTP, ver Levy y otros, Blood 106:11-17, 2005.

15 Un "control", como se usa en la presente descripción, puede referirse a un control activo, positivo, negativo o vehículo. Como se entenderá por aquellos con experiencia en la materia, los controles se usan para establecer la relevancia de los resultados experimentales, y proporcionar una comparación de la afección que se estudia. Por ejemplo, un control negativo generalmente se refiere a una muestra que representa un estado sin tratar, o "normal". Los controles negativos pueden también incluir muestras tratadas con, por ejemplo, componentes inactivos. Un conjunto no limitante de controles ilustrativos se muestra en los Ejemplos.

20 Como se usa en la presente descripción, un modelo "agudo" de la TTP o una respuesta "aguda", indica que el mamífero experimenta síntomas graves de la TTP, que incluye daño de órganos. En algunos casos, el mamífero es incapaz de recuperarse completamente. Tales modelos agudos pueden ser indicativos de las condiciones observadas en pacientes humanos con TTP grave, por ejemplo, aquellos con defectos genéticos en ADAMTS13. Un modelo agudo de la TTP puede generarse mediante la administración de una dosis alta del rVWF, por ejemplo, en un bolo único.

30 Como se usa en la presente descripción, un modelo "crónico" de la TTP o una respuesta "crónica", indica que el mamífero experimenta a largo plazo, síntomas menos graves de la TTP. Tales modelos crónicos pueden ser indicativos de la condición hallada en algunos pacientes humanos de la TTP que experimentan síntomas menos severos, tales como aquellos sin deficiencia severa en ADAMTS13. Un modelo crónico de la TTP puede generarse mediante la administración de dosis menores del rVWF, por ejemplo, en administraciones múltiples en un período de tiempo.

35 El término "reduce la gravedad", cuando se refiere a un síntoma de la TTP, significa que el síntoma ha retrasado la aparición, reducido la gravedad, o causa menos daño al animal. Generalmente, la gravedad de un síntoma se compara con un control, por ejemplo, que no recibe una composición activa profiláctica o terapéutica. En ese caso, una composición se puede decir que reduce la gravedad de un síntoma de la TTP si el síntoma se reduce en 10 %, 40 25 %, 30 %, 50 %, 80 %, o 100 % (es decir, prácticamente eliminado), en comparación con el nivel control del síntoma.

#### Factores de Coagulación Sanguínea y Enzimas de la Sangre

45 Como se mencionó anteriormente, los métodos proporcionados incluyen opcionalmente el uso del Factor VIII. El Factor VIII (FVIII) es una glicoproteína del plasma sanguíneo de aproximadamente 260 kDa de masa molecular producida en el hígado de los mamíferos. Es un componente crítico de la cascada de reacciones de coagulación que conducen a la coagulación sanguínea. Dentro de esta cascada es una etapa en la que el Factor IXa, en conjunto con el FVIII, convierte el Factor X a una forma activada, el Factor Xa. El FVIII actúa como un cofactor en esta etapa, que se requiere con iones calcio y fosfolípidos para la actividad del Factor IXa. Los dos trastornos hemofílicos más comunes son causados por una deficiencia del FVIII funcional (Hemofilia A, aproximadamente 80 % de todos los casos) o del Factor IXa funcional (Hemofilia B o enfermedad del factor de Navidad).

55 Hasta hace poco, el tratamiento estándar de Hemofilia A involucró la infusión frecuente de preparaciones de concentrados del FVIII derivados de los plasmas de donantes humanos. Mientras que esta terapia de reemplazamiento es generalmente efectiva, tal tratamiento pone los pacientes en riesgo de enfermedades transmitidas por virus tales como hepatitis y SIDA. Aunque este riesgo se ha reducido mediante purificación adicional del FVIII del plasma por inmunopurificación mediante el uso de anticuerpos monoclonales, y por la inactivación de virus mediante tratamiento con un solvente orgánico o con calor, tales preparaciones han aumentado grandemente el costo del tratamiento y no están exentas de riesgo. Por estas razones, los pacientes se han tratado episódicamente, en lugar de profilácticamente. Una complicación adicional es que aproximadamente el 15 % de los pacientes desarrollan anticuerpos inhibidores para el FVIII derivado del plasma.

65 Un avance importante en el tratamiento de la Hemofilia A es el aislamiento de clones de ADNc que codifican la secuencia completa de 2351 aminoácidos del FVIII humano (ver, Wood y otros, Nature, 312: 330 (1984) y la patente de Estados Unidos núm. 4,757,006, 12 de julio, 1988) y la provisión de la secuencia de ADN del gen FVIII humano y

métodos recombinantes para su producción. Sin embargo, los pacientes que reciben el FVIII recombinante pueden aún desarrollar anticuerpos específicos contra el FVIII que interfieren con el tratamiento de la enfermedad. Los productos del Factor VIII para el tratamiento de la Hemofilia A incluyen, pero no se limitan a: ADVATE® (Factor Antihemofílico (Recombinante), Método libre de Plasma/Albumina, rAHF-PFM, Baxter), Factor Antihemofílico recombinante (BIOCLATE™, GENARC®, HELIXATE FS®, KOATE®, KOGENATE FS®, RECOMBIMATE®): MONOCLATE-P®, preparación purificada del Factor VIII:C, Factor Antihemofílico/Complejo del factor von Willebrand (Humano) HUMATE-P® y ALPHANATE®, Factor Antihemofílico/Complejo del factor von Willebrand (Humano); y HYATE C®, Factor VIII de cerdo purificado.

Por consiguiente, los métodos proporcionados incluyen el uso de HAEMATE® P (ZLB Behring GmbH, Marburg, Alemania) como un control positivo. HAEMATE® P como se usa en los ejemplos prácticos de la invención contiene los ingredientes activos VWF y FVIII (114.34 IU del VWF:RCo/mL, 77 IU del FVIII/mL) y se produce mediante extracciones de plasma sanguíneo de donantes de sangre seleccionados. Sin embargo, otras formas y concentraciones de HAEMATE® P se contemplan también para su uso en los métodos.

Los métodos proporcionados también incluyen, en varios aspectos, el uso del VWF. El VWF es una glicoproteína compleja adhesiva con una masa molecular del monómero de aproximadamente 260 kDa. El VWF circula en el plasma humano como un dímero y como oligómeros que varían en masa molecular de 450 kDa a 20 000 kDa. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, se sintetiza en las células endoteliales y en los megacariocitos, y consiste en un péptido señal de 22 residuos de aminoácidos, un propéptido de 741 residuos y un polipéptido de 2050 residuos. Después de la eliminación *in vivo* del péptido señal, dos unidades pro-VWF se unen a través de puentes disulfuros formando dímeros, los componentes básicos para los multímeros maduros del VWF. Otros polímeros del VWF con pesos moleculares crecientes, hasta 20 millones de Dalton, se forman a partir de los dímeros del VWF mediante enlace. Se presume que particularmente los multímeros del VWF de alto peso molecular tienen una importancia esencial en la coagulación sanguínea.

El síndrome del VWF se manifiesta clínicamente cuando hay una subproducción o una sobreproducción del VWF. La sobreproducción del VWF causa trombosis aumentada (formación de un coágulo o trombo dentro de un vaso sanguíneo, que obstruye el flujo de la sangre) mientras que niveles reducidos de, o falta de, formas de alto peso molecular del VWF provoca un aumento en el sangrado y un aumento del tiempo de sangrado debido a la inhibición de la agregación plaquetaria y cierre de herida.

Una deficiencia en el VWF puede también provocar una Hemofilia A fenotípica debido a que el VWF es un componente esencial del FVIII funcional. En estos casos, el tiempo de vida media del Factor VIII se reduce de tal manera que su función en la cascada de la coagulación sanguínea se afecta. Los pacientes que padecen de la enfermedad de von Willebrand (VWD) o síndrome VWF frecuentemente presentan una deficiencia en el FVIII. En estos pacientes, la actividad reducida del FVIII no es la consecuencia de un defecto del gen cromosómico X, sino una consecuencia indirecta del cambio cuantitativo y cualitativo del VWF en el plasma. La diferenciación entre la Hemofilia A y VWD puede efectuarse normalmente mediante la medición del antígeno VWF o mediante la determinación de la actividad del cofactor de ristocetina. La actividad del cofactor de ristocetina se mide mediante la adición de ristocetina y un sustrato de plaquetas al plasma del paciente. La ristocetina potencia la unión del VWF al receptor de la glicoproteína plaquetaria Ib, lo que resulta en la aglutinación. El VWF del paciente mantendrá la aglutinación plaquetaria inducida por la ristocetina medida por un cambio en la transmisión de la luz. Por lo tanto, esto es una medición *in vitro* de la actividad funcional del VWF del paciente, y es el ensayo más sensible para el diagnóstico de la VWD. Tanto el contenido del antígeno VWF como la actividad del cofactor de ristocetina están disminuidos en la mayoría de los pacientes con VWD, mientras que son normales en los pacientes con Hemofilia A. Los productos del VWF para el tratamiento del síndrome VWF incluyen, pero no se limitan a: HUMATE-P®; y, IMMUNATE®, INNOBRAND®, y 8Y®, cuyas terapias comprenden concentrado de FVIII/VWF del plasma.

El rVWF humano es resistente a la actividad proteolítica de ADAMTS13 murina presente en el plasma murino. Esta observación se ha demostrado *in vitro* al exponer el rVWF humano a plasmas de varias especies, incluidos los ratones, y e incluso al medir la actividad residual del VWF o visualizar la composición multimérica. La resistencia del VWF humano a ADAMTS13 murina también se demostró *ex vivo* después de la infusión del rVWF en ratones. Las muestras de plasma obtenidas en varios puntos de tiempo después de la infusión no mostraron fragmentos del VWF derivados de la acción de ADAMTS13 después de la escisión en la Tyr<sup>1605</sup>-MET<sup>1606</sup> (el C-terminal de 176 kDa y el N-terminal de 140 kDa), consistente con la resistencia del rVWF a ADAMTS13 murina *in vivo*. En contraste, la administración del rVWF a un conejo resultó en el patrón de escisión esperado de la subunidad del VWF con la aparición de los fragmentos en las inmutransferencias que usaron anticuerpos monoclonales.

El VWF recombinante consiste en subunidades intactas del VWF debido a que el rVWF nunca se ha expuesto a la proteólisis específica de ADAMTS13. El VWF derivado del plasma consiste en subunidades que se escinden en la Tyr<sup>1605</sup>-MET<sup>1606</sup> del dominio A2 del VWF. Los ratones C57BL/6J normales tienen ADAMTS13 murina que es incapaz de escindir el rVWF humano con las subunidades intactas. Por tanto, la administración del rVWF a ratones C57BU6J resulta en multímeros del VWF ultragrandes y metabolismo afectado del rVWF.

65

ADAMTS13 (una desintegrina y metaloproteinasa con un motivo trombospondina tipo 1, miembro 13) también conocido como proteasa de escisión del VWF (VWF-CP) es una enzima metaloproteasa que contiene zinc que escinde el VWF. ADAMTS13 se secreta en la sangre y se degrada los multímeros del VWF grandes, lo que disminuye su actividad. ADAMTS13 es una metaloproteasa que consiste en múltiples dominios estructurales y funcionales, y estos dominios pueden participar en el reconocimiento y la unión de ADAMTS13 al VWF. Los multímeros de ULVWF se escinden por ADAMTS13 una vez que se secretan de las células endoteliales.

Se ha encontrado que los pacientes con TTP congénita o TTP adquirida son severamente deficientes en ADAMTS13. La deficiencia congénita de ADAMTS13 es causada por mutaciones del gen de ADAMTS13. Los pacientes con la forma familiar tienen deficiencia severa en la proteasa. La mutación en el gen de ADAMTS13 en TTP familiar provoca inactividad o actividad disminuida de la ADAMTS13. La deficiencia adquirida ocurre con la producción de autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS13. La TTP adquirida es una complicación secundaria idiopática de enfermedad autoinmune, malignidad, trasplante de células madre, embarazo (especialmente en el tercer trimestre), ciertos fármacos (como ticlopidina, mitomicina, clopidogrel y ciclosporina) o infección

Púrpura Trombocitopénica Trombótica (TTP) y Otros Trastornos de Coagulación Sanguínea

EL modelo de ratón de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

La descripción también proporciona modelos animales y métodos para probar la capacidad de un agente para reducir los trastornos de coagulación sanguínea (trombofilia) que incluyen, pero no se limitan a, la púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y otras microangiopatías trombóticas. TTP es un trastorno multisistémico con peligro para la vida que fue el primero descubierto por Moschcowitz en 1924 cuando observó que una muchacha de 16 años tenía anemia, petequia, y hematuria microscópica. La muchacha murió de fallo multiorgánico, y, en la autopsia, prevalecieron los trombos microvasculares diseminados. Estos trombos siguen siendo distintivos en el diagnóstico patológico.

El síndrome TTP se caracteriza por hemólisis microangiopática y agregación plaquetaria/trombos hialinos cuya formación no se relaciona con la actividad del sistema de coagulación. Predominan los microtrombos plaquetarios; se forman en la microcirculación (es decir, arteriolas, capilares) a través del cuerpo lo que causa la oclusión parcial de los vasos. Se produce isquemia de órganos, trombocitopenia, y fragmentación de eritrocitos (es decir, esquistocitos). Los trombos ocluyen parcialmente la luz vascular con células endoteliales proliferativas que lo recubren. El endotelio de los riñones, cerebro, corazón, páncreas, vaso, y de las glándulas adrenales son particularmente vulnerables a TTP. El hígado, los pulmones, el tracto gastrointestinal, la vesícula biliar, los músculos esqueléticos, la retina, la glándula pituitaria, los ovarios, el útero, y los testículos también se afectan a un grado menor. No ocurren cambios inflamatorios.

En 1982, Moake y sus colegas observaron que los multímeros ultragrande del factor von Willebrand (ULVWF) en el plasma de cuatro pacientes con TTP recurrente (Moake, Semin. Hematol. 34:83-89, 1997; Moake, Semin. Hematol. 41:4-14, 2004). Estos multímeros fueron del mismo tamaño que los observados en las células endoteliales. El plasma de individuos normales tiene VWF mucho más pequeños. Moake sugirió que existía una deficiencia en una enzima que reduce el VWF grande a su tamaño normal en el plasma en pacientes con TTP. También se observó que este VWF grande tiene una capacidad mayor para adherirse con las plaquetas que median la formación de un trombo.

Las células endoteliales agitadas son la principal fuente de multímeros ULVWF en el torrente sanguíneo donde se unen a receptores plaquetarios de superficie específicos. Los multímeros ULVWF se entrelazaron con las plaquetas que se adhieren al subendotelio. La patogénesis de la TTP se debe a la acumulación de plaquetas en la microvasculatura. Existe una adherencia aumentada del ULVWF y la falta de una enzima proteolítica que funcione para normalizar este multímero. El estrés por cizallamiento del fluido y el trombo plaquetario en la microcirculación no potencia la proteólisis del ULVWF. Aún no se conoce cómo la unión adhesiva se opone al estrés por cizallamiento en el microangiopático que causa la formación de trombos que inicia las plaquetas y contribuye a la actividad de las plaquetas.

El intercambio de plasma ha sido la primera línea terapia para la TTP desde 1991. La deficiencia congénita puede reemplazar la deficiencia y las mutaciones en el gen de ADAMTS13 por la infusión de plasma. La deficiencia adquirida puede eliminar el inhibidor de ADAMTS13 por plasmáferesis. Sin embargo, el intercambio de plasma es un tratamiento más efectivo que la infusión de plasma.

Los multímeros de ADAMTS13 son abundantes y el fibrinógeno/fibrina es mínimo en la TTP, mientras que el fibrinógeno es abundante en la coagulación intravascular diseminada (DIC). El ULVWF, que es, el multímero ADAMTS13, es un marcador encontrado en el plasma de pacientes con mayor probabilidad de tener una recurrencia de la TTP.

Esta afección con peligro para la vida puede tener un desenlace positivo si se reconoce temprano y la intervención médica se inicia temprano. Por lo tanto, la presente invención proporciona modelos de ratón para usarse en el desarrollo de nuevas terapias en el tratamiento de la TTP.

#### 5 Diseño de un Modelo Murino para la TTP

El VWF recombinante consiste en subunidades intactas del VWF debido a que nunca se ha expuesto a proteólisis por ADAMTS13 endógena circulante. El VWF derivado del plasma consiste en subunidades que se escinden por ADAMTS13 en la Tyr<sup>1605</sup>-MET<sup>1606</sup> en el dominio A2 del VWF. Por tanto, las preparaciones del VWF derivado del plasma, tales como HAEMATE® P, proporcionan un control útil para la presente invención.

Los multímeros de peso molecular ultragrande son fisiológicos en los humanos bajo circunstancias especiales, por ejemplo, bajo la estimulación de las células endoteliales con DDAVP (DDAVP es un tratamiento para hemofilia A leve y la enfermedad de von Willebrand). Bajo la estimulación de las células endoteliales, el VWF almacenado se libera a la circulación desde los cuerpos de Weibel-Palade en la forma del VWF ultragrandes. Estos multímeros del VWF ultragrandes desaparecen en 2 horas, acompañado por la proteólisis aumentada del VWF por ADAMTS13 humana. Las concentraciones plasmáticas del VWF después de la administración de DDAVP regresan a la línea basal en aproximadamente 24 horas.

ADAMTS13 murina no escinde suficientemente el rVWF humano para disminuir los multímeros de peso molecular ultragrande del rVWF, puesto que el factor humano es resistente a ADAMTS13 murina. Además, los ratones normales tienen multímeros de peso molecular ultragrande del VWF en circulación debido a que ADAMTS13 murina tiene una actividad disminuida incluso para el VWF murino endógeno.

En ratones deficientes en ADAMTS13, el VWF murino endógeno consiste en multímeros de peso molecular ultragrande debido a la ausencia de ADAMTS13. La administración del rVWF humano, directamente o a través de la expresión de un transgén, por tanto resulta en niveles circulante suprafisiológicos del VWF y un aumento sustancial en los multímeros del VWF ultragrandes.

#### 30 Expresión de Proteínas Recombinantes

El VWF recombinante para usarse de acuerdo con la invención incluye las formas humanas del VWF y sus variantes polimórficas y alélicas, por ejemplo, polipéptidos con identidad sustancial a la secuencia con el número de acceso de Genpept P04275.1. De manera similar, el Factor VIII recombinante incluye formas humanas del factor de la coagulación, que incluye varias isoformas, alelos, y variantes polimórficas. Generalmente, el Factor VIII tendrá una secuencia sustancialmente idéntica a la con el número de acceso de Genpept P00451.1. El FVIII humano está también disponible comercialmente. ADAMTS13 recombinante incluye formas humanas de la proteasa y sus variantes polimórficas y alélicas, por ejemplo, polipéptidos con identidad sustancial a la secuencia con el número de acceso de Genpept Q3SYG5.

Las técnicas recombinantes que pueden usarse para expresar y obtener los polipéptidos y complejos del rVWF, rFVIII, o rADAMTS13 son rutinarias en el campo. Los textos básicos que describen los métodos generales de uso en esta invención incluyen Sambrook y otros, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (2da edición 1989); Kriegler, *Gene Transfer and Expression: A Laboratory Manual* (1990); y *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel y otros, eds., 1994)).

En general, la secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína de interés (por ejemplo, VWF, FVIII, y ADAMTS13) se clona a partir de ADNc o de una biblioteca genómica de ADN, o se aísla mediante el uso de técnicas de amplificación con cebadores de oligonucleótidos. Por ejemplo, la secuencia codificante puede aislarse de una biblioteca de ácido nucleico humano (genómico o ADNc) mediante hibridación con una sonda de ácido nucleico. Las técnicas de amplificación mediante el uso de cebadores pueden usarse para amplificar y aislar una secuencia de polinucleótidos que codifica la proteína de interés a partir de ADNc o ARN (ver, por ejemplo, Dieffenbach & Dveksler, *PCR Primer: A Laboratory Manual* (1995)).

Un experto apreciará que cualquier secuencia particular de polipéptidos puede incluir variaciones polimórficas o alélicas que no afectarán la actividad del polipéptido o su uso.

Para obtener alto nivel de expresión de la proteína de interés (por ejemplo, VWF, FVIII, ADAMTS13), uno típicamente subclona una secuencia que codifica el factor en un vector de expresión que contiene un promotor fuerte para dirigir la transcripción. Tales técnicas se conocen bien en la técnica, y se describen generalmente, por ejemplo, en Ausubel y otros, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 suplementario); y Sambrook y otros, *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2da Edición, (1989).

La proteína puede expresarse en cualquier tipo de célula. Los promotores bacterianos adecuados se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros y Ausubel y otros. Los sistemas de expresión bacterianos para expresar proteínas están disponibles en, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.*, y *Salmonella* (Palva y

otros, Gene 22:229-235,1983); Mosbach y otros, Nature 302:543-545,1983). Los kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente.

5 Otros microbios, tales como levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*), puede usarse también para la expresión. Las levaduras tienen una gran cantidad de vectores adecuados con secuencias de control de la expresión, tales como promotores, que incluyen 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glucolíticas, y un origen de replicación, secuencias de terminación y similares, como se desee.

10 El cultivo de células de mamíferos puede usarse también para expresar y producir polipéptidos recombinantes (ver Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, Nueva York (1987)). Las células de mamíferos incluyen células HEK-293, HUVECs, EA.hy926, células CMK, las líneas celulares CHO, varias líneas celulares COS, células HeLa, líneas celulares de mieloma, etc. Los vectores de expresión para estas células pueden incluir secuencias de control de la expresión, tales como un origen de replicación, un promotor, un potenciador (Queen y otros, Immunol. Rev. 89:49-68,1986), y sitios de procesamiento de la información necesarios, tales como sitios de unión a ribosomas, sitios de corte y empalme de ARN, sitios de poliadenilación y secuencias terminadoras de la transcripción. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores derivados de SV40, adenovirus, virus del papiloma bovino, citomegalovirus y similares. Un marcador de selección, tal como un casete de expresión neo, puede también incluirse en el vector de expresión.

20 La proteína de interés (por ejemplo, VWF, FVIII, o ADAMTS13) puede después aislarse de otras proteínas y sustancias contaminantes mediante el uso de métodos comunes. Las técnicas de purificación de proteínas incluyen, por ejemplo, los métodos que usan la solubilidad (tales como la precipitación salina y la precipitación por solvente), los métodos que usan la diferencia en peso molecular (tales como diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, y electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS), los métodos que usan una diferencia en la carga eléctrica (tales como cromatografía en columna de intercambio iónico), los métodos que usan la interacción específica (tales como cromatografía de afinidad), los métodos que usan una diferencia en hidrofobicidad (tales como cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa) y los métodos que usan una diferencia en el punto isoeléctrico (tal como electroforesis de isoelectroenfoque). Los recursos de referencia incluyen: Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer Press, 3ra edición (1994) y Abelson y otros, Methods in Enzymology, Volumen 182: Guide to Protein Purification, Academic Press (1990).

#### Administración de las composiciones del rVWF

35 Las composiciones del rVWF usadas en la invención son para administrarse de manera intravenosa.

La composición se inyecta generalmente de manera intravenosa, por ejemplo, a través de la vena de la cola, como es común en la técnica. Para la inyección, la composición se formula en tampones o soluciones estériles, fisiológicamente compatibles, tales como solución salina, solución de Hank, o solución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes del uso. Las formas liofilizadas pueden también producirse.

40 Para la administración transmucosal de acuerdo con la presente descripción, se usan en la formulación penetrantes adecuados para la barrera que se permea. Tales penetrantes se conocen generalmente en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosal, sales biliares y derivados de ácido fusídico. Además, pueden usarse detergentes para facilitar la permeación. La administración transmucosal puede ser a través de pulverización, bomba, atomizador, o nebulizador.

#### Expresión Transgénica del rVWF en Animales

50 La presente descripción proporciona un animal no humano que expresa el VWF recombinante como un modelo para la TTP. El animal transgénico puede usarse para desarrollar un agente activo biológicamente efectivo para prevenir o reducir los síntomas de la TTP. En un aspecto, el animal transgénico en cuestión porta una secuencia de nucleótidos que codifica el VWF integrada de manera estable en el genoma del animal, en donde el VWF forma multímeros de alto peso molecular. Típicamente, el transgén del VWF es de una fuente exógena, es decir, de un animal diferente del que expresa el transgén. El VWF puede ser VWF humano recombinante.

60 Un "animal transgénico" se refiere a cualquier animal no humano (por ejemplo ratón, rata, otro roedor, cerdo, o primate) en el que una o más células contienen un ácido nucleico heterólogo introducido mediante el uso de técnicas transgénicas comunes. El ácido nucleico se introduce en la célula, directa o indirectamente, mediante la introducción en un precursor de la célula, por medio de la manipulación genética deliberada, tal como por microinyección, o por infección con un virus recombinante. El término manipulación genética no incluye el cruce clásico, o fertilización in vitro, sino que se dirige a la introducción de una molécula de ADN recombinante. Esta molécula puede integrarse dentro de un cromosoma, o el ADN puede replicarse de manera extracromosómica.

65 La presente descripción contempla animales transgénicos que portan el transgén deseado en todas sus células, así como también animales que portan los transgenes en algunas, pero no en todas sus células, es decir, animales

5 mosaicos. El transgén puede integrarse como una copia única o en concatámeros, por ejemplo, tándems de cabeza a cabeza o tándem de cabeza a cola. El transgén puede también introducirse selectivamente o activarse selectivamente en un tipo de tejido o célula particular (por ejemplo, células endoteliales, megacariocitos, células subendoteliales). Las secuencias reguladoras requeridas para tal activación específica del tipo celular serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

10 El transgén puede integrarse en el sitio cromosómico de la contraparte endógena mediante el uso de direccionamiento génico. Brevemente, cuando tal una técnica se va a utilizar, los vectores que contienen algunas secuencias de nucleótidos homólogas a la contraparte endógena se diseñan para el propósito de la integración, a través de la recombinación homóloga con secuencias cromosómicas, y alterar la función de la secuencia de nucleótidos del gen endógeno.

15 Los avances en las tecnologías de micromanipulación de embriones permiten actualmente también la introducción de ADN heterólogo en los óvulos de mamíferos fertilizados. Por ejemplo, las células madres totipotenciales o pluripotenciales pueden transformarse por microinyección, precipitación mediada por fosfato de calcio, fusión de liposomas, infección retroviral u otros medios. Las células transformadas se introducen después en el embrión, y el embrión se desarrollará después en un animal transgénico.

20 Los embriones en desarrollo pueden infectarse con un vector viral que contiene el transgén del VWF, de modo que los animales transgénicos que expresan el transgén pueden producirse a partir del embrión infectado. El transgén del VWF puede también inyectarse en el pronúcleo o citoplasma del embrión, preferentemente en la etapa de célula única, y el embrión se desarrolla hasta un animal transgénico maduro. Estos y otras variantes de métodos para generar animales transgénicos están bien establecidos en la técnica (ver, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Núms. 5,175,385 y 5,175,384).

25 Los animales transgénicos incluyen "knockouts" y "knockins". Un "knockout" tiene una alteración en el gen diana a través de la introducción de secuencias transgénicas que resulta en una disminución de la función del gen diana, típicamente de manera que la expresión del gen diana es insignificante o indetectable. Un "knockin" es un animal transgénico que tiene una alteración en un genoma de la célula huésped que resulta en una expresión aumentada de un gen diana, por ejemplo, por la introducción de una copia adicional del gen diana, o por la inserción de manera operativa de una secuencia reguladora que proporciona la expresión potenciada de una copia endógena del gen diana. Los animales transgénicos knockin o knockout pueden ser heterocigóticos o homocigóticos con respecto a los genes dianas. Los knockouts y los knockins pueden ser "bigénicos," es decir, que tienen al menos dos genes alterados. Por ejemplo, un animal bigénico puede incluir un knockin del rVWF y un knockout de ADAMTS13.

35 Los ratones transgénicos pueden derivarse mediante el uso de la metodología conocida por aquellos con experiencia en la técnica, ver, por ejemplo, Hogan y otros, *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*, 1988; *Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach*, Robertson, ed., 1987; y Capecchi y otros, *Science* 244:1288, 1989.

40 **Animales de la invención**

El modelo de ratón de la invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

45 La invención incluye los modelos de ratones de la TTP que se establecen mediante la administración del VWF recombinante, como se define en las reivindicaciones adjuntas. Los ratones se usan, puesto que los roedores son baratos, se reproducen rápidamente y pueden alojarse en grandes cantidades en una instalación bastante pequeña. De acuerdo con la descripción, también pueden usarse otros roedores, tales como ratas, hámsteres, jerbos, cobayas y similares. Los experimentos pueden realizarse con un gran número de réplicas.

50 Los ratones que se usan de acuerdo con la invención incluyen cepas de laboratorio comunes, tales como cepas C57BL/6J, Balb-c, y FVB. Tales ratones están fácilmente disponibles por Jackson Labs, Bar Harbor, ME.

55 De acuerdo con la descripción pueden usarse los ratones inmunodeficientes y otros roedores. Estos ratones o roedores carecen de un sistema inmunitario funcional, e incluyen, por ejemplo, knockouts de SCID, RAG 1 o 2, y ratones desnudos. Tales ratones o roedores pueden ser útiles, por ejemplo, para descartar los efectos inflamatorios o inmunitarios de introducir una sustancia exógena en el ratón o roedor. Otra vez, tales ratones están fácilmente disponibles de fuentes comerciales.

60 Además, pueden usarse ratones humanizados. Los ratones humanizados portan genes, células, tejidos, y/o órganos humanos funcionales que se trasplantan inicialmente y crecen en el animal. Los roedores humanizados, tales como ratones, se generan a menudo para tener un sistema inmunitario que es esencialmente humano. Tales ratones son útiles, por ejemplo, para determinar las respuestas humanas a sustancias terapéuticas. Por ejemplo, en la médula ósea/hígado/timo, o ratón "BLT", ratones diabéticos no obesos (NOD)/SCID (que carecen de células T y B endógenas) se implantan quirúrgicamente con timo e hígado fetal o ganoides, como en el sistema hub de la SCID.  
65 Los ratones se irradian después de manera subletal y se trasplantan con células madres autólogas CD34+ obtenidas de hígado fetal. Estas células después residen en la médula ósea murina. Por lo tanto, los ratones se someten a un

- trasplante de médula ósea, por lo que reciben células madres humanas que son autólogas a sus implantes de timo e hígado humano. Los roedores, tales como ratones, preparados de esta manera muestran un intervalo impresionante de células humanas en la sangre periférica, que incluye linfocitos T y B maduros, monocitos, macrófagos, y células dendríticas. Igualmente importante, muestran infiltración extensiva de órganos y tejidos con células humanas, que incluyen hígado, pulmón, y tracto gastrointestinal. Los roedores humanizados, tales como ratones, se conocen en la técnica, y están disponibles comercialmente (ver, por ejemplo, Gonzales y Cheung (Agosto. 5, 2008) *J. Pharmacol. Exp. Ther.*; Ito y otros (2008) *Current Topics in Microbiology and Immunology*, Springer-Verlag, Berlin y Heidelberg, p. 53-76; Schmidt y otros (2008) *PLoS ONE* 3:e3192).
- 5
- 10 Como se explicó anteriormente, tales roedores pueden alterarse genéticamente para expresar un transgén o alterar un gen endógeno. Por ejemplo, en algunas modalidades de la invención, se usan ratones deficientes en ADAMTS13, u otros ratones, (por ejemplo, ratones knockout ADAMTS13). En algunas modalidades, se usan los ratones que carecen del VWF endógeno (knockouts VWF).
- 15 Los ratones knockout ADAMTS13 se generaron inicialmente mediante el uso del direccionamiento génico (Banno y otros, *Blood* 107:3161-66, 2006; Desch y otros, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 27:1901-08, 2007). Ellos se han caracterizado ampliamente, y están disponibles públicamente (ver, por ejemplo, Miyata y otros, *Curr. Opin. Hematol.* 14:277-83, 2007; Chauhan y otros, *Blood* 111:3452-57, 2008; Chauhan y otros, *J. Exp. Med.* 205:2065-74, 2008). Los ratones deficientes en ADAMTS13 son viables y fértiles, pero son susceptibles a trombosis. Sin embargo, no se observan generalmente la trombocitopenia espontánea, la anemia hemolítica, y la trombosis microvascular. Algunos de estos síntomas pueden inducirse, por ejemplo, mediante la administración de FeCl<sub>3</sub> o la toxina Shiga a los ratones knockout (Chauhan y otros, *Blood* 111 :3452-57, 2008).
- 20
- 25 Los ratones knockout VWF se conocen también en la técnica y están comercialmente disponibles (ver, por ejemplo, Pergolizzi y otros, *Blood* 108:862-69, 2006). Los ratones knockout VWF son viables y fértiles, y no presentan ninguna anomalía física o conductual. Sin embargo, muestran defectos en la hemostasia caracterizada por tiempos de sangrado prolongados y sangrado espontáneo ocasional. Los knockouts también carecen de formación de trombos seguido de daño vascular, y se reducen los niveles de FVIII.
- 30 **Agentes o Compuestos de Prueba**
- Los agentes o compuestos (o "composiciones") para probarse en los modelos de ratones de la invención pueden ser cualquier compuesto químico pequeño, o una macromolécula, tal como una proteína, azúcar, ácido nucleico o lípido. Típicamente, los compuestos de prueba serán pequeñas moléculas químicas y péptidos. Esencialmente, puede usarse cualquier compuesto químico como un compuesto de prueba en este aspecto mediante el uso de la invención, aunque la mayoría de las veces se usan compuestos que pueden disolverse en soluciones acuosas u orgánicas (por ejemplo, basadas en DMSO).
- 35
- 40 Los agentes o compuestos (o "composiciones") de prueba ilustrativos incluyen proteasas que se dirigen a complejos de alto peso molecular del VWF, que incluyen ADAMTS13, variantes de ADAMTS13 que conservan actividad, y homólogos de especies. Tales composiciones de polipéptidos pueden diseñarse mediante el uso de un vector de polinucleótidos que codifica la secuencia de polipéptidos de interés (por ejemplo, en un vector adenoviral). Las composiciones de prueba también incluyen péptidos, fragmentos de anticuerpos, y moléculas pequeñas que interfieren con la agregación del VWF. Las composiciones adicionales incluyen los compuestos que interfieren con la expresión de los polipéptidos y polinucleótidos del VWF (por ejemplo, ARN antisentido, ARNsi, etc.). Otros ejemplos son moléculas pequeñas que pueden usarse para tratar la TTP tales como glucocorticoides, medicación antiplaquetaria (por ejemplo, aspirina, dipiridamol,) azatioprina, ciclofosfamida, prostaciclina, o similares.
- 45
- 50 Con respecto a los oligonucleótidos antisentido, ARNsi o de ribozima, pueden usarse oligonucleótidos de fosforotioato. Las modificaciones del enlace fosfodiéster así como también del heterociclo o la azúcar pueden proporcionar un aumento en la eficiencia. El fosforotioato se usa para modificar el enlace fosfodiéster. Se ha descrito que un enlace N3'-P5' fosforamidato estabiliza los oligonucleótidos a nucleasas y que aumenta la unión al ARN. El enlace del ácido péptidonucleico (PNA) es un reemplazo completo del esqueleto de ribosa y fosfodiéster y es estable a nucleasas, aumenta la afinidad de unión al ARN, y no permite la escisión por la RNAsa H. Su estructura básica es también susceptible a modificaciones que puedan permitir su optimización como un componente antisentido. Con respecto a las modificaciones del heterociclo, ciertas modificaciones del heterociclo han mostrado aumentar los efectos antisentidos sin interferir con la actividad de la RNAsa H. Un ejemplo de tal modificación es la modificación del C-5 con tiazol. Finalmente, puede considerarse también la modificación del azúcar. Las modificaciones de la ribosa con 2'-O-propil y 2'-metoxietoxi estabilizan los oligonucleótidos a nucleasas en el cultivo celular e in vivo.
- 55
- 60 Los ensayos de eficacia, por ejemplo, para la unión de un compuesto de prueba a polipéptidos o polinucleótidos del VWF, pueden diseñarse de manera que las grandes bibliotecas químicas se tamicen con etapas de ensayo automatizadas, típicamente ejecutadas en paralelo (por ejemplo, en formatos de microtitulación en placas de microtitulación en ensayos robóticos). Se apreciará que existen muchos proveedores de compuestos químicos, que incluyen Sigma (St. Louis, MO), Aldrich (St. Louis, MO), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO), Fluka Chemika-Biochemica Analytika (Buchs Suiza) y similares.
- 65

5 Pueden usarse métodos de selección de alto rendimiento que involucran proporcionar una biblioteca combinatoria de productos químicos o péptidos que contiene un gran número de compuestos de prueba. Tales "bibliotecas combinatorias de productos químicos" se seleccionan después en uno o más ensayos para identificar aquellos miembros de la biblioteca (especies o subclases particulares de los productos químicos) que presentan una actividad característica deseada. En este caso, tales compuestos se seleccionan por su capacidad para reducir la expresión o agregación del VWF.

10 Los métodos descritos en la presente descripción usan las composiciones que comprenden agentes de prueba. Para administrar las composiciones que comprenden los agentes de prueba (que incluyen polipéptidos, fragmentos, y análogos o variantes de estos) descritos en la presente descripción a los sujetos de prueba, los agentes de prueba se formulan en una composición que comprende uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. La frase "farmacéuticamente o farmacológicamente aceptables" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen alergias, u otras reacciones adversas, cuando se administran mediante el uso de rutas bien conocidas en la técnica, como se describe más abajo. Los "portadores farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquiera y todos los solventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antimicóticos, agentes isotónicos y que retardan la absorción y similares.

15 Además, los compuestos que son agentes de prueba, en ciertos casos, forman solvatos con el agua o con solvente orgánicos comunes. Tales solvatos también se contempla.

20 Las composiciones se administran, por ejemplo y sin limitación, de manera oral, tópica, transdermal, parenteral, por rociador para inhalación, de manera vaginal, rectal, o por inyección intracranial. El término parenteral como se usa en la presente descripción incluye inyecciones subcutáneas, inyecciones intravenosas, intramusculares, intracisternales, o técnicas de infusión. La administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar, y o implantación quirúrgica en un sitio particular se contempla también. En ciertos aspectos, las composiciones son esencialmente libres de pirógenos, así como también de otras impurezas que pudieran ser dañinas al receptor.

30 La formulación de la composición farmacéutica varía de acuerdo con la ruta de administración seleccionada (por ejemplo, solución, emulsión). Una composición apropiada que comprende la composición para administrarse puede prepararse en un vehículo o portador fisiológicamente aceptable. Para soluciones o emulsiones, los portadores adecuados incluyen, por ejemplo y sin limitación, soluciones acuosas o alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen, por ejemplo y sin limitación, solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, láctica de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen, por ejemplo y sin limitación, varios aditivos, conservantes, o rellenos de fluido, nutriente, o electrolito.

40 Las composiciones, que incluyen las composiciones farmacéuticas, útiles en los métodos descritos en la presente descripción que contienen un agente de prueba como un ingrediente activo contienen en ciertos aspectos, portadores farmacéuticamente aceptables o aditivos en dependencia de la ruta de administración. Los ejemplos de tales portadores o aditivos incluyen sin limitación, agua, un solvente orgánico farmacéuticamente aceptable, colágeno, alcohol polivinílico, polivinilpirrolidona, un polímero de carboxivinilo, carboximetilcelulosa sódica, sodio poliacrílico, alginato de sodio, dextrano soluble en agua, carboximetil almidón sódico, pectina, metil celulosa, etil celulosa, goma de xantano, goma arábica, caseína, gelatina, agar, diglicerina, glicerina, propilenglicol, polietilenglicol, vaselina, parafina, alcohol estearílico, ácido esteárico, albúmina de suero humano (HSA), manitol, sorbitol, lactosa, un tensioactivo farmacéuticamente aceptable y similares. Los aditivos usados se eligen a partir de, pero sin limitarse a, lo anterior o sus combinaciones, como sea adecuado, en dependencia de la forma de dosificación.

50 Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo agua, agua tamponada, 0,4 % de solución salina, 0,3 % de glicina, o suspensiones acuosas contienen, en ciertos aspectos, el componente activo en mezcla con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma de tragacanto y goma acacia; agentes dispersantes o humectantes pueden ser un fosfátido de origen natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenooxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación del óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, monooleato de polietileno sorbitán. Las suspensiones acuosas, pueden contener también uno o más conservantes, por ejemplo etilo, o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

65 En varias modalidades, las composiciones se liofilizan para su almacenamiento y se reconstituyen en un portador adecuado antes de usarse. Estas técnicas han demostrado ser efectivas con inmunoglobulinas convencionales. Se emplea cualquier técnica adecuada de liofilización y reconstitución. Se apreciará por los expertos en la técnica que

la liofilización y la reconstitución pueden conducir a varios grados de pérdida de la actividad del anticuerpo y que los niveles de uso pueden tener que ajustarse para compensar.

5 Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa por la adición de agua proporcionan el compuesto activo en una mezcla con un agente dispersante o humectante, agente de suspensión y uno o más conservantes. Los agentes dispersantes o humectantes y los agentes de suspensión adecuados se ilustran por aquellos ya mencionados anteriormente.

10 La concentración del agente de prueba en estas formulaciones varía ampliamente, por ejemplo de menos de aproximadamente 0,5 %, usualmente a o al menos a aproximadamente 1 % a tanto como 15 o 20 % en peso y se seleccionará primariamente en base al volumen de fluido, la viscosidad, etc., de acuerdo con el modo particular de administración seleccionado. Por lo tanto, por ejemplo, una composición farmacéutica típica para la inyección parenteral se prepara hasta contener 1 ml de agua estéril tamponada, y 50 mg de un agente de prueba. Una composición típica para la infusión intravenosa se prepara hasta contener 250 ml de solución de Ringer estéril, y 150 mg de factor de coagulación de sangre. Los métodos actuales para preparar composiciones administrables de manera parenteral se conocerán o serán evidentes para los expertos en la técnica y se describen en más detalle en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18va edición, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1980). Una dosificación efectiva de anticuerpo biespecífico está dentro del intervalo de 0,01 mg a 1000 mg por kg de peso corporal por administración.

20 Las composiciones farmacéuticas están en ciertos aspectos, en la forma de una suspensión oleaginosa, acuosa inyectable estéril, dispersiones o polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. La suspensión se formula de acuerdo con la técnica conocida mediante el uso de aquellos agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados los cuales se han mencionado anteriormente. La preparación inyectable estéril incluye soluciones o suspensiones inyectables estériles en un diluyente o solvente parenteralmente aceptable no tóxico, por ejemplo como una solución en 1,3-butanodiol. El portador en ciertos aspectos, es un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido, y similares), mezclas adecuadas de estos, aceites vegetales, solución de Ringer y solución de cloruro de sodio isotónica. Además, los aceites fijos, estériles, se emplean convencionalmente como un solvente o medio de suspensión. Para este fin, cualquier aceite fijo suave se emplea, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tal como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de los inyectables.

35 En todos los casos, la forma debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil inyección si se emplea la administración por inyección. La fluidez apropiada se mantiene, por ejemplo, por el uso de un recubrimiento, tal como lecitina u otro recubrimiento conocido bien en la técnica, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de tensoactivos. Debería ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debería preservarse contra la acción de contaminación de los microorganismos, tales como bacterias y hongos. La prevención de la acción de los microorganismos se produce por varios agentes antibacteriales y antimicóticos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal, y similares.

40 En muchos casos será conveniente incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares o cloruro de sodio. La absorción prolongada de las composiciones inyectables se produce mediante el uso en las composiciones de agentes que retardan la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

45 Las composiciones útiles para la administración se formulan, por ejemplo y sin limitación, con potenciadores de la captación o absorción para aumentar su eficacia. Tales potenciadores, incluyen, por ejemplo, salicilato, glicocolato/linoleato, glicolato, aprotinina, bacitracina, dodecil sulfato sódico, caprato y similares. Ver, por ejemplo, Fix (J. Pharm. Sci., 85:1282-1285, 1996) y Oliyai y otros (Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32:521-544, 1993).

50 Además, las propiedades de hidrofiliidad e hidrofobicidad de las composiciones contempladas para su uso en los métodos mediante el uso de la invención están bien equilibradas, de esta manera potencian su utilidad para ambos usos *in vitro* y especialmente *in vivo*, mientras que otras composiciones que carecen de tal equilibrio son de menos utilidad sustancialmente. Específicamente, las composiciones para usar tienen un grado apropiado de solubilidad en medio acuoso lo cual permite la absorción y biodisponibilidad en el cuerpo, mientras que también tienen un grado de solubilidad en lípidos lo cual permite al compuesto atravesar la membrana celular a un sitio de acción putativo.

55 Composiciones Fisiológicamente Aceptables

60 La presente invención proporciona el primer modelo de ratón válido para la TTP, lo que crea la oportunidad para la prueba bien controlada de las composiciones para la prevención y mejora de la TTP. Por consiguiente, las composiciones fisiológicamente (o farmacéuticamente) aceptables que comprenden, por ejemplo, rVWF, FVIII, o composiciones para la prevención o mejora de la TTP, pueden usarse de acuerdo con la invención.

65 Las composiciones fisiológicamente aceptables pueden formularse para su administración por inyección oral, intraperitoneal, transdérmica, subcutánea, intravenosa o intramuscular, inhalación, tópica, intralesional, infusión; suministro mediado por liposomas; medios tópicos, rectales, intrabronquiales, nasales, transmucosos, intestinales u otros medios comunes. Las composiciones fisiológicamente aceptables pueden administrarse en una variedad de

formas de dosificación unitaria en dependencia del método/modo de administración. Las formas de dosificación unitaria adecuadas incluyen, pero no se limitan a, polvos, tabletas, píldoras, cápsulas, comprimidos para chupar, supositorios, parches, rociadores nasales, inyectables, formulaciones implantables de liberación sostenida, etc.

5 Como tal, en otro aspecto, la presente descripción proporciona composiciones fisiológicamente aceptables que comprenden una cantidad efectiva de una composición de prueba y un portador aceptable y/o excipientes. Un portador fisiológicamente (o farmacéuticamente) aceptable incluye cualquier solvente, medio de dispersión, o recubrimientos que sean fisiológicamente compatibles y que preferentemente no interfieran con o de otro modo inhiban la actividad del polipéptido o peptidomimético. El portador generalmente es adecuado para la administración intravenosa, intramuscular, oral, intraperitoneal, transdérmica, tópica o subcutánea.

10 Los portadores fisiológicamente aceptables pueden contener uno o más compuesto(s) fisiológicamente aceptable(s) que actúa(n), por ejemplo, para estabilizar la composición o aumentar o disminuir la absorción del (de los) agente(s) de prueba. Los compuestos fisiológicamente aceptables pueden incluir, por ejemplo, carbohidratos, tales como glucosa, sacarosa o dextranos, antioxidantes, como el ácido ascórbico o glutatión, agentes quelantes, proteínas de bajo peso molecular, composiciones que reducen el aclaramiento o hidrólisis de los agentes activos, o excipientes u otros estabilizadores y/o tampones.

15 El portador farmacéuticamente aceptable puede ser solución salina fisiológica. Otros portadores fisiológicamente aceptables y sus formulaciones se conocen bien y se describen generalmente en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Science (18va Edición, ed. Gennaro, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990). Varios excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien en la técnica y pueden encontrarse en, por ejemplo, Handbook of Pharmaceutical Excipients (4ta edición, Ed. Rowe y otros, Pharmaceutical Press, Washington, D.C.). De nuevo, la composición farmacéutica puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, cápsula, tableta u otra forma adecuada. El componente activo puede recubrirse en un material para protegerlo de la inactivación por el ambiente antes de alcanzar el sitio de acción diana.

20 Los dispositivos implantados (por ejemplo, stents arteriales e intravenosos, que incluye stents de liberación, y catéteres) pueden usarse para suministrar las composiciones fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, las soluciones acuosas que comprenden una composición fisiológicamente aceptable administrada directamente a través de los stents y catéteres. Los stents adecuados se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos Núms. 6,827,735; 6,827,735; 6,827,732; 6,824,561; 6,821,549; 6,821,296; 6,821,291; 6,818,247; 6,818,016; 6,818,014; 6,818,013; 6,814,749; 6,811,566; 6,805,709; 6,805,707; 6,805,705; 6,805,704; 6,802,859; 6,802,857; 6,802,856; y 49 6,802,849. Los catéteres adecuados se describen en, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos 30 Núms. 6,829,497; 6,827,798; 6,827,730; 6,827,703; 6,824,554; 6,824,553; 6,824,551; 6,824,532; y 6,819,951.

35 La vida media sérica elevada se puede mantener mediante el uso de sistemas de "empaquetado" de polipéptidos de liberación sostenida. Tales sistemas de liberación sostenida se conocen bien por los expertos en la técnica. En una modalidad preferida, se usa el sistema de suministro de microesferas biodegradables ProLease para proteínas y polipéptidos (Tracy, Biotechnol. Prog., 14:108 (1998); Johnson y otros, Nature Med., 2:795 (1996); Herbert y otros, Pharmaceut. Res., 15:357 (1998)), que involucra el uso de un polvo seco compuesto de microesferas poliméricas biodegradables que contienen el polipéptido en una matriz polimérica que puede combinarse como una formulación seca con o sin otros agentes.

40 Los oligonucleótidos (por ejemplo, que codifican proteína o inhibidores) pueden suministrarse mediante transfección directa o transfección y expresión a través de un vector de expresión. Los vectores de expresión apropiados incluyen vectores de expresión de mamíferos y vectores virales, en los cuales se ha clonado un oligonucleótido con las secuencias reguladoras apropiadas que incluyen un promotor para resultar en la expresión en una célula huésped. Los promotores adecuados pueden ser promotores constitutivos o promotores específicos del desarrollo. El suministro por transfección puede lograrse mediante reactivos de transfección liposomal, conocidos en la técnica (por ejemplo, reactivo de transfección Xtreme, Roche, Alameda, CA; formulaciones de Lipofectamina, Invitrogen, Carlsbad, CA). El suministro mediado por liposomas catiónicos, mediante vectores retrovirales y el suministro directo son eficientes. Otro posible modo para el suministro es el direccionamiento mediante el uso de anticuerpos contra marcadores de la superficie celular de las células dianas.

45 Para la transfección, una composición que comprende una o más moléculas de ácido nucleico (dentro de o sin vectores) puede comprender un vehículo de suministro, que incluye liposomas, para la administración a un animal, portadores y diluyentes y sus sales, y/o puede presentarse en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Los métodos para el suministro de moléculas de ácido nucleico se describen, por ejemplo, en Gilmore, y otros, Curr. Drug Delivery (2006) 3:147-5 y Patil, y otros, AAPS Journal (2005) 7:E61-E77.

50 El suministro de moléculas de ARNsi también se describe en varias publicaciones de patentes de Estados Unidos, que incluyen por ejemplo, 2006/0019912; 2006/0014289; 2005/0239687; 2005/0222064; y 2004/0204377.

55 Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse a las células mediante una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica, que incluyen, pero no se restringen a, la encapsulación en liposomas, por iontoforesis,

por electroporación o por incorporación en otros vehículos, que incluyen polímeros biodegradables, hidrogeles, ciclodextrinas (ver, por ejemplo, Gonzalez y otros, 1999, Bioconjugate Chem., 10:1068-1074; Wang y otros, las Publicaciones internacionales PCT núms. WO03/47518 y WO03/46185), poli(ácido láctico-co-glicólico) ácido (PLGA) y microesferas PLGA (ver, por ejemplo, la patente de Estados Unidos núm. 6,447,796 y la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos núm. 2002/130430), nanocápsulas biodegradables, y microesferas bioadhesivas, o por vectores proteicos (O'Hare y Normand, Publicación internacional PCT núm. WO00/53722). Las moléculas de ácido nucleico descritas en la presente descripción pueden también formularse o formar complejos con polietilenimina y derivados de esta, tales como derivados de polietilenimina-polietilenglicol-N-acetilgalactosamina (PEI-PEG-GAL) o polietilenimina-polietilenglicol-tri-N-acetilgalactosamina(PEI-PEG-triGAL).

En algunas modalidades, las secuencias de oligonucleótidos se suministran a las células a través de un vector de expresión viral. Los vectores virales adecuados para el suministro de tales moléculas a las células incluyen vectores adenovirales, vectores adenoasociados, y vectores retrovirales (que incluye vectores lentivirales). Por ejemplo, los vectores virales desarrollados para el suministro y expresión de oligonucleótidos ARNsi están disponibles comercialmente de, por ejemplo, GeneDetect, Bradenton, FL; Ambion, Austin, TX; Invitrogen, Carlsbad, CA; Open BioSystems, Huntsville, AL; y Imgenex, San Diego, CA.

#### Métodos de Determinación del Efecto de una Composición de Prueba en los síntomas de la TTP

La presente invención proporciona el primer modelo de ratón para la TTP como se define en las reivindicaciones adjuntas, lo que crea la oportunidad para la prueba bien controlada de las composiciones para la prevención y mejora de la TTP. La descripción siguiente describe algunas de las observaciones y ensayos que pueden aplicarse en los modelos de ratones de la invención.

Los síntomas de la TTP que pueden observarse en el presente modelo de ratón incluyen síntomas conductuales, tales como confusión, piloerección, depresión conductual, y ataxia. Los síntomas hematológicos y seroquímicos de la TTP incluyen el conteo plaquetario reducido, hematocrito reducido, y creatinina cinasa, creatinina, y lactato deshidrogenasa aumentadas. Los términos "aumentar" y "disminuir" se determinan con relación a un control sin TTP, por ejemplo, un ratón bajo condiciones normales. Los síntomas histopatológicos que pueden observarse incluyen microtrombos o necrosis en varios órganos y tejidos, especialmente el corazón. Los síntomas adicionales microscópicos y macroscópicos de la TTP se describen en la sección de Ejemplos.

La cantidad de hemólisis puede determinarse mediante la medición del nivel de hemoglobina en el plasma. Un nivel mayor que el normal indica lisis de RBC, tal como la que se asocia con la TTP. Por lo tanto, una disminución en la hemoglobina del plasma, con relación a la que se observa en el modelo de ratón de la invención, indica que un compuesto de prueba efectivamente mejora la TTP.

Los niveles de hemoglobina en el plasma pueden medirse visualmente, por ejemplo, después de separar los componentes celulares de la sangre por centrifugación suave. Los métodos tradicionales también incluyen la técnica de Benzidina, como se describió, por ejemplo, por Crosby y Furth (1956) Blood 11:380. La hemoglobina en el plasma puede también medirse específicamente en roedores (donde la separación de los componentes celulares puede ser más difícil que en humanos) mediante el uso de los métodos descritos por Kruszyna y otros (1977) Clin. Chem. 23:2156-59. En resumen, se añade ferricianuro a la porción de plasma de la sangre y se mide la absorbancia a 540 nm. Se añade después cianuro a la solución y se vuelve a medir A540. A1 se sustrae después de A2 para determinar la cantidad de hemoglobina libre. Métodos adicionales se conocen en la técnica.

El hematocrito es una medida de la proporción del volumen de sangre ocupada por los glóbulos rojos (RBC), expresada como un porcentaje del volumen total de la sangre. Puede medirse de manera relativamente simple, por ejemplo, mediante centrifugación suave de la sangre en un tubo con indicaciones de volumen. La capa inferior (la más pesada) se compone de los RBC, seguido por una capa más pequeña de leucocitos, la parte de más arriba por el componente de plasma libre de células. Los analizadores de hematocrito automáticos están disponibles comercialmente, y a menudo ofrecen una lectura más precisa. El hematocrito en ratones está generalmente en el intervalo de aproximadamente 38-45. Un hematocrito más bajo de lo normal indica lisis de RBC y se asocia con la TTP.

Un conteo plaquetario puede realizarse mediante el uso de técnicas de laboratorio comunes, tales como conteo en un hemocitómetro. Alternativamente, pueden usarse analizadores de sangre electrónicos. Existen dos tipos de conteo electrónico, sistemas de conteo de pulso de voltaje y electro-ópticos. En ambos sistemas, la sangre colectada se diluye y se cuenta al pasar la sangre a través de un contador electrónico. Los instrumentos se configuran para contar solo las partículas dentro del intervalo de tamaño correcto para las plaquetas. Los niveles superior e inferior del intervalo de tamaño se llaman límites de exclusión de tamaño. Cualquier célula o material más o más pequeño que los límites de exclusión de tamaño no se contabilizarán. Un intervalo normal está generalmente entre 150 000- 450 000 por DI de sangre. Mientras que los conteos plaquetarios altos se asocian normalmente con afecciones trombocíticas, la TTP se caracteriza generalmente por conteos plaquetarios bajos.

Los niveles de creatinina se detectan generalmente para determinar la función del riñón. Un intervalo normal está usualmente entre aproximadamente 50 y 120  $\mu\text{mol/litro}$  de sangre, pero se eleva generalmente en la TTP. Como el

riñón es un órgano altamente vascularizado, un número significativo de pacientes con TTP presentan insuficiencia renal. La creatinina quinasa (CK) es una enzima primariamente encontrada en el corazón y músculo esquelético y el cerebro. Como CK es primariamente intracelular, niveles de CK más alto que los normales indican daño tisular y celular, tal como el que se asocia con la TTP. La creatinina cinasa de la sangre está generalmente presente a aproximadamente 15-180 unidades por litro de sangre. Ambos niveles de creatinina y CK se miden típicamente mediante el uso de equipos de análisis de sangre automatizados.

Los niveles de lactosa deshidrogenasa es otro indicador de hemólisis, y son de manera general extremadamente altos en pacientes con TTP. Los niveles elevados de LDH y hemólisis también se asocian con hiperbilirrubinemia (bilis en sangre) y niveles bajos de haptoglobulina. La LDH puede medirse mediante el uso de un método espectroscópico enzimático indirecto como se describió, por ejemplo, en J. Clin Lab. Invest. 33: 291-306 (1974). La LDH cataliza la reacción de lactato a piruvato a pH 8,8 - 9,8 con la producción concomitante de NADH. El NADH se mide después espectrofotométricamente a 340 nm, y la LDH se calcula proporcionalmente. Los niveles de LDH están normalmente en el intervalo de aproximadamente 100- 250 U/ litro de sangre.

Los síntomas adicionales que pueden ser incluyen fiebre, insuficiencia renal, signos de ictericia (ojos o piel amarillentos) y signos de anemia, tales como niveles bajos de hemoglobina y orina oscura. Pueden ocurrir convulsiones, como también arritmias cardíacas o insuficiencia cardíaca.

La composición de prueba puede resultar en una reducción en la gravedad de al menos un síntoma de la TTP observado en un modelo animal de la TTP, o un retraso en la aparición del síntoma. La gravedad del síntoma de la TTP puede reducirse en al menos 5 %, por ejemplo, 10 %, 20 %, 30 %, o más. La composición de prueba puede eliminar el síntoma, es decir, reducir la gravedad del síntoma a una insignificancia estadística en comparación con un control apropiado.

Generalmente, los estudios de composiciones de prueba particulares incluyen controles apropiados para descartar los efectos de fondo, por ejemplo, de un tampón usado para la administración. Los ejemplos de controles apropiados se describen en la sección de Ejemplos. Por ejemplo, un estudio de la composición de prueba puede incluir una condición con la composición de prueba en comparación con una condición con el tampón de la composición de prueba solo. Estas condiciones pueden probarse en cualquiera de los modelos animales que se describen en la presente descripción.

#### Modelos animales

En general, los animales de la invención son ratones.

En una modalidad, el ratón es de la cepa C57BL/6J.

En incluso un aspecto adicional, los ratones de la invención son ratones modificados genéticamente en los cuales al menos un gen extraño se ha insertado en el genoma o se ha eliminado del genoma. Tales ratones transgénicos permiten que se examinen los procesos reguladores en el nivel celular e influyan en una manera sistemática y específica que no se puede lograr con otros sistemas de prueba. Los ratones transgénicos del tipo descrito son útiles para analizar *in vivo* los efectos de la administración de un agente de prueba terapéutico. En un aspecto, un ratón transgénico de la invención incluye un ratón deficiente en el VWF. En otro aspecto, un ratón transgénico de la invención incluye un ratón deficiente en ADAMTS13.

Los ratones transgénicos también sirven como modelos para evaluar el efecto de los agentes de prueba en provocar el desarrollo de anti-auto anticuerpos en el contexto de un sistema inmunitario del huésped putativo tolerante. Tal entendimiento es esencial para el diseño y la prueba de los agentes para el tratamiento de los trastornos de la coagulación sanguínea que incluyen, pero no se limitan a, TTP, VWD, y similares.

Los transgenes en la presente descripción comprenden una secuencia codificante (por ejemplo, ADNc, una secuencia codificante sintética, o ADN genómico) para un factor humano de la coagulación sanguínea u otra proteína flanqueada por secuencias reguladoras naturales (control de la expresión), o asociadas con secuencias heterólogas, que incluyen promotores, sitios internos de entrada al ribosoma (IRES) y otras secuencias de sitios de unión a ribosomas, potenciadores, elementos de respuesta, supresores, secuencias de señal, secuencias de poliadenilación, intrones, regiones 5'- y 3'- no codificantes, y similares. La secuencia codificante se modifica, en ciertos aspectos, por muchos medios conocidos en la técnica. Los ejemplos no limitantes de tales modificaciones incluyen metilación, "caperuzas," sustitución de uno o más nucleótidos presentes de manera natural con un análogo, y modificaciones internucleótidos tales como, por ejemplo, aquellas con enlaces no cargados (por ejemplo, metil fosfonatos, fosfotriésteres, fosforoamidatos, carbamatos, etc.) y con enlaces cargados (por ejemplo, fosforotioatos, fosforditioatos, etc.). Los polinucleótidos contienen, por ejemplo y sin limitación una o más porciones adicionales unidas covalentemente, tales como, por ejemplo, proteínas (por ejemplo, nucleasas, toxinas, anticuerpos, péptidos señales, poli-L-lisina, etc.), intercaladores (por ejemplo, acridina, psoraleno, etc.), quelantes (por ejemplo, metales, metales radioactivos, hierro, metales oxidativos, etc.), y alquilantes. Los polinucleótidos se derivan, en ciertos aspectos, mediante la formación de un enlace metil o etil fosfotriéster o un alquil fosforamidato. Además, los

polinucleótidos en la presente descripción se modifican, de nuevo, en ciertos aspectos, con una etiqueta capaz de proporcionar una señal detectable, directa o indirectamente. Las etiquetas ilustrativas incluyen radioisótopos, moléculas fluorescentes, biotina, y similares.

5 El control de la expresión génica se realiza mediante una variedad de medios bien conocidos en la técnica. La expresión de un transgén es alternativamente constitutiva o regulada para ser inducible o reprimible por medios conocidos, típicamente al elegir un promotor que responde a un conjunto de condiciones determinadas, por ejemplo, la presencia de un compuesto determinado, o una sustancia especificada, o el cambio en una condición ambiental tal como el tipo de tejido o la temperatura. El término "expresión inducible" se extiende a cualquier medio para hacer  
10 que la expresión génica tenga lugar bajo condiciones definidas, la elección de los medios y las condiciones se eligen sobre la base de la conveniencia y adecuación para el organismo huésped.

La transformación se realiza mediante una variedad de técnicas conocidas, en dependencia del organismo, de las características de las células del organismo y de su biología. La transformación estable involucra la entrada de ADN  
15 en las células y en el núcleo de las células. Para los organismos que pueden regenerarse a partir de células únicas (que incluyen algunos mamíferos), la transformación se realiza, por ejemplo en cultivo *in vitro*, seguido de la selección para transformantes y la regeneración de los transformantes. Los métodos usados a menudo para transferir el ADN o ARN a las células incluyen microinyección, bombardeo con pistola de partículas, la formación de complejos de ADN o ARN con lípidos catiónicos, liposomas u otros materiales portadores, electroporación, y la  
20 incorporación de ADN o ARN transformantes a vectores virales. Otras técnicas se conocen en la técnica. La transferencia de ADN al núcleo de las células ocurre mediante procesos celulares, y se ayuda, en ciertos aspectos, por la elección de un vector apropiado, al incluir secuencias de integración de sitio sobre las que actúa una transposasa o recombinasa intracelular (ver por ejemplo, [Craig, Ann. Rev. Genet. 1988, 22:77; Cox. In Genetic Recombination (R. Kucherlapati y G. R. Smith, eds.) 1988, American Society for Microbiology, Washington, D.C.,  
25 páginas 429-493; Hoess. In Nucleic Acid and Molecular Biology (F. Eckstein y D. M. J. Lilley eds.) Vol. 4, 1990, Springer-Verlag, Berlín, páginas 99-109.

Como se expuso anteriormente, el modelo animal de la invención es un ratón. El contexto genético de las cepas de ratón de las que se derivan las diversas células madre embrionarias (ES) se conoce en la técnica, que incluyen  
30 células ES que se originan de la cepa de ratón C57BL/6J o 129: Las células R1 se originan de un blastocisto de ratón de un cruce entre las subcepas 129/Sv y 129/Sv-CP (Nagy y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8424-8, 1993); Las células GS1 se originan de 129/Sv/Ev. Las células D3 (Doetschman y otros, Nature 330:576-8, 1987) y células J1 se originan de 129/Sv o de 129/terSv. Las células TT2 que también produjeron ratones ES se originaron a partir de una cepa híbrida F1 (C57BL/6 x CBA) (Yagi y otros, Anal. Biochem. 14:70-6, 1993). En un aspecto  
35 particular, la invención incluye ratones C57BL/6J y ratones knockout derivados de ratones C57BL/6J.

Los vectores de expresión y los ácidos nucleicos usados para expresar una proteína de interés en la descripción contienen en varias modalidades un promotor específico de tejido. Tales promotores se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a promotores específicos de hígado (por ejemplo, albúmina; Miyatake y otros, J. Virol. 1:5124-32, 1997;  $\alpha$ -fetoproteína), promotores específicos de músculo (por ejemplo, cadena ligera de la miosina 1 (Shi y otros, Hum. Gene Ther. 8:403-10, 1997,  $\alpha$ -actina), promotor específico de páncreas (por ejemplo, promotores de insulina o glucagón), promotores específicos neuronales (por ejemplo, el promotor de la tirosina hidroxilasa o el promotor enolasa específico neuronal), promotores específicos de células endoteliales (por ejemplo, factor von Willebrand; Ozaki y otros, Hum. Gene Ther. 7:1483-90, 1996), y promotores específicos de células de músculo liso (por ejemplo, 22a; Kim y otros, J. Clin. Invest. 100:1006-14, 1997). Otros promotores específicos de tejido incluyen promotores que también se usan en el desarrollo de terapias contra el cáncer, que incluyen promotores específicos de tirosinasa (Diaz y otros, J. Virol. 72: 789-95, 1998), un promotor de tejido adiposo derivado de la aromatasa humana citocromo p450 (p450arom) (ver la Patente de Estados Unidos núm. 5,446,143; Mahendroo y otros, J. Biol. Chem. 268: 19463 19470, 1993, y Simpson y otros, Clin. Chem. 39: 317 324, 1993). Los vectores y otras moléculas de ácido nucleico útiles en relación con la invención pueden incluir también secuencias que limiten la expresión temporal del transgén. Por ejemplo, el transgén puede controlarse mediante la inclusión de potenciadores del elemento de respuesta AMPc en un promotor y el tratamiento de la célula transfectada o infectada con un fármaco que module el AMPc (Suzuki y otros, Hum. Gene Ther. 7:1883-93, 1996). Alternativamente, los elementos represores previenen la transcripción en presencia del fármaco (Hu y otros, Cancer Res. 57:3339-43, 1997). El control espacial de la expresión se logra también mediante el uso de radiación ionizante (radioterapia) en relación con el promotor génico erg (Sung y otros, Cancer Res. 55:5561-5, 1995).

Los constructos de ácido nucleico recombinante que codifican las proteínas de interés se insertan, por ejemplo, en cualquier plásmido adecuado, bacteriófago, o vector viral para la amplificación, y se propagan mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, tales como aquellos descritos en Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2da Edición, ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989). En una modalidad, se usan vectores de expresión compatibles con células eucarióticas, tales como células de vertebrados. Los vectores de expresión de células eucarióticas se conocen bien en la técnica y están disponibles de fuentes comerciales. Los vectores de expresión contemplados contienen secuencias procarióticas (para facilitar la propagación del vector en la bacteria), y una o más unidades de transcripción eucarióticas que son funcionales en células de cerdo. Típicamente, tales vectores proporcionan sitios de restricción convenientes para la inserción de la molécula de ADN

recombinante deseada. Los vectores derivados de pcDNA1, pSV2, pSVK, pMSG, pSVL, pPVV-1/PML2d y pTDT1 (ATCC Núm. 31255) son ejemplos de vectores de expresión de mamíferos adecuados para la transfección de células no humanas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y la selección por resistencia a fármacos en ambas células procariótica y eucariótica. Alternativamente, los derivados de virus tales como el virus de papiloma bovino (BPV-1), o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) pueden usarse para la expresión de proteínas en células de cerdo. Los distintos métodos que se emplean en la preparación de los plásmidos y la transformación de las células huésped se conocen bien en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados útiles en la presente invención, así como también procedimientos recombinantes generales, ver *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2da Edición, ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989).

Las técnicas para generar un animal transgénico, particularmente un ratón o rata se conocen bien (Gordon, *International Rev. Cytol.* 115:171-229, 1989). Están disponibles distintos enfoques para introducir transgenes, que incluyen la microinyección de ácido nucleicos a las células, los métodos de vectores retrovirales, y la transferencia génica a células madres (ES) embrionarias. Los genes se interrumpen, en ciertos aspectos, para producir animales knockout transgénicos.

Cualquier método para generar ratones knockout se contempla en la invención. En algunas modalidades, el gen del VWF se interrumpe mediante recombinación homóloga entre el alelo endógeno y un gen del VWF mutante o por la secuencia apropiada para eliminar el alelo endógeno, o una porción del mismo, que se ha introducido en un precursor de células madre embrionarias del ratón. Después se permite que se desarrolle el precursor de células madre embrionarias, lo que resulta en un ratón que tiene un gen del VWF interrumpido funcionalmente. El ratón puede tener un alelo del gen del VWF interrumpido funcionalmente (es decir, el ratón puede ser heterocigoto para la mutación de anulación), o en otro aspecto, el ratón tiene ambos alelos del gen el VWF interrumpidos funcionalmente (es decir, el ratón puede ser homocigoto para la mutación). La interrupción funcional de ambos alelos del gen del VWF produce ratones en que la expresión del producto del gen del VWF en las células del ratón es sustancialmente o completamente ausente con relación a los ratones no mutantes. En otra modalidad de la descripción, los alelos del gen del VWF se interrumpen de manera que se produce un producto alterado (es decir, mutante) del gen del VWF en las células del ratón. Tal ratón puede ser deficiente en el VWF o carecer por completo del VWF.

En una modalidad adicional, la invención incluye un modelo de ratón con un gen interrumpido de ADAMTS13.

Los ratones deficientes en ADAMTS13 se usan en la invención debido a que esta cepa transgénica mimetiza la condición en los pacientes que carecen de la proteasa de escisión ADAMTS13 para el VWF. Adicionalmente, estos ratones se usan en la invención debido a que los ratones se usan ampliamente en estudios de toxicidad aguda y se reconocen generalmente como adecuados para tales estudios de toxicidad por las autoridades reguladoras. En un aspecto adicional, los ratones deficientes en ADAMTS13 y deficientes en el VWF de la invención se derivan de la cepa C57BL/6J. En incluso un aspecto adicional, los ratones C57BL/6J se usan como controles adicionales y se usan como un modelo de la invención.

Si se usan ovocitos fertilizados para generar un transgénico, se incorporan en los ovocitos el ADN o transgén extraño deseado. La incorporación del transgén en el ovocito se realiza mediante diversos métodos tales como a través de un vector retroviral apropiado, o por microinyección. Los ratones transgénicos se generan de manera rutinaria en la técnica por microinyección de ADN a blastocistos aislados de ratones gestantes, como se describió en la patente de Estados Unidos Núm. 4,736,866, y como se proporcionó por B. Hogan y otros, titulado "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., U.S.A. (1986). Ver también, por ejemplo, Haren y otros, *Annu. Rev. Microbiol.* 53:245-281, 1999; Reznikoff y otros, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266(3):729-734, 1999; Ivics y otros, *Methods Cell Bid.*, 60:99-131, 1999; Hall y otros, *FEMS Microbiol. Rev.* 21:157-178 1997. La patente de Estados Unidos 6,492,575 describe un método para generar ratones transgénicos mediante la transformación de células ES y la inyección de las células transformadas en un blastocisto tetraploide. Al cruzar hermanos heterocigotos, pueden obtenerse animales homocigotos que llevan el gen deseado.

Adicionalmente, Capecchi y otros describen un método por el cual los transgenes pueden incorporarse a células madres embrionarias, fetales o adultas pluripotentes (*Science* 244:1288-1292, 1991). En este método, las células madres embrionarias se aíslan a partir de blastocistos cultivados in vitro. Estas células madres embrionarias pueden mantenerse estables en cultivo durante muchas generaciones celulares sin diferenciación. El transgén se incorpora después a las células madres embrionarias por electroporación o por otros métodos de transformación. Las células madres que portan el transgén se seleccionan y se inyectan en la masa celular interna de los blastocistos. Los blastocistos se implantan después en hembras pseudogestantes. Debido a que no todas las células de la masa celular interna de los blastocistos portan los transgenes, los animales son quiméricos con respecto a los transgenes. El cruce de los animales quiméricos permite la producción de los animales que portan el transgén. Se proporciona una descripción general del proceso en Capecchi, *Trends in Genetics* 1989, 5: 70-76.

El suministro del transgén se realiza en un aspecto mediante un sistema de suministro retroviral, ver por ejemplo, Eglitis y otros, *Adv. Exp. Med Biol.* 241:19, 1988. En una modalidad, un constructo retroviral es uno en el que los

genes estructurales del virus se sustituyen por un gen único que se transcribe después bajo el control de los elementos reguladores contenidos en la repetición terminal larga (LTR) viral. Se han usado una variedad de esqueletos de vectores de gen único, que incluyen el virus de la leucemia murina Moloney (MoMuLV). Los vectores retrovirales que permiten inserciones múltiples de diferentes genes tal como un gen para un marcador de selección y un segundo gen de interés, bajo el control de un promotor interno, pueden derivarse de este tipo de esqueleto, ver por ejemplo, Gilboa, *Adv. Exp. Med Biol.* 241:29, 1988.

Los elementos de la construcción de vectores para la expresión de un producto proteico se conocen para los expertos en la técnica. La expresión eficiente de los vectores retrovirales se observa cuando se usan promotores "fuertes" para el control de la transcripción, tal como el promotor SV 40 o promotores LTR, revisados en Chang y otros, *Int. J. Cell Cloning* 7:264, 1989. Estos promotores son constitutivos y no permiten generalmente la expresión específica de tejido. Otros promotores adecuados se discuten en la presente descripción.

El uso de líneas de células empaquetadoras aumenta la eficiencia y la infectividad de los viriones recombinantes producidos, ver Miller, 1990, *Human Gene Therapy* 1:5. Los vectores retrovirales murinos son útiles para la transferencia de genes eficientemente a embriones murinos, ver por ejemplo, Wagner y otros, 1985, *EMBO J.* 4:663; Griedley y otros, *Trends Genet.* 3:162, 1987, y células madres hematopoyéticas, ver por ejemplo, Lemischka y otros, *Cell* 45:917-927, 1986; Dick y otros, *Trends Genet.* 2:165-170, 1986.

Una tecnología retroviral adicional que permite obtener títulos virales mucho más altos de lo que era posible antes involucra la amplificación mediante transferencia consecutiva entre líneas de células empaquetadoras ecotrópicas y anfotrópicas, el método llamado "ping-pong", ver por ejemplo, Kozak y otros, *J. Virol.* 64:3500-3508, 1990; Bodine y otros, *Prog. Clin. Biol. Res.* 319: 589-600, 1989. Además, las técnicas para aumentar los títulos virales permiten el uso de sobrenadantes que contienen virus, en lugar de la incubación directa con líneas celulares que producen de virus para lograr una transducción eficiente, ver por ejemplo, Bodine y otros, *Prog. Clin. Biol. Res.* 319:589-600, 1989. Debido a que la replicación del ADN celular se requiere para la integración de los vectores retrovirales en el genoma huésped, puede ser conveniente aumentar la frecuencia en la que las células madres dianas ciclen activamente por ejemplo, al inducir las células dianas a dividirse mediante el tratamiento in vitro con factores de crecimiento, ver por ejemplo, Lemischka y otros, *Cell* 45:917-927, 1986; Bodine y otros, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86:8897-8901, 1989, o para exponer al receptor a 5-fluorouracilo, ver por ejemplo, Mori y otros, *Japón. J. Clin. Oncol.* 14 Suppl. 1:457-463, 1984.

La presente descripción proporciona métodos para generar un animal transgénico, que comprende cruzar el animal knockout de la presente invención (es decir, un ratón) con un segundo animal (es decir, un segundo ratón).

En algunas modalidades, la presente invención es de utilidad para los métodos de selección de un compuesto (agente), que comprende: a) exponer al animal a un compuesto; y b) determinar una respuesta del animal al compuesto. ¶Un cambio en la respuesta en comparación con un animal control no expuesto al compuesto puede indicar la respuesta al compuesto. Los animales (células, tejidos u órganos del animal) pueden también examinarse directamente sin comparación con un animal silvestre.

En la determinación de la respuesta que el animal tiene al compuesto, se puede examinar la sangre y la orina del animal.

Un órgano o tejido del animal puede también examinarse. Tales órganos y tejidos incluyen, pero no se limitan a, ojo, tejido ocular, retina, tejido retinal, riñón, tejido renal, páncreas, tejido pancreático, próstata, tejido prostático, vesícula, tejido vesicular, corazón, tejido cardíaco, cerebro, tejido cerebral, glándulas suprarrenales, tejido adrenal, hígado, tejido hepático, pulmones, tejido pulmonar, bazo, tejido del bazo o sus combinaciones, se examinan. Los compuestos que, por ejemplo, reducen o previenen la coagulación sanguínea en estos órganos o tejidos pueden considerarse potencialmente beneficiosos en el tratamiento de la TTP.

El compuesto probado puede ser un agente anticoagulante candidato o un agente que aumenta la expresión o actividad de ADAMTS13. Aunque no se limita a ningún mecanismo, se cree que los modelos de ratón de la invención tienen una susceptibilidad aumentada a la coagulación sanguínea. Como tal, los modelos de ratón de la invención permiten evaluar fácilmente el potencial anticoagulante de los compuestos candidatos.

Como se expuso anteriormente en la presente descripción, los términos "agente" y "compuesto" se usan indistintamente para describir cualquier molécula, por ejemplo proteína o fármaco, con la capacidad de afectar la coagulación sanguínea en el modelo de ratón de la invención. En un aspecto, el agente reduce la coagulación sanguínea en el modelo de ratón. En otro aspecto, el agente reduce la mortalidad en el modelo de ratón. En un aspecto adicional, el agente mejora una patología en el modelo de ratón. Generalmente, una pluralidad de mezclas de ensayos se ejecuta en paralelo con diferentes concentraciones de agente para obtener una respuesta diferencial a las diversas concentraciones. Típicamente, una de estas concentraciones funciona como un control negativo, es decir, a concentración cero o por debajo del nivel de detección.

Los agentes candidatos (compuestos) abarcan numerosas clases químicas y se obtienen a partir de una amplia variedad de fuentes que incluyen bibliotecas de compuestos sintéticos o naturales. Por ejemplo, numerosos medios están disponibles para la síntesis aleatoria y dirigida de una amplia variedad de compuestos orgánicos y biomoléculas, que incluyen la expresión de oligonucleótidos y oligopéptidos aleatorios. Como alternativa, las bibliotecas de compuestos naturales en forma de bacterias, hongos, extractos de plantas y animales están disponibles o se producen con facilidad. Además, las bibliotecas naturales o producidas sintéticamente y los compuestos son fácilmente modificados a través de medios convencionales químicos, físicos y bioquímicos, y pueden usarse para producir bibliotecas combinatorias. Los agentes farmacológicos conocidos pueden someterse a modificaciones químicas dirigidas o aleatorias, tales como acilación, alquilación, esterificación, amidificación, etc. para producir análogos estructurales. La selección puede dirigirse a compuestos conocidos activos farmacológicamente y sus análogos químicos.

#### Evaluación Clínica de los animales

La púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) es un diagnóstico clínico sin hallazgos de pruebas de laboratorio patognomónicas. En el pasado, un conjunto de cinco signos y síntomas (es decir, patologías) se asoció con la TTP: trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, anomalías neurológicas, insuficiencia renal, y fiebre. Un uso relacionado con la invención incluye monitorear estas patologías en busca de agentes que disminuyan estas y otras patologías relevantes desde el punto de vista clínico, conductual e histológico.

Los criterios de diagnóstico actuales en la práctica clínica para sugerir el diagnóstico de la TTP incluyen trombocitopenia, esquistocitosis, y elevaciones significativas en suero de los niveles de LDH. La ausencia *in vitro* de pruebas capaces de detectar anomalías en todas las interacciones moleculares requeridas para la escisión de los multímeros ULVWF por ADAMTS13 *in vivo* es una limitación. Por lo tanto, un uso relacionado con la invención incluye la examinación patológica de la sangre, la orina, y varios órganos del cuerpo del modelo animal. La necropsia se realiza en los animales a distintos puntos de tiempo y tejidos que incluyen, pero sin limitar a, glándulas adrenales, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo, y ojos, se colectan para la examinación histopatológica.

La investigación hematológica comprende el análisis del hematocrito, concentración de hemoglobulina, conteo de eritrocitos, reticulocitos, conteo total de leucocitos, conteo diferencial de leucocitos, anomalías de la morfología de la sangre, conteo plaquetario, hemoglobulina media celular, volumen medio de las células y concentración media de la hemoglobulina celular.

Aunque un punto final primario en la prueba del efecto de distintos agentes en los modelos animales es la mortalidad, un uso relacionado con la invención incluye el monitoreo del nivel de actividad y las condiciones físicas de los animales después del tratamiento. Los animales también se pesan a distintos puntos de tiempo (por ejemplo, en los días 0, 1, 7, 14, y similares) debido a que el peso del animal proporciona un indicativo de la salud general. Los estudios a largo plazo también se contemplan de manera que puntos de tiempo pueden extenderse a semanas, meses, y similares.

Un uso relacionado con la invención incluye el uso de pruebas de laboratorios que se usan a menudo para hacer el diagnóstico de la TTP. Tales pruebas incluyen pruebas de sangre. La sangre y/o orina se extraen bajo anestesia (cuando sea apropiado) e incluye, pero no se limita a, las siguientes pruebas: (1) Conteo sanguíneo completo (CSC): se observan trombocitopenia y anemia. La evidencia de trombocitopenia puede preceder la aparición de RBC fragmentados y la elevación de LDH durante varios días. (2) Frotis de sangre periférica - RBC fragmentados (es decir, esquistocitos) son consistentes con la hemólisis. Los esquistocitos en un frotis de sangre es el distintivo morfológico de la enfermedad, pero no existen guías del número de esquistocitos requeridos para diferenciar la TTP de otras microangiopatías trombóticas. (3) Nivel de Lactato deshidrogenasa (LDH) - Extremadamente elevado, principalmente como una consecuencia de LDH de células de tejido isquémico o necrótico en lugar de deberse a hemólisis. (4) Nivel de bilirrubina indirecta - Elevado. (5) Conteo de Reticulocito - Elevado. (6) Tiempo de Protrombina (PT) y Tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) - Normal. (6) Panel DIC (por ejemplo, fibrinógeno, dímero D) - Los resultados son usualmente normales Niveles aumentados de dímero D es el parámetro DIC más específico y refleja fibrinólisis de la fibrina entrecruzada. (7) Nivel de Creatinina - Medianamente elevado (46 %). (8) Análisis de orina - Proteinuria y hematuria microscópica.

#### Métodos Estadísticos, Cálculos, Comparaciones

Un uso relacionado con la invención incluye el uso de cualquier método estadístico, cálculos y comparaciones conocido por uno con experiencia en la técnica. Algunos métodos estadísticos, cálculos y comparaciones que se discuten en los Ejemplos *abajo* se describen en la presente descripción. Sin embargo, no son de ninguna manera exclusivos o limitantes, puesto que uno con experiencia en la técnica puede usar cualquier método aceptable conocido por uno con experiencia en la técnica. En un aspecto, por ejemplo, un uso relacionado con la invención incluye el monitoreo de la dosis mínima detectable (MDD) en desarrollo de la masa corporal. MDD se define como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente. En los ejemplos prácticos, la MDD se estimó para tampón rVWF + rFVIII así como también para rVWF mediante el uso de contrastes que se probaron en una manera

descendente. Las diferentes dosis del tampón rVWF + rFVIII y rVWF se compararon también con el tampón correspondiente para la mortalidad y el desarrollo de la masa corporal. Adicionalmente, se comparó HAEMATE® P a una dosis de 2000 RCoU/kg del VWF + 1664 IU/kg del FVIII con el tampón rVWF + rFVIII a una dosis de 2000 RCoU/kg del rVWF + 1538 IU/kg del rFVIII. Esta comparación se hizo para la mortalidad y el desarrollo de la masa corporal.

Todos los cálculos estadísticos discutidos en los Ejemplos *abajo* se realizaron, por ejemplo, con SAS versión 8.2 para Linux. El nivel de significación estadística se fijó en 5 % Las hipótesis nulas de no diferencias se probaron contra sus alternativas bilaterales. El conjunto de datos del análisis a corto plazo (STADS) consistió en los animales que recibieron el tratamiento en el día 0 del estudio y se sacrificaron en el día 1 del estudio. El conjunto de datos de análisis a corto plazo (STADS) consistió en los animales que recibieron tratamiento el día 0 del estudio y se sacrificaron el día 14 del estudio.

En ciertos aspectos relacionados con la invención, cualquier punto final se considera al evaluar la efectividad de un agente de prueba en el modelo animal. En un aspecto, el punto final primario para la evaluación estadística es la mortalidad. En un aspecto adicional, los puntos finales secundarios para evaluaciones estadísticas fue el desarrollo de la masa corporal (como un porcentaje de la masa corporal en el día 0) y cambios en las variables hematológicas y serológicas. Los cambios en las variables hematológicas y serológicas se analizan mediante el uso de la estadística descriptiva. Un análisis adicional se realiza para probar la hipótesis de que no hay tendencia a la mortalidad con dosis ascendentes del rVWF+rFVIII así como también con el rVWF solo contra la alternativa bilateral mediante el uso de la prueba de tendencia Cochran-Armitage como una prueba exacta [mediante el procedimiento de SAS PROC FREQ, declaración = TENDECIA EXACTA].

En uso relacionado con la invención, se realizan estudios con diferentes dosis del rVWF solo, o en combinación con diferentes dosis de rFVIII. En tales estudios, la dosis mínima detectable (MDD) en el desarrollo de la masa corporal, definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estima en una manera descendente mediante el uso de contrastes. Las modificaciones de los estudios se realizan basadas en la toxicidad de varios reactivos usados en los métodos mediante el uso de la invención. Por ejemplo, se ha planificado una comparación de HAEMATE® P con el tampón rVWF + rFVIII a una dosis de 4000 RCoU/kg en los experimentos iniciales, pero esta dosis proporcionada no es factible con HAEMATE® P (toxicidad por citrato) y una dosis de 2000 RCoU/kg de HAEMATE® P se incluyó. Por lo tanto, tampón rVWF + rFVIII a una dosis de 2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg se comparó con HAEMATE® P a una dosis de 2000 RCoU/kg del VWF (ver Ejemplos).

En un aspecto, las variables hematológicas y serológicas agrupadas por compuesto y día de estudio se resumen mediante el uso de medias y coeficientes de variación en lugar de medianas e intervalos. Esto se hace debido a que los coeficientes de variación son independientes de la escala y permiten la evaluación de las diferencias en la variabilidad de las dosis en las variables de laboratorio.

#### Análisis de la Mortalidad

Un uso relacionado con la invención incluye el análisis de la mortalidad. Cualquier análisis estadístico conocido en la técnica se contempla para su uso. Esto incluye, pero no se limita a, los métodos estadísticos siguientes. La proporción de los animales que mueren durante el período de observación y los correspondientes intervalos de confianza del 95 % bilaterales pueden calcularse por compuesto y dosis. Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales pueden calcularse mediante el método de puntuación de Wilson (Altman y otros, *Statistics with Confidence*. Brit. Med. J. Books, 2nd ed., JW Arrowsmith Ltd., Bristol, páginas 46-48, 2000). Estos análisis pueden realizarse para los STADS, LTADS y para los STADS y LTADS agrupados por separado. Estos análisis pueden también proporcionarse para los animales machos y hembras por separado y para los animales machos y hembras combinados.

Las diferencias en mortalidad entre las diferentes dosis del rVWF y rVWF+rFVIII con el tampón correspondiente pueden evaluarse para los animales machos y hembras combinados mediante la prueba exacta de Fisher bilateral [mediante el procedimiento de SAS PROC MULTEST]. Este análisis puede realizarse para los STADS y LTADS agrupados. El ajuste por multiplicidad para la comparación de cinco grupos de dosis con el correspondiente tampón se puede aplicar simultáneamente mediante el uso del método de Holm (Scandinavian J. Stat. 6: 65-70, 1979). Se presentan valores p bilaterales no ajustados y ajustados por multiplicidad. No se aplica ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de compuestos diferentes.

Un análisis adicional se realiza para probar la hipótesis de que no hay tendencia a la mortalidad con dosis ascendentes del rVWF+rFVIII así como también del rVWF solo contra la alternativa bilateral mediante el uso de la prueba de tendencia Cochran-Armitage como una prueba exacta [mediante el procedimiento de SAS PROC FREQ, declaración = TENDECIA EXACTA]. Este análisis puede realizarse para los STADS y LTADS agrupados y para machos y hembras combinados.

#### Análisis del Desarrollo de la Masa Corporal

El cambio en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como un porcentaje de la masa corporal en el día 0) es otro punto de evaluación y, en ciertos aspectos, se visualiza mediante el uso de diagramas de caja agrupados por compuesto y dosis. Los animales machos y hembras se combinan, en ciertos aspectos, para estos diagramas de caja. El grupo de tratamiento de HAEMATE® P administrado con una dosis de 4000 RCoU/kg no se incluyó en los diagramas de caja en los ejemplos presentes puesto que solo estaban disponible los datos de 2 animales.

El borde inferior de la caja representó el percentil 25 (o 1er cuartil), el borde superior de la caja representó el percentil 75 (o 3er cuartil) y la línea dentro del borde inferior y el borde superior de la caja indicaron la mediana. El más indicó la media. La distancia desde el borde inferior al borde superior de la caja representó el intervalo intercuartil (IQR). Un bigote se dibujó por encima del percentil 75 al valor de datos más grande que fue menor o igual al valor que fue  $1,5 * IQR$  por encima del percentil 75. Cualquier valor de datos mayor que eso se marcó. Un bigote se dibujó por debajo del percentil 25 al valor de datos más grande que fue menor o igual al valor que fue  $1,5 * IQR$  por debajo del percentil 25. Cualquier valor de datos menor que eso se marcó.

Las medias y los correspondientes intervalos de confianza bootstrap-t de 95 % (Efron y otros, "An Introduction to the Bootstrap." Chapman y Hall / CRC, Boca Raton, Londres, N.Y., Washington D.C., 1993) se presentaron para los cambios en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como A% de la masa corporal en el día 0) agrupados por compuesto y dosis. Estos análisis se realizaron para los cambios desde el día 0 al día 1 (STADS), para los cambios desde el día 0 al día 7 (LTADS) y para los cambios desde el día 0 al día 14 (LTADS) para los animales machos y hembras por separado así como también para los animales machos y hembras combinados. Los intervalos de confianza Bootstrap-t se calcularon en base a 10 000 repeticiones de bootstrap estratificadas por sexo. Los intervalos de confianza bootstrap-t del 95 % bilaterales para las medias se proporcionaron para un tamaño de muestra mayor a 3 animales.

Los diagramas de caja, las medias y los intervalos de confianza correspondiente del 95 % bilaterales para las medias del desarrollo de la masa corporal tienen que interpretarse con mucho cuidado debido a que no incorporan los animales que murieron antes de la fecha de sacrificio planificada. Los animales que mueren antes de la fecha planificada reciben el rango más bajo (Lachin, Controlled Clinical Trials 20: 408-422, 1999) para el cálculo de los valores de p bilaterales. Los valores de p bilaterales son por tanto apropiados para evaluar los efectos en el desarrollo de la masa corporal entre compuestos que las medias y los correspondientes intervalos de confianza del 95 % bilaterales del desarrollo de la masa corporal.

Las diferencias en el desarrollo de la masa corporal entre las diferentes dosis del rVWF y rVWF+rFVIII con el tampón correspondiente se evalúan, por ejemplo, para los cambios desde el día 0 al día 1 (STADS) y para los cambios desde el día 0 al día 14 (LTADS) por separado.

El desarrollo de la masa corporal se compara para los contrastes especificados mediante una prueba de permutación bilateral [por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST, opción = PERMUTACIÓN, declaración = MEDIA DE PRUEBA] estratificada por sexo con 1 000 000 de réplicas de permutación.

El ajuste por multiplicidad para la comparación de cinco grupos de dosis con el correspondiente tampón se aplica simultáneamente, por ejemplo, mediante el uso del método de Holm (Scandinavian J. Stat. 6:65-70, 1979). En los Ejemplos en la presente descripción, se presentan valores de p bilaterales no ajustados y ajustados por multiplicidad. No se aplica ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de diferentes compuestos o para la investigación de diferentes días de estudio.

Las diferencias en el desarrollo de la masa corporal entre HAEMATE® P y la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII se evalúan, por ejemplo, para los cambios desde el día 0 al día 1 (STADS) y para los cambios desde el día 0 al día 14 (LTADS) por separado. Los valores de p bilaterales se calculan mediante pruebas de permutación [por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST, opción = PERMUTACIÓN, declaración = MEDIA DE PRUEBA] estratificadas por sexo con 1 000 000 de réplicas de permutación. No se aplica ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de dos días diferentes de estudio.

La dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estima en un aspecto mediante el uso de contrastes que se prueban en una manera descendiente como sugirió Tamhane y otros. (Biometrics 52:21-37, 1996; procedimiento SD2). Como este análisis es exploratorio, se consideran los contrastes de Helmert lineal e inverso para la estimación donde se reportó el contraste que resultó en la MDD más baja.

La dosis mínima detectable así determinada es un nivel de dosis más alto que la dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL). La dosis mínima detectable se estima, por ejemplo, para rVWF+rFVIII y para rVWF para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 (STADS) así como también para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 (LTADS) por separado.

Los valores de p bilaterales para los contrastes lineales se calculan, por ejemplo, mediante el uso de pruebas de permutación [por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST, opción = PERMUTACIÓN, declaración = MEDIA DE PRUEBA] estratificadas por sexo con 1 000 000 de réplicas de permutación. No se aplica ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de diferentes compuestos o para la investigación de diferentes días de estudio.

Las variables hematológicas y serológicas en, por ejemplo, el día de estudio 1 y día de estudio 14 se visualizan mediante el uso de diagramas de caja agrupados por compuesto y dosis. Los animales machos y hembras se combinan opcionalmente para estas figuras. El grupo de tratamiento de HAEMATE® P administrado con una dosis de 4000 RCoU/kg no se incluyó en los diagramas de caja puesto que solo estaban disponible los datos de 2 animales.

Las variables hematológicas y serológicas en, por ejemplo, el día de estudio 1 y día de estudio 14 se resumen mediante el uso de medias y coeficientes de variación (CV) agrupados por compuesto y dosis. Estas estadísticas se proporcionan para los animales machos y hembras por separado así como también para los animales machos y hembras combinados.

El desarrollo de la masa corporal se ordena, por ejemplo, sobre todos los compuestos investigados por día de estudio. Los animales que mueren antes de la fecha de sacrificio planificada recibieron el rango más bajo. Los rangos del desarrollo de la masa corporal se usan para los contrastes investigados. Los valores perdidos no se reemplazan para el cálculo de las medias e intervalos de confianza correspondientes o para la generación de los diagramas de caja.

Los valores perdidos no se reemplazan para las variables hematológicas y serológicas de los animales que mueren antes de la fecha de sacrificio planificada.

#### Examinación de Varias Patologías

La invención está de acuerdo con el monitoreo y/o la medición de varias patologías, que se refieren a una desviación de un supuesto estado normal. Tales patologías incluyen, pero no se limitan a, patologías clínicas, conductuales, e histológicas.

Si la patología es una "patología clínica," se refleja en una anomalía en un fluido corporal, tal como, pero sin limitar a, sangre y orina. La clínica se observa, por ejemplo, mediante el uso de química, microbiología, hematología o patología molecular. Por ejemplo, la investigación hematológica se usa para detectar una anomalía en el hematocrito, la concentración de hemoglobulina, conteo de eritrocitos, reticulocitos, conteo total de leucocitos, conteo diferencial de leucocitos, anomalías de la morfología de la sangre, conteo plaquetario, hemoglobulina media celular, volumen medio de las células y concentración media de la hemoglobulina celular. La investigación química de la sangre se usa para detectar una anomalía en los niveles de lactato deshidrogenasa (LDH) y/o creatinina cinasa (CK). La orina se examina en busca de orina de color cobre, orina sanguinolenta y otras anomalías de la orina.

Si la patología es una "patología conductual," se observa en un aspecto, mediante el monitoreo de los cambios en la apariencia y conducta del animal. Por ejemplo, las patologías conductuales incluyen, pero no se limitan a, depresión conductual, cambios en la posición corporal (tal como propensa o lateral), disnea, ataxia, inmovilidad, convulsiones, calambres, y piloerección.

Si la patología es una "patología histológica," se observa en un aspecto, mediante el uso de la examinación general, microscópica, o molecular de órganos, tejidos, o cuerpos completos (autopsia o necropsia), que incluye medir las diferencias en la masa corporal.

Se realiza la preparación histológica de los tejidos. Se colectan los cortes de tejido de todas las muestras de tejido en la necropsia de cada animal en los grupos de dosis alta tratados con el compuesto de prueba, los grupos tratados con el compuesto de referencia, los grupos de control así como también se procesan las muestras de tejido de todos los hallazgos macroscópicos, se embeben en parafina, se cortan a un grosor nominal de 2 a 4 micrómetros, se tiñen con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinan con un microscopio óptico por el patólogo del estudio. El mismo proceso se aplica a las muestras de tejido de varios órganos (corazón, cerebro, ojos, riñones, glándulas adrenales, y pulmones) de cada animal en todos los otros grupos tratados con el compuesto de prueba.

Los hallazgos microscópicos se registran por el patólogo durante la examinación histopatológica. Los cortes de tejido se evalúan y cambios histológicos se describen, si es posible, de acuerdo con la distribución, la gravedad y el carácter morfológico. Tales histopatologías incluyen, pero no se limitan a, microtrombos, necrosis del miocardio, perivasculitis coronaria aumentada, degeneración/reparación del miocardio, infarto del miocardio, reparación del miocardio, focos de células gliales, necrosis cortical, hemorragia, incidencia aumentada o gravedad media de un microtrombos, una coagulopatía intravascular diseminada (DIC), púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), cardiopatía isquémica, cambios tromboembólicos, necrosis, perivasculitis coronaria reactiva, inflamación, fibrosis, deposición de hemosiderina, calcificación, infarto renal o una reducción de la masa corporal.

Se entiende que los ejemplos y modalidades descritas en la presente descripción son solo para fines ilustrativos y que varias modificaciones o cambios a la luz del mismo se sugerirán a las personas con experiencia en la técnica.

## EJEMPLOS

5 Los aspectos adicionales y detalles de la invención serán evidentes a partir de los siguientes ejemplos, los cuales se pretende que sean ilustrativos en lugar de limitativos. El Ejemplo 1 describe la toxicidad aguda del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones C57BL/6J. El Ejemplo 2 describe la toxicidad aguda del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones deficientes en el VWF. El Ejemplo 3 describe la toxicidad aguda del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones deficientes en ADAMTS13. El Ejemplo 4 muestra que la toxicidad aguda del rVWF humano en ratones deficientes en ADAMTS13 puede atenuarse con la coadministración de rADAMTS13 humana. El Ejemplo 5 muestra que ADAMTS13 murina no reacciona con el rVWF. El Ejemplo 6 describe la aplicación intravenosa del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones C57BL/6J. El Ejemplo 7 describe la aplicación intravenosa del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones deficientes en el VWF. El Ejemplo 8 describe la aplicación intravenosa del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones deficientes en ADAMTS13. El Ejemplo 9 describe la coadministración de rADAMTS13 humana con el rVWF humano en ratones deficientes en ADAMTS13.

20 Ejemplo 1:

Toxicidad aguda del factor von Willebrand recombinante humano (rVWF) solo o en combinación con el factor VIII recombinante humano (rFVIII) en ratones C57BL/6J

25 El objetivo del estudio fue determinar el perfil de toxicidad aguda del VWF recombinante (rVWF) solo o en combinación con el factor VIII recombinante (rFVIII) (ADVATE®, Baxter) después de una única inyección intravenosa (vía de aplicación clínica) en ratones C57BL/6J. El estudio se realizó para determinar si los eventos trombóticos, especialmente microvasculares, pueden ocurrir después de la administración de los agentes de prueba. Los ratones de la cepa C57BL/6J se eligieron para este estudio debido a que son la cepa de fondo genético de los ratones con deficiencia en el VWF y ADAMTS13 usados en los estudios paralelos de toxicidad aguda (ver Ejemplos 2 y 3).

30 El VWF recombinante, administrado solo o en combinación con el rFVIII, se comparó con la preparación del VWF-FVIII derivado del plasma humano (HAEMATE® P), los correspondientes tampones de solución (control del vehículo) y solución salina isotónica (control negativo).

35 El VWF recombinante se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500, y 250 de cofactor de ristocetina (RCo) U/kg de peso corporal (BW), y en combinación con el rFVIII también a cinco dosis. En la administración combinada, las dosis del rVWF fueron las mismas que en la administración única y las del rFVIII fueron 3077, 1538, 769, 385, y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII, y similares. HAEMATE® P se probó a 2000 RCoU/kg de BW (+ 1347 IU/kg de BW del FVIII). Los tampones correspondientes para rVWF solo, el tampón mezclado, y solución salina isotónica se administraron de acuerdo con el volumen de dosis más alto determinado (es decir, 31,7 mL/kg, 49,3 mL/kg, y 49,3 mL/kg, respectivamente).

45 Cada animal recibió una única inyección intravenosa a través de una vena de la cola, con el objetivo de una velocidad de flujo de 2 ml/min. La asignación de grupos y el régimen de tratamiento se realizaron según se expone en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1: Asignación de Grupo y Regímenes de Tratamiento

5	Grupo		Compuesto	Dosis/Volumen
	plazo corto (1 día)	plazo largo (14 días)		
	A	K	tampón rVWF + ADVATE®	31,7 mL/kg +17,6 mL kg; 49,3 mL/kg
10	B	L	rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg
	C	M	rVWF + rFVIII	1000 RCoU/kg + 769 IU/kg
	D	N	rVWF	1000 RCoU/kg
15	E	O	rVWF + rFVIII	2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg
	F	P	tampón rVWF	31,7 mL/kg
	G	Q	HAEMATE® P	2000 RCoU/kg
20	H	R	Solución salina	49,3 mL/kg
	I	S	rVWF	2000 RCoU/kg
	J	T	rVWF	4000 RCoU/kg
	U	Y	rVWF + rFVIII	500 RCoU/kg + 385 IU/kg
25	V	Z	rVWF	500 RCoU/kg
	W	AA	rVWF + rFVIII	250 RCoU/kg + 192 IU/kg
	X	BB	rVWF	250 RCoU/kg

30 El estudio se dividió en una parte a corto plazo y una parte a largo plazo para evaluar los posibles efectos inmediatos y tardíos. Cada parte consistió en 14 grupos, cada uno que comprende 10 animales (5 machos y 5 hembras). La parte a corto plazo se concluyó un día después del tratamiento y la parte a largo plazo se concluyó después de 14 días de observación. Las muestras de sangre se extrajeron de los ratones bajo anestesia (Ketamina y Xilacina) mediante punción cardíaca el día uno (parte del estudio 1) o el día 14 (parte del estudio 2). Todos los animales sobrevivientes se pesaron al final de cada parte del estudio y las muestras de sangre se extrajeron para el análisis de hematocrito, conteo plaquetario, nivel de lactato deshidrogenasa (LDH), y nivel de creatinina cinasa (CK). Se realizó una necropsia, y los órganos seleccionados (glándulas adrenales, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo, y ojos) se preservaron y evaluaron histopatológicamente.

40 El punto final primario fue la mortalidad. El nivel de actividad y las condiciones físicas se monitorearon de cerca durante las primeras seis horas después de la inyección y después se chequeó diariamente hasta los 14 días para detectar signos indicativos de toxicidad. Todos los animales se pesaron en el día 0 y el día 1 (parte a corto plazo) y el día 1, el día 7 (8) y el día 14 (parte plazo largo) para proporcionar un indicativo de la salud general.

45 Los puntos finales secundarios para las evaluaciones estadísticas fueron el desarrollo de la masa corporal (como un porcentaje de la masa corporal en el día 0) y los cambios en las variables hematológicas y serológicas. Los cambios en las variables hematológicas y serológicas se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva. Las variables analizadas fueron hematocrito, conteo plaquetario, LDH y CK.

50 Bajo las condiciones de este estudio, la administración intravenosa del rVWF solo a dosis de 4000, 2000, 1000, 500, y 250 RCoU/kg de BW solo, o en combinación con el rFVIII a dosis de 3077, 1538, 769, 385, y 192 IU/kg de BW no se asoció con ninguna muerte espontánea. No hubo cambios claros en la masa corporal relacionados con la dosis. La comparación con HAEMATE® P no reveló diferencias significativas estadísticamente.

55 Los síntomas clínicos indicativos de toxicidad en los ratones se observaron en los grupos de dosis altas, aquellos tratados con el rVWF a 4000 o 2000 RCoU/kg de BW con o sin rFVIII. La trombocitopenia fue evidente con el rVWF a dosis de 2000 RCoU/kg de BW o más, solo o en combinación con el rFVIII en el día 1 con recuperación después de 14 días. Otras variables no mostraron cambios biológicamente relevantes. Al comparar los datos de las variables hematológicas y químicas del suero seleccionadas, se observó una caída en el conteo plaquetario en el día 1 después de la administración del rVWF a dosis de 2000 RCoU/kg y más administrado solo o en combinación con el rFVIII. Un aumento en la concentración en la sangre de lactato deshidrogenasa se observó en los grupos tratados con el rVWF a dosis de 2000 RCoU/kg de BW o más en combinación con el rFVIII después del días 1. Todas las variables regresaron a los niveles normales después de 14 días.

65 Los cambios histopatológicos revelaron la imagen de una "cardiopatía isquémica" de bajo grado después de la administración del rVWF a una dosis de 500 RCoU/kg de BW o más solo o en combinación con el rFVIII. Estos

cambios consistieron en microtrombos coronarios, necrosis del miocardio, regeneración/repación del miocardio (todos de gravedad mínima a moderada) y perivasculitis coronaria levemente aumentada. La mayoría de estos cambios mostraron un aumento ligero dependiente de la dosis en la incidencia (y parcialmente también en la gravedad), especialmente en los animales tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII. Indicaron que el rVWF tiene potencial trombogénico en los ratones C57BL/6J a dosis de 500 RCoU/kg o más, ya sea administrado solo o en combinación con el rFVIII.

En los animales, que se sometieron a una necropsia programada el día 1, se registraron cambios tromboembólicos en el corazón, que es altamente sensible a la hipoxia. La oclusión vascular por microtrombos coronarios condujo a un flujo sanguíneo reducido hacia el corazón, lo que provoca necrosis isquémica del miocardio (inanición celular secundaria a una falta de oxígeno) y perivasculitis coronaria reactiva (efectos tempranos).

En los animales, que se sometieron a una necropsia programada el día 14, se registraron cambios predominantemente degenerativos y/o reparativos en el corazón (inflamación, fibrosis, calcificación, deposición de hemosiderina). Estos cambios similares al infarto cardíaco se consideraron ser las consecuencias de una oclusión vascular previa por microtrombos (efectos tardíos).

No pudo demostrarse efecto tóxico para el tratamiento con HAEMATE® P (usado aquí como un control positivo). Esta falta de efecto tóxico con HAEMATE® P es mayormente probable debido a una composición diferente de los multímeros del VWF con la ausencia de formas de peso molecular ultragrande y es debido a que la subunidad del VWF presente en HAEMATE® P se escinde por ADAMTS13. Además, HAEMATE® P contiene una variedad de proteínas de plasma contaminantes, así como también citrato en la composición final, lo que también puede influenciar los resultados.

Debido a que el rVWF humano es resistente a ADAMTS13 murina, los ratones no son capaces de escindir suficientemente la subunidad humana del rVWF y de disminuir los multímeros de peso molecular ultragrande del rVWF mediante ADAMTS13 murina. Además, se encontró mediante análisis de transferencia Western que los ratones normales C57BL/6J tienen el VWF con multímeros de peso molecular ultragrande en la circulación debido a que la actividad de ADAMTS13 se reduce en estos ratones. Por lo tanto, la administración del rVWF humano resulta en niveles circulantes del VWF suprafisiológicos y en particular en un aumento sustancial en la presencia de multímeros ultragrandes del VWF. En consecuencia, los síntomas observados de microtrombosis pueden interpretarse como un efecto farmacológico exagerado.

La "dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL)" para el rVWF en el ratón C57BL/6J fue 250 RCoU/kg de BW. Por lo tanto, los ratones C57BL/6J pueden usarse como un modelo de la TTP si se les administran dosis del rVWF a concentraciones mayores que 250 RCoU/kg de BW.

Con respecto a las diferencias específicas de las cepas del perfil toxicológico del rVWF, los ratones normales C57BL/6J son claramente menos susceptibles que los ratones deficientes en ADAMTS13 al rVWF, pero ligeramente más susceptible al rVWF que los ratones deficientes en el VWF (ver Ejemplos 2 y 3).

Ejemplo 2:

Toxicidad aguda del factor von Willebrand recombinante humano (rVWF) solo o en combinación con el factor VIII recombinante humano (rFVIII) en ratones deficientes en el VWF

El objetivo del estudio fue determinar la toxicidad aguda del rVWF solo o en combinación con el rFVIII (ADVATE®, Baxter) después de una única inyección intravenosa (vía de aplicación clínica) en ratones deficientes en el VWF. Los ratones deficientes en el VWF (Baxter) se eligieron para el estudio debido a que esta cepa transgénica mimetiza las condiciones en pacientes que carecen del VWF.

Un lote del rVWF, administrado solo o en combinación con el rFVIII (ADVATE®), se comparó con una preparación del VWF-FVIII derivado del plasma (HAEMATE® P), los correspondientes tampones de solución (control del vehículo) y solución salina isotónica (control negativo). El VWF recombinante se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500, y 250 cofactor de ristocetina (RCo) U/kg de peso corporal (BW), o en combinación con el rFVIII también a cinco dosis. En la administración combinada, las dosis del rVWF fueron las mismas que en la administración única y las del rFVIII fueron 3077, 1538, 769, 385 y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendiente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII, y similares. HAEMATE® P se probó a 2000 RCoU/kg de BW (+ 1347 IU/kg de BW del FVIII). Los tampones correspondientes para el rVWF solo, el tampón mezclado, y la solución salina isotónica se administraron de acuerdo con el volumen de dosis más alto dado.

Cada animal recibió una única inyección intravenosa a través de una vena de la cola, con el objetivo de una velocidad de flujo de 2 mL/min. Para la asignación de grupo y los regímenes de tratamiento, ver Tabla 2 a continuación:

Tabla 2: Asignación de Grupo y regímenes de Tratamiento

5	Grupo		Compuesto	Dosis/Volumen
	plazo corto (1 día)	plazo largo (14 días)		
	A	K	rVWF + rFVIII	1000 RCoU/kg + 769 IU/kg
	B	L	rVWF	1000 RCoU/kg
10	C	M	rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg
	D	N	tampón rVWF + tampón ADVATE®	31,7 mL/kg + 17,6 mL/kg; 49,3 mL/kg
15	E	O	HAEMATE® P	2000 RCoU/kg
	F	P	rVWF + rFVIII	2000 RCoU/kg+ 1538 IU/kg
	G	O	tampón rVWF	31,7 mL/kg
20	H	R	rVWF	4000 RCoU/kg
	I	S	Solución salina	49,3 mL/kg
	J	T	rVWF	2000 RCoU/kg
	U	Y	rVWF + rFVIII	500 RCoU/kg + 385 IU/kg
25	V	Z	rVWF	500 RCoU/kg
	W	AA	rVWF + rFVIII	250 RCoU/kg + 192 IU/kg
	X	BB	rVWF	250 RCoU/kg

30 El estudio se dividió en una parte a corto plazo y una parte a largo plazo para evaluar los posibles efectos inmediatos y tardíos. Cada parte consistió en 14 grupos, cada uno que comprende 10 animales (5 machos y 5 hembras). La parte a corto plazo se concluyó un día después del tratamiento y la parte a largo plazo se concluyó después de 14 días de observación. Todos los animales sobrevivientes se pesaron al final de cada parte del estudio y las muestras de sangre se extrajeron para el análisis de hematocrito, conteo plaquetario, nivel de lactato deshidrogenasa (LDH) y nivel de creatinina cinasa (CK). Se realizó una necropsia, y los órganos seleccionados (glándulas adrenales, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo, y ojos) se preservaron y evaluaron histopatológicamente.

40 Bajo las condiciones expuestas anteriormente, la administración intravenosa del rVWF solo a dosis de 4000, 2000, 1000, 500 y 250 RCoU/kg de BW solo, o en combinación con el rFVIII a dosis de 3077 1538, 769, 385 y 192 IU/kg de BW no se asoció con ninguna muerte espontánea.

45 El desarrollo de la masa corporal no se afectó por el tratamiento con el rVWF solo o con el rVWF+rFVIII a una dosis de 500 o 4000 RCoU/kg de BW, respectivamente. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre el desarrollo medio de la masa corporal (día 0 a 1 y día 0 a 14) de los animales tratados con HAEMATE® P y aquellos tratados con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII.

50 Los síntomas clínicos se observaron en los animales de los grupos de dosis altas, aquellos tratados con el rVWF a 4000 RCoU/kg de BW con o sin rFVIII. La trombocitopenia fue evidente a dosis del rVWF de 2000 RCoU/kg de BW o más, con o sin rFVIII en el día 1 con recuperación después de 14 días. Otras variables no mostraron cambios biológicamente relevantes.

55 Los cambios histopatológicos revelaron la imagen de una "cardiopatía isquémica" de grado bajo después de la administración del rVWF a dosis de 1000 RCoU/kg de BW o más solo o en combinación con el rFVIII. Ningún efecto tóxico pudo demostrarse para HAEMATE® P. Como se discutió en la presente descripción en el Ejemplo 1, los ratones no son capaces de escindir suficientemente la subunidad del rVWF y disminuir los multímeros de peso molecular ultragrande del rVWF mediante ADAMTS13 murina, debido a que el rVWF humano es resistente a ADAMTS13 murina. Por lo tanto, los síntomas observados de microtrombosis pueden interpretarse como un efecto farmacológico exagerado.

60 El NOAEL para el rVWF en el ratón deficiente en el VWF fue 500 RCoU/kg de BW. Por lo tanto, los ratones deficientes en el VWF pueden usarse como un modelo de la TTP para personas deficientes en el VWF si se le administran a los ratones dosis del rVWF a concentraciones mayores que 500 RCoU/kg de BW.

65

Además, este estudio muestra que la presencia del VWF murino endógeno (como se evidenció en los ratones en el Ejemplo 1) tiene una influencia sobre la toxicidad, debido a que los ratones controles (C57BL/6J) fueron más sensibles al rVWF con un NOAEL de 250 RCoU/kg de BW.

5 Ejemplo 3:

Toxicidad aguda del factor von Willebrand recombinante humano (rVWF) solo o en combinación con el factor VIII recombinante humano (rFVIII) en ratones deficientes en ADAMTS13

10 El objetivo del estudio fue determinar la toxicidad aguda del rVWF solo o en combinación con el rFVIII (ADVATE®, Baxter) después de una única inyección intravenosa (vía de aplicación clínica) en ratones deficientes en ADAMTS13 (Baxter). ADAMTS13 es una proteasa que escinde el VWF para reducir los multímeros de alto peso molecular. Por lo tanto, los ratones knockout para ADAMTS13 no son capaces de escindir la subunidad del rVWF en Tyr1605-MET1606 debido a que carecen de ADAMTS13. En consecuencia, estos ratones no pueden degradar los

15 multímeros ultragrandes del VWF, lo que resulta en la trombosis microvascular en múltiples órganos. Por lo tanto, deben ser susceptibles a los efectos dañinos del rVWF a una dosis mucho menor que sus controles contrapartes. Los ratones deficientes en ADAMTS13 se eligieron para el estudio debido a que esta cepa transgénica mimetiza la condición en pacientes que carecen de la proteasa de escisión ADAMTS13 para el VWF.

20 El VWF recombinante, administrado solo o en combinación con ADVATE®, se comparó con una preparación del VWF-FVIII derivado del plasma (HAEMATE® P), los tampones de solución correspondientes (control del vehículo), y solución salina isotónica (control negativo). El VWF recombinante se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500, y 250 cofactor de ristocetina (RCo) U/kg de peso corporal (BW), o en combinación con el rFVIII también a cinco dosis. En la administración combinada, las dosis del rVWF fueron las mismas que en la

25 administración única y las del rFVIII fueron 3077, 1538, 769, 385, y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII, y similares. HAEMATE® P se probó a 4000 RCoU/kg de BW del VWF (+3322 IU/kg de BW del FVIII) y 2000 RCoU/kg de BW del VWF (+1664 IU/kg de BW del FVIII) (Tabla 3). Los tampones correspondientes para el rVWF solo, el tampón mezclado, y la solución salina isotónica se administraron

30 de acuerdo con el volumen de dosis más alto dado. Por ejemplo, el tampón correspondiente para el rVWF solo se administró a un volumen de 31,7 mL/kg (de acuerdo con el volumen de dosis mayor del rVWF), el tampón mixto (de acuerdo con el volumen mayor de la administración combinada del tampón rVWF + rFVIII) a 49,3 mL/kg y solución salina isotónica a 51,1 mL/kg (de acuerdo con el volumen mayor de HAEMATE® P).

35 Cada animal recibió una única inyección intravenosa a través de una vena de la cola, con el objetivo de una velocidad de flujo de 2 mL/min. Para la asignación de grupo y los regímenes de tratamiento, ver Tabla 3 a continuación:

Tabla 3: Asignación de Grupo y regímenes de Tratamiento

Grupo		Compuesto	Dosis/Volumen
plazo corto (1 día)	plazo largo (14 días)		
A	K	rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg
B	L	rVWF	2000 RCoU/kg
C	M	tampón rVWF + tampón ADVATE®	31,7 mL/kg + 17,6 mL/kg; 49,3 mL/kg
D	N	rVWF + rFVIII	1000 RCoU/kg + 769 RCoU/kg
E	O	rVWF	4000 RCoU/kg
F	P	Solución salina	51,1 mL/kg
G	Q	rVWF	1000 RCoU/kg
H	R	tampón rVWF	31,7 mL/kg
I	S	rVWF + rFVIII	2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg
J	U	HAEMATE® P	2000 RCoU/kg
V	Z	rVWF + rFVIII	500 RCoU/kg + 385 IU/kg
W	AA	rVWF	500 RCoU/kg
X	BB	rVWF + rFVIII	250 RCoU/kg + 192 IU/kg
Y	CC	rVWF	250 RCoU/kg
	T	HAEMATE® P	4000 RCoU/kg

El estudio se dividió en una parte a corto plazo y una a largo plazo para evaluar los posibles efectos inmediatos y tardíos. Cada parte consistió en grupos de 10 animales (5 machos y 5 hembras). La parte a corto plazo se concluyó un día después del tratamiento y la parte a largo plazo se concluyó después de 14 días de observación. Todos los animales sobrevivientes se pesaron al final de cada parte del estudio y se extrajeron muestras de sangre para el análisis de hematocrito, conteo plaquetario, y nivel de lactato deshidrogenasa (LDH). Se realizó una necropsia, y los órganos seleccionados (glándulas adrenales, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo y ojos) se preservaron y evaluaron histopatológicamente.

Se colectan los cortes de tejido de todas las muestras de tejido en la necropsia de cada animal en los grupos de dosis altas tratados con el compuesto de prueba, los grupos tratados con el compuesto de referencia, los grupos controles así como también muestras de tejido de todos los hallazgos macroscópicos se procesaron, se embebieron en parafina, se cortaron a un grosor nominal de 2-4 micrómetros, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron por el microscopio óptico por el patólogo del estudio. Lo mismo se aplicó a las muestras de tejido de varios órganos (corazón, cerebro, ojos, riñones, adrenales y pulmones) de cada animal en todos los otros grupos tratados con el compuesto de prueba.

La mortalidad más alta en este estudio se observó en el grupo tratado con HAEMATE® P al nivel de dosis de 4000 RCoU/kg; el 80 % (8 de 10) murió inmediatamente después de la administración lo que muestra signos inequívocos de sobrecarga de citrato de sodio (se inyectaron 281 mg/kg de citrato con el volumen administrado de 51,1 ml/kg) Como la LD<sub>50</sub> del citrato de sodio después de la aplicación intravenosa en los ratones es 231 mg/kg (Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 8va edición, 1992), la dosis de HAEMATE® P se cambió a 2000 RCoU/kg del VWF. Ninguna mortalidad adicional se observó a este nivel de dosis con HAEMATE® P.

El 40 % (8 de 20) de los animales que recibieron 4000 RCoU/kg del rVWF solo, murieron, mientras que la mortalidad disminuyó a 20 % (4 de 20) en aquellos que recibieron 2000 RCoU/kg. No hubo mortalidad adicional en los grupos de dosis más bajas. El 25 % (5 de 20) de los animales que recibieron 4000 RCoU/kg del rVWF en combinación con 3077 IU/kg del rFVIII murieron. No hubo mortalidad adicional en los grupos de dosis más bajas, incluso en el grupo que recibió 2000 RCoU/kg en combinación con el rFVIII. Como hubo 141 mg/kg de citrato de sodio en el volumen inyectado de los grupos de dosis de 4000 RCoU/ g, esto también puede ser una razón para algunas muertes repentinas en estos grupos. Esta causa de muerte puede excluirse para los casos tardíos en los grupos de dosis altas así como también para las muertes repentinas en los grupos de dosis de 2000 RCoU/kg.

La prueba estadística realizada ad hoc para una tendencia demostró que la probabilidad de muerte aumentaba a medida que aumentaba la dosis del rVWF (valor p bilateral <0,0001).

No hubo mortalidad (0 de 20) con HAEMATE® P administrado a una dosis de 2000 RCoU/kg del VWF + 1664 IU/kg del FVIII, y no hubo mortalidad (0 de 20) con 2000 RCoU/kg del rVWF + 1538 IU/kg del rFVIII.

Las observaciones clínicas revelaron un amplio espectro de anomalías. Los síntomas a corto plazo fueron obviamente causados por la cantidad inyectada de citrato de sodio, debido a que los síntomas típicos para la toxicidad por citrato de sodio (por ejemplo depresión conductual a corto plazo, convulsiones, disnea) se registraron en el 20 % (4 de 20) de los animales del grupo de tampón.

Sin embargo, hubo una clara correlación entre la incidencia y la gravedad de los síntomas de la dosis administrada. El 85 % (17 de 20) de los animales se afectaron después de recibir 4000 RCoU/kg del rVWF, mientras que el 45 % (9 de 20) de los animales se afectaron después de recibir 2000 RCoU/kg del rVWF.

Las anomalías clínicas se observaron en el 75 % (15 de 20) de los animales que recibieron 4000 RCoU/kg en combinación con 3077 IU/kg del rFVIII, mientras que el 35 % (7 de 20) se afectaron después de recibir 2000 RCoU/kg del rVWF en combinación con 1538 IU/kg del rFVIII. No se registraron observaciones clínicas en ninguno de los otros grupos tratados con el rVWF solo o en combinación con el rFVIII.

Los síntomas observados en el grupo tratado con HAEMATE® P al nivel de dosis de 4000 RCoU/kg (90 %, 9 de 10 animales) fueron claramente causados por la sobrecarga de citrato (281 mg/kg) y condujeron a la muerte. Todos los animales afectados (el 40 %, 8 de 20 animales) en los grupos tratados con 2000 RCoU/kg HAEMATE® P también mostraron solo anomalías a corto plazo, indicativas de toxicidad por citrato de sodio (140,5 mg/kg; por ejemplo depresión conductual a corto plazo, convulsiones, disnea). No se registraron síntomas adicionales a largo plazo.

La dosis mínima detectable (MDD) para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 se estimó en 1000 RCoU/kg del rVWF + 769 IU/kg del rFVIII. La dosis de 500 RCoU/kg del rVWF + 385 IU/kg del rFVIII podría considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14, y la dosis más alta del tampón rVWF + rFVIII investigadas (4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg) podría considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14.

65

- La dosis mínima detectable (MDD) para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 para el rVWF administrado solo se estimó en 2000 RCoU/kg. La dosis de 1000 RCoU/kg podría considerarse por lo tanto como la dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1. La dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 se estimó en la dosis más baja del rVWF investigada (250 RCoU/kg). Ninguna dosis entre las dosis del rVWF investigadas podrían considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14. Esta diferencia estimada puede considerarse impredecible debido a que el aumento en la masa corporal (2,3 % vs. 4,8 % para el grupo tampón) es mayor que el de la solución salina (1,8 %) y HAEMATE® P (1,5 %) y similar al del grupo tratado con 250 RCoU/kg del tampón rVWF + rFVIII (2,7 %). El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 1 fue de 0,6 % con HAEMATE® P administrado a una dosis de 2000 RCoU/kg + 1664 IU/kg del FVIII y -7,4 % con la dosis correspondiente del tampón rVWF + rFVIII administrado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral < 0,0001). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas desde el día 0 al día 14.
- Al comparar los datos de las variables hematológicas y químicas del suero seleccionadas en los animales sobrevivientes, se observó una caída en el conteo plaquetario en el día 1 después de la administración de 1000 RCoU/kg del rVWF y dosis superiores, administradas solas o en combinación con el rFVIII. Adicionalmente, el hematocrito disminuyó después de la administración de 2000 RCoU/kg del rVWF y dosis más altas administrado solo o en combinación con el rFVIII.
- En comparación con los grupos controles, la lactato deshidrogenasa aumentó en el día 1 después del tratamiento con 2000 RCoU/kg del rVWF y dosis más altas administradas solas o combinadas con el rFVIII.
- Solo pudo medirse una caída en el conteo plaquetario 1 día después de la aplicación de 2000 RCoU/kg del VWF en HAEMATE® P (+1664 IU/kg del FVIII). Las variables medidas regresaron a la normalidad en todos los grupos afectados después de los 14 días de observación.
- La examinación histopatológica reveló muchos órganos afectados: Corazón (microtrombos coronarios, necrosis del miocardio, perivasculitis coronaria aumentada, degeneración/reparación del miocardio), cerebro (microtrombos, focos de células gliales), ojos (microtrombos), riñones (microtrombos, necrosis cortical), adrenales (microtrombos, hemorragia), y pulmones (incidencia aumentada o gravedad media de microtrombos). Estos cambios patohistológicos pueden resumirse como una coagulopatía intravascular diseminada (DIC). A dosis altas ( $\geq$  2000 RCoU del rVWF), los animales asemejan el cuadro de una púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) en humanos en cierta medida. A dosis más bajas (500-1000 RCoU), el corazón se afectó principalmente con cambios histopatológicos que asemeja el cuadro de una "cardiopatía isquémica" de grado bajo. Por el contrario de los animales tratados con el compuesto de prueba que recibieron producto(s) recombinante(s), tales hallazgos no se registraron en los animales tratados con el compuesto de referencia que recibieron la preparación del VWF-FVIII derivado de plasma humano (HAEMATE® P). Aquí, solo se registraron microtrombos pulmonarios de grado bajo a incidencias similares a aquellas de los animales controles.
- Los cambios tromboembólicos se registraron para uno o varios órganos en los animales tratados con el compuesto de prueba que se sacrificaron en el día 1 programado (o que murieron espontáneamente poco después de la administración). El corazón, que es altamente sensible a la hipoxia, fue el órgano más gravemente afectado. La oclusión vascular por los microtrombos coronarios condujo a un flujo de sangre reducido al corazón lo que causa necrosis isquémica del miocardio (inanición celular secundaria a una falta de oxígeno) y perivasculitis coronaria reactiva (efectos tempranos).
- Los cambios degenerativos y/o reparativos se registraron predominantemente en los corazones (inflamación, fibrosis, deposición de hemosiderina, calcificación) de los animales tratados con el compuesto de prueba que se sacrificaron en el día programado 14 (o que murieron espontáneamente con algún retraso después de la administración). Estos cambios similares al infarto cardíaco se consideraron ser las consecuencias de una oclusión vascular previa por microtrombos (efectos tardíos). La necrosis cortical renal registrada en un animal del grupo tratado con 2000 RCoU/kg del rVWF solo, que murió espontáneamente, puede interpretarse de la misma manera. Aquí, la oclusión vascular de los vasos renales por los microtrombos condujo a un infarto renal.
- Se registraron incidencias bajas de microtrombos (de grado mínimo a leve) sin destrucción acompañante de órganos para varios órganos (pulmones, riñones, cerebro) de los animales controles tratados con solución salina, tampón y también con HAEMATE® P
- Los cambios patológicos registrados consistieron en una microtrombosis adversa en uno o varios órganos. Indicaron un potencial trombogénico del compuesto de prueba, el rVWF, en este modelo animal con una falta de la proteasa de escisión del VWF (ratón deficiente en ADAMST13) a dosis de 500 RCoU/kg del rVWF y mayores, administrado solo o en combinación con el rFVIII. Como no se registraron cambios histopatológicos adversos en los grupos de dosis bajas (el rVWF solo y en combinación con el rVWF) un NOAEL puede establecerse en 250 RCoU/kg.

Debido a su incapacidad de escindir el rVWF, los ratones knockout para ADAMTS13 fueron muy sensibles al tratamiento con el rVWF. De hecho, los ratones knockout para ADAMTS13 representan la cepa murina más sensible q en este estudio. Los resultados pueden interpretarse como un efecto farmacológico exagerado del rVWF a dosis altas causado tanto por la ausencia de ADAMTS13 murina endógena y también por la presencia del VWF murino endógeno que tiene múltímeros ultragrandes del VWF. El NOAEL para el rVWF en el ratón knockout para ADAMTS13 fue 250 RCoU/kg de BW. Por lo tanto, los ratones deficientes en ADAMTS13 pueden usarse como un modelo de la TTP para personas deficientes en ADAMTS13 si se les administran dosis a los ratones del rVWF a concentraciones mayores que 250 RCoU/kg de BW.

La ausencia de ADAMTS13 (knockouts de ADAMTS13) en presencia del VWF murino endógeno tiene el efecto más grave en la mortalidad y la toxicidad, lo que resulta en la trombosis microvascular en múltiples órganos.

Ejemplo 4:

La toxicidad aguda del factor von Willebrand recombinante humano (rVWF) en ratones deficientes en ADAMTS13 puede atenuarse con la coadministración de ADAMTS13

El objetivo de este estudio fue evaluar si la toxicidad aguda del rVWF puede atenuarse mediante la coadministración (es decir, el reemplazo) de ADAMTS13 recombinante en ratones deficientes en ADAMTS13 (Baxter).

Como se expuso en el Ejemplo 3, no hubo efectos sustanciales en los ratones deficientes en ADAMTS13 tratados con HAEMATE® P, que se usó como un control positivo, en comparación con los ratones tratados con el rVWF humano. Esta diferencia se debió a una composición diferente de los múltímeros del VWF en los diferentes compuestos, con la ausencia de formas de peso molecular ultragrande en HAEMATE® P, debido a que la subunidad del VWF presente en HAEMATE® P se escinde por ADAMTS13. Además, HAEMATE® P contiene una variedad de proteínas del plasma contaminantes así como también citrato y ADAMTS13, que también pueden influenciar los resultados.

En el presente estudio, el rVWF humano (BAXTER) se administró a una dosis de 2000 RCoU/kg + rADAMTS13 humana (de células CHO, clon 938, BAXTER) a una dosis de 19,4 µg/kg (según una relación analizada en la preparación derivada del plasma humano, HAEMATE® P). Los compuestos se inyectaron premezclados en la jeringuilla inmediatamente antes de la aplicación (grupo A, 10 ratones) o inyectados consecutivamente como una primera inyección de rADAMTS13, seguida inmediatamente por la inyección del rVWF (grupo B, 10 ratones).

Los animales se observaron en busca de signos indicativos de toxicidad después de la inyección hasta la culminación en el día 1. Como en los estudios previos expuestos anteriormente en la presente descripción, las muestras de sangre se extrajeron bajo anestesia, los tejidos se prepararon para el análisis histológico, y se realizaron necropsias.

No se observaron muertes ni signos de toxicidad clínica en ninguno de los animales, independiente del régimen de tratamiento, lo que demuestra claramente un papel de ADAMTS13 en la reducción de la toxicidad del rVWF.

Al comparar los datos analíticos, se midió una caída en el conteo plaquetario 1 día después de la administración consecutiva de rADAMTS13 y rVWF, por el contrario a la administración de los compuestos premezclados. No hubo hallazgos en la necropsia que dieran un indicativo de una posible asociación relacionada con el compuesto de prueba. Los cambios histopatológicos se registraron para el corazón que consistieron en microtrombos coronarios (de grado mínimo a leve), necrosis del miocardio (de grado mínimo a moderado), y perivasculitis coronaria levemente aumentada en los grupos A y B de los animales tratados con el compuesto de prueba.

Además, se registró una fibrosis de grado leve en un único animal del grupo B tratado con el compuesto de prueba. Este hallazgo, que se caracterizó claramente por signos de cronicidad, se consideró preexistente y por lo tanto no relacionado con el compuesto de prueba puesto que se registró en un animal sacrificado 1 día después de la administración.

Al comparar los dos grupos (A vs. B), y considerar la caída en el conteo plaquetario después de la administración consecutiva de rADAMTS13 y rVWF, no se registró una diferencia pronunciada en la gravedad o la incidencia de los cambios histopatológicos. Sin embargo, por el contrario al estudio expuesto en el Ejemplo 3 (sin coadministración de rADAMTS13), en este estudio no se registró mortalidad ni hallazgos macroscópicos relacionados con el compuesto de prueba en la necropsia. La incidencia y la gravedad de la necrosis del miocardio fue similar en ambos estudios (Ejemplos 3 y 4). Sin embargo, la microtrombosis coronaria y la perivasculitis coronaria fue menos pronunciada con la coadministración de rADAMTS13. Además, con la coadministración de rADAMTS13, los efectos relacionados con el tratamiento solo se registraron para el corazón, mientras que en el estudio sin la coadministración de ADAMTS13 (Ejemplo 3), también se registraron microtrombos para el cerebro, riñones, y pulmones.

La reducción de la actividad precoagulativa del rVWF después de la coadministración con la enzima de escisión ADAMTS13 refleja la importancia de ADAMTS13 para los efectos farmacológicos del rVWF en este modelo animal y también explica parcialmente la falta de toxicidad observada de HAEMATE® P en el Ejemplo 3.

5 Ejemplo 5:

ADAMTS13 murina no reacciona con el rVWF

10 ADAMTS13 es una proteasa que escinde el VWF para reducir los multímeros de alto peso molecular. ADAMTS13 murina no reacciona con el VWF humano recombinante como se demostró en las pruebas *in vitro* así como también *ex vivo*.

15 Los ratones tienen una actividad disminuida de ADAMTS13, por lo tanto el plasma murino contiene multímeros ultragrandes del VWF. La administración del rVWF resultará en niveles suprafisiológicos y en un efecto farmacológico exagerado.

20 El rVWF humano es resistente a la actividad proteolítica de ADAMTS13 murina. Los datos demostraron esto *in vitro* al exponer el rVWF humano a plasmas de varias especies, incluidos los ratones, y e incluso al medir la actividad residual del VWF o visualizar la composición multimérica. Los datos también demostraron la resistencia del VWF humano a ADAMTS13 murina *ex vivo* después de la infusión del rVWF en ratones. Las muestras de plasma obtenidas en varios puntos de tiempo después de las infusiones no mostraron fragmentos del VWF derivados de la acción de la escisión de ADAMTS13 en la Tyr<sup>1605</sup>-Met<sup>1606</sup> (el C-terminal de 176 kD y el N-terminal de 140 kD), consistente con la resistencia del rVWF a ADAMTS13 murina *in vivo*. En contraste, la administración del rVWF a un conejo resultó en el patrón de escisión esperado de la subunidad del VWF con la aparición de los fragmentos en las inmutransferencias que usaron anticuerpos monoclonales. Ver la Figura 1.

25 El rVWF consiste en subunidades intactas del VWF debido a que el rVWF nunca se ha expuesto a la proteólisis específica de ADAMTS13. El VWF derivado del plasma consiste en subunidades que se escinden en Tyr1605-Met1606 en el dominio A2 del VWF. El rVWF no se procesa a multímeros del VWF de menor peso molecular en los ratones, lo que resulta en un efecto farmacológico exagerado y en multímeros potencialmente trombogénicos.

30 Resumen experimental de los Ejemplos 6-9

35 Se estableció un modelo animal para la TTP mediante la exposición de los ratones a varias condiciones y la observación de los síntomas y la toxicidad de la TTP. Los conjuntos de datos se obtuvieron a partir de los ratones tipo silvestre (C57BL/6J), los ratones deficientes en el VWF, y los ratones knockout para ADAMTS13. Los ratones se trataron con una única inyección de: rVWF solo (a una de 5 dosis), rVWF en combinación con el rFVIII (Advate) (cada una de 5 dosis), HAEMATE® P (una preparación comercial del VWF y el FVIII aislado de suero humano), o los tampones correspondientes. Los ratones se observaron en el día 1 y en los 14 días posteriores a la inyección, después de lo cual, se realizaron análisis de necropsia.

40 Más específicamente, las condiciones estudiadas fueron las siguientes. El rVWF se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500, y 250 cofactor de ristocetina (RCo) U/kg de peso corporal (BW), y en combinación con el rFVIII también a cinco dosis. En la administración combinada las dosis del rVWF fueron las mismas que en la administración única y las del rFVIII fueron 3077, 1538, 769, 385 y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendiente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII etc. HAEMATE® P se probó a 2000 RCoU/kg de BW (+ 1347 IU/kg de BW del FVIII). Los tampones correspondientes para el rVWF solo, el tampón mezclado, y la solución salina isotónica se administraron de acuerdo con el volumen de dosis más alto dado.

45 El estudio se dividió en una parte a corto plazo y una a largo plazo para evaluar los posibles efectos inmediatos y tardíos. Cada parte consistió en 14 grupos cada uno que comprende 10 animales (5 machos y 5 hembras). La parte a corto plazo se concluyó un día después de la aplicación y la parte a largo plazo se concluyó después de 14 días de observación. Todos los animales sobrevivientes se pesaron al final de cada parte del estudio y se extrajeron muestras de sangre para el análisis de hematocrito, conteo plaquetario, lactato deshidrogenasa (LDH), y creatinina cinasa (CK). Se realizó una necropsia, y los órganos seleccionados (glándulas adrenales, cerebro, corazón, riñones, hígado, pulmones, bazo y ojos) se preservaron y evaluaron histopatológicamente.

50 1. Materiales

60 Los siguientes materiales se usaron para los experimentos.

65 El factor von Willebrand recombinante humano (rVWF) liofilizado (630,85 IU del VWF:RCo/vial (valor real)) se reconstituyó en 5 ml de agua para la inyección (WFI). Después de la reconstitución, el rVWF estuvo presente a 126 IU del VWF: RCo/ml. El tampón VWF consistió en un tampón hepes/citrato con un agente de carga, un tensioactivo, un agente estabilizante y un aminoácido.

Advate rAHF-PFM (método libre de albúmina de plasma del factor antihemofílico (recombinante); FVIII) estuvo presente a 876 IU/ vial. Después de la reconstitución en WFI, la solución consistió en un tampón Tris, con las sales apropiadas, un agente de carga, un tensioactivo, un agente estabilizante, un aminoácido, y un antioxidante. La solución se almacenó a 2-8 °C.

La mezcla del rVWF y Advate estuvo en una relación de 1,3 partes del rVWF:RCo (IU) a 1 parte de rFVIII(IU).

Los controles del vehículo consistieron en el tampón Citrato para el rVWF y el tampón de combinación, que fue una mezcla del tampón del rVWF y el tampón de Advate. El tampón de combinación se preparó al mezclar la misma relación de volumen para los tampones rVWF y Advate como se mezclaron para el grupo del rVWF y Advate combinado con dosis alta. Se usó solución isotónica salina como un control negativo (0,9 % NaCl).

Se usó HAEMATE® P (complejo del factor von Willebrand, factor antihemofílico, derivado del plasma humano) como un control activo. La composición fue de 1143,4 IU del VWF:RCo/vial, 770 IU del FVIII/vial como se obtuvo de ZLB Behring GmbH, Alemania. Después de la reconstitución en WFI, la composición fue la siguiente: 114,34 IU del VWF:RCo/mL, 77 IU del FVIII/mL en un tampón de NaCl, citrato de sodio, albúmina humana, y glicina.

## 2. Procedimientos

### a. Tratamiento de los animales

Los ratones se enjaularon en jaulas Macrolon II. Los animales se mantuvieron a una temperatura (media  $\pm$  SEM) de  $20,8 \pm 0,44$  °C y  $21,6 \pm 0,36$  °C (intervalo objetivo: 20-24 °C), a una humedad relativa (media  $\pm$  SEM) de  $52,8 \pm 3,51$  % y  $53,5 \pm 2,77$  % (intervalo objetivo: 45-65 %) en la sala 3/1-83 (18 cambio de aire por hora) y a una relación luz:oscuridad de 1:1 (12 h de luz: 12 h oscuridad; iluminación artificial).

Los ratones se asignaron a 28 grupos (A-J y U-X para la parte del estudio de 1 día, y K-T y Y-BB para la parte del estudio de 14 días) de 10 animales (5 machos y 5 hembras) por grupo. Cada grupo recibió uno de los tratamientos siguientes:

- el factor von Willebrand recombinante (rVWF) solo a cinco niveles de dosis
- el rVWF en combinación con Advate (RCoU: IUFVIII en una relación de 1,3:1) a cinco niveles de dosis
- HAEMATE® P
- El tampón de formulación correspondiente para el rVWF solo
- Los tampones de formulación combinada para el rVWF y Advate en la misma relación de volumen que para la dosis alta del rVWF y la combinación Advate
- Solución salina isotónica

El punto final primario fue la mortalidad. El nivel de actividad y las condiciones físicas se monitorearon de cerca durante las primeras 6 horas después de la inyección y después se chequeó diariamente hasta los 14 días para detectar signos indicativos de toxicidad. Todos los animales se pesaron en el día 0 y el día 1 (parte a corto plazo) y el día 1, el día 7 (8) y el día 14 (parte plazo largo) para proporcionar un indicativo de la salud general.

Cada animal recibió una única inyección intravenosa a través de una vena de la cola, con el objetivo de una velocidad de flujo de 2 mL/min. Para la asignación de grupo y el régimen de tratamiento ver Tabla 4 a continuación:

Tabla 4: Asignación y Régimen de tratamiento de los grupos

5	Grupo		Ítem	Dosis/Volumen
	plazo corto (1 día)	plazo largo (14 días)		
	A	K	rVWF tampón + tampón Advate	31,7 mL/kg + 17,6 mL/kg; 49,3 mL/kg
10	B	L	rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg
	C	M	rVWF + rFVIII	1000 RCoU/kg + 769 IU/kg
	D	N	rVWF	1000 RCoU/kg
15	E	O	rVWF + rFVIII	2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg
	F	P	tampón rVWF	31,7 mL/kg
	G	Q	HAEMATE® P	2000 RCoU/kg
	H	R	Solución salina	49,3 mL/kg
20	I	S	rVWF	2000 RCoU/kg
	J	T	rVWF	4000 RCoU/kg
	U	Y	rVWF + rFVIII	500 RCoU/kg + 385 IU/kg
25	V	Z	rVWF	500 RCoU/kg
	W	AA	rVWF + rFVIII	250 RCoU/kg + 192 IU/kg
	X	BB	rVWF	250 RCoU/kg

30 b. Análisis de la masa corporal

El cambio en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) se visualizaron mediante el uso de diagramas de caja agrupados por ítem y dosis. Los animales machos y hembras se combinaron para estos diagramas de caja. (Ver las Figuras 2-4, 13-15, 24-26)

35 Los diagramas de caja se diseñan como sigue. El borde inferior de la caja representó el percentil 25 (o 1er cuartil), el borde superior de la caja representó el percentil 75 (o 3er cuartil) y la línea dentro del borde inferior y el borde superior de la caja indicaron la mediana. El más indicó la media. La distancia desde el borde inferior al borde superior de la caja representó el intervalo intercuartil (IQR). Un bigote se dibujó por encima del percentil 75 al valor de datos más grande que fue menor o igual al valor que fue  $1,5 * IQR$  por encima del percentil 75. Cualquier valor de datos mayor que eso se marcó. Un bigote se dibujó por debajo del percentil 25 al valor de datos más grande que fue menor o igual al valor que fue  $1,5 * IQR$  por debajo del percentil 25. Cualquier valor de datos menor que eso se marcó.

45 Las medias y los correspondientes intervalos de confianza bootstrap-t de 95 % (Efron B y Tibshirani RJ, An Introduction to the Bootstrap, Chapman y Hall / CRC, Boca Raton, Londres, N.Y., Washington D.C., páginas 160-167 (1993)) se presentaron para los cambios en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) agrupados por ítem y dosis. Estos análisis se realizaron para los cambios desde el día 0 al día 1 (STADS y LTADS agrupados, para los cambios desde el día 0 al día 7 (LTADS) y para los cambios desde el día 0 al día 14 (LTADS) para los animales machos y hembras por separado así como también para los animales machos y hembras combinados. Los intervalos de confianza Bootstrap-t se calcularon basados en 100 000 repeticiones de bootstrap estratificadas por sexo y conjunto de datos.

55 Las diferencias en el desarrollo de la masa corporal entre las diferentes dosis del rVWF y rVWF+rFVIII con el tampón correspondiente se evaluaron para los cambios desde el día 0 al día 1 (STADS y LTADS agrupados) y para los cambios desde el día 0 al día 14 (LTADS) por separado.

60 El desarrollo de la masa corporal se comparó para los contrastes especificados por una prueba de permutación bilateral (por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST, opción = PERMUTACIÓN, declaración = MEDIA DE PRUEBA) estratificadas por sexo con 1 000 000 de réplicas de permutación.

65 El ajuste por multiplicidad para la comparación de dos grupos de dosis con el tampón correspondiente simultáneamente se aplicó mediante el uso del método de Holm (1979) (Holm S., Scandinavian Journal of Statistics, 6:65-70 (1979)). Se presentaron valores p bilateral no ajustados y ajustados por multiplicidad. No se aplicó ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de ítems diferentes o para la investigación de días diferentes de estudio.

- 5 Las diferencias en el desarrollo de la masa corporal entre HAEMATE® P y la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII se evaluaron para los cambios desde el día 0 al día 1 (STADS y LTADS agrupados) y para los cambios desde el día 0 al día 14 (LTADS) por separado. Los valores de p bilaterales se calcularon mediante pruebas de permutación [por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST, opción = PERMUTACIÓN, declaración = MEDIA DE PRUEBA] estratificadas por sexo con 1 000 000 de réplicas de permutación. No se aplicó ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de dos días diferentes de estudio.
- 10 La dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estimó mediante el uso de contrastes que se probaron de una manera descendiente como sugirió Tamhane y otros (Biometrics, 52:21-37 (1996)). Como este análisis es exploratorio, se consideraron los contrastes de Helmert lineal e inverso para la estimación donde se reportó el contraste que resultó en la MDD más baja.
- 15 La dosis mínima detectable así determinada es un nivel de dosis más alto que la dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL). La dosis mínima detectable se estimó para el rVWF+rFVIII y para el rVWF para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 (STADS y LTADS agrupados) así como también para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 (LTADS) por separado.
- 20 Los valores de p bilaterales para los contrastes lineales se calcularon mediante el uso de pruebas de permutación [por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST, opción = PERMUTACIÓN, declaración = MEDIA DE PRUEBA] estratificadas por sexo con 1 000 000 de réplicas de permutación. No se aplicó ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de ítems diferentes o para la investigación de días diferentes de estudio.
- 25 c. Muestreo de sangre, preparación y medición de las variables de hematología y químicas del suero
- 30 Las muestras de sangre se extrajeron bajo anestesia (Ketamina + Xilacina i.m.) mediante punción cardíaca en el día uno (parte del estudio 1) o día 14 (parte del estudio 2). Aproximadamente 300 µL de sangre se colectó en tubos EDTA para la investigación hematológica y aproximadamente 300 µL de sangre se prepararon para la preparación de suero, se llenaron en vasos de muestra y se enviaron a temperatura ambiente al laboratorio para el análisis. Las variables siguientes se investigaron mediante el uso del sistema de hematología ADVIA 120 y Serumchemieanalysegerät Konelab 20i.
- 35 La investigación hematológica comprendió hematocrito, concentración de hemoglobulina, conteo de eritrocitos, reticulocitos, conteo total de leucocitos, conteo diferencial de leucocitos, anomalías de la morfología de la sangre, conteo plaquetario, hemoglobulina media celular, volumen medio de las células, y concentración media de la hemoglobulina celular. La investigación química de la sangre comprendió lactato deshidrogenasa (LDH) y creatinina cinasa (CK).
- 40 Solo se consideraron las variables del hematocrito, conteo plaquetario, LDH y CK para el análisis estadístico.
- 45 Las variables hematológicas y serológicas (hematocrito, conteo plaquetario, LDH, CK) en el día de estudio 1 y día de estudio 14 se visualizaron mediante el uso de diagramas de caja agrupados por ítem y dosis. Los animales machos y hembras se combinaron para estas figuras.
- 50 Las variables hematológicas y serológicas en el día de estudio 1 y día de estudio 14 se resumieron mediante el uso de medias y coeficientes de variación (CV) agrupados por ítem y dosis. Estas estadísticas se proporcionaron para los animales machos y hembras por separado así como también para los animales machos y hembras combinados.
- 50 d. Necropsia e histología
- 55 La necropsia se realizó en todos los animales sobrevivientes en el día 1 (parte del estudio 1) y día 14 (parte del estudio 2). Todos los tejidos modificados macroscópicamente y los siguientes tejidos se colectaron para una examinación histopatológica adicional:
- 60 Glándulas Adrenales
- Cerebro (con médula oblonga)
- 60 Corazón
- Riñón
- Hígado
- 65 Pulmones (perfundidos, sin tráquea)

Bazo

Ojos

5 Todos los órganos y tejidos se fijaron en formaldehído tamponado al 4 % (los ojos en solución de Davidson modificada) y se enviaron al laboratorio histológico a temperatura ambiente para la preparación histológica.

10 Se colectan los cortes de tejido de todas las muestras de tejido en la necropsia de cada animal en los grupos de dosis altas tratados con el ítem de prueba, los grupos tratados con el ítem de referencia, los grupos controles así como también se procesaron las muestras de tejido de todos los hallazgos macroscópicos, se embebieron en parafina, se cortaron a un grosor nominal de 2 a 4 micrómetros, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron por el microscopio óptico por el patólogo del estudio. Lo mismo se aplicó a las muestras de tejido del corazón de cada animal en todos los otros grupos tratados con el ítem de prueba.

15 Los hallazgos microscópicos se registraron por el patólogo durante la examinación histopatológica. En un informe de patología separado, se describieron los cambios histológicos, si era posible, de acuerdo con la distribución, gravedad y carácter morfológico. Los puntajes de gravedad se asignaron como se indica en "Explicación de Códigos y Símbolos."

20 Los hallazgos microscópicos se registraron, y se generaron las tablas de incidencia derivadas de estos datos.

e. Métodos estadísticos y conjuntos de datos

25 La dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estimó para el tampón rVWF + rFVIII así como también para el rVWF mediante el uso de contrastes que se probaron en una manera descendiente. Las diferentes dosis del tampón rVWF + rFVIII y el rVWF se compararon también con el tampón correspondiente.

30 Adicionalmente, HAEMATE® P a una dosis de 2000 RCoU/kg del VWF + 1347 IU/kg del FVIII se comparó con el tampón rVWF + rFVIII a una dosis de 2000 RCoU/kg del rVWF + 1538 IU/kg del rFVIII.

35 Todos los cálculos estadísticos se realizaron con SAS versión 8.2 para Linux (SAS Institute Inc. (2000). SAS OnlineDoco, Versión 8, Febrero de 2000, Cary, NC, USA: SAS Institute Inc.; SAS Institute Inc. (2001). SAS/STAT® Software: Changes and Enhancements, Release 8.2, Cary, NC, EE.UU: SAS Institute Inc.). El nivel de significación estadística se fijó en 5 % Las hipótesis nulas de no diferencias se probaron contra sus alternativas bilaterales.

40 El conjunto de datos del análisis a corto plazo (STADS) consistió en los animales que recibieron el tratamiento en el día 0 del estudio y se sacrificaron en el día 1 del estudio. El conjunto de datos del análisis a largo plazo (LTADS) consistió en los animales que recibieron el tratamiento en el día de estudio 0 y se sacrificaron en el día de estudio 14.

45 El punto final primario para la evaluación estadística fue la mortalidad. Los puntos finales secundarios para las evaluaciones estadísticas fueron el desarrollo de la masa corporal (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) y los cambios en las variables hematológicas y serológicas. Los cambios en las variables hematológicas y serológicas se analizaron mediante el uso de estadística descriptiva. Las variables analizadas fueron hematocrito, conteo plaquetario, LDH y CK.

Ejemplo 6:

50 Aplicación intravenosa del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones C57BL/6J

1. Ratones

55 Los ratones C57BL/6J se eligieron para el estudio debido a que esta cepa es la cepa de fondo genético de los ratones deficientes en el VWF y los ratones deficientes en ADAMTS13 se usaron en los estudios paralelos. En general, los ratones se usan ampliamente en estudios de toxicidad aguda y se reconocen como adecuados para este propósito por las autoridades reguladoras

60 2. Protocolo usado en este estudio

65 No hubo mortalidades con ninguno de los ítems investigados El análisis estadístico de la mortalidad por lo tanto no se realizó Las comparaciones del desarrollo de la masa corporal se planificaron en rangos donde los animales que murieron antes de la medición de la masa corporal recibieron el rango más bajo (Lachin JM, Controlled Clinical Trials, 20(5) 408-422 (1999)). No hubo mortalidad y por lo tanto se realizaron comparaciones del desarrollo de la masa corporal en los cambios relativos ( $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) y no en los rangos correspondientes.

Se investigaron seis diferentes dosis del rVWF y el rVWF + rFVIII. Por esta razón, la dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estimó en una manera descendiente mediante el uso de contrastes.

Las variables hematológicas y serológicas agrupadas por ítem y día de estudio se resumieron mediante el uso de medias y coeficientes de variación en lugar de medianas e intervalos debido a que los coeficientes de variación son independientes de la escala y permiten la evaluación de las diferencias en variabilidad de dosis en las variables de laboratorio.

### 3. Anomalías clínicas

Las anomalías clínicas indicativas de toxicidad se observaron después de la administración de 4000 RCoU/kg del rVWF en el 75 % (15 de 20, grupos J y T) de los animales, y en el 85 % (17 de 20, grupos B y L) de los animales después de la administración combinada de 4000 RCoU/kg del rVWF y 3077 IU/kg del rFVIII.

Los síntomas a corto plazo se observaron también en el 20 % (4 de 20, grupos A y K) de los animales tratados con las soluciones combinadas de tampón (volumen total de 49,3 mL/kg). Todos los otros grupos tratados fueron normales durante el período de observación.

Un resumen de las anomalías clínicas de los animales por grupo se presenta en la Tabla 5.

Tabla 5: Anomalías clínicas en los animales

Ítem	dosis	grupo	Animal núm.	Síntomas
rVWF	4000 RCoU/kg	J	46	depresión conductual hasta 6 horas
			48	posición boca abajo, disnea 3 min; depresión conductual hasta 6 horas
			50	depresión conductual hasta 6 horas
			146	posición boca abajo, disnea; depresión conductual hasta 6 horas
			147	depresión conductual hasta 6 horas
			148	depresión conductual hasta 6 horas
			149	depresión conductual hasta 6 horas
rVWF	4000 RCoU/kg	T	96	ataxia, depresión conductual hasta 6 horas
			97	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			98	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			99	piloerección hasta 6 horas
			197	posición lateral, disnea; depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
		B	198	depresión conductual breve
			199	depresión conductual hasta 6 horas
			200	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			6	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			7	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			8	posición lateral, disnea 2 min; depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			9	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas

5	rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg		10	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
10				106	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
				107	depresión conductual hasta 6 horas
				109	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
15				110	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
20	rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg	L	56	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
				57	piloerección hasta 6 horas
				58	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
25				59	depresión conductual (breve)
				60	disnea, depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
30				157	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
	158	depresión conductual hasta 6 horas			
	159	depresión conductual hasta 6 horas			
35	rVWF tampón + tampón Advate	49,3 mL/kg	A	4	depresión conductual breve
				102	posición lateral, convulsiones, disnea; 0,5 min
				104	depresión conductual breve
40			K	51	disnea 1 min

4. Análisis de la masa corporal

El cambio en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) se visualizaron mediante el uso de diagramas de caja agrupados por ítem y dosis. Los animales machos y hembras se combinaron para estos diagramas de caja (Figuras 2-4). Una comparación del desarrollo de la masa corporal también se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen del análisis de la masa corporal

Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [U/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a Día 14		
				N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media
NaCl	0		Hembra	10	1,3 %	-0,7 % a 2,9 %	5	2,8 %	-2,2 % a 6,5 %	5	4,5 %	-5,4 % a 7,6 %
			Macho	10	-0,2 %	-1,1 % a 0,9 %	5	5,4 %	2,7 % a 8,9 %	5	10,2 %	1,6 % a 12,9 %
			Agrupados	20	0,6 %	-0,3 % a 1,5 %	10	4,1 %	2,0 % a 5,7 %	10	7,3 %	5,1 % a 9,5 %
HAEMA T E® 2000 P		1347	Hembra	10	-3,1 %	-4,1 % a -2,1 %	5	-1,2 %	-7,1 % a 0,5 %	5	3,3 %	-15,4 % a 10,5 %
			Macho	10	1,0 %	-1,5 % a 12,3 %	5	1,1 %	-1,7 % a 6,1 %	5	6,0 %	3,7 % a 13,0 %
			Agrupados	20	-1,1 %	-2,3 % a 1,8 %	10	-0,0 %	-1,5 % a 2,0 %	10	4,7 %	-1,1 % a 7,7 %
tampón rVWF	0		Hembra	10	2,8 %	0,8 % a 5,8 %	5	4,4 %	2,1 % a 6,3 %	5	4,6 %	2,1 % a 10,4 %
			Macho	10	-1,8 %	-5,1 % a -0,2 %	5	2,3 %	-40,4 % a 6,3 %	5	6,0 %	-7,6 % a 12,1 %
			Agrupados	20	0,5 %	-0,9 % a 1,9 %	10	3,3 %	-4,0 % a 5,1 %	10	5,3 %	1,1 % a 8,4 %
tampón rVWF+ rFVIII	0		Hembra	10	1,6 %	-0,2 % a 2,6 %	5	0,0 %	-15,1 % a 2,7 %	5	1,5 %	-2,3 % a 2,9 %
			Macho	10	0,4 %	-0,2 % a 1,3 %	5	2,5 %	0,4 % a 4,5 %	5	8,9 %	-5,1 % a 12,1 %
			Agrupados	20	1,0 %	-0,3 % a 1,6 %	10	1,3 %	-1,2 % a 2,5 %	10	5,2 %	3,8 % a 7,5 %

Ítem	Dosis del VWF:RCo [IU/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a Día 14			
				N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media	
rVWF	250	0	Hembra	10	-2,1 %	-5,2 % a 3,3 %	5	-2,3 %	-5,5 % a -0,5 %	5	2,3 %	-14,0 % a 12,4 %	
			Macho	10	-2,2 %	-3,7 % a -0,7 %	5	1,4 %	-8,0 % a 6,2 %	5	5,6 %	1,4 % a 16,8 %	
			Agrupados	20	-2,2 %	-3,8 % a 0,0 %	10	-0,4 %	-2,3 % a 2,2 %	10	3,9 %	-1,5 % a 7,8 %	
			Hembra	5	-0,1 %	-2,5 % a 9,1 %	5	-2,3 %	-4,0 % a 3,7 %	5	0,4 %	-1,9 % a 9,2 %	
			Macho	5	0,6 %	-10,2 % a 28,3 %	5	1,9 %	-1,7 % a 5,5 %	5	8,3 %	-2,6 % a 12,7 %	
				Agrupados	10	0,2 %	-4,1 % a 8,0 %	10	-0,2 %	-1,4 % a 1,3 %	10	4,3 %	2,7 % a 6,6 %
	1000	0	Hembra	10	-0,2 %	-1,5 % a 0,9 %	5	-1,3 %	-4,8 % a 12,4 %	5	2,1 %	-1,1 % a 4,7 %	
			Macho	10	-0,5 %	-1,3 % a 0,2 %	5	1,0 %	-3,4 % a 5,2 %	5	8,1 %	0,5 % a 12,1 %	
			Agrupados	20	-0,3 %	-1,0 % a 0,3 %	10	-0,2 %	-2,2 % a 1,9 %	10	5,1 %	3,3 % a 7,4 %	
			Hembra	10	0,4 %	-2,1 % a 3,2 %	5	1,5 %	-5,3 % a 7,1 %	5	6,5 %	-0,7 % a 17,2 %	
Macho			10	0,2 %	-0,6 % a 0,8 %	5	5,3 %	3,7 % a 10,1 %	5	10,8 %	8,3 % a 13,1 %		
2000	0	Agrupados	20	0,3 %	-0,8 % a 1,5 %	10	3,4 %	0,5 % a 5,3 %	10	8,7 %	4,5 % a 11,0 %		
		Hembra	10	0,3 %	-1,1 % a 1,7 %	5	-0,1 %	-3,2 % a 4,0 %	5	5,6 %	-3,6 % a 13,5 %		
		Macho	10	0,3 %	-1,1 % a 1,7 %	5	-0,1 %	-3,2 % a 4,0 %	5	5,6 %	-3,6 % a 13,5 %		
4000	0	Agrupados	20	0,3 %	-0,8 % a 1,5 %	10	3,4 %	0,5 % a 5,3 %	10	8,7 %	4,5 % a 11,0 %		
		Hembra	10	0,3 %	-1,1 % a 1,7 %	5	-0,1 %	-3,2 % a 4,0 %	5	5,6 %	-3,6 % a 13,5 %		
		Macho	10	0,3 %	-1,1 % a 1,7 %	5	-0,1 %	-3,2 % a 4,0 %	5	5,6 %	-3,6 % a 13,5 %		

ES 2 713 270 T3

Ítem	Dosis del VWF:RCo [IU/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a Día 14		
				N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media
			Macho	10	-4,1 %	-6,5 % a -2,6 %	5	1,0 %	-0,7 % a 3,7 %	5	4,4 %	1,0 % a 19,2 %
			Agrupados	20	-1,9 %	-3,1 % a -1,0 %	10	0,4 %	-1,1 % a 2,0 %	10	5,0 %	2,0 % a 8,6 %
rVWF+ rFVIII	250	192	Hembra	10	-2,5 %	-3,5 % a -1,0 %	5	-0,8 %	-13,0 % a 29,3 %	5	3,1 %	-8,6 % a 32,4 %
			Macho	10	-1,3 %	-4,0 % a 0,7 %	5	5,7 %	-20,3 % a 12,5 %	5	10,3 %	-3,5 % a 15,9 %
			Agrupados	20	-1,9 %	-3,1 % a -0,7 %	10	2,4 %	-5,2 % a 8,9 %	10	6,7 %	-0,2 % a 12,8 %
	500	385	Hembra	5	0,6 %	-5,8 % a 6,3 %	5	0,4 %	-4,6 % a 8,8 %	5	3,5 %	-0,6 % a 13,2 %
			Macho	5	0,1 %	-1,6 % a 1,9 %	5	1,1 %	-1,3 % a 33,2 %	5	6,0 %	2,1 % a 14,5 %
			Agrupados	10	0,4 %	-2,2 % a 2,9 %	10	0,7 %	-1,7 % a 4,0 %	10	4,8 %	2,2 % a 9,2 %
	1000	769	Hembra	10	-0,3 %	-1,3 % a 0,8 %	5	-1,7 %	-4,6 % a 2,7 %	5	0,3 %	-17,5 % a 7,0 %
			Macho	10	-0,4 %	-1,3 % a 0,6 %	5	0,2 %	-4,9 % a 2,6 %	5	5,0 %	1,7 % a 11,4 %
			Agrupados	20	-0,3 %	-0,9 % a 0,3 %	10	-0,7 %	-2,4 % a 0,8 %	10	2,6 %	-2,8 % a 5,2 %
	2000	1538	Hembra	10	-2,0 %	-3,2 % a -1,1 %	5	1,5 %	-0,3 % a 6,8 %	5	4,2 %	3,4 % a 6,6 %

Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [U/kg]	Sexo	N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media	N	Media	95 % CI para Media
			Macho	10	-1,2 %	-3,2 % a 0,6 %	5	5,2 %	2,2 % a 13,6 %	5	11,2 %	2,7 % a 23,6 %
			Agrupados	20	-1,6 %	-2,6 % a -0,6 %	10	3,4 %	1,8 % a 6,3 %	10	7,7 %	5,4 % a 14,4 %
	4000	3077	Hembra	10	-2,7 %	-4,6 % a -1,0 %	5	0,7 %	-1,2 % a 3,1 %	5	3,5 %	2,2 % a 5,9 %
			Macho	10	-3,2 %	-5,5 % a -1,9 %	5	2,5 %	0,3 % a 5,6 %	5	8,4 %	5,4 % a 19,6 %
			Agrupados	20	-2,9 %	-4,1 % a -1,9 %	10	1,6 %	0,4 % a 2,9 %	10	6,0 %	4,8 % a 8,3 %

5 Hubo disminuciones mayores estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5%) en la masa corporal desde el día 0 hasta el día 1 con dosis de 4000+3077 (media  $\Delta\%$  de -2,9 %) y con 2000+1538 (media  $\Delta\%$  de -1,6%) que con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de 1,0%). También hubo una disminución mayor estadísticamente significativa en el desarrollo de la masa corporal con una dosis de 250+192 (media  $\Delta\%$  de -1,9 %) que con el tampón correspondiente (valor de p bilateral ajuste por multiplicidad = 0,0033).

10 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14 entre las diferentes dosis del rVWF+rFVIII y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad fueron mayores que el 5 %.

La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más baja investigada donde el valor de p bilateral fue todavía por debajo de 5 %. La dosis mínima detectable fue por lo tanto 250 U/kg del VWF:RCo + 192 IU/kg del FVIII.

15 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más alta. El valor de p bilateral para la dosis más alta fue 0,8476, que estuvo por encima del 5 %, y no se investigaron más contrastes. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 con el rVWF+rFVIII y la dosis más alta investigada podría considerarse como la dosis NOAEL.

20 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1 (como  $\Delta\%$  desde el día 0) entre las diferentes dosis del rVWF y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad fueron mayores que el 5 %. La comparación de la dosis más alta (media  $\Delta\%$  de -1,9 %) y la dosis más baja (media  $\Delta\%$  de -2,2) del rVWF con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de 0,5%) resultó en valores de p bilaterales no ajustados por debajo del 5 % mientras que los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad estuvieron por encima del 5 %. Por lo tanto, estos resultados significativos pueden haberse producido de casualidad con una probabilidad de más del 5 % si la hipótesis nula fuera verdadera.

30 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14 (como  $\Delta\%$  desde el día 0) entre las diferentes dosis del rVWF y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad fueron mayores que el 5 %.

35 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 así como también para los cambios desde el día 0 al día 14 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más alta. Los valores de p bilaterales para la dosis más alta estuvieron por encima del 5 % y no se investigaron más contrastes. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 o para los cambios desde el día 0 al día 14 con el rVWF y la dosis más alta investigada podría considerarse como la dosis NOAEL.

40 El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 1 fue -1,1 % (95 % CI: - 2,3 % a 1,8 %) con HAEMATE® P y -1,6% (95% CI: -2,6% a -0,6 %) con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,6931).

45 El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 14 fue 4,7% (95% CI: - 1,1% a 7,7%) con HAEMATE® P y 7,7% (95% CI: 5,4% a 14,4%) con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,2289).

## 50 5. Variables hematológicas y serológicas

Las variables hematológicas y serológicas (hematocrito, conteo plaquetario, LDH, CK) en el día de estudio 1 y día de estudio 14 se visualizaron mediante el uso de diagramas de caja agrupados por ítem y dosis. Los animales machos y hembras se combinaron para estas figuras.

55 Las variables hematológicas y serológicas en el día de estudio 1 y día de estudio 14 se resumieron mediante el uso de medias y coeficientes de variación (CV) agrupados por ítem y dosis. Estas estadísticas se proporcionaron para los animales machos y hembras por separado así como también para los animales machos y hembras combinados.

60 Se presenta una comparación de hematocrito, conteo plaquetario, LDH y CK indicados como diagramas de caja en las Figuras 5-12 y Tablas 7-10.

65

Tabla 7: Resumen de los datos del hematocrito

Hematocrito (%)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	45,3	3,6	5	43,6	3,9
			Hembra	5	42,6	2,9	5	43,8	2,1
			Agrupados	10	44,0	4,4	10	43,7	3,0
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	44,1	4,6	5	43,0	3,1
			Hembra	5	42,5	4,9	5	42,8	3,3
			Agrupados	10	43,3	4,9	10	42,9	3,1
tampón rVWF	0	0	Macho	5	44,2	2,2	5	43,7	2,3
			Hembra	5	40,8	2,7	5	42,7	2,2
			Agrupados	10	42,5	4,8	10	43,2	2,5
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	39,7	16,5	5	44,8	4,2
			Hembra	5	39,9	10,8	5	43,9	4,4
			Agrupados	10	39,8	13,2	10	44,4	4,2
rVWF	250	0	Macho	5	44,4	3,4	3	45,9	3,9
			Hembra	4	43,6	2,5	4	52,5	5,4
			Agrupados	9	44,1	3,1	7	49,7	8,4
	500	0	Macho	5	41,7	3,7	5	46,4	3,9
			Hembra	5	44,0	1,4	5	48,3	7,0
			Agrupados	10	42,8	3,8	10	47,4	5,8
	1000	0	Macho	5	41,8	26,1	5	42,9	5,5
			Hembra	5	42,7	3,1	5	43,7	4,4
			Agrupados	10	42,2	17,4	10	43,3	4,8
	2000	0	Macho	5	43,6	5,3	5	43,1	4,3
			Hembra	5	41,9	4,0	5	44,3	1,5
			Agrupados	10	42,8	4,9	10	43,7	3,3
	4000	0	Macho	5	40,5	7,3	4	43,6	3,5
			Hembra	5	40,7	4,9	5	43,4	3,3
			Agrupados	10	40,6	5,8	9	43,5	3,2

rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	43,0	5,9	4	38,7	13,9
			Hembra	5	42,0	5,9	5	46,6	11,0
			Agrupados	10	42,5	5,7	9	43,1	14,9
	500	385	Macho	5	41,6	5,3	4	33,8	51,9
			Hembra	5	42,4	4,1	4	43,6	24,9
			Agrupados	10	42,0	4,6	8	38,7	37,4
	1000	769	Macho	5	44,5	2,4	5	44,5	4,0
			Hembra	5	43,2	3,3	5	43,9	2,8
			Agrupados	10	43,9	3,1	10	44,2	3,4
	2000	1538	Macho	5	42,9	5,5	5	43,3	7,3
			Hembra	5	41,6	4,0	5	43,2	1,7
			Agrupados	10	42,3	4,9	10	43,2	5,0
	4000	3077	Macho	5	41,5	3,4	5	45,0	3,5
			Hembra	5	36,7	10,7	5	44,1	1,8
			Agrupados	10	39,1	9,6	10	44,6	2,9

Tabla 8: Resumen de los conteos plaquetarios

Conteo de plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	1203	15	5	1302	14
			Hembra	5	1252	8	5	1323	5
			Agrupados	10	1227	11	10	1312	10
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	1280	6	5	1380	9
			Hembra	5	1136	7	5	1146	17
			Agrupados	10	1208	9	10	1263	15
tampón rVWF	0	0	Macho	5	1367	3	5	1361	3
			Hembra	5	1174	8	5	1347	5
			Agrupados	10	1270	10	10	1354	4
tampón rVWF +rFVIII	0	0	Macho	5	1242	10	5	1257	13
			Hembra	5	1088	17	5	1067	32
			Agrupados	10	1165	15	10	1162	24
			Macho	5	1202	18	3	1433	10
			Hembra	4	1114	6	4	1080	17
			Agrupados	9	1163	14	7	1231	20

ES 2 713 270 T3

rVWF	250	0	Macho	5	1202	18	3	1433	10
			Hembra	4	1114	6	4	1080	17
			Agrupados	9	1163	14	7	1231	20
	500	0	Macho	5	1202	29	5	1210	16
			Hembra	5	1189	5	5	1084	25
			Agrupados	10	1196	20	10	1147	20
	1000	0	Macho	5	1059	1	5	1356	5
			Hembra	5	876	30	5	1365	5
			Agrupados	10	967	21	10	1361	5
	2000	0	Macho	5	511	47	5	1314	2
			Hembra	5	801	42	5	1336	8
			Agrupados	10	656	48	10	1325	6
	4000	0	Macho	5	93	21	4	1404	15
			Hembra	5	334	107	5	1154	31
			Agrupados	10	214	127	9	1265	25
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	1279	9	4	1202	50
			Hembra	5	1180	3	5	963	23
			Agrupados	10	1229	8	9	1069	39
	500	385	Macho	5	1270	11	4	818	68
			Hembra	5	1081	9	4	951	53
			Agrupados	10	1175	13	8	884	56
	1000	769	Macho	5	1054	18	5	1427	8
			Hembra	5	1132	11	5	1197	4
			Agrupados	10	1093	15	10	1312	11
	2000	1538	Macho	5	284	57	5	1377	9
			Hembra	5	545	41	5	1171	6
			Agrupados	10	414	55	10	1274	11
	4000	3077	Macho	5	93	11	5	1335	24
			Hembra	5	123	14	5	1366	8
			Agrupados	10	108	19	10	1350	16

Tabla 9: Resumen de creatinina cinasa

Creatinina Cinasa (U/L)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	144	21	5	183	27
			Hembra	5	106	40	5	153	53
			Agrupados	10	125	32	10	168	39

ES 2 713 270 T3

HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	159	28	5	147	8.5
			Hembra	5	99	36	5	134	30
			Agrupados	10	129	38	10	141	21
tampón rVWF	0	0	Macho	5	164	35	5	144	28
			Hembra	5	196	45	5	116	29
			Agrupados	10	180	40	10	130	29
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	186	16	5	156	20
			Hembra	5	126	39	5	136	42
			Agrupados	10	156	32	10	146	31
rVWF	250		Macho	5	443	26	3	512	23
			Hembra	5	181	27	2	768	9.2
			Agrupados	10	312	52	5	614	27
	500		Macho	5	538	23	5	573	42
			Hembra	5	354	27	3	527	59
			Agrupados	10	446	32	8	556	44
	1000		Macho	5	250	68	5	123	19
			Hembra	5	116	39	5	110	50
			Agrupados	10	183	75	10	116	35
	2000		Macho	5	239	29	5	169	22
			Hembra	5	112	29	5	195	26
			Agrupados	10	176	48	10	182	24
	4000		Macho	5	261	36	5	344	45
			Hembra	5	153	45	5	108	42
			Agrupados	10	207	46	10	226	73
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	323	38	5	364	65
			Hembra	5	248	30	3	448	33
			Agrupados	10	285	36	8	395	51
	500	385	Macho	5	306	56	3	244	18
			Hembra	5	273	42	2	301	34
			Agrupados	10	289	47	5	267	25
	1000	769	Macho	5	137	35	5	139	11
			Hembra	5	92	23	5	90	49
			Agrupados	10	115	37	10	114	35
	2000	1538	Macho	5	234	44	5	178	14
			Hembra	5	154	39	5	104	24
			Agrupados	10	194	46	10	141	32
	4000	3077	Macho	5	293	16	5	224	98
			Hembra	5	248	15	5	108	19
			Agrupados	10	271	17	10	166	96

ES 2 713 270 T3

Tabla 10: Resumen de los datos de LDH

LDH [U/L]				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	257	17	5	329	42
			Hembra	5	314	37	5	287	56
			Agrupados	10	285	31	10	308	46
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	394	17	5	365	23
			Hembra	5	427	36	5	357	35
			Agrupados	10	411	27	10	361	28
tampón rVWF	0	0	Macho	5	340	47	5	277	23
			Hembra	5	353	28	5	280	27
			Agrupados	10	346	36	10	279	24
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	317	20	5	341	24
			Hembra	5	298	17	5	418	50
			Agrupados	10	308	18	10	380	41
rVWF	250	0	Macho	5	374	18	3	388	21
			Hembra	5	239	35	2	306	9
			Agrupados	10	307	33	5	355	21
	500	0	Macho	5	432	28	5	329	19
			Hembra	5	321	41	3	265	20
			Agrupados	10	377	35	8	305	21
	1000	0	Macho	5	266	35	5	232	21
			Hembra	5	305	30	5	315	47
			Agrupados	10	286	31	10	273	41
	2000	0	Macho	5	434	41	5	315	11
			Hembra	5	263	15	5	530	37
			Agrupados	10	348	44	10	422	42
	4000	0	Macho	5	498	25	5	584	45
			Hembra	5	346	28	5	426	47
			Agrupados	10	422	31	10	505	46
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	313	20	5	391	16
			Hembra	5	251	14	3	344	33
			Agrupados	10	282	21	8	373	22
	500	385	Macho	5	281	34	3	353	20
			Hembra	5	248	23	2	598	74
			Agrupados	10	265	29	5	451	58

	1000	769	Macho	5	273	10	5	289	20
5			Hembra	5	331	19	5	256	28
			Agrupados	10	302	18	10	273	23
			Macho	5	455	28	5	402	41
10	2000	1538	Hembra	5	355	20	5	282	18
			Agrupados	10	405	27	10	342	38
			Macho	5	486	15	5	357	69
15	4000	3077	Hembra	5	547	11	5	329	41
			Agrupados	10	517	14	10	343	55
			Macho	5	486	15	5	357	69

6. Necropsia

20 No hubo hallazgos en la necropsia que indicaran una posible asociación relacionada con el ítem de prueba. Sin embargo, se encontraron y registraron una variedad de cambios incidentales.

7. Histopatología

25 En el estudio a corto plazo (1 día), se registró necrosis del miocardio (de grado mínimo a moderado) en los corazones de los animales tratados con el ítem de prueba de los grupos de 500 RCoU/kg, 1000 RCoU/kg y 2000 RCoU/kg y de dosis altas, que se trataron con el rVWF solo o con una combinación del rVWF y el rFVIII. Adicionalmente, se registraron microtrombos (de grado mínimo a moderado) en los animales tratados con el ítem de prueba de los grupos de 2000 RCoU/kg y de dosis altas que se trataron con el rVWF solo, así como también en los animales de 1000 RCoU/kg y 2000 RCoU/kg y de dosis altas que se trataron con una combinación del rVWF y el rFVIII. Ambos cambios mostraron un aumento claro dependiente de la dosis en la incidencia (y parcialmente también la gravedad), especialmente en los animales tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII.

35 Adicionalmente, se registró una perivasculitis coronaria levemente aumentada en los animales del grupo de dosis de 2000 RCoU/kg que se trataron con el rVWF solo, así como también en los animales de los grupos de 1000 RCoU/kg y 2000 RCoU/kg y de dosis alta que se trataron con una combinación del rVWF y el rFVIII.

40 En el cerebro, se registró un único microtrombo (de grado mínimo) en un animal control tratado con tampón citrato. Este hallazgo no se registró en ningún animal tratado con el ítem de prueba de la parte del estudio a corto plazo (1 día) o en ningún animal de la parte del estudio a largo plazo (14 días). Por lo tanto, este órgano no se investigó en grupos de dosis más bajas.

45 En los pulmones, se registraron incidencias bajas de microtrombos (todos de grado mínimo) en los animales tratados con el ítem de prueba así como también en los controles tratados con HAEMATE® P, solución salina o tampón citrato (incidencia: ≤ 2/10; gravedad media: ≤ 1,0). Sin embargo, no se registraron diferencias entre los animales tratados con el ítem de prueba y los controles. Por lo tanto, este órgano no se investigó en grupos de dosis más bajas.

50 En la parte del estudio a largo plazo (14 días), se registró degeneración/reparación del miocardio (de grado mínimo a moderado) en los corazones de los animales tratados con el ítem de prueba de los grupos de 1000 RCoU/kg y 2000 RCoU/kg y de dosis altas que se trataron con el rVWF solo así como también en los animales de los grupos de 500 RCoU/kg, 1000 RCoU/kg, 2000 RCoU/kg y de dosis altas que se trataron con una combinación del rVWF y el rFVIII. Este cambio mostró un ligero aumento dependiente de la dosis en la incidencia (y parcialmente también en la gravedad) y se caracterizó por la inflamación (principalmente mononuclear) y fibrosis, acompañado por la deposición de hemosiderina y algunas veces también por la calcificación del miocardio.

60 En los pulmones, se registraron bajas incidencias de microtrombos (todas de grado mínimo) en los animal tratados con el ítem de prueba así como también en los controles tratados con HAEMATE® P, solución salina, tampón citrato o tampón de combinación (incidencia: ≤ 1/10; gravedad media: ≤ 1,0). Sin embargo, no se registraron diferencias entre los animales tratados con el ítem de prueba y los controles. Por lo tanto, este órgano no se investigó en los grupos de dosis baja y media.

65 En el sitio de inyección, se registró una trombosis de grado moderado de vasos de la cola en un único animal tratado con el ítem de prueba (grupo de dosis baja) y condujo a una decoloración negra del extremo distal de la cola registrada en la necropsia. Como este hallazgo no se registró en ningún otro animal de este estudio su incidencia y

aparición morfológica no dieron indicios de una asociación relacionada con el ítem de prueba. Esto se consideró estar causado por el procedimiento técnico de la aplicación intravenosa.

#### 8. Discusión

5 Como se estableció anteriormente, el rVWF se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500, y 250  
 cofactor de ristocetina (RCo) U/kg de peso corporal (BW), y en combinación con el rFVIII también a cinco dosis. En  
 la administración combinada las dosis del rVWF fueron las mismas que en la administración única y las del rFVIII  
 fueron 3077, 1538, 769, 385 y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF  
 se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII  
 10 etc. HAEMATE® P, una preparación del VWF-FVIII derivado del plasma, se probó a 2000 RCoU/kg (+ 1347 IU/kg  
 del FVIII). El tampón solo y la solución salina isotónica se incluyeron como controles.

15 Los síntomas indicativos de toxicidad se observaron durante la observación clínica hasta 6 horas en los grupos de  
 dosis altas tratados con 4000 RCoU/kg del rVWF solo (en 15 de 20 animales) y en combinación con el rFVIII (en 17  
 de 20 animales) y en los grupos tratados con el tampón de combinación (en 4 de 20 animales). Los síntomas a corto  
 plazo, como se observó en los grupos de tampón, fueron indicativos de toxicidad por citrato de sodio (por ejemplo  
 disnea, convulsiones, depresión conductual de tiempo breve) debido a que la dosis administrada de citrato de sodio  
 en el volumen correspondiente de 49,3 mL/kg fue 143 mg/kg. Síntomas similares también se observaron en 2 de los  
 20 32 animales afectados de los grupos de dosis altas, lo que indica también efectos de toxicidad por citrato de sodio.  
 Por el contrario, 30 de los 32 animales en los grupos tratados con 4000 RCoU/kg del rVWF solo o en combinación  
 con el rFVIII mostraron síntomas a largo plazo (por ejemplo, depresión conductual, ataxia, piloerección) hasta 6  
 horas después de la administración. Estos síntomas fueron obviamente indicativos de un efecto tóxico directo de la  
 dosis alta, debido a que no se observaron síntomas en ninguno de los otros grupos.

25 No hubo dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón  
 correspondiente, con el rVWF en los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 así como también para los  
 cambios desde el día 0 al día 14. La dosis más alta del rVWF investigada (4000 RCoU/kg) podría considerarse por lo  
 tanto como la dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL).

30 La dosis mínima detectable (MDD) con el tampón rVWF + rFVIII para los cambios en la masa corporal desde el día 0  
 al día 1 se estimó en la dosis más baja del tampón rVWF + rFVIII investigada (250 RCoU/kg + 192 IU/kg del rFVIII).  
 Por lo tanto, ninguna dosis entre las dosis investigadas con el rVWF+rFVIII podría considerarse como la dosis  
 NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1. Este efecto estimado puede  
 considerarse que se produjo por casualidad debido a que hay un aumento del peso en el siguiente nivel de dosis  
 35 más alta de 500 RCoU/kg del rVWF+ 385 IU/kg del rFVIII y la disminución del es moderada en comparación  
 directamente con el grupo tratado con 250 RCoU/kg del rVWF solo (-1,9 % vs. -2,2 %). No hubo dosis mínima  
 detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14, y la dosis más alta del tampón rVWF +  
 rFVIII investigada (4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg del rFVIII) podría considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en  
 términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14.

40 El desarrollo medio de la masa corporal (como  $\Delta\%$  de la masa corporal desde el día 0) desde el día 0 al día 1 fue -  
 1,1 % con HAEMATE® P y -1,6 % con la dosis correspondiente del tampón rVWF + rFVIII. Esta diferencia no fue  
 estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,6931). El desarrollo medio de la masa corporal  
 desde el día 0 al día 14 fue 4,7 % con HAEMATE® P y 7,7 % con la dosis correspondiente del tampón rVWF +  
 45 rFVIII. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,2289).

Al comparar los datos de las variables hematológicas y de la química del suero seleccionadas, se observó una caída  
 en el conteo plaquetario en el día 1 después de la administración de 2000 RCoU/kg del rVWF y más administrado  
 solo o en combinación con el rFVIII. No se observaron cambios después de la administración de HAEMATE® P.

50 La creatinina cinasa aumentó en los días 1 y 14 después de la administración de 250 RCoU/kg y 500 RCoU/kg del  
 rVWF solo o en combinación con el rFVIII. Puede excluirse una dependencia de la dosis debido a que el aumento de  
 estas variables solo se observó en los grupos de dosis más bajas. Además, no se pudo encontrar correlación  
 histopatológica en la dosis más baja.

55 Se observó un aumento de lactato deshidrogenasa para el grupo tratado con una dosis de 2000 RCoU/kg de BW del  
 rVWF o más en combinación con el rFVIII después del día 1.

No hubo hallazgos en la necropsia que indicaran una posible asociación relacionada con el rVWF.

60 Los cambios histopatológicos se registraron para el corazón en los animales tratados con el ítem de prueba tratados  
 con dosis de 500 RCoU del rVWF o más (solo o en combinación con el rFVIII). Estos cambios consistieron en  
 microtrombos coronarios, necrosis del miocardio, degeneración/reparación del miocardio (todo de gravedad mínima  
 a moderada), y perivascularitis coronaria levemente aumentada. La mayoría de estos cambios mostraron un aumento  
 65 ligero dependiente de la dosis en la incidencia (y parcialmente también en la gravedad), especialmente en los  
 animales tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII. Los cambios patohistológicos asemejan el cuadro de

una "cardiopatía isquémica" de grado bajo. Por el contrario a los animales tratados con el ítem de prueba que recibieron producto(s) recombinante(s), tales hallazgos no se registraron en los animales tratados con el ítem de referencia que recibieron una preparación del VWF-FVIII derivado del plasma humano (HAEMATE® P).

5 En los animales tratados con el ítem de prueba que se sacrificaron en necropsia programada el día 1, se registraron cambios tromboembólicos en el corazón, que es altamente sensible a la hipoxia. La oclusión vascular por los microtrombos coronarios condujo a un flujo de sangre reducido al corazón, lo que causa necrosis isquémica del miocardio (inanición celular secundaria a una falta de oxígeno) y perivasculitis coronaria reactiva (efectos tempranos).

10 En los animales tratados con el ítem de prueba que se sacrificaron en necropsia programada el día 14 se registraron predominantemente cambios degenerativos y/o reparativos en el corazón (inflamación, fibrosis, calcificación, deposición de hemosiderina). Estos cambios similares al infarto cardíaco se consideraron ser las consecuencias de una oclusión vascular previa por microtrombos (efectos tardíos).

15 Adicionalmente, se registraron incidencias bajas de microtrombos (todos de grado mínimo) sin destrucción acompañante de órganos para los pulmones (y parcialmente para el cerebro) en los animales tratados con el ítem de prueba así como también animal en los controles tratados con solución salina, tampones y HAEMATE® P. Además, una trombosis de los vasos de la cola se registró en un animal tratado con el ítem de prueba en el estudio. Estos "cambios de fondo" se consideraron estar causados por los procedimientos técnicos (tratamiento i.v. de simulación, muestreo de sangre intracardial) y por lo tanto no se relacionaron con el ítem de prueba.

20 En resumen, los síntomas clínicos indicativos de toxicidad se observaron hasta 6 horas en los grupos de dosis altas tratados con 4000 RCoU/kg de BW del rVWF solo o en combinación con el rFVIII. La trombocitopenia aguda se indujo después de la administración de 2000 RCoU/kg de BW del rVWF y dosis superiores, administrado solo o en combinación con el rFVIII. Los cambios patológicos asemejan el cuadro de una "cardiopatía isquémica" de grado bajo. Indicaron un potencial trombogénico del ítem de prueba, el rVWF, en el ratón C57BL/6J a dosis de 500 RCoU/kg y más, administrado solo o en combinación con el rFVIII.

25 Con respecto a las diferencias específicas de las cepas del perfil toxicológico del rVWF, los ratones C57BL/6J normales son menos susceptibles que los ratones deficientes en ADAMTS13 (Ejemplo 8), pero ligeramente más susceptibles que los ratones deficientes en el VWF (Ejemplo 7).

30 No se realizaron observaciones sustanciales en los ratones C57BL/6J tratados con HAEMATE® P, que se usó en la presente descripción como un control positivo. HAEMATE® P tiene una composición diferente de multímeros del VWF, y carece de formas de peso molecular ultragrande debido a la escisión por ADAMTS13 humana endógena. Además, HAEMATE® P contiene una variedad de proteínas del plasma contaminantes así como también citrato, que también pueden influenciar los resultados.

35 Al considerar todos los resultados, la NOAEL global en los ratones C57BL/6J puede establecerse en 250 RCoU/kg.

40 Ejemplo 7:

45 Aplicación intravenosa del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ratones deficientes en el VWF

#### 1. Ratones

50 Los ratones deficientes en el VWF se eligieron para el estudio debido a que esta cepa transgénica mimetiza la condición en pacientes que carecen del VWF. Los ratones se usan ampliamente en estudios de toxicidad aguda y se reconocen generalmente como adecuados para este propósito por las autoridades regulatorias.

#### 2. Protocolo usado en este estudio

55 No hubo mortalidades con ninguno de los ítems investigados El análisis estadístico de la mortalidad por lo tanto no se realizó Las comparaciones del desarrollo de la masa corporal se planificaron en rangos donde los animales que murieron antes de la medición de la masa corporal recibieron el rango más bajo No hubo mortalidad y por lo tanto se realizaron comparaciones del desarrollo de la masa corporal en los cambios relativos ( $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) y no en los rangos correspondientes.

60 Se planificó un estudio con cuatro dosis diferentes del rVWF y el rVWF+rFVIII (que incluye el tampón correspondiente como la dosis cero) pero finalmente se investigaron seis dosis diferentes del rVWF y el rVWF+rFVIII. Por esta razón, la dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estimó en una manera descendiente mediante el uso de contrastes.

65 Las variables hematológicas y serológicas agrupadas por ítem y día de estudio se resumieron mediante el uso de medias y coeficientes de variación en lugar de medianas e intervalos debido a que los coeficientes de variación son

independientes de la escala y permiten la evaluación de las diferencias en variabilidad de dosis en las variables de laboratorio.

3. Anomalías clínicas

5 No se observaron muertes en este estudio.

10 Los signos clínicos de toxicidad se observaron en 3 de 20 (15 %) animales después de la administración de 4000 RCoU/kg del rVWF solo (grupos H, R), en 4 de 20 (20 %) animales después de la administración de 4000 RCoU/kg del rVWF en combinación con 3077 IU/kg del rFVIII (Advate, grupos C, M), en 4 de 20 animales (20 %) después de la administración de 31,7 mL/kg del tampón del rVWF de formulación correspondiente (grupos G, Q) y también en 4 de 20 animales (20 %) después de la administración de 49,3 mL/kg de los tampones de formulación combinada (grupos D, N).

15 Los síntomas registrados fueron depresión conductual a plazo corto (que duró hasta 2 minutos) después de la inyección, independiente del régimen de tratamiento.

4. Análisis de la masa corporal

20 El cambio en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) se visualizaron mediante el uso de diagramas de caja agrupados por ítem y dosis. Los animales machos y hembras se combinaron para estos diagramas de caja. El análisis de la masa corporal se proporciona en la Tabla 11 y las Figuras 13-15.

25

Tabla 11: Resumen del análisis de la masa corporal

Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a día 14		
				N	Media	95 %CI para la media	N	Media	95 %CI para la media	N	Media	95 %CI para la media
NaCl	0	0	Hembra	10	-3,2 %	-7,2 % a -1,0 %	5	1,7 %	-10,8 % a 18,2 %	5	9,1 %	-1,8 % a 26,5 %
			Macho	10	-3,7 %	-5,1 % a -2,0 %	5	-3,2 %	-9,5 % a 3,4 %	5	0,5 %	-2,2 % a 10,7 %
			Agrupados	20	-3,4 %	-4,8 a -2,1 %	10	-0,8 %	-4,5 % a 5,4 %	10	4,8 %	1,4 % a 13,0 %
HAEMAT E® P	2000	1347	Hembra	10	-1,4 %	-3,0 % a 0,8 %	5	0,1 %	-2,7 % a 6,9 %	5	1,1 %	-11,1 % a 7,5 %
			Macho	10	-1,9 %	-2,9 % a -0,9 %	5	0,8 %	-4,4 % a 5,4 %	5	4,4 %	1,0 % a 13,0 %
			Agrupados	20	-1,7 %	-2,5 % a -0,7 %	10	0,4 %	-1,6 % a 3,0 %	10	2,8 %	-2,1 % a 5,8 %
tampón rVWF	0	0	Hembra	10	-1,1 %	-2,6 % a 0,0 %	5	-0,2 %	-8,6 % a 2,6 %	5	3,3 %	-2,3 % a 17,1 %
			Macho	10	0,0 %	-0,8 % a 0,9 %	5	2,1 %	-1,1 % a 4,5 %	5	9,0 %	-16,9 % a 11,5 %
			Agrupados	20	-0,5 %	-1,3 % a 0,1 %	10	1,0 %	-1,6 % a 2,4 %	10	6,2 %	2,9 % a 8,4 %
tampón rVWF + rFVIII	0	0	Hembra	10	-3,4 %	-5,9 % a -2,8 %	5	-2,3 %	-5,5 % a 1,7 %	5	2,2 %	-6,4 % a 9,9 %
			Macho	10	-1,8 %	-6,4 a 3,7 %	5	1,3 %	-14,6 % a 17,2 %	5	8,4 %	-9,2 % a 33,6 %
			Agrupados	20	-2,6 %	-4,7 % a -0,0 %	10	-0,5 %	-6,0 % a 6,4 %	10	5,3 %	-1,5 % a 15,7 %
rVWF	250	0	Hembra	10	1,9 %	0,3 % a 3,6 %	5	2,3 %	1,4 % a 7,8 %	5	8,4 %	4,9 % a 12,5 %
			Macho	10	0,0 %	-0,6 % a 0,6 %	5	2,6 %	1,8 % a 5,0 %	5	6,9 %	4,9 % a 9,5 %
			Agrupados	20	0,9 %	0,3 % a 1,9 %	10	2,4 %	1,9 % a 3,7 %	10	7,6 %	6,3 % a 9,7 %
	500	0	Hembra	10	-2,3 %	-4,4 % a -0,5 %	5	-1,1 %	-4,2 % a 8,3 %	5	6,6 %	-2,8 % a 17,0 %
			Macho	10	-1,3 %	-2,1 % a -0,1 %	5	-0,0 %	-2,3 % a 3,2 %	5	7,1 %	0,7 % a 11,1 %
			Agrupados	20	-1,8 %	-2,9 % a -0,9 %	10	-0,6 %	-2,3 % a 1,8 %	10	6,9 %	3,2 % a 10,1 %
	1000	0	Hembra	10	-3,0 %	-4,3 % a -1,7 %	5	0,5 %	-41,2 % a 3,1 %	5	0,5 %	-3,7 % a 15,5 %
			Macho	10	-1,1 %	-1,9 % a 0,0 %	5	-0,1 %	-Infinito a 0,4 %	5	2,0 %	0,5 % a 7,1 %
			Agrupados	20	-2,1 %	-2,9 % a -1,3 %	10	0,2 %	-2,0 % a 1,4 %	10	1,3 %	-1,0 % a 3,3 %

Ítem	Dosis del VWF:RCO [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a día 14		
				N	Media	95 %CI para la media	N	Media	95 %CI para la media	N	Media	95 %CI para la media
	2000	0	Hembra	10	-3,1 %	-4,6 % a -0,2 %	5	-1,2 %	-5,5 % a 13,9 %	5	3,9 %	-1,2 % a 36,6 %
			Macho	10	-2,1 %	-5,0 % a -0,4 %	5	-1,8 %	-5,7 % a 1,7 %	5	1,9 %	-2,7 % a 4,5 %
			Agrupados	20	-2,6 %	-3,8 % a -1,4 %	10	-1,5 %	-3,9 % a 1,5 %	10	2,9 %	0,6 % a 7,6 %
	4000	0	Hembra	10	-1,1 %	-2,0 % a 0,4 %	5	-0,5 %	-2,3 % a 14,0 %	5	5,6 %	0,5 % a 9,7 %
			Macho	10	-1,5 %	-3,6 % a 0,6 %	5	-0,8 %	-3,9 % a 2,6 %	5	-2,0 %	-34,5 % a 4,2 %
			Agrupados	20	-1,3 %	-2,3 % a -0,3 %	10	0,7 %	-2,0 % a 2,1 %	10	1,8 %	-4,4 % a 4,5 %
rVWF + FVIII	250	192	Hembra	10	0,7 %	-0,6 % a 2,7 %	5	2,0 %	-32,4 % a 15,1 %	5	7,6 %	2,8 % a 19,8 %
			Macho	10	0,3 %	-1,3 % a 1,3 %	5	1,3 %	-0,9 % a 3,1 %	5	5,2 %	2,9 % a 8,4 %
			Agrupados	20	0,5 %	-0,4 % a 1,4 %	10	1,7 %	-5,0 % a 6,9 %	10	6,4 %	4,2 % a 11,4 %
	500	385	Hembra	10	-3,0 %	-4,2 % a -1,5 %	5	-0,1 %	-4,5 % a 2,2 %	5	6,2 %	2,5 % a 11,1 %
			Macho	10	-0,5 %	-2,5 % a 0,7 %	5	-0,5 %	-5,0 % a 2,6 %	5	7,8 %	4,2 % a 8,9 %
			Agrupados	20	-1,8 %	-2,7 % a -0,9 %	10	-0,3 %	-3,1 % a 1,4 %	10	7,0 %	5,1 % a 8,4 %
	1000	769	Hembra	10	-1,6 %	-3,3 % a -0,1 %	5	-0,7 %	-3,5 % a 4,2 %	5	3,0 %	-0,9 % a 15,9 %
			Macho	10	-0,2 %	-1,0 % a 1,9 %	5	1,8 %	0,5 % a 7,9 %	5	2,8 %	-2,8 % a 7,1 %
			Agrupados	20	-0,9 %	-1,7 % a 0,1 %	10	0,5 %	-1,2 % a 2,1 %	10	2,9 %	0,8 % a 6,0 %
	2000	1538	Hembra	10	-2,9 %	-12,9 % a 2,6 %	5	1,6 %	-2,0 % a 18,1 %	5	6,6 %	-6,4 % a 13,3 %
			Macho	10	-0,7 %	-3,0 % a 0,9 %	5	2,5 %	-1,4 % a 3,8 %	5	6,4 %	2,0 % a 12,9 %
			Agrupados	20	-1,8 %	-6,1 % a 0,8 %	10	2,1 %	0,4 % a 4,3 %	10	6,5 %	2,2 % a 10,4 %
	4000	3077	Hembra	10	-3,8 %	-5,0 % a 0,9 %	5	-3,8 %	-6,2 % a 4,4 %	5	1,4 %	-2,7 % a 14,1 %
			Macho	10	-4,1 %	-6,3 % a -2,9 %	5	-2,6 %	-4,4 % a -2,0 %	5	3,2 %	-0,6 % a 7,0 %

Ítem	Dosis del VWF:RCO [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a día 14		
				N	Media	95 %CI para la media	N	Media	95 %CI para la media	N	Media	95 %CI para la media
			Agrupados	20	-4,0 %	-4,8 % a - 2,8 %	10	-3,2 %	-4,4 % a - 1,8 %	10	2,3 %	-0,0 % a 4,6 %

- 5 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1 (como  $\Delta\%$  desde el día 0) entre las diferentes dosis del rVWF+rFVIII y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad fueron mayores que el 5 %. Hubo un valor de p bilateral no ajustado de 0,0299 para la comparación de la dosis más baja del rVWF+rFVIII (media  $\Delta\%$  de 0,5 %) con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de -2,6 %) mientras que el valor de p bilateral de ajuste por multiplicidad fue 0,1496. Esta disminución significativamente mayor en el desarrollo de la masa corporal con el tampón que con la dosis más baja del rVWF+rFVIII puede haber ocurrido por lo tanto, por casualidad en más del 5 % si la hipótesis nula fuera verdadera.
- 10 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14 entre las diferentes dosis del rVWF+rFVIII y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad fueron mayores que el 5 %.
- 15 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más alta. El valor de p bilateral para la dosis más alta fue 0,1195, que estuvo por encima del 5 %, y no se investigaron más contrastes. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 con el rVWF+rFVIII y la dosis más alta investigada podría considerarse como la dosis NOAEL.
- 20 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más alta. El valor de p bilateral para la dosis más alta fue 0,3031, que estuvo por encima del 5 %, y no se investigaron más contrastes. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 con el rVWF+rFVIII y la dosis más alta investigada podría considerarse como la dosis NOAEL.
- 25 Hubo una mayor disminución estadísticamente significativa (en el nivel de multiplicidad del 5 %) en la masa corporal con una dosis del rVWF de 2000 (media  $\Delta\%$  de -2,6 %) que con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de -0,5 %) desde el día 0 hasta el día 1. Hubo dos valores de p bilaterales no ajustados por debajo del 5 % mientras que los valores de p bilaterales de ajuste por multiplicidad estuvieron por encima del 5 %. Estas diferencias significativas con una dosis de 1000 (media  $\Delta\%$  de -2,1 %) y con una dosis de 250 (media  $\Delta\%$  de 0,9 %) en comparación con el tampón (media  $\Delta\%$  de -0,5%) podía haber ocurrido por lo tanto con una probabilidad de más del 5 % si la hipótesis nula fuera verdadera.
- 30 Hubo una tendencia estadística (ajuste por multiplicidad valor de p bilateral de 0,0693) para aumentos menor en la masa corporal con una dosis del rVWF de 1000 (media  $\Delta\%$  de 1,3 %) que con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de 6,2 %) desde el día 0 al día 14. Hubo un valor de p bilateral no ajustado de 0,0279 para la comparación de la dosis más alta del rVWF (media  $\Delta\%$  de 1,8 %) con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de 6,2 %) mientras que el valor de p bilateral de ajuste por multiplicidad fue 0,1117. Este significativo menor desarrollo de la masa corporal con la dosis más alta del rVWF que con el tampón correspondiente pueden haber ocurrido por lo tanto con una probabilidad de más del 5% si la hipótesis nula fuera verdadera.
- 35 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para 500 U/kg, que fue el primer valor de p bilateral por encima del 5 % (valor de p bilateral = 0,0741). La dosis mínima detectable fue por lo tanto 1000 U/kg del rVWF.
- 40 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para 500 U/kg, que fue el primer valor de p bilateral por encima del 5% (valor de p bilateral = 0,7267). La dosis mínima detectable fue por lo tanto 1000 U/kg del rVWF.
- 45 El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 1 fue -1,7% (95 % CI: - 2,5 % a - 0,7 %) con HAEMATE® P y -1,8 % (95 % CI: -6,1 % a 0,8 %) con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,9499).
- 50 El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 14 fue 2,8 % (95 % CI: -2,1 % a 5,8 %) con HAEMATE® P y 6,5 % (95 % CI: 2,2 % a 10,4 %) con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,1855).
- 55
5. Variables hematológicas y serológicas
- 60 Una comparación de las variables del hematocrito, conteo plaquetario, CK y LDH seleccionadas se muestra en las siguientes figuras 16-23 y Tablas 12-15.
- 65

ES 2 713 270 T3

Tabla 12: Resumen de los datos del hematocrito

Hematocrito (%)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCO [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	41,8	7,4	5	45,3	1,8
			Hembra	5	44,0	6,4	5	44,0	2,6
			Agrupados	10	42,9	7,0	10	44,7	2,6
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	45,8	1,7	5	45,8	4,1
			Hembra	5	43,7	4,1	5	44,3	6,0
			Agrupados	10	44,8	3,8	10	45,1	5,1
tampón rVWF	0	0	Macho	5	44,9	4,1	5	44,0	3,2
			Hembra	5	43,7	1,2	5	42,7	3,9
			Agrupados	10	44,3	3,2	10	43,4	3,7
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	44,1	3,0	5	44,3	2,5
			Hembra	5	45,6	1,4	5	44,2	4,9
			Agrupados	10	44,9	2,8	10	44,2	3,7
rVWF	250	0	Macho	5	45,2	4,7	5	46,4	3,7
			Hembra	5	44,5	6,4	5	47,2	1,4
			Agrupados	10	44,9	5,4	10	46,8	2,8
	500	0	Macho	5	46,6	3,8	5	46,5	3,6
			Hembra	5	43,7	7,1	4	42,9	1,1
			Agrupados	10	45,2	6,3	9	44,9	5,1
	1000	0	Macho	5	43,7	5,3	5	45,9	3,6
			Hembra	5	42,6	10,1	4	44,8	2,3
			Agrupados	10	43,1	7,6	9	45,4	3,2
	2000	0	Macho	5	43,8	2,7	5	45,7	2,6
			Hembra	5	45,2	3,5	5	45,1	3,6
			Agrupados	10	44,5	3,4	10	45,4	3,1
	4000	0	Macho	5	39,2	28,0	5	42,0	12,7
			Hembra	5	44,3	2,6	5	45,1	1,9
			Agrupados	10	41,8	18,8	10	43,6	9,1
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	44,8	2,4	5	43,0	6,4
			Hembra	5	43,2	5,1	5	45,6	4,5
			Agrupados	10	44,0	4,2	10	44,3	6,1
	500	385	Macho	5	41,6	16,3	3	46,4	2,9
			Hembra	5	44,0	5,5	5	46,4	2,5
			Agrupados	10	42,8	11,6	8	46,4	2,5

ES 2 713 270 T3

	1000	769	Macho	5	44,5	4,1	5	45,0	7,0
			Hembra	5	46,0	5,4	3	42,1	10,3
			Agrupados	10	45,3	4,9	8	43,9	8,3
	2000	1538	Macho	5	44,5	1,9	5	44,3	1,1
			Hembra	5	43,7	4,3	5	44,4	3,9
			Agrupados	10	44,1	3,3	10	44,4	2,7
	4000	3077	Macho	5	45,0	6,0	5	45,0	1,9
			Hembra	5	42,5	3,6	5	41,6	10,5
			Agrupados	10	43,8	5,6	10	43,3	8,0

Tabla 13: Resumen de los conteos plaquetarios

Conteo de plaquetas (x10 <sup>3</sup> /μL)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCO [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	1112	4	5	1121	10
			Hembra	5	874	12	5	1029	8
			Agrupados	10	993	15	10	1075	10
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	1102	4	5	1192	10
			Hembra	5	934	12	5	1028	13
			Agrupados	10	1018	12	10	1110	13
tampón rVWF	0	0	Macho	5	1140	4	5	1133	7
			Hembra	5	1064	8	5	940	9
			Agrupados	10	1102	7	10	1037	12
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	1158	5	5	1213	8
			Hembra	5	1050	9	5	1160	5
			Agrupados	10	1104	9	10	1186	7
rVWF	250	0	Macho	5	1157	11	5	1186	4
			Hembra	5	982	9	5	934	8
			Agrupados	10	1070	13	10	1060	14
	500	0	Macho	5	1149	7	5	1161	9
			Hembra	5	970	3	4	996	9
			Agrupados	10	1060	10	9	1088	12
	1000	0	Macho	5	1132	6	5	1230	9
			Hembra	5	908	10	4	998	9
			Agrupados	10	1020	14	9	1127	14
	2000	0	Macho	5	1003	22	5	1130	6
			Hembra	5	874	13	5	1012	13
			Agrupados	10	939	19	10	1071	11

ES 2 713 270 T3

	4000	0	Macho	5	897	12	5	1427	20
			Hembra	5	796	13	5	1051	6
			Agrupados	10	847	13	10	1239	22
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	1272	9	5	1073	17
			Hembra	5	985	11	5	1005	6
			Agrupados	10	1129	16	10	1039	13
	500	385	Macho	5	1159	6	3	1150	8
			Hembra	5	970	6	5	1067	7
			Agrupados	10	1065	11	8	1098	8
	1000	769	Macho	5	1118	10	5	1187	10
			Hembra	5	984	7	3	848	29
			Agrupados	10	1051	11	8	1060	23
	2000	1538	Macho	5	973	5	5	1087	7
			Hembra	5	779	18	5	960	15
			Agrupados	10	876	16	10	1023	13
	4000	3077	Macho	5	502	51	5	1200	6
			Hembra	5	635	13	5	1005	6
			Agrupados	10	569	34	10	1103	11

Tabla 14: Resumen de creatinina cinasa

Creatinina Cinasa (U/L)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCO [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	153	32	5	195	73
			Hembra	5	100	26	5	108	31
			Agrupados	10	126	37	10	151	71
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	152	19	5	102	13
			Hembra	5	150	43	5	88	31
			Agrupados	10	151	31	10	95	23
tampón rVWF	0	0	Macho	5	70	20	5	172	36
			Hembra	5	54	11	5	103	18
			Agrupados	10	62	21	10	137	41
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	236	25	5	123	21
			Hembra	5	138	12	5	136	34
			Agrupados	10	187	35	10	129	28
rVWF	250		Macho	5	116	23	3	237	18
			Hembra	5	103	25	5	156	21
			Agrupados	10	110	23	8	186	29

ES 2 713 270 T3

	500		Macho	5	229	29	5	315	57
			Hembra	5	199	47	5	379	57
			Agrupados	10	214	26	10	347	55
	1000		Macho	5	223	51	5	260	30
			Hembra	5	464	52	5	290	47
			Agrupados	10	344	63	10	275	38
	2000		Macho	5	131	13	5	162	77
			Hembra	5	145	14	5	112	38
			Agrupados	10	138	14	10	137	67
	4000		Macho	5	118	29	5	187	35
			Hembra	5	67	24	5	130	16
			Agrupados	10	92	40	10	159	35
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	112	35	5	174	61
			Hembra	5	88	33	1	127	NA
			Agrupados	10	100	35	6	166	58
	500	385	Macho	5	176	33	5	816	167
			Hembra	5	164	75	5	601	98
			Agrupados	10	170	54	10	709	141
	1000	769	Macho	5	180	39	5	421	43
			Hembra	5	157	18	5	248	71
			Agrupados	10	168	31	10	335	26
	2000	1538	Macho	5	176	29	5	123	26
			Hembra	5	175	51	5	137	15
			Agrupados	10	176	39	10	130	20
	4000	3077	Macho	5	163	42	5	133	29
			Hembra	5	106	40	5	285	83
			Agrupados	10	135	46	10	209	86

Tabla 15: Resumen de los datos de LDH

LDH [U/L]				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	427	11	5	364	25
			Hembra	5	330	25	5	304	32
			Agrupados	10	378	21	10	334	28
HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	504	12	5	368	19
			Hembra	5	302	26	5	296	15
			Agrupados	10	403	31	10	332	20

ES 2 713 270 T3

tampón rVWF	0	0	Macho	5	478	27	5	371	21
			Hembra	5	326	19	5	259	22
			Agrupados	10	402	31	10	315	27
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	518	11	5	416	12
			Hembra	5	274	15	5	318	22
			Agrupados	10	396	35	10	367	21
rVWF	250	0	Macho	5	363	13	5	475	27
			Hembra	5	254	15	5	229	12
			Agrupados	10	309	23	10	352	44
	500	0	Macho	5	375	15	5	415	31
			Hembra	5	305	27	5	428	38
			Agrupados	10	340	22	10	422	33
	1000	0	Macho	5	472	28	5	423	11
			Hembra	5	428	32	5	463	34
			Agrupados	10	450	29	10	443	25
	2000	0	Macho	5	304	8	5	365	43
			Hembra	5	276	23	5	239	14
			Agrupados	10	290	17	10	302	42
	4000	0	Macho	5	439	16	5	371	10
			Hembra	5	315	17	5	220	7
			Agrupados	10	377	24	10	296	28
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	286	18	5	368	25
			Hembra	5	258	19	5	270	21
			Agrupados	10	272	18	10	319	28
	500	385	Macho	5	372	19	5	656	54
			Hembra	5	378	37	5	712	56
			Agrupados	10	375	28	10	684	52
	1000	769	Macho	5	460	30	5	545	34
			Hembra	5	452	23	5	349	47
			Agrupados	10	456	25	10	447	44
	2000	1538	Macho	5	415	18	5	345	11
			Hembra	5	318	23	5	308	34
			Agrupados	10	366	24	10	327	24
	4000	3077	Macho	5	381	21	5	450	15
			Hembra	5	294	27	5	472	51
			Agrupados	10	338	26	10	461	36

6. Necropsia

No hubo hallazgos en la necropsia cuyas incidencias, distribución o apariencia morfológica indicaran una posible asociación relacionada con el rVWF.

7. Histopatología

En el estudio a corto plazo (1 día), se registró necrosis del miocardio (de grado mínimo a leve) en los animales tratados con el ítem de prueba de los grupos de dosis de 1000 RCoU/kg y más, que se trataron con el rVWF solo o con una combinación del rVWF y el rFVIII. Este cambio mostró una ligera relación de dosis, especialmente en los animales tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII. Se registró un único microtrombo (grado leve) en un único animal del grupo de dosis alta tratado con una combinación del rVWF y el rFVIII. Adicionalmente, una ligera incidencia aumentada de perivasculitis coronaria se registró en los animales tratados con el rVWF de los grupos de dosis altas, que se trataron con el rVWF solo o con una combinación del rVWF y el rFVIII.

En el estudio a largo plazo (14 días), se registró degeneración/repación del miocardio mínima en unos pocos animales tratados con el ítem de prueba de los grupos de dosis de 2000 RCoU/kg y más, que se trataron con el rVWF solo o con una combinación del rVWF y el rFVIII. Este cambio fue de grado muy bajo y se caracterizó por inflamación mínima (principalmente mononuclear) y fibrosis, parcialmente acompañado por la deposición de hemosiderina. Adicionalmente, también se registró degeneración/repación del miocardio mínima en un único animal tratado con HAEMATE® P.

Una variedad de otros cambios también se encontraron en este estudio. Estos suelen ocurrir con la aplicación intravenosa. Los microtrombos (de grado mínimo a leve) en los pulmones fueron entre estos hallazgos. Además, se registró una degeneración/repación del miocardio de grado moderado en un único animal en el día 1 (1000 RCoU/kg en combinación con el rFVIII). Las incidencias, distribución y apariencia morfológica de estos cambios no dieron indicios de una asociación relacionada con el rVWF.

#### 8. Discusión

Como se explicó anteriormente, el rVWF se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500 y 250 RCoU/kg de BW, y en combinación con el rFVIII, también a cinco dosis. En la administración combinada, las dosis del rVWF fueron las mismas que en la administración única y las del rFVIII fueron 3077, 1538, 769, 385 y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII, y similares. HAEMATE® P se probó a 2000 RCoU/kg de BW + 1347 IU/kg de BW del rFVIII. El tampón correspondiente para el rVWF solo se administró a un volumen de 31,7 mL/kg (de acuerdo con el volumen de dosis mayor), el tampón mixto a 49,3 mL/kg, y la solución salina isotónica a 49,3 mL/kg.

Se observaron síntomas a corto plazo (principalmente depresión conductual, que duró durante unos pocos minutos) después de la administración de la dosis alta del rVWF solo o en combinación con el rFVIII y los correspondientes volúmenes de tampón, indicativos de toxicidad por citrato de sodio. La incidencia y la gravedad fue similar en todos los grupos afectados.

La dosis mínima detectable (MDD), definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estimó en 1000 RCoU/kg del rVWF para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 así como también para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14. La dosis de 500 RCoU/kg podría considerarse por lo tanto como la dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1 así como también para el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14.

No hubo dosis mínima detectable para el rVWF+rFVIII en los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 así como también para los cambios desde el día 0 al día 14. La dosis más alta del rVWF+rFVIII investigada (4000 RCoU/kg del rVWF + 3077 IU/kg del rFVIII) podría considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1 así como también para el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14.

El desarrollo medio de la masa corporal (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) desde el día 0 al día 1 fue -1,7 % con HAEMATE® P y -1,8 % con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII investigada. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,9499). El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 14 fue 2,8 % con HAEMATE® P y 6,5 % con la dosis correspondiente del rVWF+rFVIII. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,1855).

Al comparar los datos de las variables hematológicas y de la química del suero seleccionadas, se observó una caída en el conteo plaquetario en comparación con los controles tratados con tampón en el día 1 después de la administración de 4000 RCoU/kg del rVWF (-23 %) y 2000 RCoU/kg del rVWF (-15 %) administrado solo o en combinación con el rFVIII (-48 % y -21 %, respectivamente). No se observaron cambios después de la administración de HAEMATE® P.

La creatinina cinasa aumentó en comparación con los grupos controles en el día 1 después de la administración de 1000 RCoU/kg del rVWF solo. Los niveles aumentados se midieron después de los 14 días de observación en los grupos tratados con 500 y 1000 RCoU/kg del rVWF solo y en combinación con el rFVIII. Se observó un aumento de

lactato deshidrogenasa después de los 14 días de observación en el grupo tratado con 500 RCoU/Akg del rVWF en combinación con el rFVIII. Puede excluirse una dependencia de la dosis y es muy improbable una relación con el ítem de prueba debido a que el aumento de estas variables solo se observó en los grupos de dosis más bajas.

5 Los cambios histopatológicos se registraron para el corazón en animales tratados con el rVWF a dosis de 1000 RCoU del rVWF o más (solo o en combinación con el rFVIII). Se encontró microtrombos coronarios, necrosis del miocardio (ambos de grado mínimo a leve) y perivasculitis coronaria levemente aumentada 1 día después de la aplicación (efectos tempranos). Se encontró degeneración/repación del miocardio (grado mínimo) después de 14 días, y puede evaluarse como efectos tardíos. Algunos de estos cambios mostraron una ligera dependencia de la  
10 dosis, especialmente en los animales tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII. Los cambios patohistológicos asemejan el cuadro de una "cardiopatía isquémica" de grado bajo. Por el contrario a los animales tratados con el ítem de prueba que recibieron producto(s) recombinante(s), la mayoría de estos hallazgos no se registraron en los animales tratados con el ítem de referencia que recibieron una preparación del VWF-FVIII derivado del plasma humano (HAEMATE® P). Sin embargo, también se registró una degeneración/repación del  
15 miocardio mínima en un animal tratado con HAEMATE® P (14 días). La relación con el ítem de referencia de este hallazgo no es clara.

Adicionalmente, se registraron incidencias muy bajas de microtrombos de gravedad mínima a ligera sin destrucción acompañante de órganos para los pulmones de los animales tratados con el rVWF así como también de los  
20 animales controles tratados con solución salina. Estos microtrombos, que todos estaban en un estado temprano que no mostraban signos de condensación de fibrina, no se registraron en los animales sacrificados en el día 1. Por lo tanto, este cambio no se consideró relacionado con el ítem de prueba. Este cambio de fondo puede estar causado por una disposición espontánea, que puede potenciarse además por los procedimientos técnicos (por ejemplo, muestreo de sangre intracardial).

25 ADAMTS13 murina no reacciona con el VWF humano recombinante. Por lo tanto, puede asumirse que los hallazgos hematológicos y patohistológicos durante este estudio son causados por el VWF recombinante sin escindir, que incluye trombogenicidad y síntomas de coagulopatía intravascular diseminada (trombocitopenia, microtrombosis). Sin embargo, como este modelo animal no tiene VWF endógeno, fue menos sensible que otras cepas de ratón. El  
30 NOAEL para el rVWF en el ratón deficiente en el VWF fue 500 RCoU/kg de BW.

Al comparar las tres cepas de ratón diferentes, los resultados indicaron lo siguiente. La presencia del rVWF endógeno murino tiene una influencia en la toxicidad, ya que los ratones C57BL/6J tuvieron gravedad aumentada de los síntomas y hallazgos histopatológicos en comparación con los ratones deficientes en el VWF. La ausencia de  
35 ADAMTS13 en presencia del VWF murino endógeno tiene el efecto más grave en la mortalidad y la toxicidad.

Ejemplo 8:

40 Aplicación intravenosa del rVWF humano solo o en combinación con el rFVIII humano en ADAMTS13 deficiente ratones

#### 1. Ratones

45 Los ratones deficientes en ADAMTS13 se eligieron para el estudio debido a que esta cepa transgénica mimetiza la condición de pacientes que carecen de la proteasa ADAMTS13 para el VWF.

#### 2. Protocolo usado en este estudio

50 Un análisis adicional se realizó para probar la hipótesis de que no hay tendencia a la mortalidad con dosis ascendentes del rVWF (con o sin rFVIII) contra la alternativa bilateral mediante el uso de la prueba Cochran-Armitage de tendencia como una prueba exacta (procedimiento de SAS PROC FREQ, declaración = TENDECIA EXACTA).

55 Se investigaron seis diferentes dosis del rVWF y el rVWF + rFVIII. Por esta razón, la dosis mínima detectable (MDD) en el desarrollo de la masa corporal, definida como la dosis mínima que se cambia a partir del tampón correspondiente, se estimó en una manera descendiente mediante el uso de contrastes.

60 Se ha planificado una comparación de HAEMATE® P con el rVWF + rFVIII a una dosis de 4000 RCoU/kg pero esta dosis proporcionada no es factible con HAEMATE® P (toxicidad por citrato) y se incluyó una dosis de 2000 RCoU/kg de HAEMATE® P. Por lo tanto, el rVWF + rFVIII, a una dosis de 2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg, se comparó con HAEMATE® P a una dosis de 2000 RCoU/kg del VWF.

65 Los datos de la masa corporal de HAEMATE® P, a una dosis de 4000 RCoU/kg, se excluyeron del cálculo de los rangos del desarrollo de la masa corporal, que se usó para comparar los ítems, y las variables de laboratorio debido a que sólo estaban disponibles los datos de 2 animales.

Las variables hematológicas y serológicas agrupadas por ítem y día de estudio se resumieron mediante el uso de medias y coeficientes de variación en lugar de medianas e intervalos debido a que los coeficientes de variación son independientes de la escala y permiten la evaluación de las diferencias en variabilidad de dosis en las variables de laboratorio.

5

### 3. Análisis de la Mortalidad

La proporción de los animales que mueren durante el período de observación y los correspondientes intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon por ítem y dosis. Los intervalos de confianza del 95 % bilaterales se calcularon mediante el método de puntuación de Wilson (Altman y otros, Brit. Med. J. Books, 2nd ed., JW Arrowsmith Ltd., Bristol, p 46-48 (2000)). Estos análisis se realizaron para los STADS, LTADS y para los STADS y LTADS agrupados por separado. Estos análisis también se proporcionaron para los animales machos y hembras por separado y para los animales machos y hembras combinados.

10

Las diferencias en la mortalidad entre las diferentes dosis del rVWF y el rVWF + rFVIII con el tampón correspondiente se evaluaron para los animales machos y hembras combinados mediante la prueba exacta de Fisher bilateral (por el procedimiento de SAS PROC MULTTEST). Este análisis se realizó para los STADS y LTADS agrupados. El ajuste por multiplicidad para la comparación de cinco grupos de dosis con el tampón correspondiente simultáneamente se aplicó mediante el uso del método de Holm. Se calcularon valores p bilaterales no ajustados y ajustados por multiplicidad. No se aplicó ningún ajuste por multiplicidad para la investigación de ítems diferentes.

15

20

Un análisis adicional se realizó para probar la hipótesis de que no hay tendencia a la mortalidad con dosis ascendentes del rVWF (con o sin rFVIII) contra la alternativa bilateral mediante el uso de la prueba Cochran-Armitage de tendencia como una prueba exacta (mediante procedimiento de SAS PROC FREQ, declaración = TENDECIA EXACTA). Este análisis se realizó para los STADS y LTADS agrupados y para machos y hembras combinados.

25

Después de la administración de 4000 RCoU/kg del rVWF, el 40 % de los animales murieron inmediatamente o hasta 4 días después del tratamiento (8 de 20, en grupos E y O). Después de la administración de 2000 RCoU/kg del rVWF, el 20 % de los animales murieron inmediatamente o hasta 9 días después del tratamiento (4 de 20, en grupos B y L). Se registró una mortalidad del 25 % después de la administración de 4000 RCoU/kg del rVWF + 3077 IU/kg del rFVIII (5 de 20, en grupos A y K), inmediatamente después del tratamiento o hasta 1 día después del tratamiento. No hubo mortalidad en los grupos I y S (2000 RCoU/kg del rVWF + 1538 IU/kg del rFVIII), o en ninguno de los otros grupos de dosis más bajas o de control negativo.

30

35

El 80 % (8 de 10) de los animales en el grupo tratado con HAEMATE® P a 4000 RCoU/kg del VWF (grupo T) murió inmediatamente después de la administración. Ningún animal murió en los grupos tratados con el nivel de dosis más bajo de 2000 RCoU/kg del VWF (grupos J y U).

40

Un resumen de la mortalidad se muestra en la siguiente Tabla 16.

Tabla 16. Resumen de mortalidad

Ítem	Dosis del VWF	Dosis del FVIII	Sexo	STADS			LTADS			STADS+LTADS		
				N	Por ciento	95 % CI	N	Por ciento	95 % CI	N	Por ciento	95 % CI
NaCl	0		F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
HAEMATE® P	2000	1664	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	4000	3322	F	NA	NA	NA	5	80 %	38 % a 96 %	5	80 %	38 % a 96 %
			M	NA	NA	NA	5	80 %	38 % a 96 %	5	80 %	38 % a 96 %
			P	NA	NA	NA	10	80 %	49 % a 94 %	10	80 %	49 % a 94 %
tampón rVWF	0	0	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
rVWF	250	0	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	500	0	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	1000	0	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	2000	0	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	4000	0	F	5	60 %	23 % a 88 %	5	20 %	4 % a 62 %	10	40 %	17 % a 69 %
			M	5	20 %	4 % a 62 %	5	60 %	23 % a 88 %	10	40 %	17 % a 69 %
			Grupo	10	40 %	17 % a 69 %	10	40 %	17 % a 69 %	20	40 %	22 % a 61 %

Ítem	Dosis del VWF	Dosis del FVIII	Sexo	STADS			LTADS			STADS+LTADS		
				N	Por ciento	95 % CI	N	Por ciento	95 % CI	N	Por ciento	95 % CI
tampón rVWF +	0	0	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
rFVIII			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
tampón rVWF +	250	192	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
rFVIII			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	500	385	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	1000	769	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	2000	1538	F	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	0 %	0 % a 43 %	10	0 %	0 % a 28 %
			Grupo	10	0 %	0 % a 28 %	10	0 %	0 % a 28 %	20	0 %	0 % a 16 %
	4000	3077	F	5	40 %	12 % a 77 %	5	40 %	12 % a 77 %	10	40 %	17 % a 69 %
			M	5	0 %	0 % a 43 %	5	20 %	4 % a 62 %	10	10 %	2 % a 40 %
			Grupo	10	20 %	6 % a 51 %	10	30 %	11 % a 60 %	20	25 %	11 % a 47 %

Hubo una mortalidad del 20 % (4 de 20) con la dosis de 2000 RCoU/kg y una mortalidad del 40 % (8 de 20) con la dosis de 4000 RCoU/kg del rVWF. No hubo mortalidad con las dosis restantes investigadas.

5 Con el rVWF + rFVIII, hubo una mortalidad del 25 % (5 de 20) con la dosis más alta investigada. No hubo mortalidad con las dosis restantes investigadas.

Hubo una mortalidad del 80 % (8 de 10) con una dosis de 4000 RCoU/kg HAEMATE® P (+3322 IU/kg del FVIII). No hubo mortalidad (0 de 20) con una dosis de 2000 RCoU/kg HAEMATE® P (+1664 IU/kg del FVIII).

10 Hubo una mortalidad del 25 % (5 de 20) con la dosis más alta del rVWF + rFVIII. No hubo mortalidad (0 de 20) con las dosis restantes o con el tampón correspondiente.

15 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en la mortalidad entre las diferentes dosis del rVWF + rFVIII y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad estuvieron por encima del 5 %.

20 La diferencia observada en la mortalidad del 25 % entre la dosis más alta del rVWF + rFVIII y el tampón correspondiente no fue estadísticamente significativa al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %. Sin embargo, el valor de p bilateral no ajustado fue 0,0471. Este valor bruto de p bilateral no se ajustó para comparar cinco grupos de dosis diferentes con el tampón correspondiente simultáneamente. Por lo tanto, el resultado significativo puede ocurrir por casualidad con una probabilidad de más del 5 % si la hipótesis nula general de no diferencia entre las cinco dosis diferentes y el tampón fuera verdadera.

25 La diferencia observada en la mortalidad del 40 % entre la dosis más alta del rVWF y el tampón correspondiente fue estadísticamente significativa (ajuste por multiplicidad valor de p bilateral = 0,0164).

No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en la mortalidad entre el tampón del rVWF y la dosis de 2000, 1000, 500 y 250 RCoU/kg.

30 La prueba de tendencia de Cochran-Armitage apoya la hipótesis de la tendencia de la dosis en la mortalidad con el rVWF + rFVIII, así como también con el rVWF solo. Ambos valores de p bilaterales estuvieron por debajo del 1 % y demostraron que la probabilidad de muerte aumentaba a medida que aumentaba la dosis.

35 No hubo mortalidad (0 de 20) con HAEMATE® P a una dosis de 2000 RCoU/kg (+ 1664 IU/kg del FVIII) o (0 de 20) con el rVWF + rFVIII a una dosis de 2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg del rFVIII (valor de p bilateral = 1,0000).

#### 4. Anomalías clínicas

40 Las anomalías clínicas indicativas de toxicidad se observaron en el 85 % de los animales tratados con 4000 RCoU/kg del rVWF (17 de 20 en grupos E y O), y en el 75 % tratados con 4000 RCoU/kg del rVWF+ 3077 IU/kg del rFVIII (15 de 20 en grupos A y K). Los síntomas se observaron en el 45 % de los animales tratados con 2000 RCoU/kg del rVWF solo (9 de 20, en grupos B y L), y en el 35 % de los animales tratados con 2000 RCoU/kg del rVWF + 1538 IU/kg del rFVIII (7 de 20, en grupos I y S). Los síntomas indicativos de toxicidad se observaron en el 90 % de los animales tratados con 4000 RCoU/kg HAEMATE® P (9 de 10 en el grupo T), y el 40 % de los animales tratados con 2000 RCoU/kg HAEMATE® P (8 de 20, en los grupos J y U).

Los síntomas clínicos también se observaron en el 20 % de los animales tratados con las soluciones combinadas de tampón (4 de 20, en los grupos C y M).

50 Todos los otros grupos de tratamiento fueron clínicamente normales. Un resumen se proporciona en la siguiente Tabla 17.

Tabla 17: Anomalías clínicas en los animales

Ítem	dosis	grupo	Animal núm.	Síntomas
60	4000 RCoU/kg	E	21	depresión conductual, posición boca abajo, 3 min
			22	depresión conductual, disnea, posición boca abajo, 3 min
			24	ataxia, posición boca abajo, depresión conductual, inmóvil, muerte después 2,5 horas
			25	disnea, posición boca abajo, piloerección, depresión conductual, orina de color cobre

			121	convulsiones, posición lateral, disnea, depresión conductual, muerte después 2,5 horas
			122	posición boca abajo, inmóvil, orina con sangre
			123	posición lateral, calambres, disnea, muerte después 2 min
			124	posición lateral, convulsiones, muerte después 2 min
rVWF	4000 RCoU/kg	O	125	ataxia, posición boca abajo, depresión conductual
			71	posición lateral, convulsiones, disnea, depresión conductual, inmóvil, muerte después 4 días
			72	disnea, depresión conductual, piloerección, inmóvil, muerte después 4 días
			73	depresión conductual, inmóvil, muerte después 1 día
			74	disnea, depresión conductual, piloerección durante 7 días
			75	posición boca abajo, depresión conductual, inmóvil, piloerección durante 4 días
			172	posición lateral, disnea, inmóvil, depresión conductual hasta 3 días
			173	posición lateral, convulsiones, muerte súbita
			175	posición lateral, disnea, inmóvil, piloerección hasta 6 horas
			2	posición boca abajo, disnea, depresión conductual
			3	posición boca abajo, depresión conductual
			4	depresión conductual hasta 6 horas
rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg	A	101	posición boca abajo, depresión conductual durante 3 min
			102	disnea, depresión conductual, inmóvil
			103	posición lateral, convulsiones, disnea, muerte
			104	depresión conductual, disnea durante 6 horas
			105	posición lateral, disnea durante 5 min depresión conductual durante 6 horas
rVWF + rFVIII	4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg	K	52	disnea, ataxia, depresión conductual, muerte después 1 hora
			53	posición boca abajo, disnea, depresión conductual durante 1 día
			54	posición boca abajo, disnea durante 5 min
			55	convulsiones, disnea, posición boca abajo for 5 min
			151	posición boca abajo, disnea, depresión conductual durante 3 min
			153	depresión conductual, disnea durante 6 horas
			154	depresión conductual, disnea durante 6 horas
rVWF	2000 RCoU/kg	B	6	depresión conductual breve
			8	depresión conductual, disnea, inmóvil
			9	depresión conductual, piloerección
			10	depresión conductual, piloerección

ES 2 713 270 T3

rVWF	2000 RCoU/kg		106	depresión conductual, piloerección
			56	posición boca abajo, disnea, depresión conductual, muerte después 1.5 horas
		L	57	depresión conductual durante 2 min
			58	depresión conductual, piloerección, muerte después 5 días
			59	depresión conductual, piloerección, inmóvil, muerte después 9 días
rVWF + rFVIII	2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg	I	42	depresión conductual hasta 6 horas
			91	depresión conductual, piloerección hasta 6 horas
			92	depresión conductual hasta 6 horas
rVWF + rFVIII	2000 RCoU/kg + 1538 IU/kg	S	94	depresión conductual hasta 6 horas
			95	depresión conductual hasta 6 horas
			191	depresión conductual hasta 6 horas
			195	depresión conductual hasta 6 horas
			96	posición lateral, muerte inmediata
			97	posición lateral, disnea, muerte inmediata
			98	posición lateral, convulsiones, muerte inmediata
			99	posición lateral, convulsiones 3 min
HAEMATE® P	4000 RCoU/kg	T	196	posición lateral, convulsiones, muerte inmediata
			197	posición lateral, disnea, muerte inmediata
			198	posición lateral, convulsiones, disnea durante 3 min
			199	convulsiones, muerte inmediata
			200	convulsiones, muerte inmediata
			48	posición boca abajo, disnea durante 1 min
HAEMATE® P	2000 RCoU/kg	J	146	posición boca abajo, convulsiones, disnea durante 1 min
			148	ataxia breve
			150	ataxia breve
			201	disnea, posición lateral durante 1 min
		U	203	posición lateral, convulsiones, disnea durante 2 min
HAEMATE® P	2000 RCoU/kg		208	ataxia durante 1 min
			209	ataxia breve
rVWF tampón + tampón Advate	31,7 + 17,6 mL/kg; 49,3 mL/kg	C	14	posición boca abajo, disnea, ataxia (2 min)
			15	depresión conductual, ataxia (2 min)
rVWF tampón + tampón Advate	31,7 + 17,6 mL/kg; 49,3 mL/kg	H	161	posición boca abajo, ataxia, disnea (3 min)
			165	posición lateral boca abajo, disnea (2 min)

5. Análisis de la masa corporal

El cambio en la masa corporal entre el día de estudio 0 y los días de estudio 1, 7 y 14 (como  $\Delta\%$  de la masa corporal en el día 0) se visualizaron mediante el uso de diagramas de caja agrupados por ítem y dosis. Los animales machos y hembras se combinaron para estos diagramas de caja. El análisis de la masa corporal se proporciona en la Tabla 18 y las Figuras 24-26.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Tabla 18: Resumen del análisis de la masa corporal

Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a día 14		
				N	Media	95 % CI para la media	N	Media	95 % CI para la media	N	Media	95 % CI para la media
NaCl	0	0	Hembra	5	-1,1 %	-4,8 % a 3,9 %	5	1,7 %	0,3 % a 4,5 %	5	1,7 %	-11,3 % a 4,3 %
			Macho	5	-1,8 %	-3,1 % a -0,1 %	5	-0,8 %	-2,6 % a 0,8 %	5	1,9 %	-2,5 % a 6,1 %
			Agrupados	10	-1,5 %	-2,7 % a 0,6 %	10	0,5 %	-0,4 % a 1,5 %	10	1,8 %	-0,3 % a 3,4 %
HAEMAT E® P	2000	1664	Hembra	5	1,9 %	-1,1 % a 6,5 %	5	2,6 %	0,4 % a 15,0 %	5	3,4 %	-16,5 % a 6,1 %
			Macho	5	-0,6 %	-2,6 % a 0,2 %	5	-1,7 %	-5,9 % a 2,6 %	5	-0,4 %	-8,9 % a 3,3 %
			Agrupados	10	0,6 %	-0,3 % a 2,7 %	10	0,5 %	-1,5 % a 2,1 %	10	1,5 %	-1,3 % a 3,5 %
tampón rVWF	0	0	Hembra	0	NA	NA	1	3,6 %	NA	1	7,6 %	NA
			Macho	0	NA	NA	1	-3,6 %	NA	1	0,7 %	NA
			Agrupados	0	NA	NA	2	-0,0 %	NA	2	4,2 %	NA
tampón rVWF + rFVIII	0	0	Hembra	5	-0,8 %	-2,4 % a 1,3 %	5	3,9 %	-1,9 % a 9,7 %	5	6,1 %	3,5 % a 7,3 %
			Macho	5	-0,6 %	-10,0 % a 1,1 %	5	1,9 %	-0,7 % a 19,4 %	5	3,5 %	-0,4 % a 10,3 %
			Agrupados	10	-0,7 %	-2,5 % a 0,2 %	10	2,9 %	0,9 % a 5,4 %	10	4,8 %	2,8 % a 6,0 %
rVWF	250	0	Hembra	5	-0,1 %	-1,9 % a 8,4 %	5	0,9 %	-13,2 % a 3,6 %	5	2,7 %	0,1 % a 29,6 %
			Macho	5	-2,1 %	-23,3 % a 4,0 %	5	-0,1 %	-9,8 % a 2,5 %	5	2,2 %	-1,7 % a 7,8 %
			Agrupados	10	-1,1 %	-8,4 % a 1,5 %	10	0,4 %	-3,6 % a 2,2 %	10	2,5 %	0,6 % a 5,0 %
rVWF	500	0	Hembra	5	-0,8 %	-2,9 % a 7,7 %	5	0,9 %	-1,4 % a 5,0 %	5	2,0 %	-4,6 % a 5,2 %
			Macho	5	-1,0 %	-3,2 % a -0,4 %	5	0,4 %	-2,4 % a 5,5 %	5	2,7 %	-0,4 % a 4,6 %
			Agrupados	10	-0,9 %	-1,9 % a 1,1 %	10	0,6 %	-0,7 % a 2,2 %	10	2,3 %	0,0 % a 3,7 %
			Hembra	5	1,6 %	-1,6 % a 15,1 %	5	-3,1 %	-13,5 % a 0,6 %	5	-0,8 %	-15,7 % a 3,7 %
			Macho	5	-11,5 %	-372,2 % a 2,7 %	5	-0,7 %	-3,9 % a 3,0 %	5	-0,3 %	-4,9 % a 2,2 %

Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a día 14		
				N	Media	95 % CI para la media	N	Media	95 % CI para la media	N	Media	95 % CI para la media
			Agrupados	10	-5,0 %	-32,4 % a 0,6 %	10	-1,9 %	-5,7 % a -0,1 %	10	-0,6 %	-6,2 % a 1,8 %
			Hembra	5	-0,6 %	-16,0 % a 1,3 %	5	0,7 %	-4,1 % a 14,2 %	5	2,8 %	-1,3 % a 15,3 %
	1000	0	Macho	5	-0,7 %	-21,8 % a 2,3 %	5	-0,5 %	-3,4 % a 5,0 %	5	0,3 %	-3,3 % a 1,6 %
			Agrupados	10	-0,6 %	-10,4 % a 0,9 %	10	0,1 %	-2,0 % a 3,9 %	10	1,5 %	0,1 % a 5,6 %
			Hembra	5	-8,3 %	-13,5 % a 0,5 %	5	-1,0 %	-5,0 % a 3,0 %	5	3,3 %	2,0 % a 6,6 %
	2000	0	Macho	5	-4,8 %	-10,4 % a 4,0 %	2	-11,5 %	NA -10,8 % a -	1	-3,7 %	NA
			Agrupados	10	-6,5 %	-9,3 % a -3,5 %	7	-4,0 %	1,6 %	6	2,1 %	1,3 % a 3,1 %
			Hembra	2	-5,0 %	NA -8,1 % a	4	1,4 %	-0,5 % a 8,4 %	4	5,5 %	3,7 % a 26,3 %
	4000	0	Macho	4	-1,6 %	1,2 %	2	-8,5 %	NA	2	-4,9 %	NA
			Agrupados	6	-2,7 %	-9,3 % a -1,1 %	6	-1,9 %	-10,2 % a 0,6 %	6	2,0 %	-1,2 % a 3,7 %
rVWF + FVIII	250	192	Hembra	5	2,2 %	-2,0 % a 5,2 %	5	1,2 %	0,3 % a 4,4 %	5	4,6 %	0,6 % a 12,0 %
			Macho	5	-1,1 %	-2,4 % a 1,6 %	5	-1,6 %	-4,2 % a 0,5 %	5	0,7 %	-16,5 % a 3,3 %
			Agrupados	10	0,5 %	-0,8 % a 2,5 %	10	-0,2 %	-1,2 % a 0,5 %	10	2,7 %	0,7 % a 5,4 %
	500	385	Hembra	5	-6,1 %	-11,1 % a 8,1 %	5	-0,7 %	-3,5 % a 9,4 %	5	0,7 %	-5,9 % a 51,9 %
			Macho	5	0,1 %	-1,8 % a 41,7 %	5	0,8 %	-9,2 % a 4,8 %	5	3,0 %	-1,4 % a 5,4 %
			Agrupados	10	-3,0 %	-5,9 % a -1,1 %	10	0,1 %	-2,6 % a 2,5 %	10	1,9 %	-1,4 % a 6,0 %
	1000	769	Hembra	5	-2,6 %	-17,5 % a 1,9 %	5	-0,4 %	-4,6 % a 3,1 %	5	1,3 %	-1,6 % a 6,6 %
			Macho	5	-3,8 %	-7,7 % a 0,5 %	5	1,1 %	-1,7 % a 11,4 %	5	3,2 %	-5,0 % a 11,8 %
			Agrupados	10	-3,2 %	-5,8 % a -1,0 %	10	0,4 %	-1,4 % a 2,5 %	10	2,3 %	-0,0 % a 5,7 %
	2000	1538	Hembra	5	-8,0 %	-11,1 % a 2,6 %	5	2,9 %	-0,4 % a 26,8 %	5	4,8 %	0,0 % a 8,9 %

Ítem	Dosis del VWF:RCO [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo	Día 0 a Día 1			Día 0 a Día 7/8			Día 0 a día 14		
				N	Media	95 % CI para la media	N	Media	95 % CI para la media	N	Media	95 % CI para la media
			Macho	5	-6,8 %	-10,8 % a 1,4 %	5	0,5 %	-3,3 % a 2,4 %	5	2,5 %	-0,5 % a 5,4 %
			Agrupados	10	-7,4 %	-9,4 % a	10	1,7 %	0,0 % a	10	3,6 %	2,0 % a
						-4,6 %			5,2 %			5,8 %
	4000	3077	Hembra	3	-2,8 %	NA	3	-0,2 %	NA	3	-0,5 %	NA
			Macho	5	-7,5 %	-9,9 % a -2,1 %	4	-0,6 %	-9,3 % a 10,1 %	4	2,4 %	-6,4 % a 11,4 %
			Agrupados	8	-5,7 %	-7,9 % a -0,8 %	7	-0,5 %	-4,2 % a 3,2 %	7	1,2 %	-1,9 % a 6,1 %

Hubo disminuciones estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en la masa corporal desde el día 0 al día 1 con la dosis más alta (media  $\Delta\%$  de -5,7 %) y con la segunda dosis más alta (media  $\Delta\%$  de -7,4 %) que con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de -1,1 %).

5 No hubo diferencias estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en el desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14 entre las diferentes dosis del rVWF + rFVIII y el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad fueron mayores que el 5 %.

10 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para 500 RCoU/kg + 385 IU/kg que fue el primer valor de p bilateral por encima del 5% (valor de p bilateral = 0,1069). Por lo tanto, la dosis mínima detectable fue 1000 RCoU/kg + 769 IU/kg del rFVIII.

15 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más alta. El valor de p bilateral para la dosis más alta fue 0,2276, que estuvo por encima de 5% y no se investigaron más contrastes. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 con el rVWF + rFVIII y la dosis más alta investigada podría considerarse como la dosis NOAEL.

20 Hubo disminuciones mayores estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en la masa corporal desde el día 0 al día 1 con la dosis más alta (media  $\Delta\%$  de -2,7 %) y con la segunda dosis más alta (media  $\Delta\%$  de -6,5 %) que con el tampón correspondiente (media  $\Delta\%$  de -0,7 %).

25 Hubo diferencias mayores estadísticamente significativas (al nivel de ajuste por multiplicidad del 5 %) en la masa corporal desde el día 0 al día 14 con todas las dosis investigadas que con el tampón correspondiente debido a que todos los valores de p bilaterales ajustados por multiplicidad estuvieron por debajo del 5 %.

30 La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para 1000 RCoU/kg, que fueron los primeros valores de p bilaterales por encima del 5 % (valor de p bilateral = 0,6932). Por lo tanto, la dosis mínima detectable fue 2000 RCoU/kg.

La estimación de la dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 en una manera descendiente se detuvo en el contraste para la dosis más baja investigada donde el valor de p bilateral estuvo todavía por encima del 5 %. Por lo tanto, la dosis mínima detectable fue 250 RCoU/kg.

35 El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 1 fue 0,6 % (95% CI: -0,3 % a 2,7 %) con HAEMATE® P (2000 RCoU/kg + 1664 IU/kg del FVIII) y -7,4 % (95% CI: -9.4% a -4.6%) con la dosis correspondiente del rVWF + rFVIII administrada. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral < 0,0001).

40 El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 14 fue 1,5 % (95 % CI: -1,3 % a 3,5 %) con HAEMATE® P (2000 RCoU/kg + 1664 IU/kg del FVIII) y 3,6 % (95 % CI: 2,0 % a 5,8 %) con la dosis correspondiente del rVWF + rFVIII administrada. Esta diferencia no fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral = 0,2079).

45 6. Variables hematológicas y serológicas

Se presenta una comparación de hematocrito, conteo plaquetario, y LDH en las Tablas 19-21 y las Figuras 27-32.

50 Los datos para el hematocrito y el conteo plaquetario en el día 14 en los grupos tratados con 1000 RCoU/kg del rVWF y tampón se perdieron debido al daño de la muestra.

Tabla 19: Resumen de los datos del hematocrito

Hematocrito (%)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
Nucl	0	0	Macho	5	42,4	4,0	5	42,3	5,4
			Hembra	5	43,2	4,8	5	42,5	1,9
			Agrupados	10	42,8	4,3	10	42,4	3,8

ES 2 713 270 T3

HAEMATE® P	2000	1347	Macho	5	42,1	6,2	5	40,2	6,0
			Hembra	5	39,7	10,6	5	42,3	2,3
			Agrupados	10	40,9	8,6	10	41,3	4,9
	4000	3322	Macho	0	NA	NA	1	35,8	NA
			Hembra	0	NA	NA	1	43,5	NA
			Agrupados	0	NA	NA	2	39,7	13,7
tampón rVWF	0	0	Macho	5	40,6	4,9	1	7,6	NA
			Hembra	5	43,8	1,3	0	NA	NA
			Agrupados	10	42,2	5,2	1	7,6	NA
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	44,0	4,4	5	43,1	4,3
			Hembra	5	44,7	3,4	5	41,7	2,1
			Agrupados	10	44,3	3,8	10	42,4	3,7
rVWF	250	0	Macho	5	43,0	2,3	5	43,8	2,8
			Hembra	4	41,5	2,6	5	43,1	2,8
			Agrupados	9	42,2	3,0	10	43,5	2,8
	500	0	Macho	5	43,6	5,1	5	42,0	4,6
			Hembra	5	41,8	1,2	5	41,6	7,6
			Agrupados	10	42,7	4,2	10	41,8	5,9
	1000	0	Macho	5	39,6	7,2	0	NA	NA
			Hembra	5	42,2	5,7	0	NA	NA
			Agrupados	10	40,9	6,9	0	NA	NA
	2000	0	Macho	5	37,7	18,5	1	46,5	NA
			Hembra	5	34,7	13,7	5	43,3	2,0
			Agrupados	10	36,2	16,2	6	43,9	3,5
	4000	0	Macho	5	42,8	6,5	2	41,8	2,7
			Hembra	5	45,1	NA	4	42,9	3,0
			Agrupados	10	43,3	6,0	6	42,5	3,0
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	41,4	4,0	5	41,2	4,6
			Hembra	5	42,9	6,5	5	42,9	4,3
			Agrupados	10	42,2	5,5	10	42,1	4,7
	500	385	Macho	5	42,8	4,1	5	43,7	6,4
			Hembra	4	42,2	1,4	5	44,3	3,0
			Agrupados	9	42,5	3,1	10	44,0	4,8
	1000	769	Macho	5	42,1	7,5	5	39,3	8,5
			Hembra	5	42,6	9,8	5	42,4	3,7
			Agrupados	10	42,3	8,3	10	40,8	7,2
	2000	1538	Macho	5	36,6	3,6	5	39,7	10,5
			Hembra	5	37,9	9,1	5	43,5	2,9
			Agrupados	10	37,2	6,9	10	41,6	8,4
	4000	3077	Macho	5	35,0	12,4	4	40,9	18,0
			Hembra	3	36,1	19,6	3	45,7	3,7
			Agrupados	8	35,4	14,2	7	43,0	13,7

ES 2 713 270 T3

Tabla 20: Resumen del conteo plaquetario

Conteo de plaquetas (x0 <sup>3</sup> /μL)				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV [%]	N	Media	CV [%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	1199	15	5	1338	3
			Hembra	5	1044	10	5	1083	7
			Agrupados	10	1122	14	10	1211	12
HAEMATE® P	2000	1664	Macho	5	940	17	5	998	45
			Hembra	5	710	40	5	1084	14
			Agrupados	10	825	30	10	1041	31
	4000	3322	Macho	0	NA	NA	1	1273	NA
			Hembra	0	NA	NA	1	1204	NA
			Agrupados	0	NA	NA	2	1239	4
tampón rVWF	0	0	Macho	5	1220	18	1	3971	NA
			Hembra	5	1103	10	0	NA	NA
			Agrupados	10	1161	15	1	3971	NA
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	1143	14	5	1180	14
			Hembra	5	999	17	5	898	22
			Agrupados	10	1071	16	10	1039	22
rVWF	250	0	Macho	5	1291	10	5	1184	11
			Hembra	5	933	23	5	994	11
			Agrupados	10	1112	23	10	1089	14
	500	0	Macho	5	1141	25	5	1348	9
			Hembra	5	783	49	5	1112	8
			Agrupados	10	962	38	10	1230	13
	1000	0	Macho	5	615	86	0	NA	NA
			Hembra	5	393	98	0	NA	NA
			Agrupados	10	504	90	0	NA	NA
	2000	0	Macho	5	307	154	1	754	NA
			Hembra	5	51	88	5	909	42
			Agrupados	10	179	193	6	883	39
	4000	0	Macho	4	423	143	2	1375	33
			Hembra	1	84	NA	4	1137	20
			Agrupados	5	355	153	6	1216	24
rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	1358	13	5	1280	13
			Hembra	5	1145	20	5	1095	6
			Agrupados	10	1252	18	10	1188	13

ES 2 713 270 T3

	500	385	Macho	5	844	62	5	1356	4
			Hembra	4	1090	10	5	1127	7
			Agrupados	9	954	42	10	1241	11
	1000	769	Macho	5	412	107	5	1408	32
			Hembra	5	378	98	5	876	29
			Agrupados	10	395	97	10	1142	39
	2000	1538	Macho	5	57	67	5	1327	19
			Hembra	5	113	84	5	1226	7
			Agrupados	10	85	87	10	1277	15
	4000	3077	Macho	5	78	21	4	1329	34
			Hembra	3	131	98	3	966	41
			Agrupados	8	98	77	7	1173	37

Tabla 21. Resumen de los datos de LDH

LDH [U/L]				Día de estudio					
				1			14		
				N	Media	CV[%]	N	Media	CV[%]
Ítem	Dosis del VWF:RCo [U/kg]	Dosis del FVIII [IU/kg]	Sexo						
NaCl	0	0	Macho	5	425	8	5	490	51
			Hembra	5	821	11	5	278	20
			Agrupados	10	623	35	10	384	53
HAEMATE® P	2000	1664	Macho	5	376	18	5	334	36
			Hembra	5	370	24	5	346	35
			Agrupados	10	373	20	10	340	33
	4000	3322	Macho	0	NA	NA	1	267	NA
			Hembra	0	NA	NA	1	261	NA
			Agrupados	0	NA	NA	2	264	2
tampón rVWF	0	0	Macho	5	662	43	5	610	49
			Hembra	5	451	25	5	297	29
			Agrupados	10	557	42	10	453	58
tampón rVWF+rFVIII	0	0	Macho	5	386	16	5	543	65
			Hembra	5	385	61	5	330	29
			Agrupados	10	385	42	10	437	62
rVWF	250	0	Macho	5	228	25	5	296	10
			Hembra	5	238	35	5	277	17
			Agrupados	10	233	29	10	287	13
	500	0	Macho	5	402	32	5	292	25
			Hembra	5	399	62	5	246	26
			Agrupados	10	401	47	10	269	26

ES 2 713 270 T3

5	1000	0	Macho	5	669	96	5	380	29	
			Hembra	5	577	37	5	405	50	
			Agrupados	10	623	73	10	392	39	
10	2000	0	Macho	5	1662	123	1	297	NA	
			Hembra	5	3990	13	5	438	59	
			Agrupados	10	2826	66	6	415	58	
15	4000	0	Macho	4	962	95	2	251	12	
			Hembra	2	5450	19	4	297	31	
			Agrupados	6	2458	100	6	282	27	
20	rVWF+rFVIII	250	192	Macho	5	352	50	5	266	24
				Hembra	5	227	31	5	232	12
				Agrupados	10	290	49	10	249	20
25	500	385	Macho	5	504	74	5	298	19	
			Hembra	5	370	21	5	264	43	
			Agrupados	10	437	60	10	281	31	
30	1000	769	Macho	5	2265	158	5	349	16	
			Hembra	5	465	78	5	413	20	
			Agrupados	10	1365	189	10	381	20	
35	2000	1538	Macho	5	3790	67	5	354	30	
			Hembra	5	2572	93	5	280	36	
			Agrupados	10	3181	76	10	317	33	
40	4000	3077	Macho	5	1614	62	4	517	46	
			Hembra	3	3790	78	3	359	16	
			Agrupados	8	2430	86	7	450	42	

7. Necropsia

Los hallazgos de la necropsia indicaron una asociación del rVWF con los animales que murieron espontáneamente.

8. Histopatología

Para el estudio a corto plazo, se registró necrosis del miocardio cardíaca (de grado mínimo a moderado, focal o multifocal) en los grupos tratados con el rVWF tratados con dosis de 500 RCoU/kg del rVWF, y más, solo o en combinación con el rFVIII. Se registraron microtrombos (de grado mínimo a moderado) en los animales tratados con el rVWF con dosis de 1000 RCoU/kg y más, solo o en combinación con el rFVIII. Ambos de estos cambios mostraron un ligero aumento dependiente de la dosis en la gravedad y/o la incidencia.

Adicionalmente, se registró una incidencia aumentada para la perivasculitis coronaria en los animales tratados con el ítem de prueba con dosis de 1000 RCoU/kg del rVWF y dosis mayores solo o en combinación con el rFVIII.

Se registraron microtrombos (grado mínimo) en combinación con focos de células gliales (grado mínimo) en los cerebros del grupo de dosis alta tratado con el rVWF solo. Se registró una incidencia ligeramente aumentada de microtrombos (todos de grado mínimo) en los animales en el grupo de dosis de 2000 RCoU/kg tratados con el rVWF solo, y en los animales del grupo de dosis de 1000 RCoU/kg tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII.

Se registraron microtrombos de incidencia y grado mínimo sin lesiones degenerativas acompañantes en únicos animales tratados con el rVWF de grupos diferentes así como también en un animal control tratado con solución salina isotónica.

- Se registraron microtrombos (grado mínimo) en los ojos de un animal tratado con el rVWF del grupo de dosis alta, que murió espontáneamente. Este hallazgo no se observó en los animales tratados con una combinación del rVWF y el rFVIII.
- 5 Se registraron microtrombos (de grado mínimo a leve) en los riñones de un animal tratado con el rVWF del grupo de dosis alta (que murió espontáneamente) y en un animal tratado con el rVWF del grupo de dosis de 500 RCoU/kg (ambos tratados con el rVWF solo), y en los animales en los grupos de dosis de 1000 RCoU/kg y alta que se trataron con una combinación del rVWF y el rFVIII.
- 10 Se registraron bajas incidencias de microtrombos (de grado mínimo a leve) en los pulmones de animales tratados con el ítem de prueba, así como también en los animales controles, que se trataron con HAEMATE® P, solución salina isotónica o tampones combinados (incidencia:  $\leq 4/10$ ; gravedad media:  $\leq 1,5$ ). Todos los microtrombos estaban en una etapa temprana, no mostraron signos de condensación de fibrina y no se acompañaron de necrosis o infarto.
- 15 Adicionalmente, la gravedad media mínimamente aumentada de los microtrombos se registró en los animales tratados con el ítem de prueba del grupo de dosis alta que se trataron con el rVWF solo. Este aumento se causó por dos animales de este grupo, que tenían una gravedad moderada de microtrombos pulmonares (grado 3). No pudo registrarse una clara relación con la dosis.
- 20 Para el estudio a largo plazo, se registró la degeneración/reparación del miocardio (grado mínimo a marcado) en los corazones de animales tratados con el ítem de prueba tratados con dosis de 500 RCoU/kg del rVWF y dosis superiores, solo o en combinación con el rFVIII. Este cambio mostró un aumento dependiente de la dosis en la gravedad y/o la incidencia y se caracterizó por la inflamación (principalmente mononuclear) y fibrosis, a menudo acompañada por la deposición de hemosiderina y algunas veces también por la calcificación del miocardio.
- 25 Adicionalmente, se registraron microtrombos y necrosis del miocardio a una baja incidencia, especialmente en los animales que murieron espontáneamente.
- 30 Se registraron microtrombos (grado mínimo) en combinación con focos de células gliales (grado mínimo) en los cerebros del grupo de dosis alta tratado con el rVWF solo, así como también en el grupo tratado con una combinación de 2000 RCoU/kg del rVWF y el rFVIII.
- 35 Adicionalmente, se registró una incidencia ligeramente aumentada de microtrombos (todos de grado mínimo) en los animales tratados con 2000 RCoU/kg del rVWF solo. Se registraron microtrombos de incidencia y grado mínimo sin lesiones degenerativas acompañantes en únicos animales tratados con el ítem de prueba de grupos diferentes así como también en un animal control tratado con los tampones combinados.
- 40 Se registraron microtrombos (de grado mínimo a leve) en los riñones de los animales tratados con el ítem de prueba de grupos que se trataron con dosis de 1000 RCoU/kg del rVWF solo y superiores, así como también en los animales de los grupos tratados con dosis de 500 RCoU/kg del rVWF y superiores en combinación con el rFVIII. Este hallazgo también se registró en grado mínimo en un animal control tratado con los tampones combinados.
- 45 Los microtrombos (grado leve) fueron acompañados por una necrosis cortical (grado moderado) en un animal tratado con el ítem de prueba en el grupo de dosis de 2000 RCoU/kg tratado con el rVWF solo (murió espontáneamente).
- 50 Se registró un microtrombo (grado mínimo) en las cortezas adrenales de un animal tratado con el ítem de prueba del grupo de dosis alta, que se trató con el rVWF solo (murió espontáneamente). Este hallazgo no se observó en los animales tratados con el rVWF en combinación con el rFVIII.
- 55 Adicionalmente, se registró una hemorragia leve a moderada en tres animales tratados con el ítem de prueba del grupo de dosis alta que se trataron con el rVWF solo (murieron espontáneamente). Este hallazgo no se observó en los animales tratados con el rVWF en combinación con el rFVIII.
- 60 Se registraron bajas incidencias de microtrombos (de grado mínimo a leve) en los pulmones de animales tratados con el ítem de prueba, así como también en los animales controles, tratados con HAEMATE® P, solución salina isotónica, tampón citrato o tampones combinados (incidencia:  $\leq 3/10$ ; gravedad media:  $\leq 1,5$ ). Todos los microtrombos (excepto el que se describe a continuación) estaban en una etapa temprana, no mostraron signos de condensación de fibrina y no se acompañaron de necrosis o infarto.
- 65 Adicionalmente, se registró una gravedad media ligeramente aumentada de microtrombos en los animales tratados con el ítem de prueba del grupo de dosis de 2000 RCoU/kg que se trataron con el rVWF solo. Este aumento se causó por un único animal de este grupo que tenía el único trombo pulmonar hialino en este estudio. Esta trombosis condujo a una decoloración azul-roja macroscópicamente visible de los pulmones registrada en la necropsia (ver "Tabla de Hallazgos Macroscópicos" en el informe de patología). No pudo registrarse una clara relación con la dosis.

Además, se registró una incidencia ligeramente aumentada de microtrombos (todos de grado mínimo) se registró en los animales tratados con el ítem de prueba del grupo de dosis alta que se trataron con una combinación del rVWF y el rFVIII. No pudo registrarse una clara relación con la dosis.

## 5 9. Discusión

Como se explicó anteriormente, el rVWF se probó solo a cinco niveles de dosis: 4000, 2000, 1000, 500, y 250 RCoU/kg de BW), y en combinación con el rFVIII, también a cinco dosis. En la administración combinada las dosis del rVWF fueron las mismas que en la administración única y las del rFVIII fueron 3077, 1538, 769, 385 y 192 IU/kg del rFVIII en orden descendiente, es decir, 4000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 3077 IU/kg del rFVIII, 2000 RCoU/kg de BW del rVWF se coadministró con 1538 IU/kg del rFVIII, etc. HAEMATE® P se probó a 4000 RCoU/kg de BW (+ 3322 IU/kg de BW del FVIII) y 2000 RCoU/kg de BW (+ 1664 IU/kg de BW del FVIII).

El tampón correspondiente para el rVWF solo se administró a un volumen de 31,7 mL/kg (de acuerdo con el volumen de dosis mayor del rVWF), el tampón mixto a 49,3 mL/kg, y la solución salina isotónica a 51,1 mL/kg.

15 La mortalidad más alta en este estudio se observó en el grupo tratado con HAEMATE® P al nivel de dosis de 4000 RCoU/kg, el 80 % (8 de 10) murió inmediatamente después de la administración lo que muestra signos inequívocos de sobrecarga de citrato de sodio (se inyectaron 281 mg/kg de citrato con el volumen administrado de 51,1 ml/kg). Como la LD50 del citrato de sodio después de la aplicación intravenosa en los ratones es 231 mg/kg (Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 1992), la dosis de HAEMATE® P se cambió a 2000 RCoU/kg del VWF. Ninguna mortalidad adicional se observó a este nivel de dosis con HAEMATE® P.

25 El 40 % (8 de 20) de los animales que recibieron 4000 RCoU/kg del rVWF solo, murieron, mientras que la mortalidad disminuyó a 20 % (4 de 20) en aquellos que recibieron 2000 RCoU/kg. No hubo mortalidad adicional en los grupos de dosis más bajas. El 25 % (5 de 20) de los animales que recibieron 4000 RCoU/kg del rVWF en combinación con 3077 IU/kg del rFVIII murieron. No hubo mortalidad adicional en los grupos de dosis más bajas, incluso en el grupo que recibió 2000 RCoU/kg en combinación con el rFVIII. Como hubo 141 mg/kg de citrato de sodio en el volumen inyectado de los grupos de dosis de 4000 RCoU/ g, esto también puede ser una razón para algunas muertes repentinas en estos grupos. Esta causa de muerte puede excluirse para los casos tardíos en los grupos de dosis altas así como también para las muertes repentinas en los grupos de dosis de 2000 RCoU/kg.

La prueba estadística realizada ad hoc para una tendencia demostró que la probabilidad de muerte aumentaba a medida que aumentaba la dosis del rVWF (valor p bilateral <0,0001).

35 No hubo mortalidad (0 de 20) con HAEMATE® P administrado con a dosis de 2000 RCoU/kg del VWF + 1664 IU/kg del FVIII y no hubo mortalidad (0 de 20) con 2000 RCoU/kg del rVWF + 1538 IU/kg del rFVIII.

40 Las observaciones clínicas revelaron un amplio espectro de anomalías. Los síntomas a corto plazo fueron obviamente causados por la cantidad inyectada de citrato de sodio, debido a que los síntomas típicos para la toxicidad por citrato de sodio (por ejemplo, depresión conductual a corto plazo, convulsiones, disnea) se registraron en el 20 % (4 de 20) de los animales del grupo de tampón.

45 Sin embargo, hubo una clara correlación entre la incidencia y la gravedad de los síntomas de la dosis administrada. El 85 % (17 de 20) de los animales se afectaron después de recibir 4000 RCoU/kg del rVWF mientras que el 45 % (9 de 20) de los animales se afectaron después de recibir 2000 RCoU/kg del rVWF.

50 Las anomalías clínicas se observaron en el 75 % (15 de 20) de los animales que recibieron 4000 RCoU/kg en combinación con 3077 IU/kg del rFVIII mientras que el 35 % (7 de 20) se afectaron después de recibir 2000 RCoU/kg del rVWF en combinación con 1538 IU/kg del rFVIII. No se registraron observaciones clínicas en ninguno de los otros grupos tratados con el rVWF solo o en combinación con el rFVIII.

55 Los síntomas observados en el grupo tratado con HAEMATE® P al nivel de dosis de 4000 RCoU/kg (90 %, 9 de 10 animales) fueron claramente causados por la sobrecarga de citrato (281 mg/kg) y condujeron a la muerte. Todos los animales afectados (el 40 %, 8 de 20 animales) en los grupos tratados con 2000 RCoU/kg HAEMATE® P también mostraron solo anomalías a corto plazo, indicativas de toxicidad por citrato de sodio (140,5 mg/kg; por ejemplo, depresión conductual a corto plazo, convulsiones, disnea). No se registraron síntomas adicionales a largo plazo.

60 La dosis mínima detectable (MDD) para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 se estimó en 1000 RCoU/kg del rVWF + 769 IU/kg del rFVIII. La dosis de 500 RCoU/kg del rVWF + 385 IU/kg del rFVIII podría considerarse por lo tanto como la dosis de "nivel de efecto adverso no observado" (NOAEL) en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1. No hubo dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14, y la dosis más alta del tampón rVWF + rFVIII investigadas (4000 RCoU/kg + 3077 IU/kg) podría considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14.

65

- La dosis mínima detectable (MDD) para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 1 para el rVWF administrado solo se estimó en 2000 RCoU/kg. La dosis de 1000 RCoU/kg podría considerarse por lo tanto como la dosis de nivel de efecto adverso no observado (NOAEL) en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 1. La dosis mínima detectable para los cambios en la masa corporal desde el día 0 al día 14 se estimó en la dosis más baja del rVWF investigada (250 RCoU/kg). Ninguna dosis entre las dosis del rVWF investigadas podrían considerarse por lo tanto como la dosis NOAEL en términos del desarrollo de la masa corporal desde el día 0 al día 14. Esta diferencia estimada puede considerarse impredecible debido a que el aumento en la masa corporal (2,3 % vs. 4,8 % para el grupo tampón) es mayor que el de la solución salina (1,8 %) y HAEMATE® P (1,5 %) y similar al del grupo tratado con 250 RCoU/kg del tampón rVWF + rFVIII (2,7 %). El desarrollo medio de la masa corporal desde el día 0 al día 1 fue de 0,6 % con HAEMATE® P administrado a una dosis de 2000 RCoU/kg + 1664 IU/kg del FVIII y -7,4 % con la dosis correspondiente del tampón rVWF + rFVIII administrado. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al nivel del 5 % (valor de p bilateral < 0,0001). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas desde el día 0 al día 14.
- Al comparar los datos de las variables hematológicas y químicas del suero seleccionadas en los animales sobrevivientes, se observó una caída en el conteo plaquetario en el día 1 después de la administración de 1000 RCoU/kg del rVWF y dosis superiores, administradas solas o en combinación con el rFVIII. Adicionalmente, el hematocrito disminuyó después de la administración de 2000 RCoU/kg del rVWF y dosis más altas administrado solo o en combinación con el rFVIII.
- En comparación con los grupos controles, la lactato deshidrogenasa aumentó en el día 1 después del tratamiento con 2000 RCoU/kg del rVWF y dosis más altas administradas solas o combinadas con el rFVIII.
- Solo pudo medirse una caída en el conteo plaquetario 1 día después de la aplicación de 2000 RCoU/kg del VWF en HAEMATE® P (+ 1664 IU/kg del FVIII). Las variables medidas regresaron a la normalidad en todos los grupos afectados después de los 14 días de observación.
- La examinación histopatológica reveló muchos órganos afectados: Corazón (microtrombos coronarios, necrosis del miocardio, perivasculitis coronaria aumentada, degeneración/repación del miocardio), cerebro (microtrombos, focos de células gliales), ojos (microtrombos), riñones (microtrombos, necrosis cortical), adrenales (microtrombos, hemorragia), y pulmones (incidencia aumentada o gravedad media de microtrombos). Estos cambios patohistológicos pueden resumirse como una coagulopatía intravascular diseminada (DIC). A dosis altas ( $\geq$  2000 RCoU del rVWF), asemejan el cuadro de una púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) en humanos en cierta medida. A dosis más bajas (500- 1000 RCoU) el corazón se afectó principalmente con cambios histopatológicos que asemejan el cuadro de una "cardiopatía isquémica" de grado bajo. Por el contrario de los animales tratados con el ítem de prueba que recibieron producto(s) recombinante(s), tales hallazgos no se registraron en los animales tratados con el ítem de referencia que recibieron la preparación del VWF-FVIII derivado de plasma humano (HAEMATE® P). Aquí, solo se registraron microtrombos pulmonarios de grado bajo a incidencias similares a aquellas de los animales controles.
- Los cambios tromboembólicos se registraron para uno o varios órganos en los animales tratados con el ítem de prueba que se sacrificaron en el día 1 programado (o que murieron espontáneamente poco después de la administración). El corazón, que es altamente sensible a la hipoxia, fue el órgano más gravemente afectado. La oclusión vascular por los microtrombos coronarios condujo a un flujo de sangre reducido al corazón lo que causa necrosis isquémica del miocardio (inanición celular secundaria a una falta de oxígeno) y perivasculitis coronaria reactiva (efectos tempranos).
- Los cambios degenerativos y/o reparativos se registraron predominantemente en los corazones (inflamación, fibrosis, deposición de hemosiderina, calcificación) de animales tratados con el ítem de prueba que se sacrificaron en el día 14 programado (o que murieron espontáneamente con algún retraso después de la administración). Estos cambios similares al infarto cardíaco se consideraron ser las consecuencias de una oclusión vascular previa por microtrombos (efectos tardíos). La necrosis cortical renal registrada en un animal del grupo tratado con 2000 RCoU/kg del rVWF solo, que murió espontáneamente, puede interpretarse de la misma manera. Aquí, la oclusión vascular de los vasos renales por los microtrombos condujo a un infarto renal.
- Se registraron incidencias bajas de microtrombos (de grado mínimo a leve) sin destrucción acompañante de órganos para varios órganos (pulmones, riñones, cerebro) de los animales controles tratados con solución salina, tampón y también con HAEMATE® P.
- Los cambios patológicos registrados consistieron en una microtrombosis adversa en uno o varios órganos. Indicaron un potencial trombogénico del ítem de prueba, el rVWF, en este modelo animal con una falta de la proteasa de escisión del VWF (ratón deficiente en ADAMST13) a dosis de 500 RCoU/kg del rVWF y superiores, administrado solo o en combinación con el rFVIII. Como no se registraron cambios histopatológicos adversos en los grupos de dosis bajas (el rVWF solo y en combinación con el rVWF) un NOAEL puede establecerse en 250 RCoU/kg.

Con respecto a las diferencias específicas de las cepas del perfil toxicológico de rVWF, los ratones deficientes en ADAMTS13 representan la cepa más susceptible de las cepas murinas probadas. Por el contrario a los ratones deficientes en ADAMTS13, no se observó mortalidad incluso con la dosis más alta del rVWF en los ratones deficientes en el VWF- y en los C57BL/6J. El NOAEL para el rVWF en el ratón knockout para ADAMTS13 fue 250 RCoU/kg de BW.

Ejemplo 9:

Coadministración de ADAMTS13 humana recombinante con el rVWF humano en ratones deficiente en ADAMTS13  
El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de la coadministración del rVWF con ADAMTS13 humana recombinante (rADAMTS13) en ratones deficientes en ADAMTS13. El rVWF se administró a 2000 RCoU/kg, y rADAMTS13 a 19,4 µg/kg, de acuerdo con la relación encontrada en la preparación derivada del plasma humano, HAEMATE® P. Se eligió 2000 RCoU del rVWF debido a que esta dosis resultó en un 20 % de mortalidad en los ratones deficientes en ADAMTS13 (estudio núm. PV1940601). El rVWF y rADAMTS13 se inyectaron premezclados en la jeringuilla inmediatamente antes de la aplicación (grupo A) o consecutivamente, como una inyección de rADAMTS13 seguida inmediatamente por el rVWF (grupo B).

HAEMATE® P no solo carece de multímeros ultragrandes del VWF, sino también contiene ADAMTS13. Como se demostró en el Ejemplo 8, los ratones deficientes en ADAMTS13 no mostraron signos de trombogenicidad después del tratamiento con HAEMATE® P.

#### 1. Protocolo para la coadministración de ADAMTS13 y rVWF

Se usaron las dosis de 2000 RCoU/kg del rVWF (equivalente a 15,9 mL/kg) y 19,4 µg/kg de rADAMTS13 (equivalente a 5 mL/kg). Ambos ítems se mezclaron en la jeringuilla inmediatamente antes de la inyección de la vena de la cola en el grupo A de tratamiento. El rADAMTS13 se inyectó inmediatamente antes de la inyección del rVWF en el grupo B de tratamiento.

Similar a los protocolos para los Ejemplos anteriores, los animales se observaron en busca de signos indicativos de toxicidad después de la inyección hasta la conclusión en el día 1. Las muestras de sangre se extrajeron bajo anestesia (i.m. ketamina + xilacina) mediante punción cardíaca 1 día después de la administración para el análisis de las variables hematológicas (hematocrito, conteo plaquetario) y serológicas (LDH, CK).

Se realizó una necropsia y los órganos seleccionados (pulmones [perfundidos, sin tráquea], corazón, riñones, glándulas adrenales, hígado, cerebro [sin médula oblonga], bazo, ojos), se preservaron en solución de formaldehído al 4 % para la evaluación histopatológica después de un procedimiento de tinción estándar con hematoxilina-eosina.

Se colectan los cortes de tejido de todas las muestras de tejido en la necropsia de cada animal (así como también muestras de tejido de todos los hallazgos macroscópicos) se procesaron, se embebieron en parafina, se cortaron a un grosor nominal de 2 a 4 micrómetros, se tñieron con hematoxilina y eosina (H&E) y se examinaron por microscopio óptico.

#### 2. Resultados

No ocurrieron muertes y no se registraron signos clínicos indicativo de toxicidad en ninguno de los animales.

Los datos clínicos y analíticos de las variables hematológicas y serológicas se resumen a continuación.

Tabla 22

Grupos de Tratamiento	Mortalidad (%)	Anomalías clínicas (%)	Análisis 1 Día (Media ± SEM)			
			Hematocrito (%)	Plaquetas (x1000/µL)	CK (U/L)	LDH (U/L)
A	0	0	41,3 ± 0,7	1065,6 ± 52,4	193,0 ± 16,4	255,9 ± 13,8
B	0	0	41,2 ± 0,5	716,2 ± 87,0	196,4 ± 15,2	346,7 ± 25,9

#### 3. Discusión

El objetivo de este estudio fue evaluar si la toxicidad aguda del rVWF puede atenuarse mediante la coadministración con ADAMTS13 recombinante en ratones deficientes en ADAMTS13.

La toxicidad del rVWF se observó claramente en los ratones deficientes en ADAMTS13 en el Ejemplo 8. El Ejemplo 8 también ilustra que HAEMATE® P no tiene un efecto significativo en los ratones deficientes en ADAMTS13 (control positivo).

5 En el presente estudio, no se observaron muertes o signos de toxicidad, lo que demuestra que la escisión por ADAMTS13 puede prevenir la toxicidad del rVWF.

10 Al comparar los datos analíticos, se midió una caída en el conteo plaquetario 1 día después de la administración consecutiva de rADAMTS13 y el rVWF, por el contrario a la administración de los ítems premezclados. No hubo hallazgos en la necropsia. Se registraron cambios histopatológicos para el corazón que consisten en microtrombos coronarios (de grado mínimo a leve), necrosis del miocardio, (de grado mínimo a moderado), y perivasculitis coronaria levemente aumentada en los grupos A y B de animales tratados con el ítem de prueba.

15 Además, se registró una fibrosis de grado leve en un único animal del grupo B tratado con el ítem de prueba. La fibrosis pareció ser una afección crónica, preexistente, tal como se registró en un animal sacrificado un día después de la administración. Por lo tanto, se consideró no relacionada con el ítem de prueba.

20 Al comparar los dos grupos (A vs. B), no se registraron diferencias pronunciadas en la gravedad o incidencia de los cambios histopatológicos. Por el contrario al estudio previo sin coadministración de rADAMTS13, no se registró mortalidad o hallazgos macroscópicos en la necropsia en este estudio. La incidencia y la gravedad de la necrosis del miocardio fue similar en ambos estudios. Sin embargo, la microtrombosis coronaria y la perivasculitis coronaria fue menos pronunciada en los ratones tratados con ADAMTS13. Además, los ratones que recibieron ADAMTS13 solo mostraron microtrombos en el corazón, mientras que se registraron microtrombos para el corazón, cerebro, riñones, y pulmones de los ratones en el estudio previo.

25 Los resultados del presente estudio demuestran que la escisión por ADAMTS13 puede prevenir la toxicidad del rVWF.

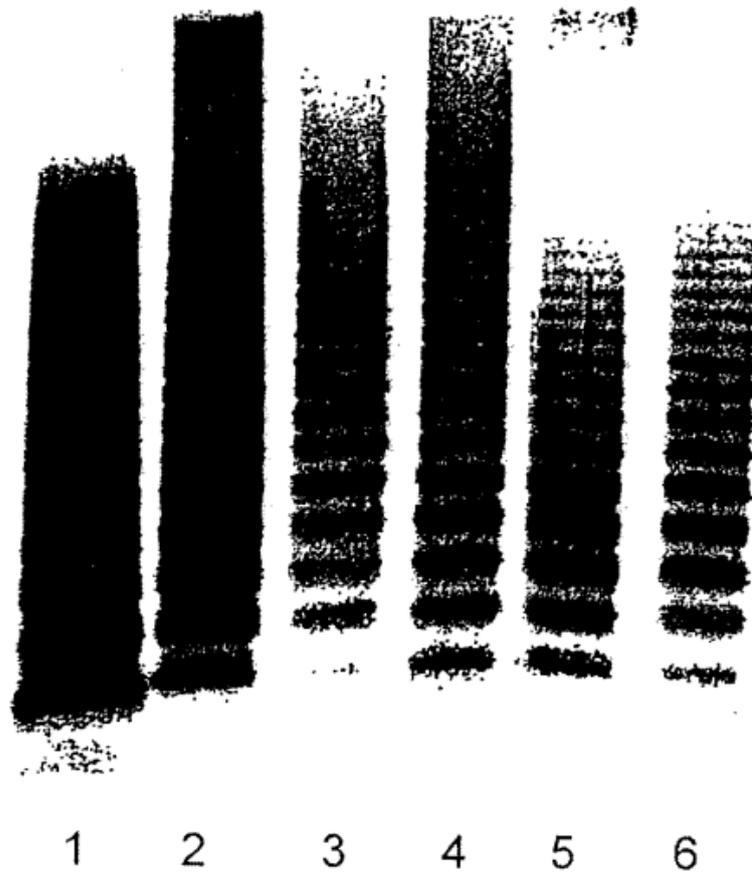
30 La invención se describió en términos de modalidades particulares encontradas o que se propone que comprenden modos específicos para la práctica de la invención. Varias modificaciones y variaciones de la invención que se describe serán evidentes para aquellos expertos en la técnica.

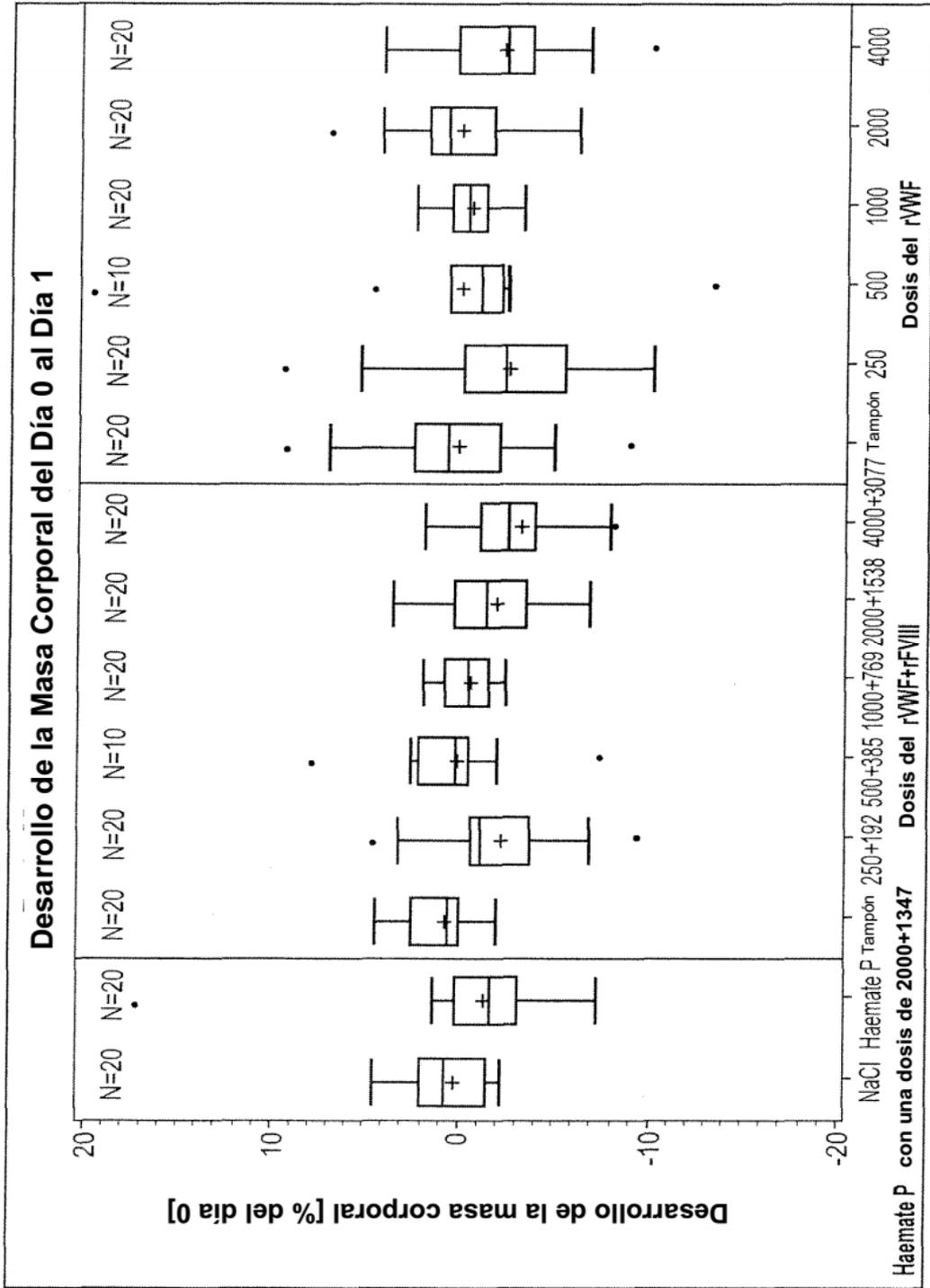
35 Aunque la invención se describió en relación con modalidades específicas, se debe entender que la invención como se reivindica no se debe limitar indebidamente a tales modalidades específicas. De hecho, varias modificaciones de los modos descritos para llevar a cabo la invención que son obvias para aquellos expertos en los campos relevantes siempre y cuando estén dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

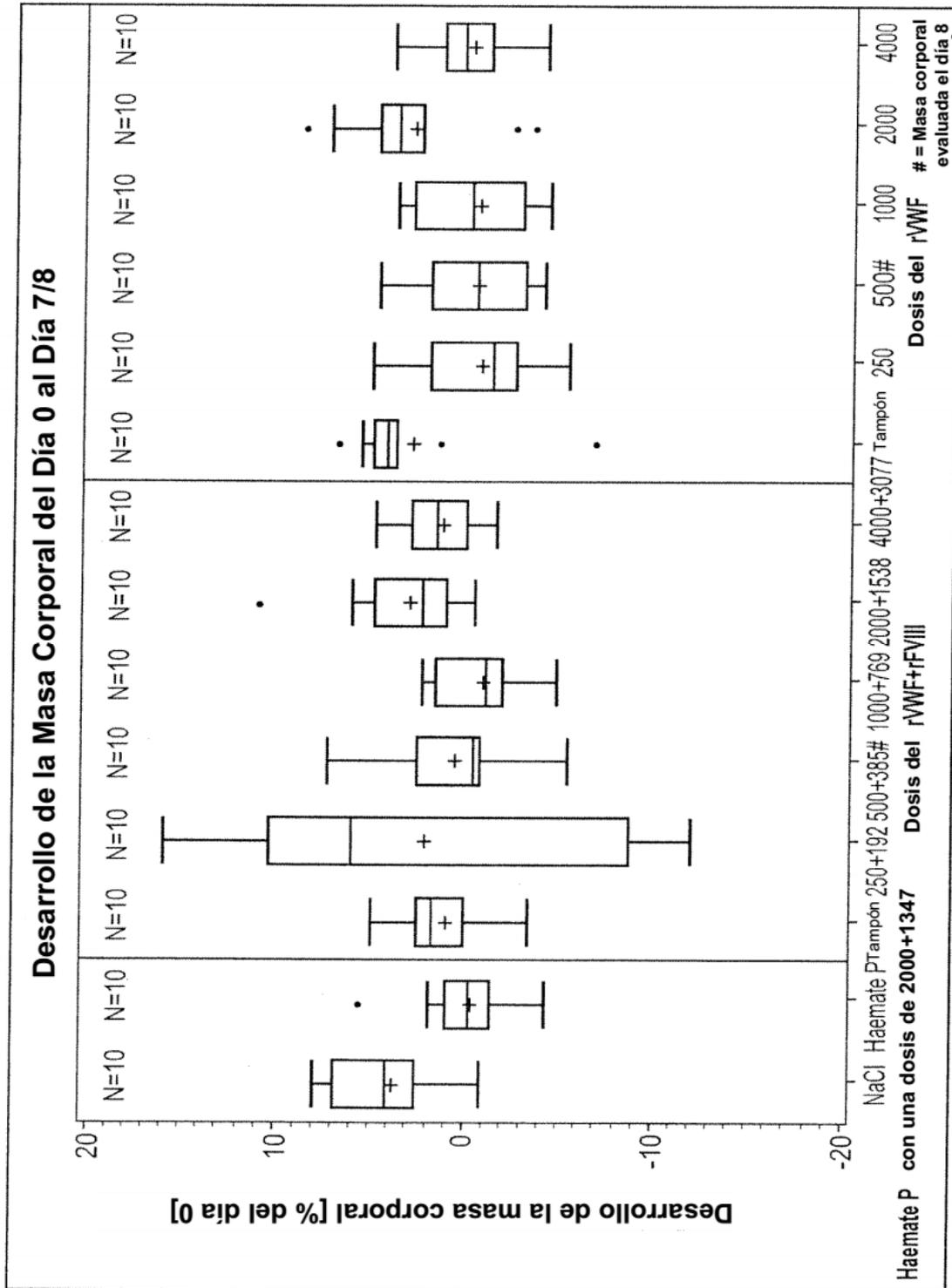
- 5 1. Un modelo de ratón de un trastorno de la coagulación sanguínea, dicho trastorno que se caracteriza por la presencia de coágulos de sangre en los vasos sanguíneos a través del cuerpo, dicho modelo de ratón que comprende una incapacidad para degradar el polipéptido del factor von Willebrand (VWF) humano recombinante que comprende multímeros ultragrandes, en donde dicho trastorno en dicho modelo de ratón se provoca después de la administración intravenosa de una dosis del VWF humano recombinante es mayor o igual a 500 RCoU/ kg de peso corporal o, si el ratón es deficiente en el polipéptido del VWF, la dosis del VWF humano recombinante es mayor o igual a 1000 RCoU/kg de peso corporal, en donde el modelo de ratón muestra cambios histopatológicos indicativos de coagulopatía intravascular diseminada y/o púrpura trombocitopénica trombótica, y en donde dicho modelo de ratón es adecuado para probar la eficacia de un agente terapéutico en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea.
- 15 2. El modelo de la reivindicación 1, en donde el trastorno es la púrpura trombocitopénica trombótica.
3. El modelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ratón es deficiente en un polipéptido de la desintegrina y metaloproteasa con trombospondina tipo 1 dominio 13 (ADAMTS13).
- 20 4. El modelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ratón es deficiente en el polipéptido del VWF.
5. El modelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el ratón es de una cepa de C57BL/6J.
- 25 6. El modelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el Factor VIII recombinante (rFVIII) además se administra al modelo.
7. El modelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosis es mayor o igual a 2000 RCoU/kg de peso corporal.
- 30 8. El modelo de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dosis es mayor o igual a 4000 RCoU/kg de peso corporal.

# Figura 1

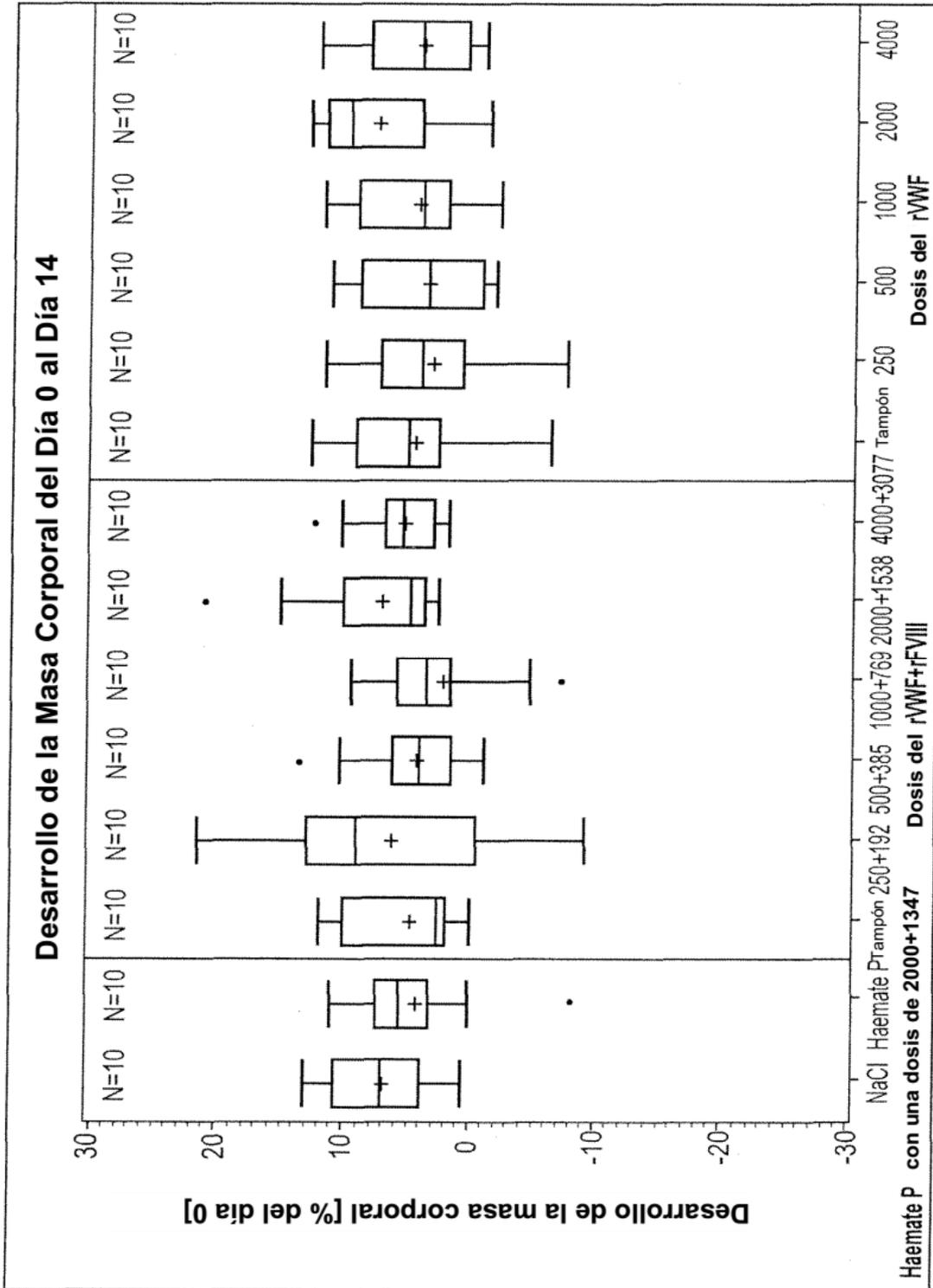




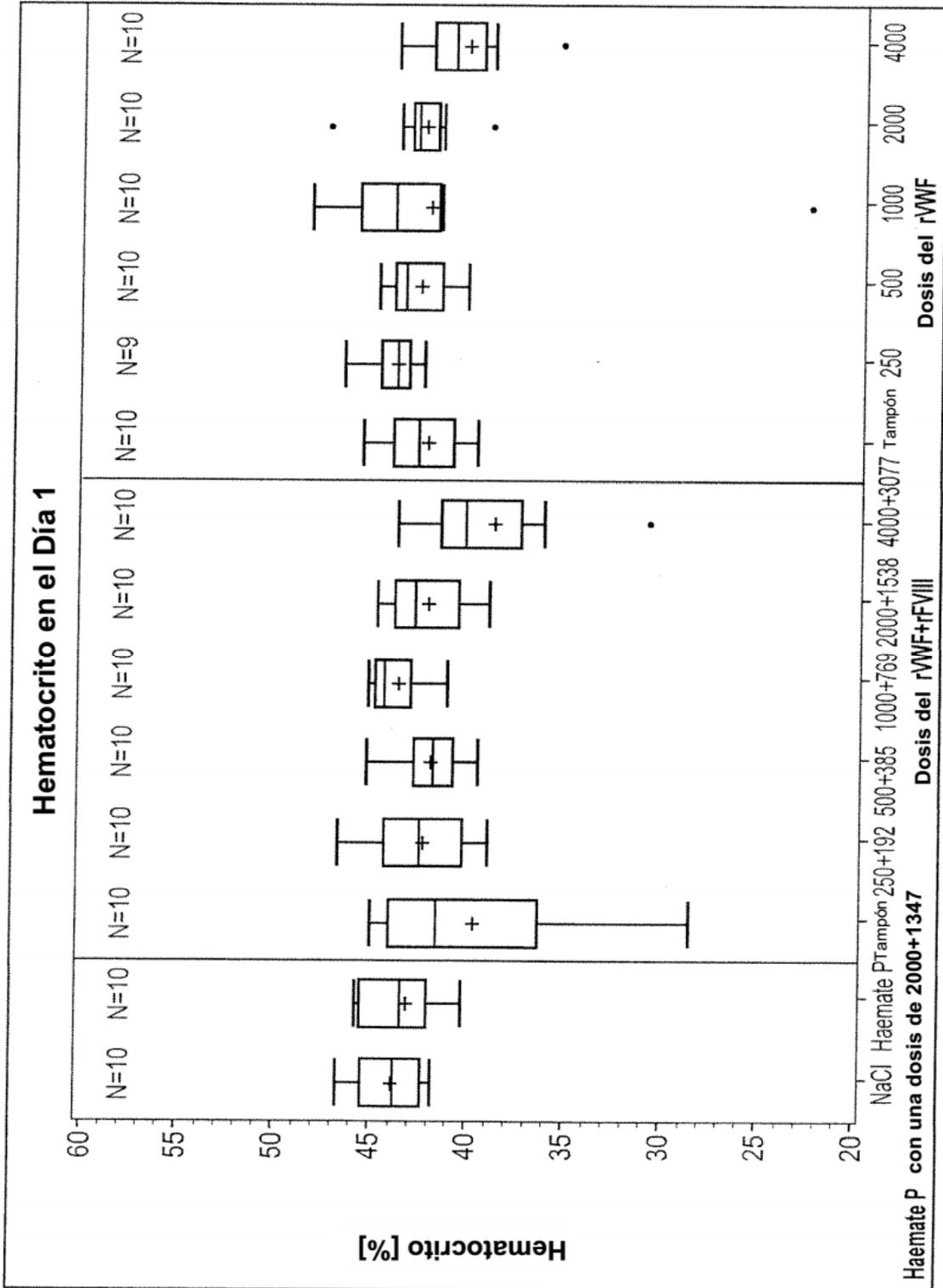
**Figura 2**



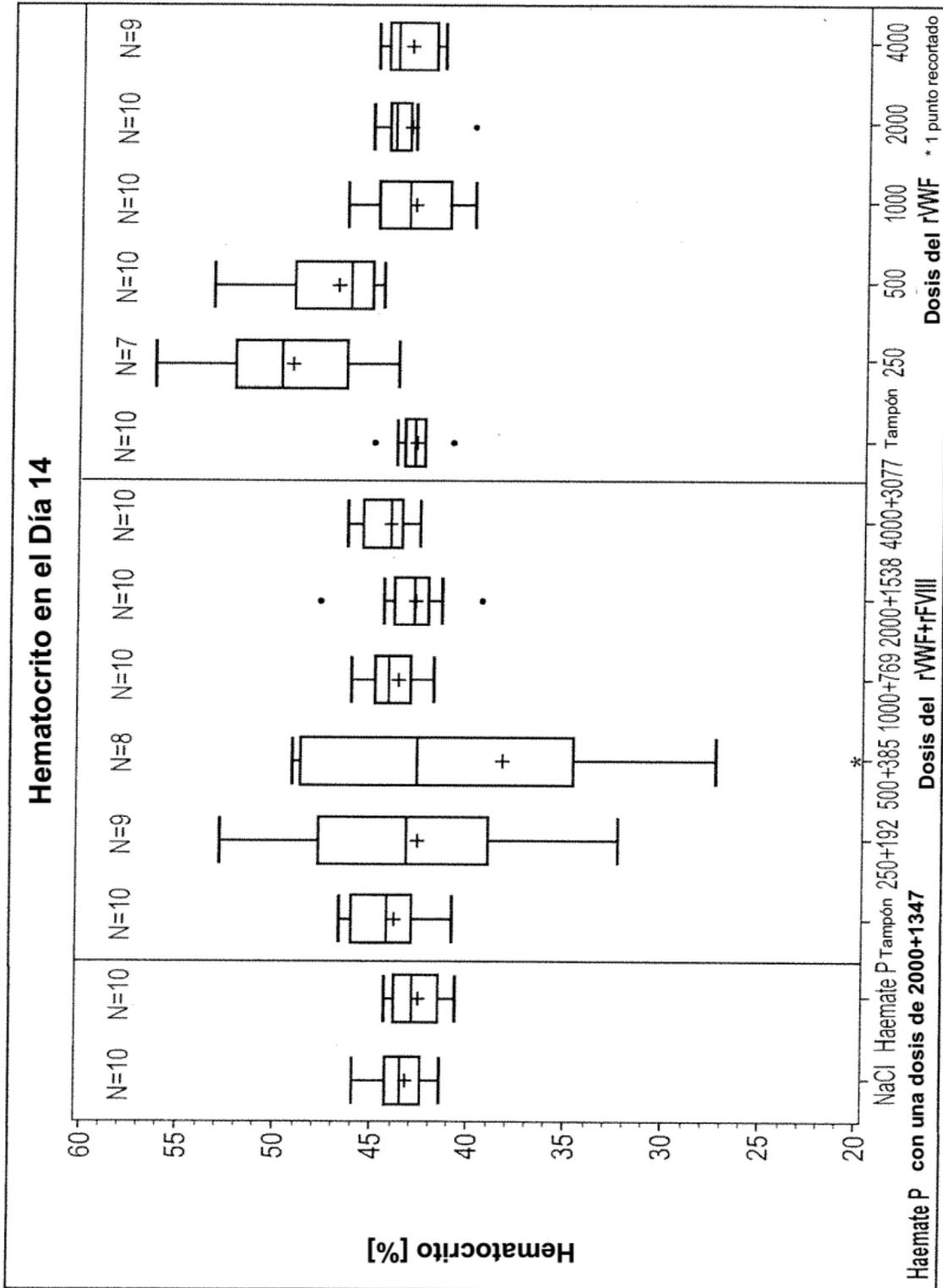
**Figura 3**



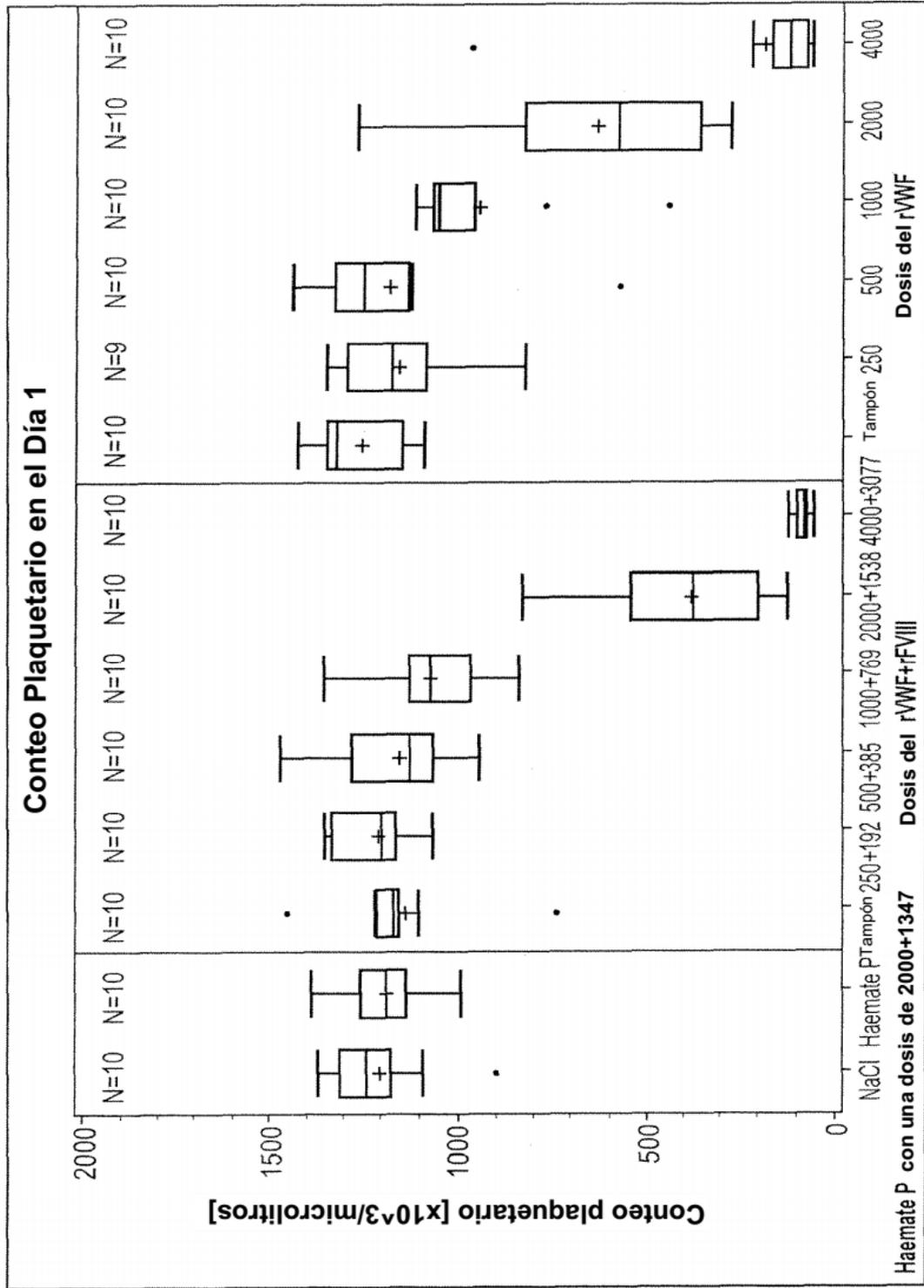
**Figura 4**



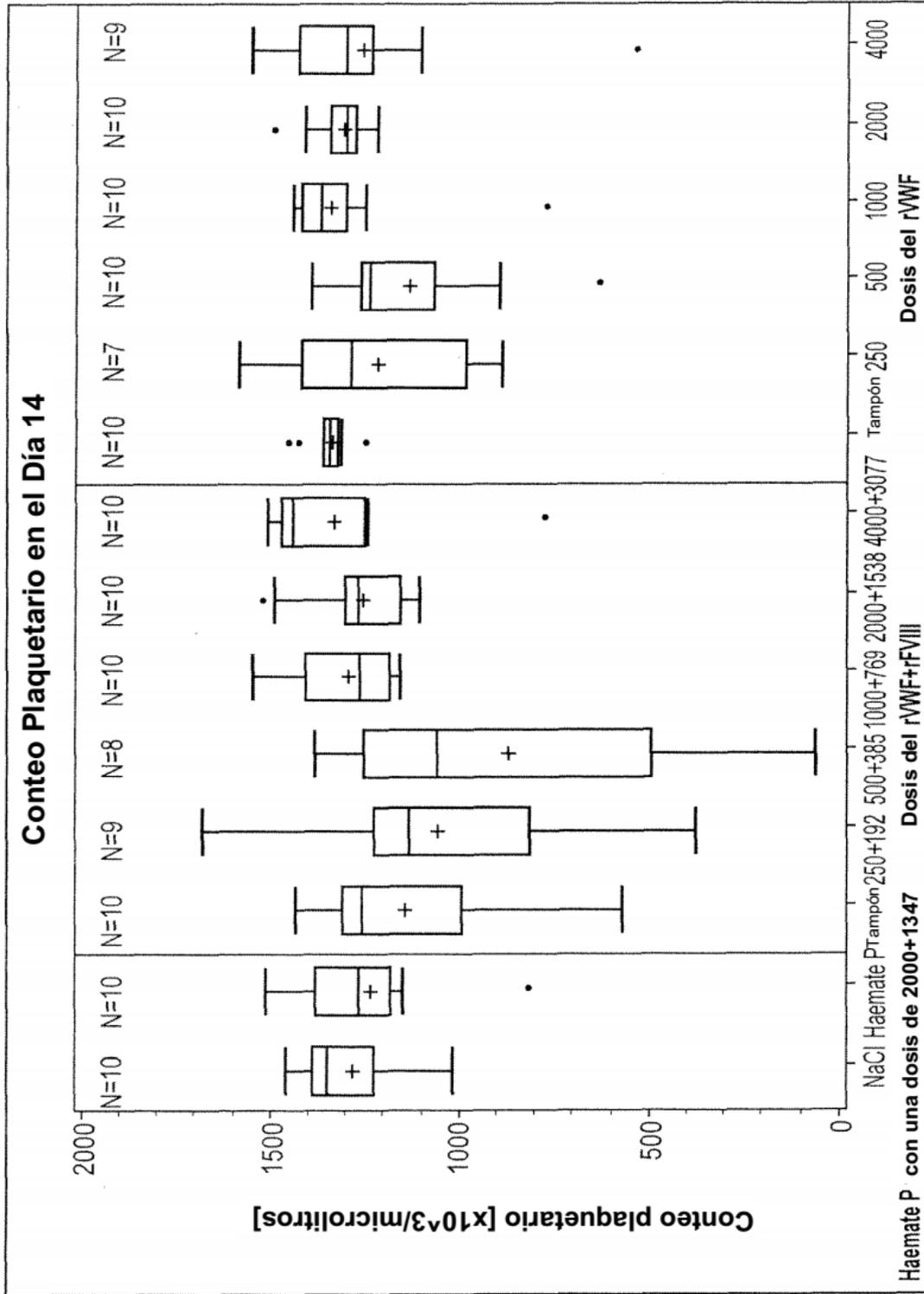
**Figura 5**



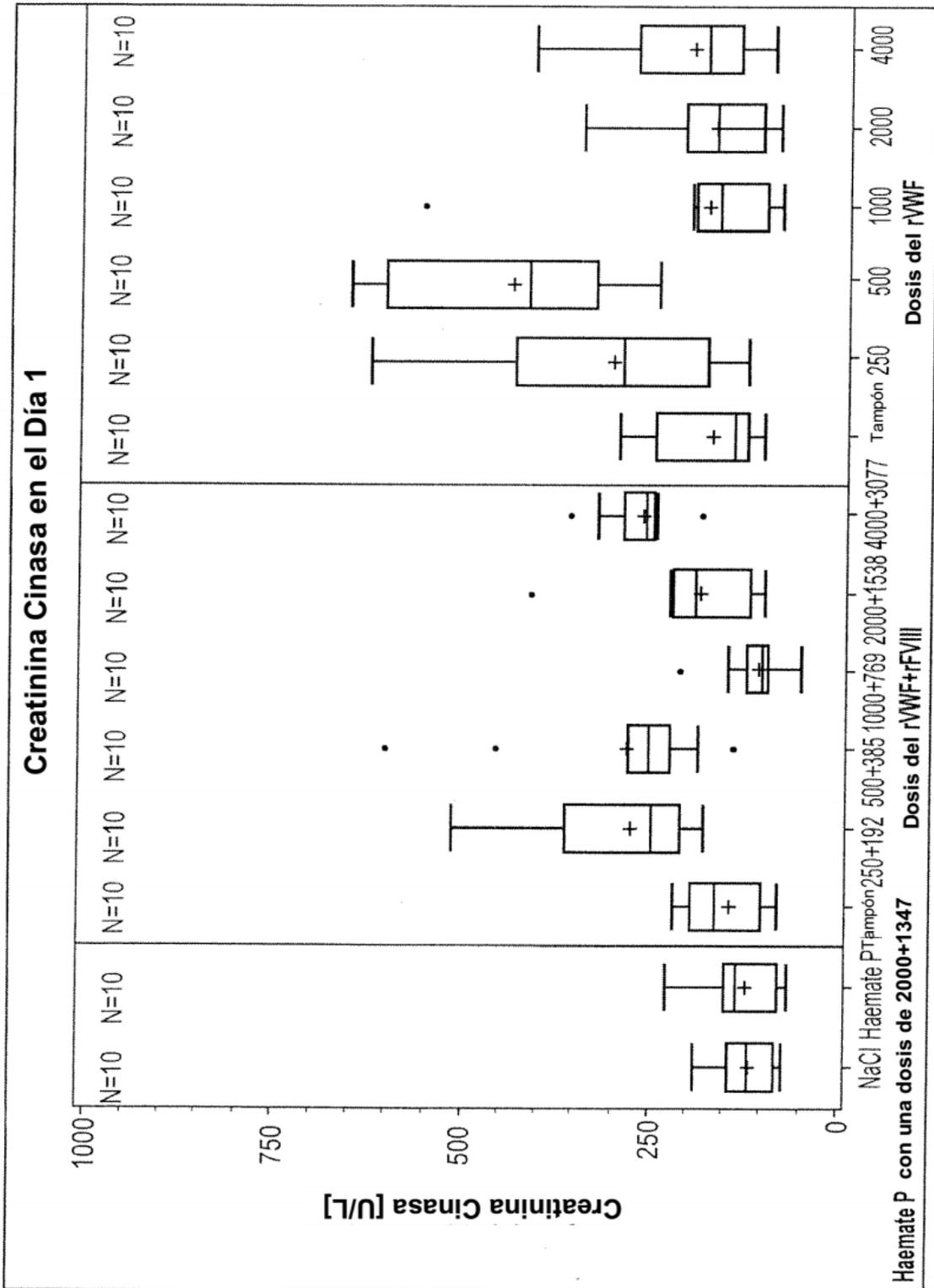
**Figura 6**



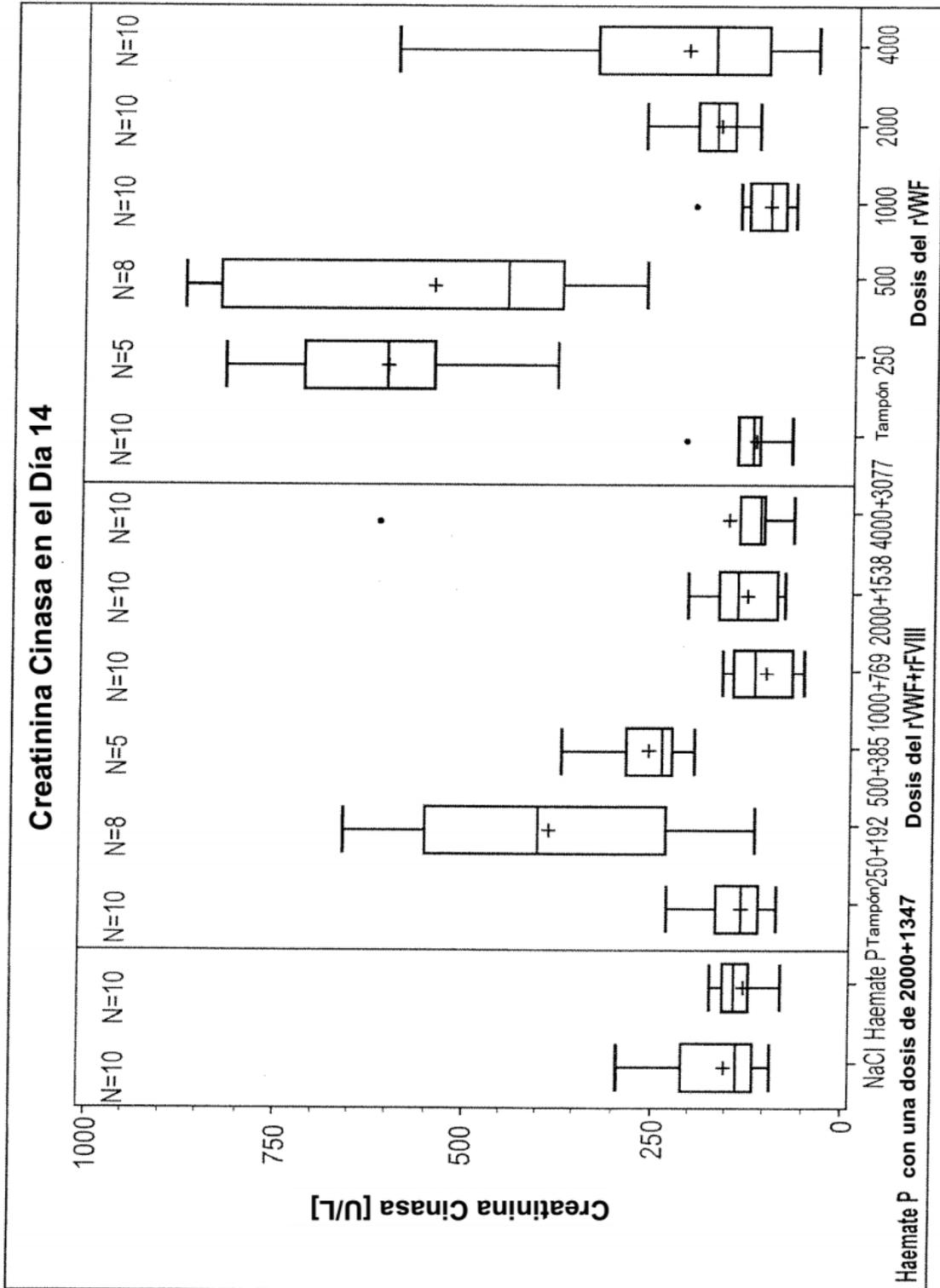
**Figura 7**



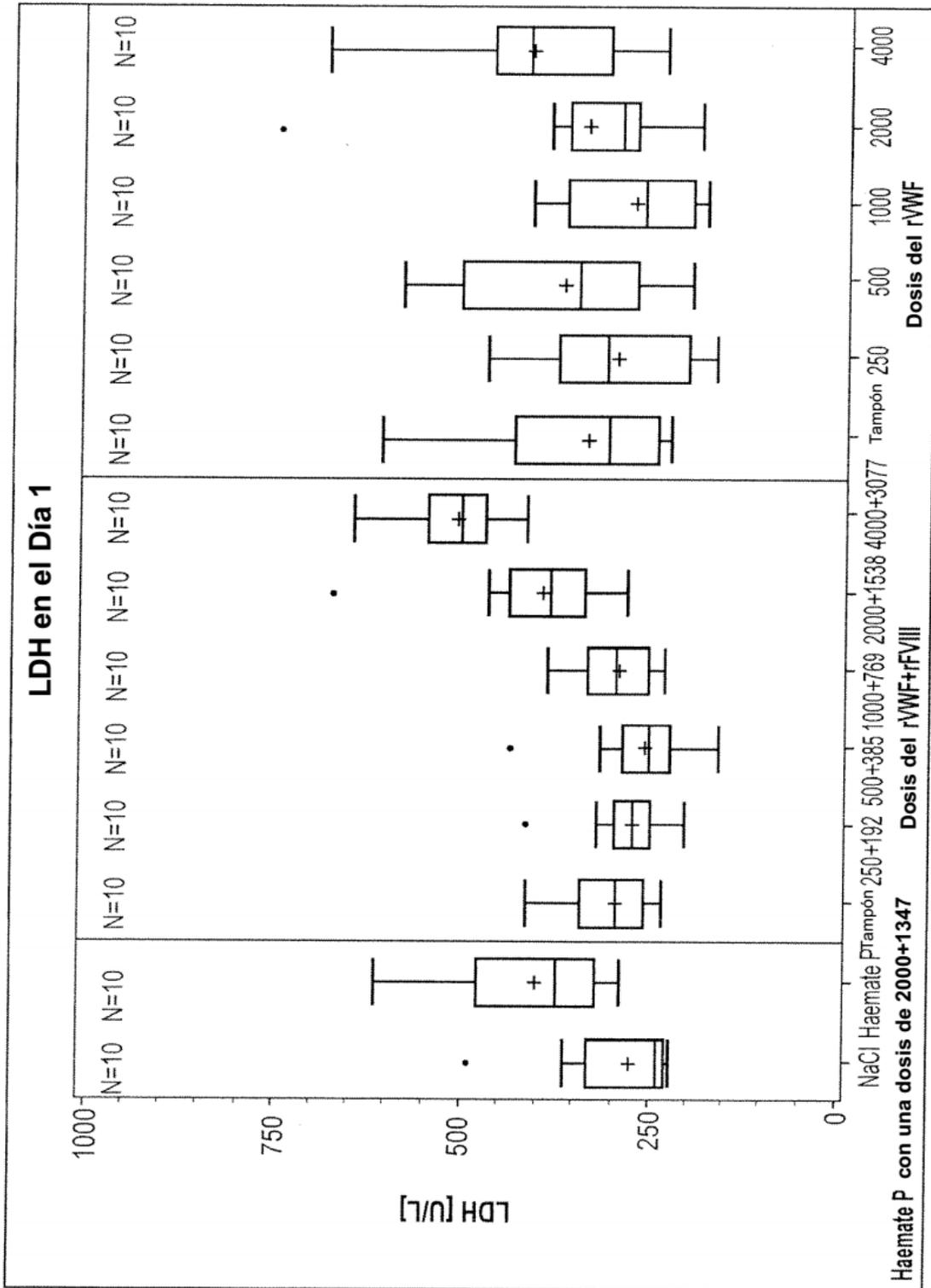
**Figura 8**



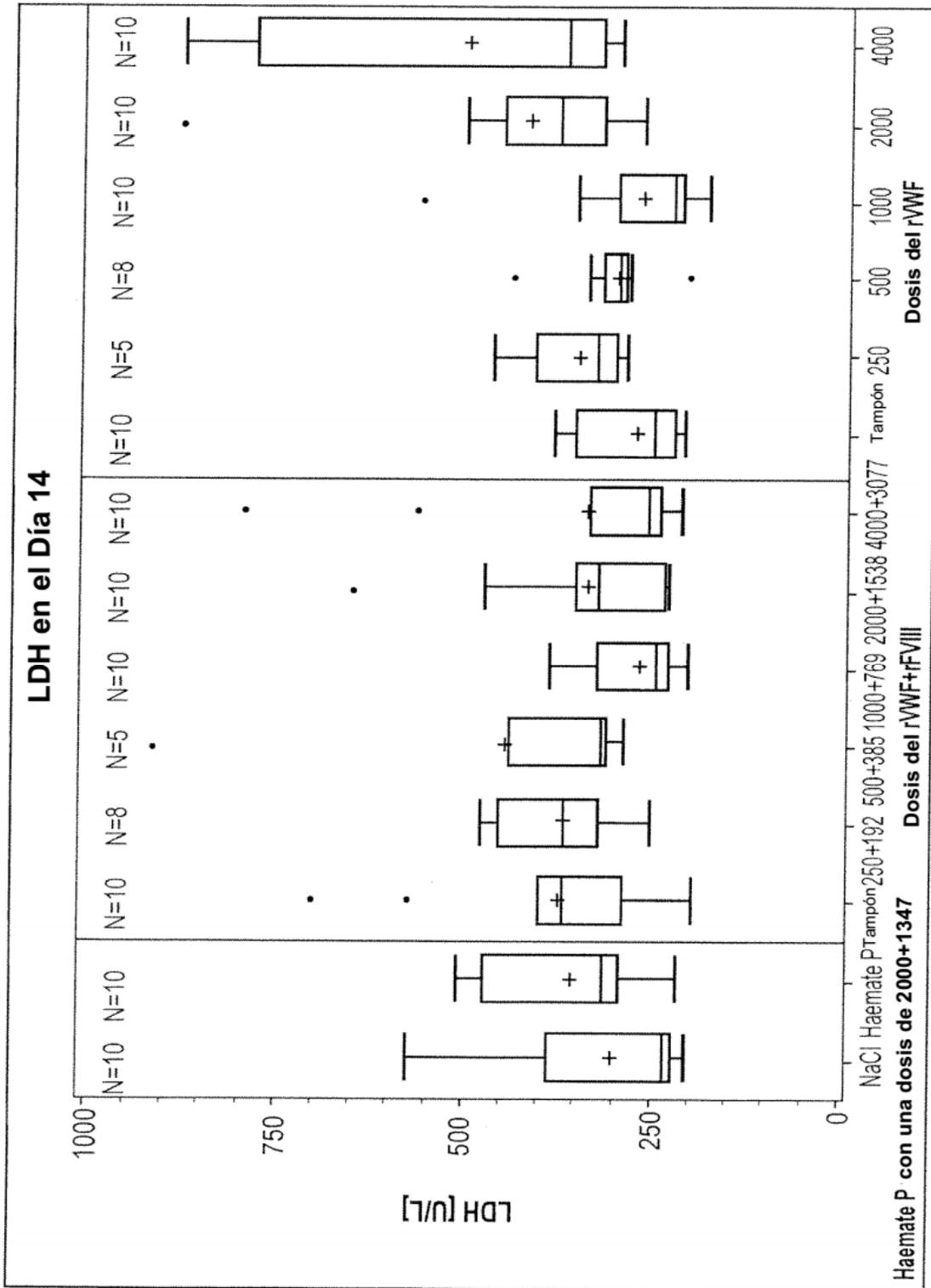
**Figura 9**



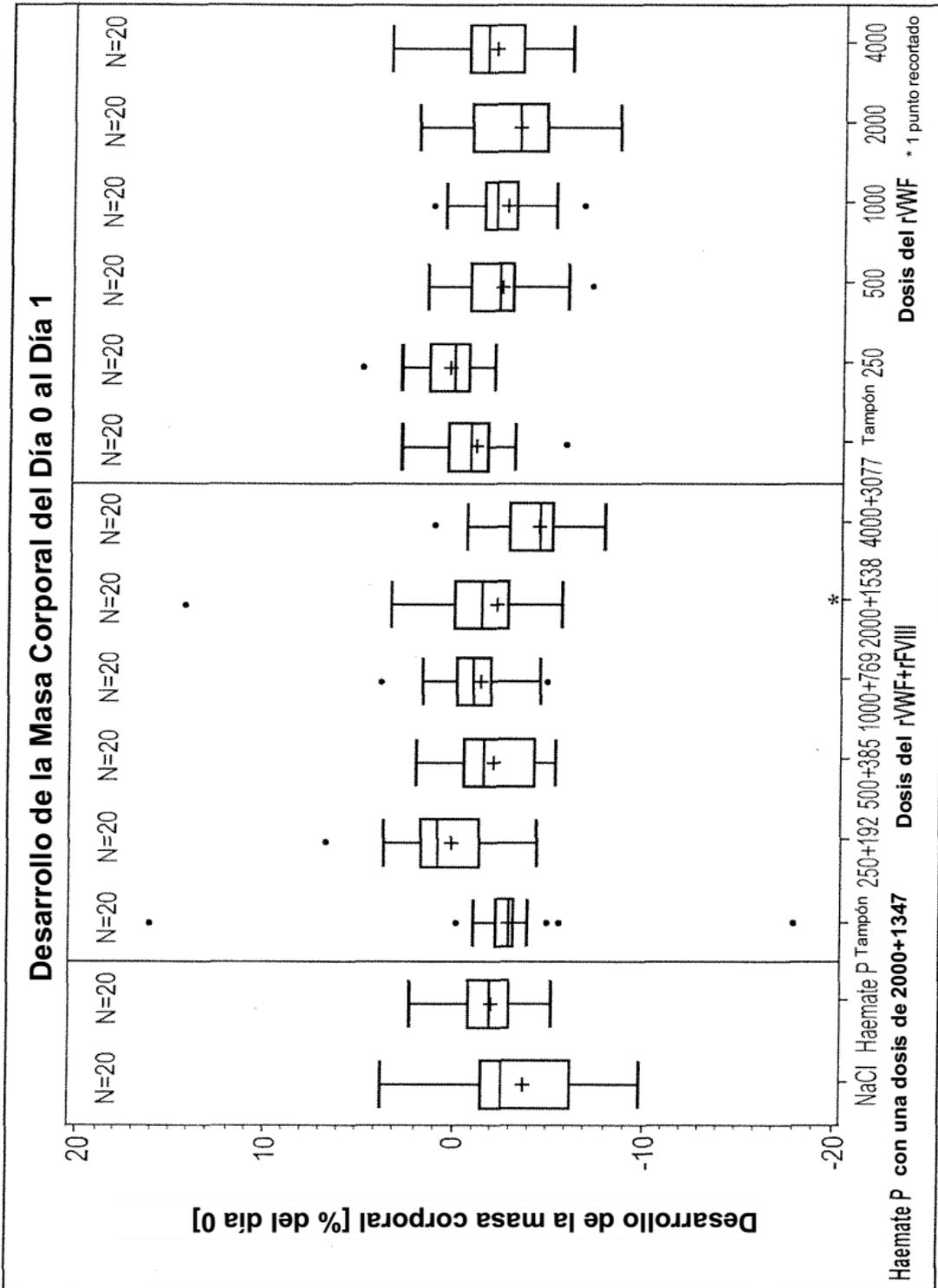
**Figura 10**



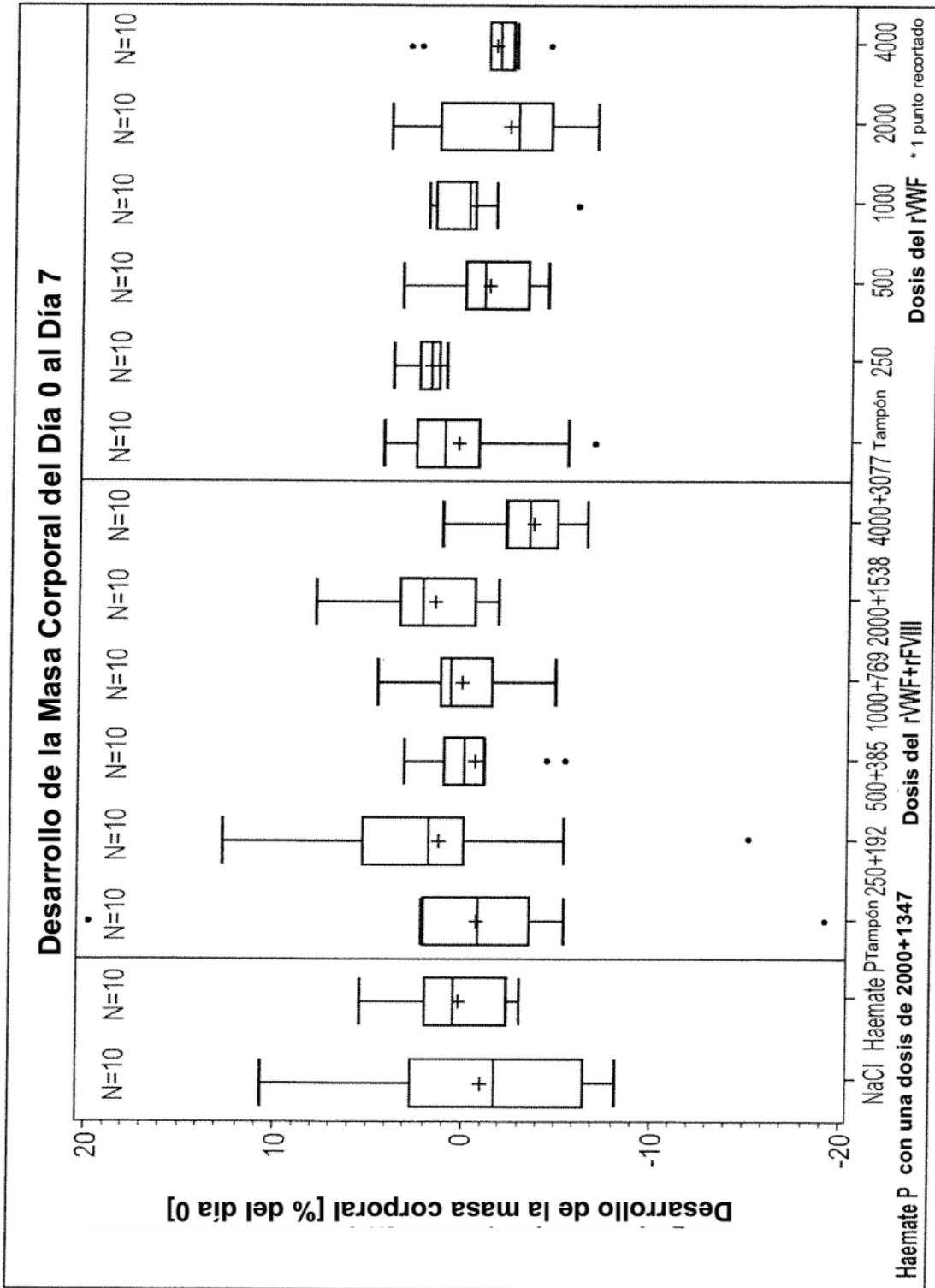
**Figura 11**



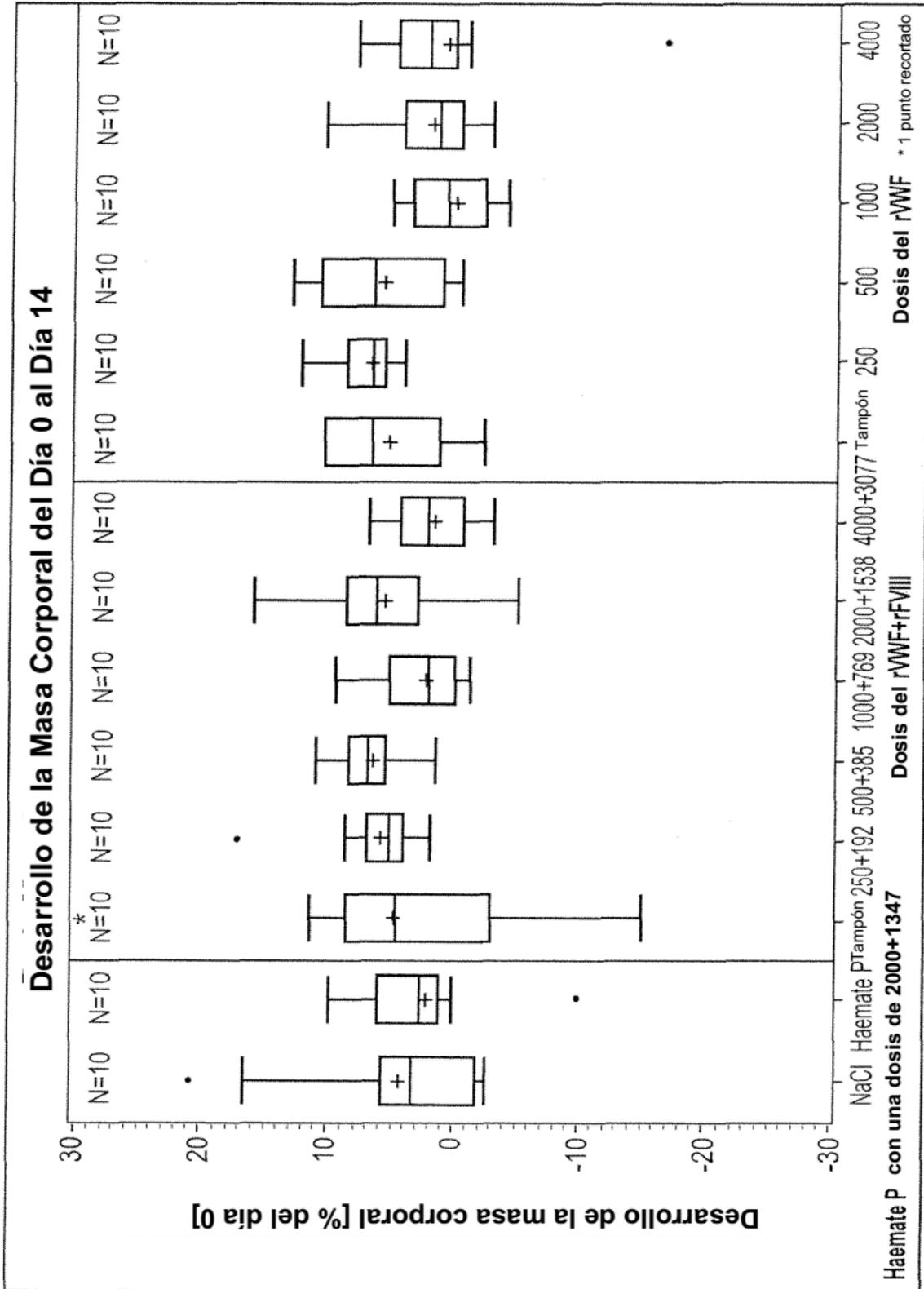
**Figura 12**



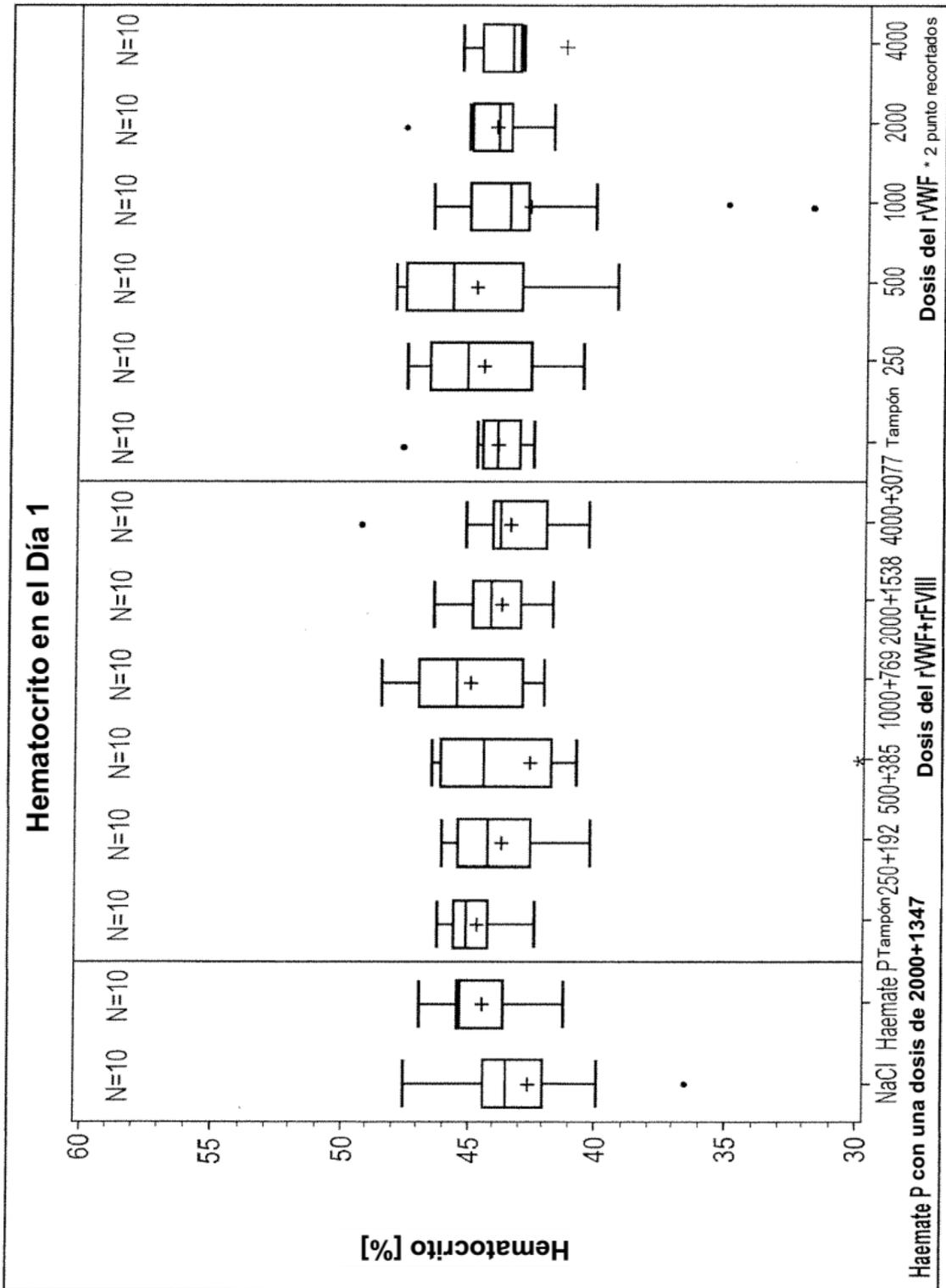
**Figura 13**



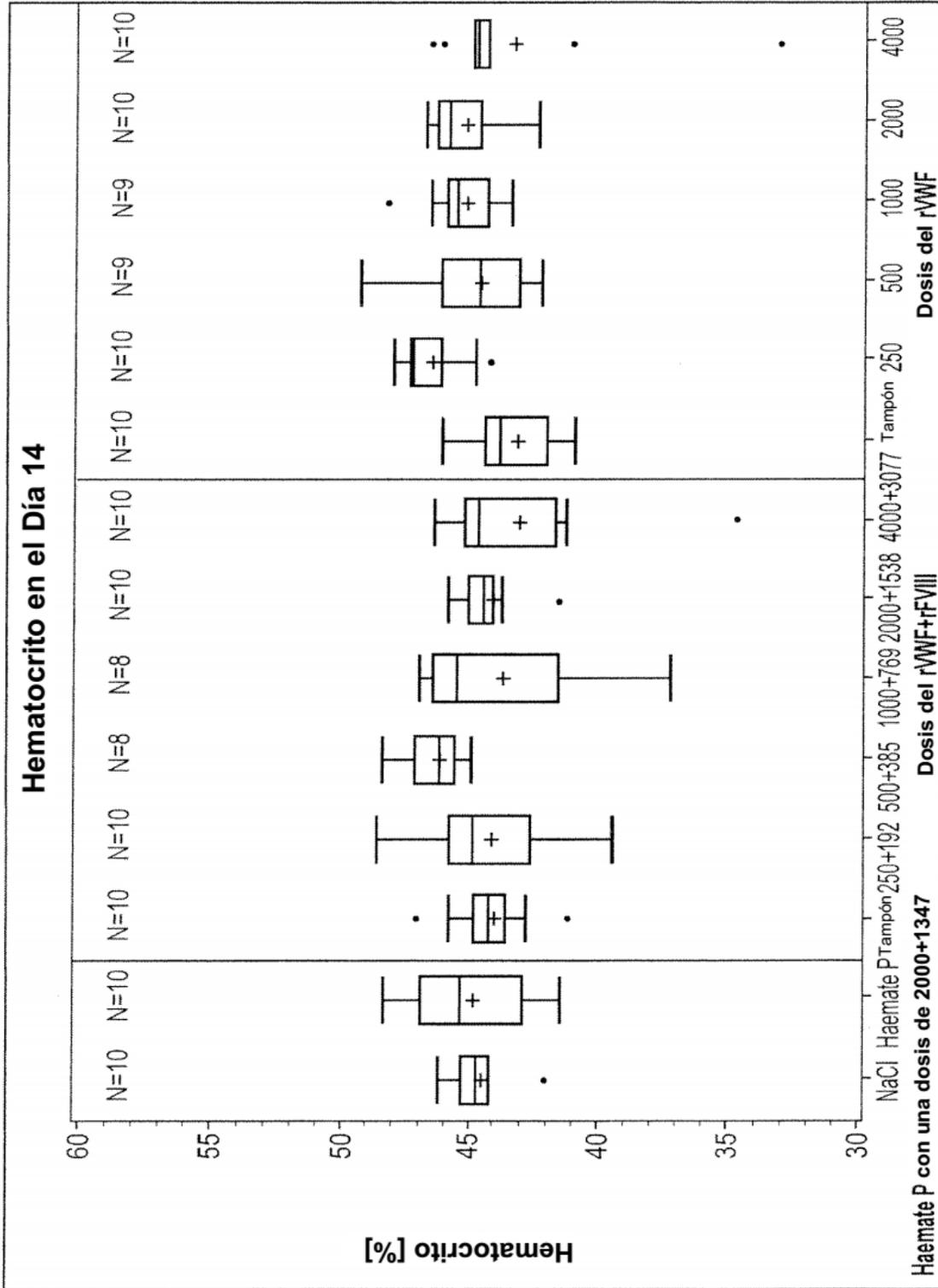
**Figura 14**



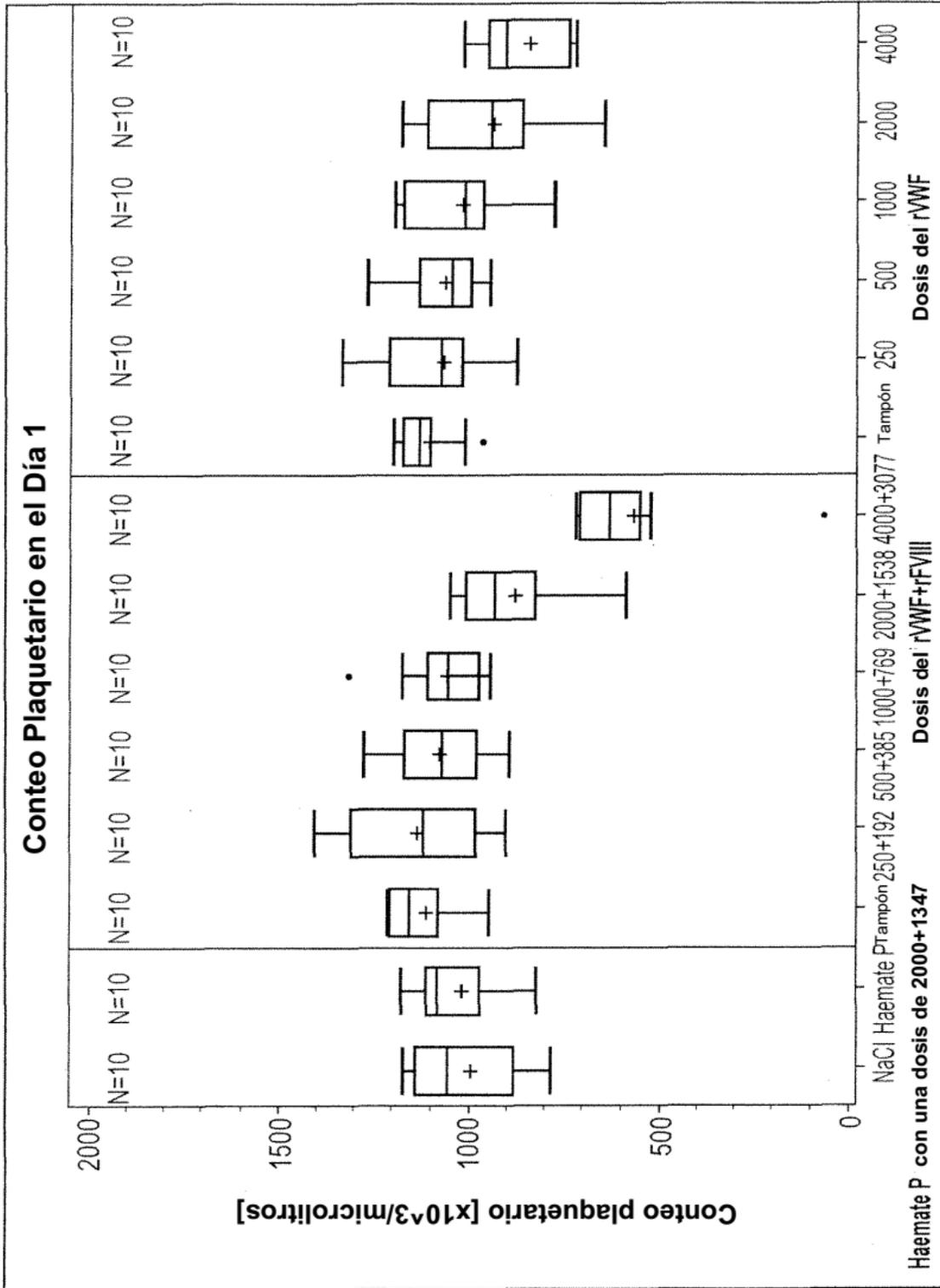
**Figura 15**



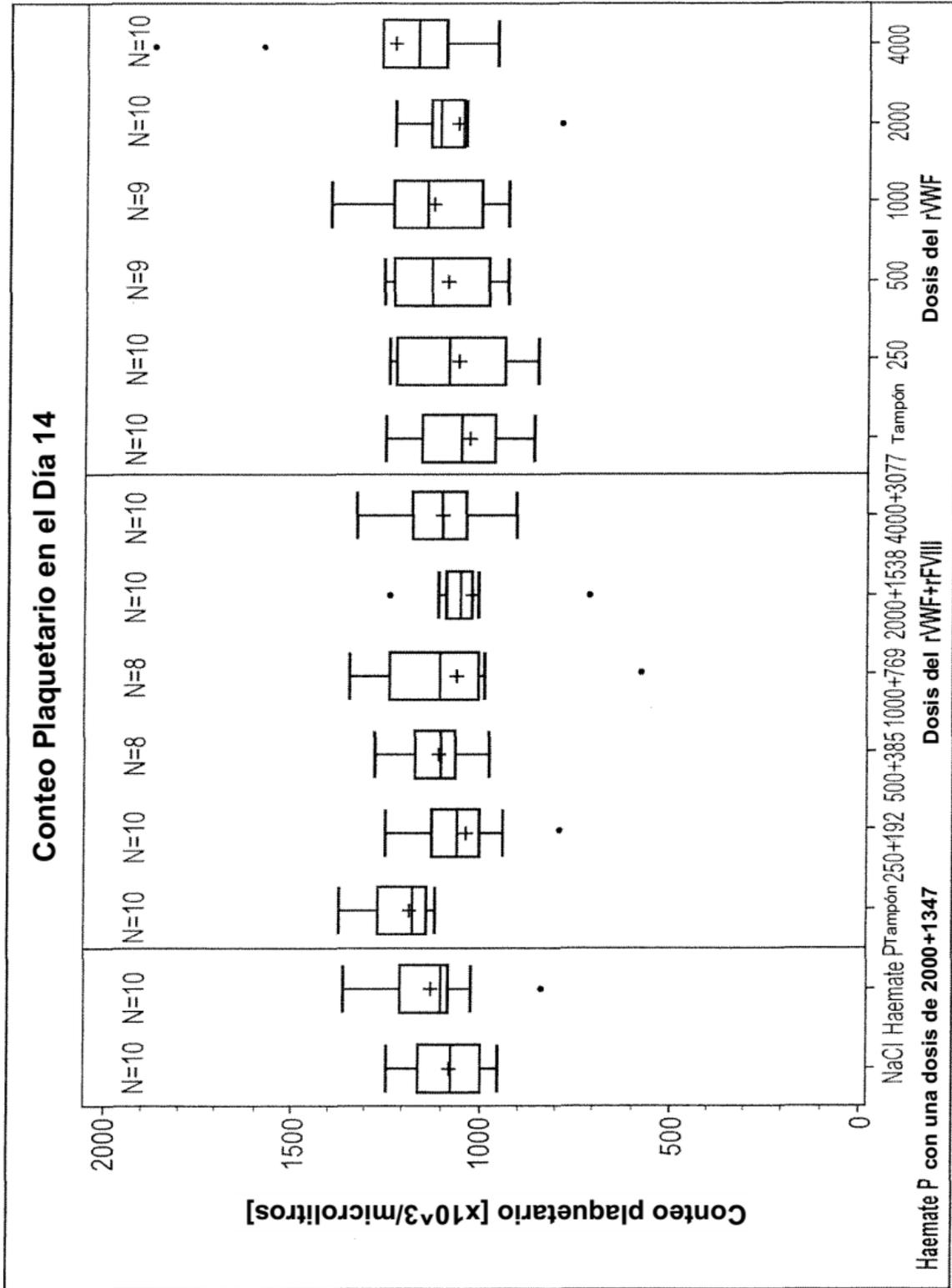
**Figura 16**



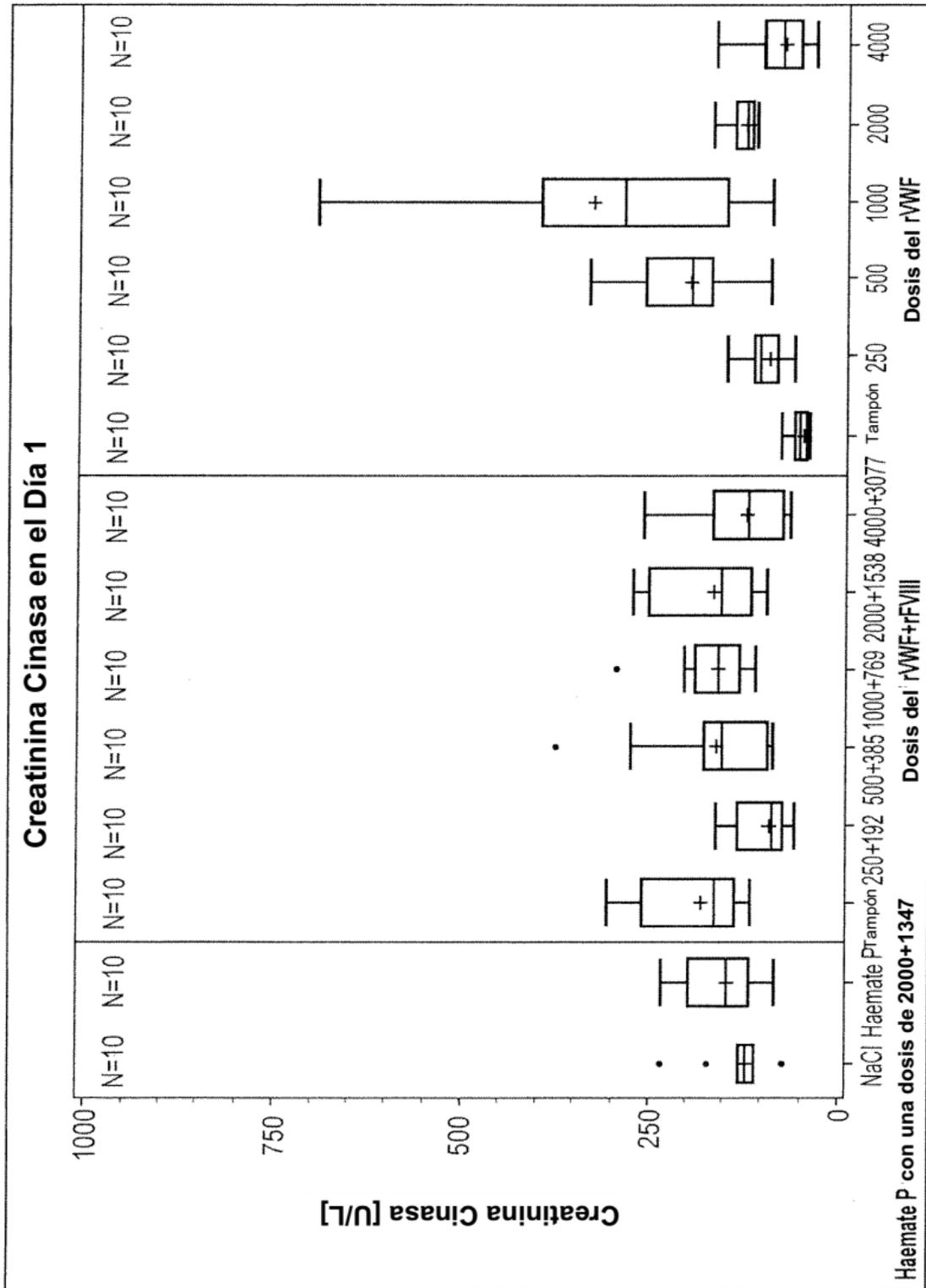
**Figura 17**



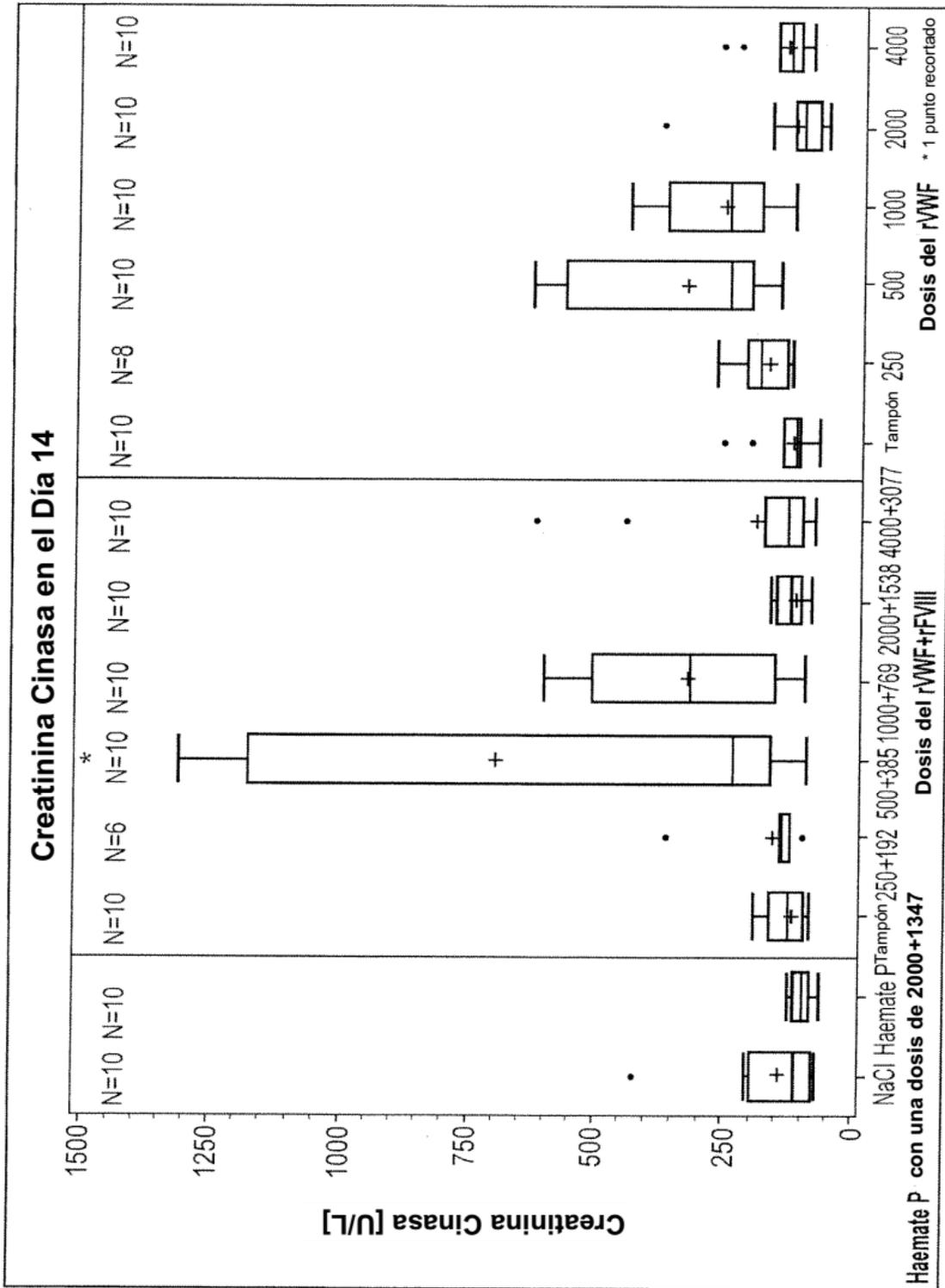
**Figura 18**



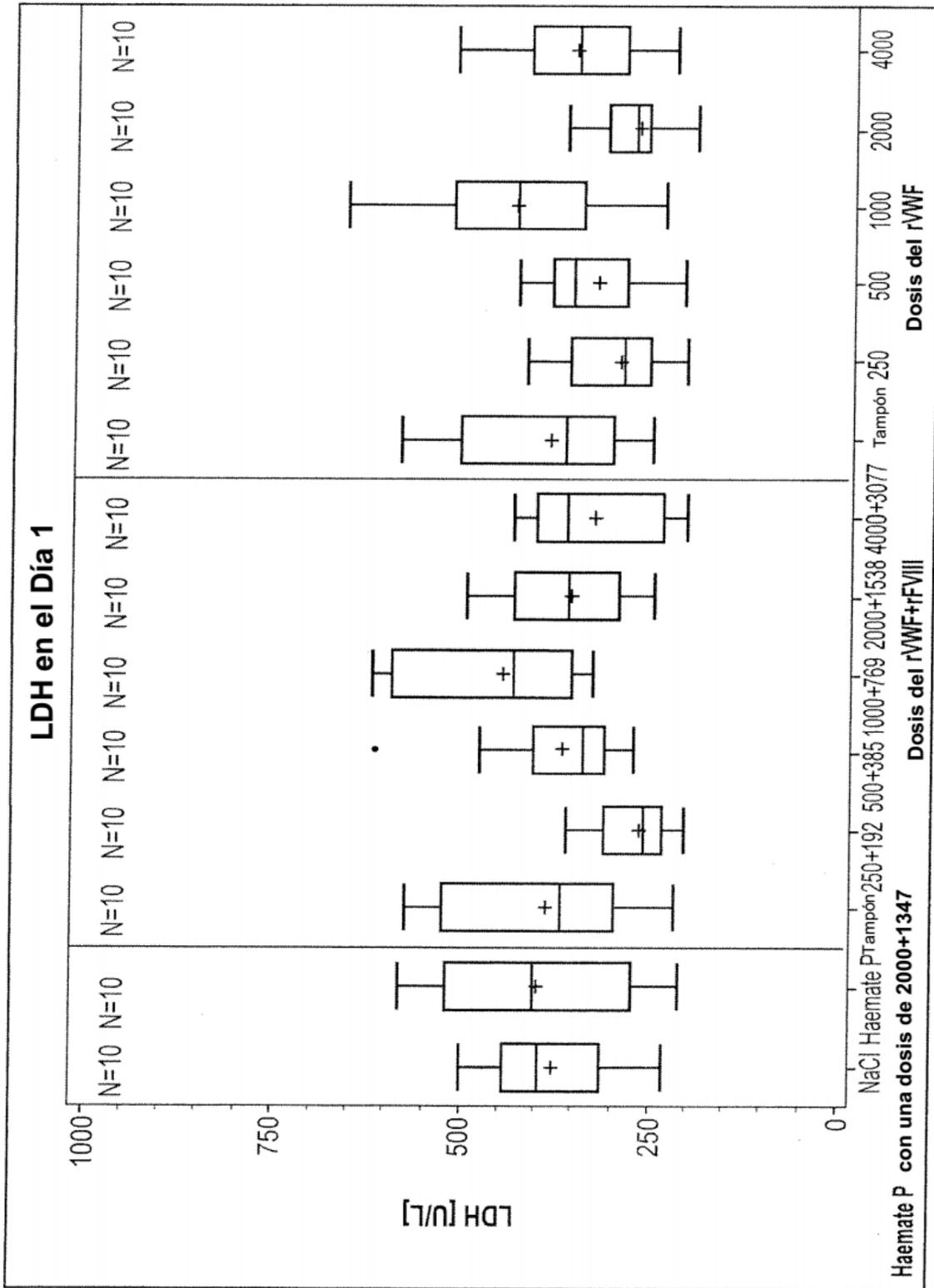
**Figura 19**



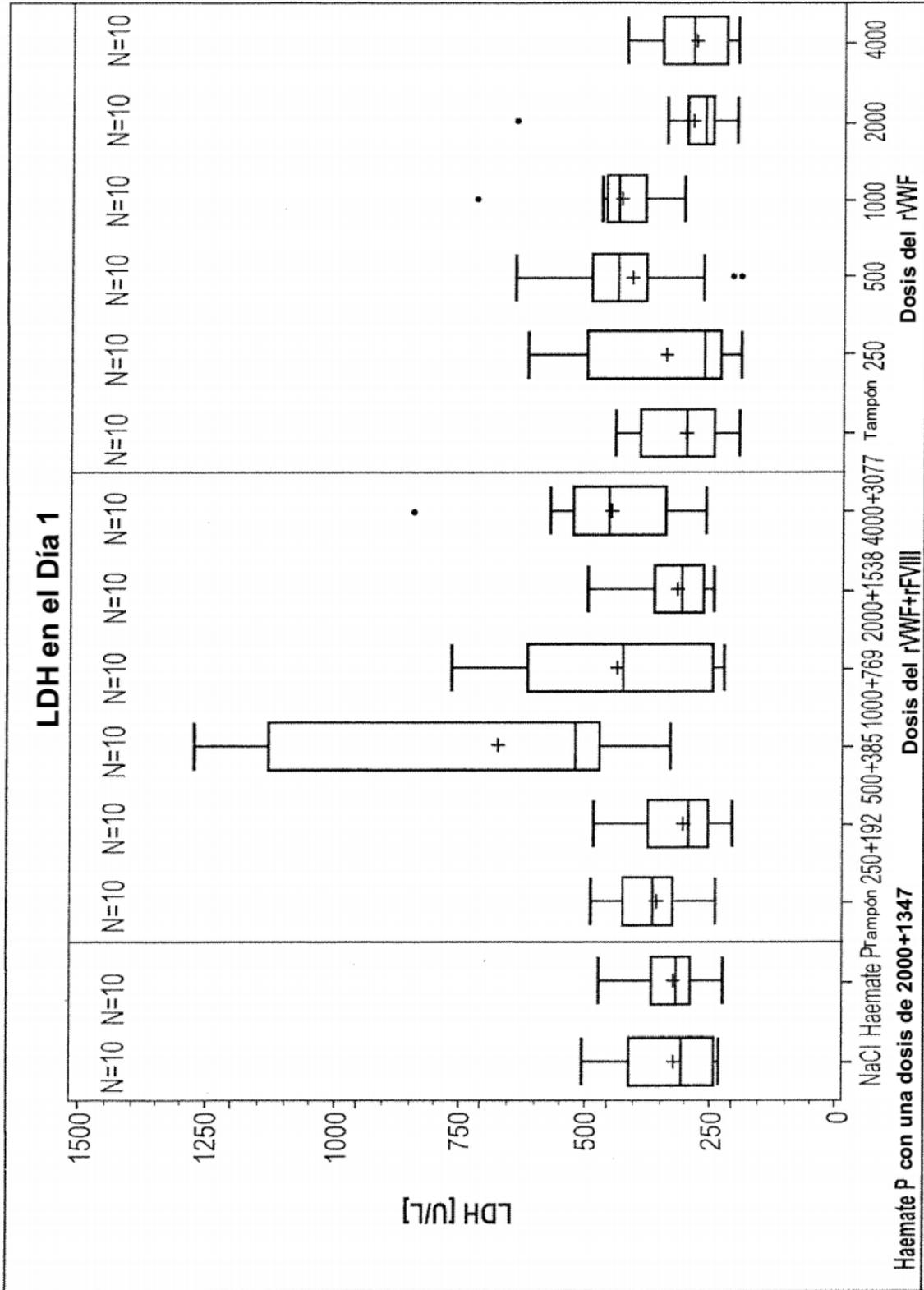
**Figura 20**



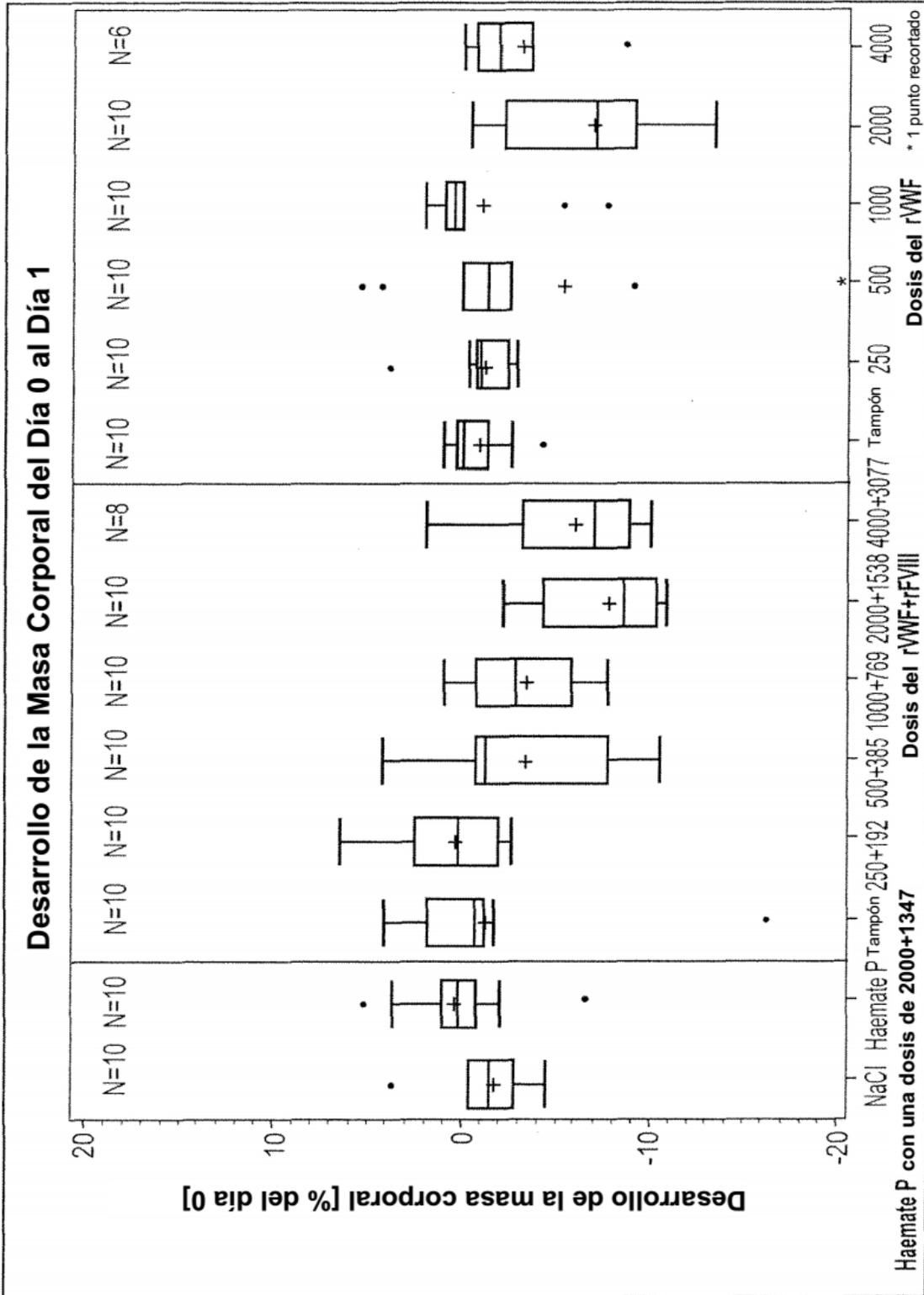
**Figura 21**



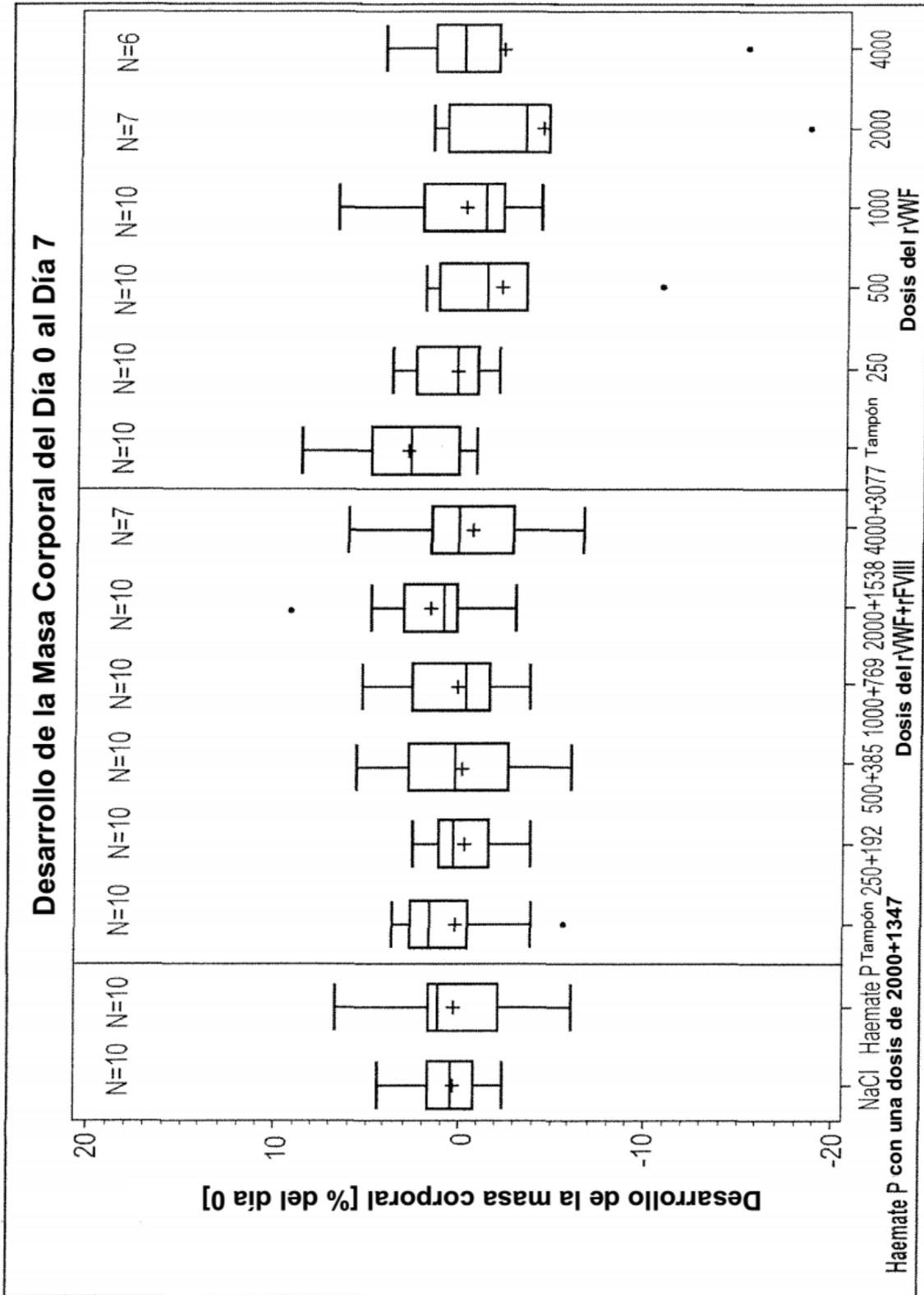
**Figura 22**



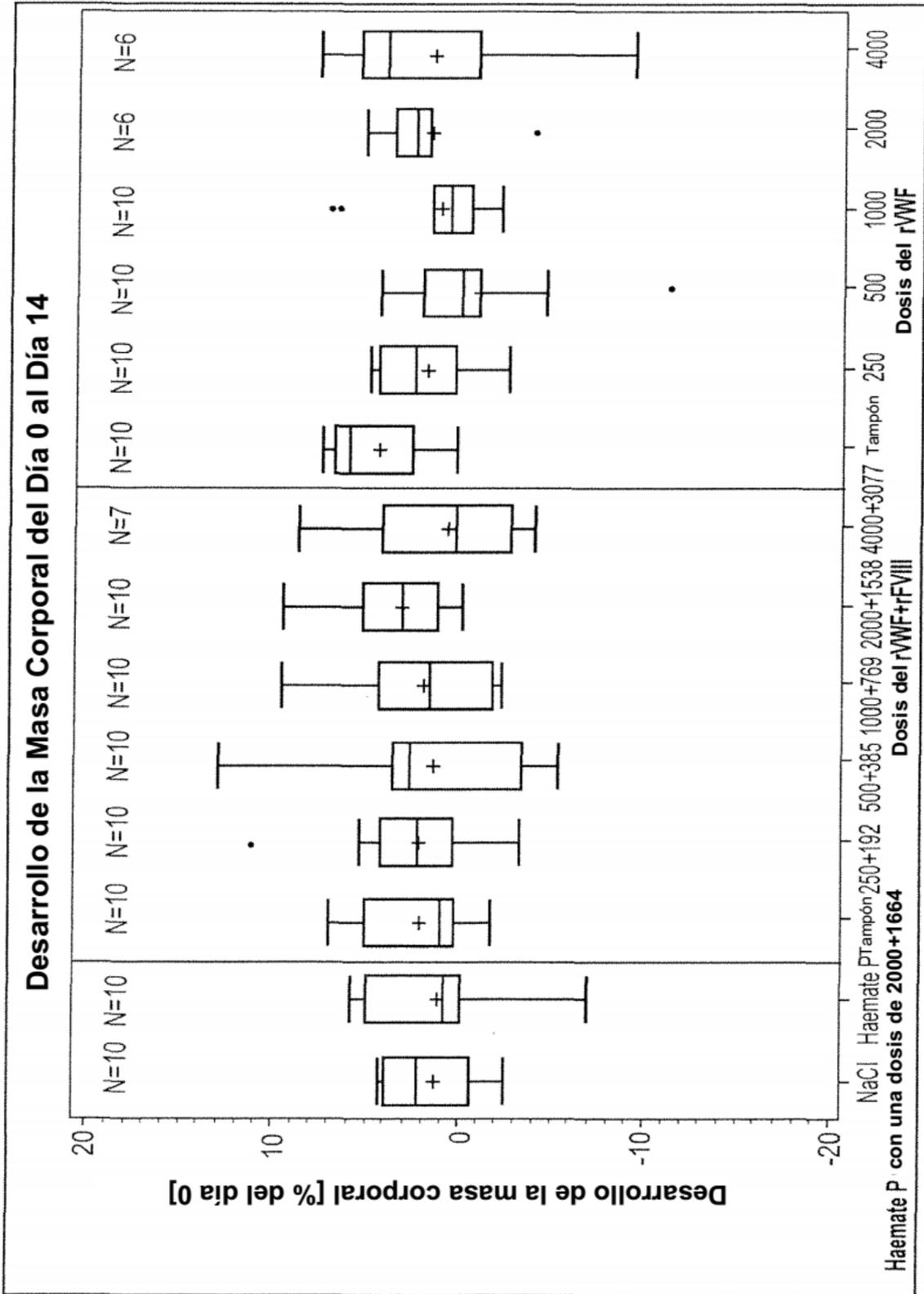
**Figura 23**



**Figura 24**

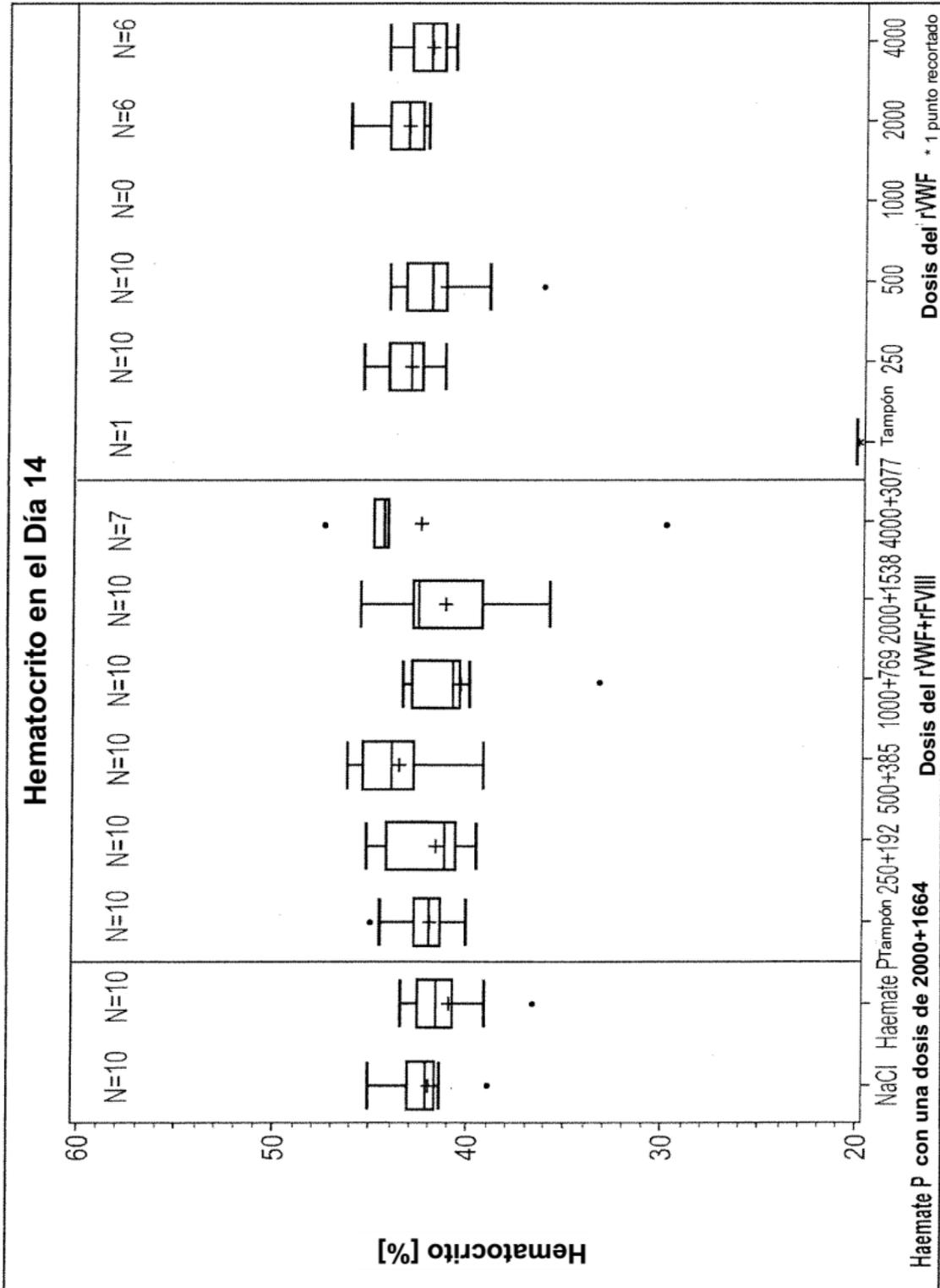


**Figura 25**

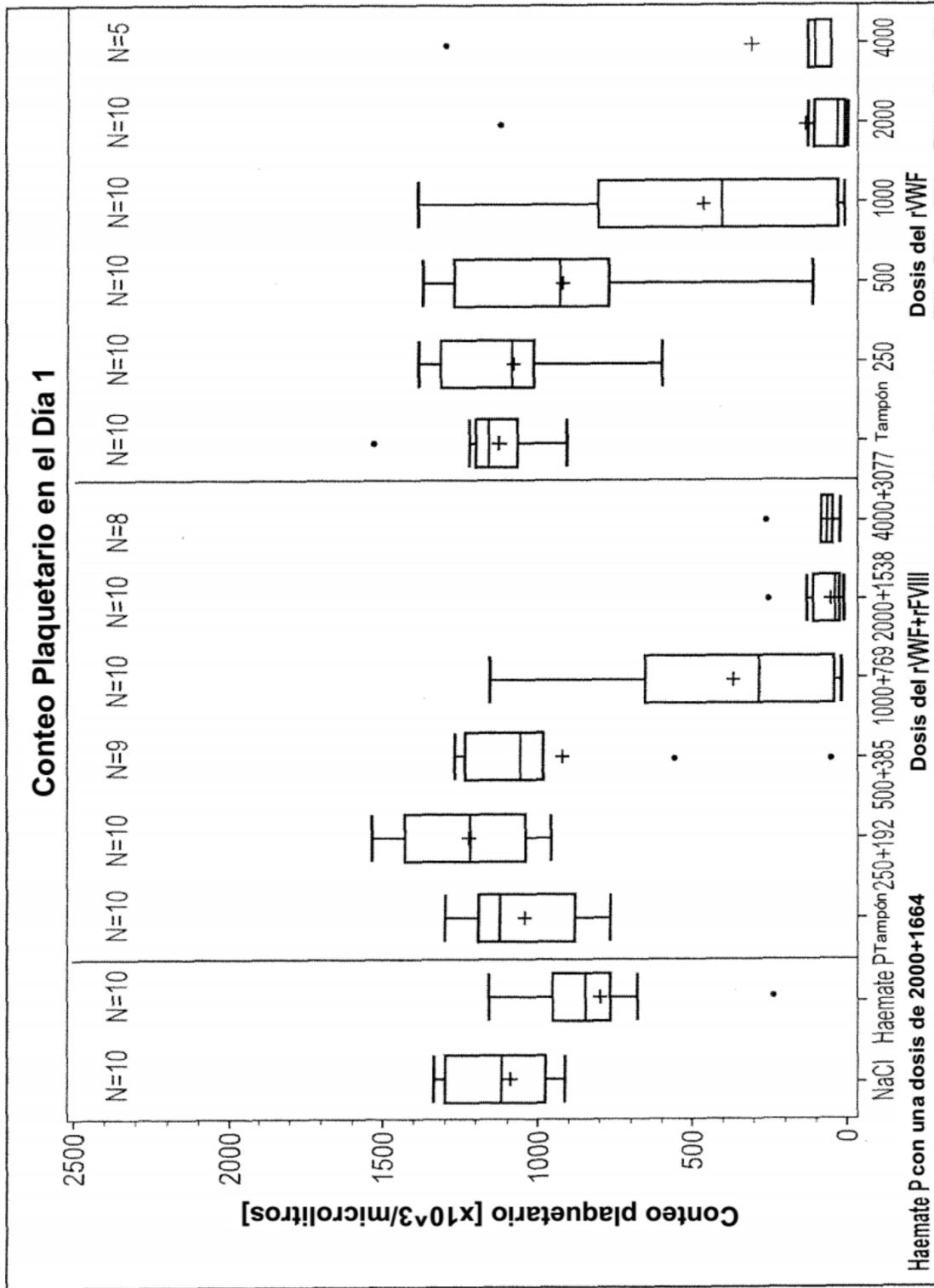


**Figura 26**

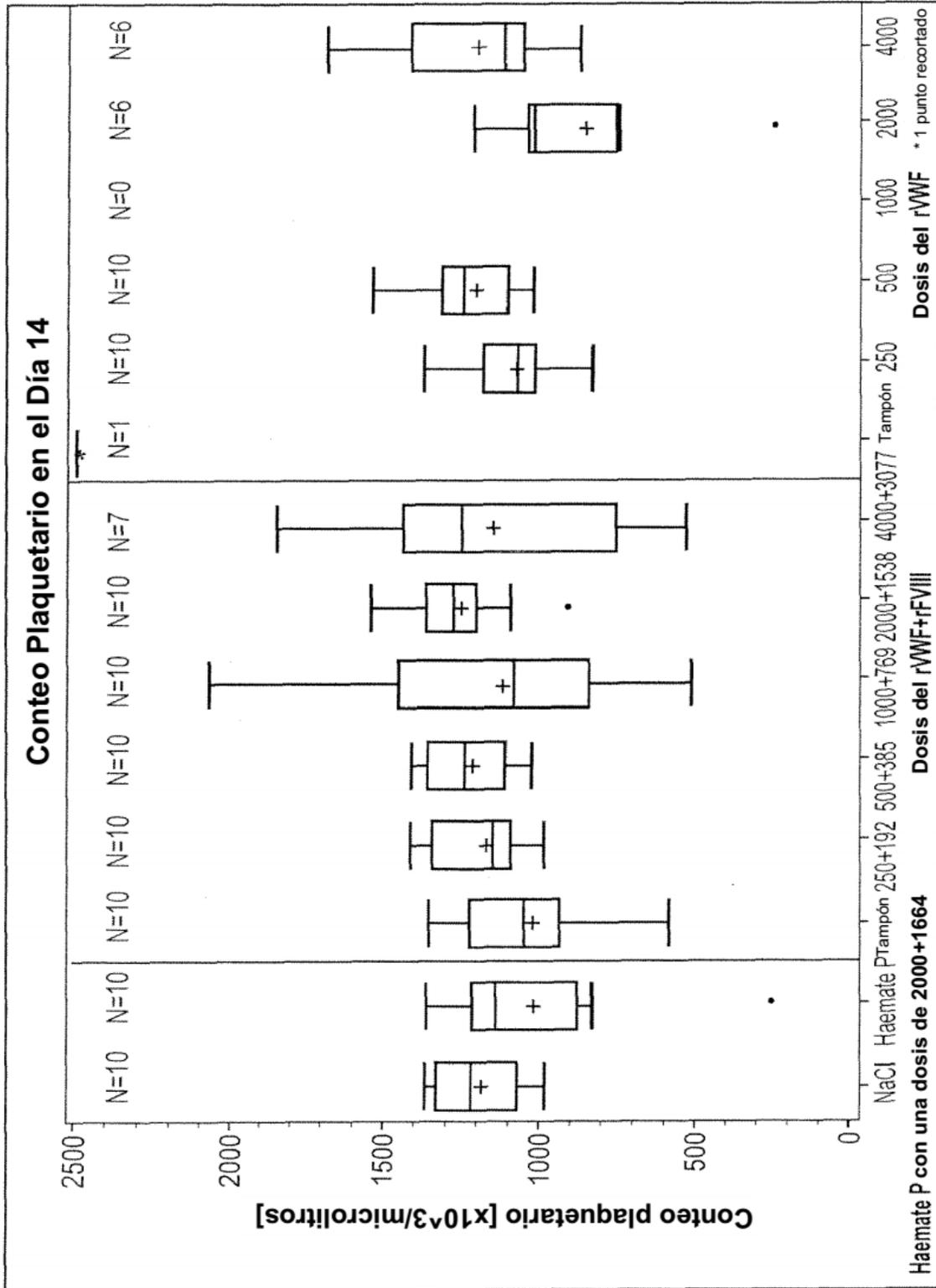




**Figura 28**



**Figura 29**



**Figura 30**



