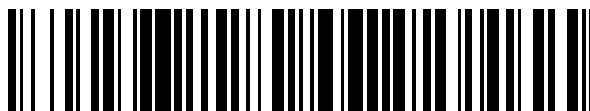


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 747 815**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.06.2015 PCT/EP2015/062730**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2015 WO15185758**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2015 E 15732554 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.08.2019 EP 3152230**

54 Título: **Preparación que comprende péptidos de factor VIII y factor von Willebrand**

30 Prioridad:

06.06.2014 EP 14171579

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

11.03.2020

73 Titular/es:

**OCTAPHARMA AG (100.0%)
Seidenstrasse 2
8853 Lachen, CH**

72 Inventor/es:

**KANNICHT, CHRISTOPH;
SOLECKA, BARBARA;
KOHLA, GUIDO y
WINGE, STEFAN**

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 747 815 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

Preparación que comprende péptidos de factor VIII y factor von Willebrand

5 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas para tratar trastornos hemorrágicos.

Antecedentes de la invención

El factor VIII («FVIII») es una glicoproteína del plasma sanguíneo de aproximadamente 280 kDa de masa molecular. 10 Está involucrado en la cascada de reacciones de coagulación que conducen a la coagulación sanguínea. El trastorno hemorrágico más común es causado por una deficiencia del factor VIII funcional, llamado hemofilia A. Se trata con el reemplazo del factor VIII, ya sea derivado del plasma o recombinante. El factor VIII se usa para el tratamiento agudo y profiláctico de las hemorragias en pacientes con hemofilia A.

15 La secuencia de aminoácidos del factor VIII está organizada en tres dominios estructurales: un dominio A triplicado de 330 aminoácidos, un dominio B simple de 980 aminoácidos y un dominio C duplicado de 150 aminoácidos. El dominio B no tiene homología con otras proteínas y proporciona 18 de los 25 sitios potenciales de glicosilación unidos a asparagina (N) de esta proteína. El dominio B aparentemente no tiene función en la coagulación. Las moléculas del factor VIII con dominio B eliminado tienen actividad procoagulante sin cambios en comparación con el factor VIII de 20 longitud completa. Algunas preparaciones de factor VIII recombinante (rFVIII) tienen un dominio B eliminado.

En plasma, el factor VIII se estabiliza mediante asociación con la proteína del factor Von Willebrand («vWF»), que parece inhibir la eliminación del factor VIII, por ejemplo, por proteólisis o aclaramiento mediado por receptor a través del receptor de LRP. En circulación, el factor von Willebrand está presente en un exceso molar de 50 veces con 25 respecto al factor VIII en condiciones fisiológicas normales.

El factor von Willebrand es una glicoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de los mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, el factor von Willebrand actúa como un mediador entre los receptores específicos en la superficie de las plaquetas y los componentes de la matriz extracelular, como el 30 colágeno. Además, el factor von Willebrand sirve como portador y proteína estabilizante para el factor VIII procoagulante. El factor von Willebrand se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. El polipéptido precursor, factor pre-pro- von Willebrand, consiste en un péptido señal de 22 residuos, un pro-péptido de 741 residuos y el polipéptido de 2050 residuos que se encuentra en el factor von Willebrand en plasma maduro (Fischer y col., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Tras la secreción en plasma, el factor 35 von Willebrand circula en forma de varias especies con diferentes tamaños moleculares. Estas moléculas del factor von Willebrand consisten en oligómeros y multímeros de la subunidad madura de 2050 residuos de aminoácidos. El factor von Willebrand se puede encontrar generalmente en plasma como multímeros que varían en tamaño aproximadamente de 500 a 20.000 kDa (Furlan, Ann Hematol. junio de 1996; 72(6): 341-8).

40 La vida media *in vivo* promedio del factor VIII humano en la circulación humana es de aproximadamente 12 horas. El factor von Willebrand podría disminuir las posibles inmunorreacciones contra el factor VIII cuando está en complejo con el factor VIII al proteger el FVIII de los sitios de anticuerpos inhibidores potenciales conocidos en la cadena pesada (dominio A2) y la cadena ligera (dominio A3 / C2) (Ragni, J Thromb. Haemost. 10: 2324-2327, 2012) o en otros sitios 45 potenciales inhibidores de anticuerpos en la molécula del factor VIII.

Otro trastorno hemorrágico en humanos es la enfermedad de von Willebrand (vWD). Dependiendo de la gravedad de los síntomas hemorrágicos, la vWD puede tratarse mediante terapia de reemplazo con concentrados que contengan el factor von Willebrand, en general derivado del plasma, aunque el factor von Willebrand recombinante también está en desarrollo. Se sabe que el factor von Willebrand estabiliza el factor VIII *in vivo* y, por lo tanto, juega un papel crucial 50 para regular los niveles plasmáticos de factor VIII y, como consecuencia, es un factor central para controlar la hemostasia primaria y secundaria.

Hasta hoy, el tratamiento estándar de la hemofilia A y la vWD implica infusiones intravenosas frecuentes de preparaciones de concentrados de factor VIII y factor VIII / factor von Willebrand. Estas terapias de reemplazo son 55 generalmente efectivas, sin embargo, por ejemplo, en pacientes con hemofilia A severa que reciben tratamiento profiláctico, el factor VIII debe administrarse por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta vida media plasmática del factor VIII de aproximadamente 12 horas. Al alcanzar niveles de factor VIII superiores al 1 % del plasma humano normal correspondiente a un aumento de los niveles de factor VIII en 0,01 U / ml, la hemofilia A grave se convierte en hemofilia A moderada. En la terapia profiláctica, el régimen de dosificación está 60 diseñado de tal manera que los niveles de la actividad del factor VIII no caen por debajo de los niveles del 2 - 3 % de la actividad del factor VIII de los no hemofílicos.

La administración de un factor VIII a través de la administración intravenosa (i.v.) es engorrosa, asociada con dolor y conlleva el riesgo de una infección, especialmente porque esto se hace principalmente en el tratamiento domiciliario por los propios pacientes o por los padres de los niños diagnosticados con hemofilia A. Además, las inyecciones intravenosas frecuentes provocan inevitablemente la formación de cicatrices, lo que interfiere con las infusiones futuras. Aún así, el tratamiento por vía intravenosa puede ser necesario en una situación de emergencia o cirugía, es decir, cuando se necesita un alto nivel de factor VIII de inmediato.

Se ha propuesto la administración subcutánea (a.s.) para el factor VIII, por ejemplo, en el documento WO 95/01804 A1 y el documento WO 95/026750 A1. Sin embargo, se tuvieron que administrar dosis muy altas de factor VIII para lograr una biodisponibilidad aceptable.

Otro enfoque para mejorar la biodisponibilidad tras la administración no intravenosa ha sido usar factor VIII fusionado con albúmina (documento WO 2011/020866 A2).

El documento WO 2013/057167 A1 propone administrar el factor VIII en combinación con glucosaminoglucanos sulfatados por administración no intravenosa, opcionalmente junto con el factor von Willebrand.

El documento WO 2008/151817 A1 describe el uso general de multímeros de factor von Willebrand sin escindir para la estabilización de factor VIII, derivado de plasma o recombinante (mutantes de supresión y longitud completa) destinados al tratamiento extravascular.

El documento WO 2013/160005 A1 y el documento WO 2013/083858 A1 describen el uso general del factor von Willebrand recombinante o fragmentos de factor von Willebrand recombinante para mejorar la biodisponibilidad después del tratamiento de administración subcutánea para moléculas de factor VIII muy específicas, donde dichas moléculas de factor VIII comprenden un dominio B truncado con un tamaño de 100 - 400 aminoácidos. De acuerdo con el documento WO 2013/160005, las moléculas de factor VIII A1 con dominios B truncados entre 100 y 400 aminoácidos tienen una mayor biodisponibilidad de factor VIII en comparación con el factor VIII que tiene el dominio B completo o moléculas de factor VIII truncado del dominio B que no tienen o tienen solo unos pocos aminoácidos.

Todavía existe la necesidad de preparaciones de factor VIII que muestren una biodisponibilidad mejorada, estabilidad y / o menor riesgo de generación de anticuerpos, evitando así los inconvenientes de la técnica anterior.

Es el objeto de la presente invención proporcionar preparaciones alternativas de factor VIII. Preferentemente, estas preparaciones deberían mostrar una estabilidad mejorada, una biodisponibilidad mejorada y / o un riesgo reducido de reacciones inmunológicas.

En una realización, este objeto se logra mediante una composición que comprende un complejo de factor VIII y un péptido de factor von Willebrand, donde el péptido de factor von Willebrand consiste en los aminoácidos 764 a 2128 de la SEQ ID NO: 1.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona una preparación de factor VIII que comprende un péptido de factor von Willebrand. El factor VIII forma un complejo con los péptidos del factor von Willebrand.

El factor VIII como se usa en el presente documento abarca el factor VIII de longitud completa, el factor VIII con dominio B eliminado o un factor VIII en el que el dominio B ha sido reemplazado por un enlazador artificial o un fragmento del dominio B natural o una combinación de ambos, es decir, el dominio B tiene un tamaño diferente en comparación con el factor VIII de longitud completa. También abarca el factor VIII con un número limitado de modificaciones que tienen inserción, supresión o sustituciones, especialmente el factor VIII adaptado a los haplotipos como se describe en K.R. Viel, y col. New England J Med 2009; 360:1618-1627. Preferentemente, la homología de secuencia con el factor VIII (como se define en los aminoácidos 20 - 2351 de P00451 de SwissProt, 21 de julio de 1986) pero sin tener en cuenta la homología en el dominio B del 99 % de acuerdo con FASTA como se implementa en la versión FASTA 36, basado en W. R. Pearson (1996) «Effective protein sequence comparison» Meth. Enzymol. 266:227-258. En otras palabras, al calcular una homología de secuencia, el dominio B no se incluye en la comparación de ambas proteínas. También se abarca el factor VIII modificado, como las proteínas de fusión Fc HES-Factor VIII o PEG Factor VIII o Factor VIII y las proteínas de fusión de albúmina de factor VIII como se describe en Oldenburg, Hemofilia (2014), 20 (Supl. 4), 23-28.

El factor VIII de la presente invención puede ser factor VIII derivado de plasma o recombinante. Cuando se usa el factor VIII recombinante, se expresa preferentemente en una línea celular humana para imitar el patrón de glicosilación humana (Casademunt, Eur J Haematol. 2012; 89:165-76) o como se describe en el documento WO 2010/020690.

El péptido del factor von Willebrand, como se usa en el presente documento, es un péptido que consiste en los

aminoácidos 764 a 2128 de la SEQ ID NO: 1 en una cadena de aminoácidos simple. SEQ ID NO: 1 es la secuencia P04275 de la base de datos Swiss Prot a partir del 11 de enero de 2011.

5 Típicamente, una relación molecular de péptidos de factor VIII y factor von Willebrand estará entre 1:1 y 1:20, preferentemente 1:2 a 1:10. Si las moléculas peptídicas del factor von Willebrand están en forma de dímeros o multímeros, la relación molecular se calcula en una sola cadena de aminoácidos, es decir, un complejo de una molécula del factor VIII con un dímero de moléculas peptídicas del factor von Willebrand tendrá una relación de 1:2

10 Un complejo, como se usa en el presente documento, se refiere a una unión no covalente del factor VIII al péptido del factor von Willebrand.

Una realización adicional de la invención es la composición que comprende el complejo del factor VIII con el péptido del factor von Willebrand, donde

- 15 - el complejo del factor VIII y el péptido del factor von Willebrand muestra una unión reducida a las membranas de fosfolípidos en comparación con el factor VIII solo;
 - el complejo del factor VIII y el péptido del factor von Willebrand muestra una unión reducida al colágeno III en comparación con el complejo del factor VIII y el factor von Willebrand de longitud completa; y
 20 - el complejo de factor VIII y el péptido de factor von Willebrand muestra una unión reducida a la heparina en comparación con el complejo del factor VIII y el factor von Willebrand de longitud completa.

Como el factor von Willebrand a menudo forma oligómeros o multímeros, también los péptidos de la presente invención pueden estar en forma de multímeros u oligómeros.

25 El péptido de la presente invención tiene al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en

- (i) una constante de unión por afinidad para heparina de $K_D > 1$ nM, preferentemente $\geq 2,43$ nM;
 (ii) una constante de unión por afinidad para el colágeno III de $K_D > 5$ nM, preferentemente $\geq 17,02$ nM;
 (iii) una constante de unión por afinidad para el factor VIII de $K_D < 100$ nM o < 10 nM, preferentemente $\leq 6,19$ nM; y
 30 (iv) una inhibición de la unión de unión a fosfolípidos de factor VIII de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80 % o al menos el 90 %.

35 El péptido de factor von Willebrand de la invención muestra una unión reducida a la heparina, una menor afinidad por el colágeno (como el colágeno III), una menor afinidad por los fosfolípidos, aunque una alta unión al factor VIII.

Sorprendentemente, la baja unión a fosfolípidos y colágeno mejora la velocidad de liberación en caso de administración no intravenosa, especialmente subcutánea.

La medición de las constantes de unión de afinidad respectivas se describe en la parte experimental.

40 En una realización, el péptido de factor von Willebrand se deriva del factor von Willebrand por escisión proteolítica o química. Si se utiliza la escisión proteolítica, se prefiere especialmente la proteasa *S. aureus* V-8.

La composición de la presente invención tiene al menos una de las siguientes propiedades:

- 45 (i) el péptido de factor von Willebrand protege el factor VIII de la unión del anticuerpo para minimizar la formación de inhibidores en un paciente;
 (ii) el factor VIII se estabiliza para proporcionar una actividad restante del factor VIII de al menos el 90 % después del almacenamiento durante 12 meses en forma líquida congelada a -70°C ;
 50 (iii) el factor VIII se estabiliza para proporcionar una actividad restante del factor VIII de al menos el 90 % después del almacenamiento durante 24 meses en forma liofilizada a 5°C ;
 (iv) el factor VIII se estabiliza para proporcionar una actividad restante del factor VIII de al menos el 90 % después del almacenamiento durante 12 meses en forma liofilizada a 25°C ;
 (v) la vida media del factor VIII se prolonga in vivo en al menos un 20 %; y
 55 (vi) la formación de inhibidores se reduce en pacientes no tratados previamente a menos del 20 %, preferentemente menos del 10 % después del tratamiento con la composición durante 6 meses.

60 Sorprendentemente, el péptido de factor von Willebrand parece aumentar la estabilidad del factor VIII durante el almacenamiento (vida útil) y / o reducir la formación de inhibidores en los pacientes. La formación de inhibidores es uno de los principales problemas en el tratamiento de los trastornos hemorrágicos crónicos.

La composición de la presente invención es especialmente útil en el tratamiento o prevención de un trastorno

hemorrágico.

Por lo tanto, una realización adicional de la invención es la composición para su uso en un procedimiento para tratar un trastorno hemorrágico, comprendiendo dicho procedimiento administrar a un paciente que lo necesite una cantidad efectiva de la composición de la presente invención.

La cantidad depende de la enfermedad o afección a tratar y puede ser seleccionada por un experto en la materia. Para el tratamiento a largo plazo, típicamente son adecuadas cantidades de 20 a 40 UI / kg de peso corporal por aplicación. En una situación de emergencia, la cantidad puede ser de aproximadamente 10 a 50 UI / kg de peso corporal.

10

La composición de la invención puede aplicarse mediante administración intravenosa o administración no intravenosa. La administración no intravenosa puede ser una inyección subcutánea, una inyección intradérmica o una administración intramuscular.

15 Una ventaja del procedimiento de la presente invención es la posibilidad de usar nano filtración para la eliminación de virus. El factor von Willebrand, debido a su tamaño, no se puede nanofiltrar con un nanofiltro con un tamaño de poro pequeño para eliminar los virus. Debido a que el péptido de factor von Willebrand es mucho más pequeño en tamaño que la molécula de factor von Willebrand de longitud completa, se hace posible la nanofiltración con tamaños de poro pequeños. La nanofiltración se realiza a un tamaño de poro y condiciones que reducen la concentración de uno de los virus parvovirus porcinos más pequeños conocidos en un factor de al menos 100 (2 log), preferentemente en un factor de 1000 (3 log) y lo más preferentemente a una concentración por debajo del límite de detección del ensayo de parvovirus, opcionalmente usando uno o más nanofiltros en serie. Para esta prueba, se agrega parvovirus porcino en una muestra y se analiza después de la filtración. •

25 Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra la purificación del fragmento III (SPIII) de pdVWF digerido por la proteasa *S.aureus* V8. A- Cromatograma MonoQ del perfil de elución del fragmento III (indicado por una flecha). B- Gel de SDS-PAGE del fragmento purificado; red.- reducido; n.r.- no reducido.

30

La figura 2 muestra la purificación del fragmento I (III-T4) del fragmento III digerido por tripsina. Cromatograma MonoQ del perfil de elución del fragmento I (indicado por una flecha). La imagen SDS-PAGE no reductora del fragmento purificado se muestra en el inserto.

35 La figura 3 muestra la purificación del fragmento II a partir del fragmento III después de la segunda digestión con proteasa *S.aureus* V8. A- Cromatograma MonoQ del perfil de elución del fragmento II (indicado por una flecha), el segundo producto de escisión así como la proteasa V8 también están indicados. B- Cromatograma de la segunda cromatografía MonoQ requerida para la eliminación completa de la proteasa. La imagen SDS-PAGE reductora del fragmento purificado se muestra en el inserto.

40

La figura 4 muestra la unión de pdVWF, fragmento II y III a rFVIII. Sensogramas de unión A, B, C (curvas grises) y alineación de curvas (curvas negras) representativas de la interacción entre rFVIII inmovilizado y pdVWF / fragmentos purificados II y III. Las concentraciones y el tipo de muestra se indican en el diagrama. C- Constantes de disociación (K_d) expresadas como media y SEM; $n = 8$.

45

La figura 5 muestra la unión de rFVIII a monocapa de fosfolípidos en SPR e inhibición por pdVWF. Sensogramas de unión a A de rFVIII y rFVIII en presencia de 108 nM de BSA (albúmina de suero bovino) o 47,6 nM de pdVWF; cada muestra por triplicado. B- Media y SD de los niveles de unión medidos 120 segundos después del final de la inyección de analito expresado como porcentaje de unión de rFVIII; $n = 3$.

50

La figura 6 muestra la inhibición de la interacción rFVIII-fosfolípido por fragmentos derivados del factor von Willebrand medidos en SPR. La unión de rFVIII a la monocapa de fosfolípidos se realizó en presencia de tres concentraciones diferentes de los tres fragmentos derivados del factor von Willebrand (las concentraciones y el tipo de fragmento se indican en el gráfico). El gráfico representa la media y SD de los niveles de unión medidos 120 segundos después del final de la inyección de analito expresado como porcentaje de unión de rFVIII; $n = 3$.

55

La figura 7 muestra la inhibición dependiente de la concentración de la unión de rFVIII a la monocapa de fosfolípidos por el fragmento III. A- sensogramas de unión de rFVIII a monocapa de fosfolípidos en presencia de diferentes concentraciones del fragmento III (las concentraciones se indican en el gráfico), cada muestra por triplicado. B- Media y SD de los niveles de unión medidos 120 segundos después del final de la inyección de analito expresado como porcentaje de unión de rFVIII; $n = 3$.

60

La figura 8 muestra la unión de pdVWF y el fragmento III al colágeno tipo III. Sensogramas de unión A, B (curvas grises) y alineación de curvas (curvas negras) representativas de la interacción entre colágeno inmovilizado tipo III y pdVWF / fragmento purificado III. Las concentraciones y el tipo de muestra se indican en el diagrama. C- Constantes de disociación (K_d) expresadas como media y SEM; n = 9.

La figura 9 muestra la unión de pdVWF y el fragmento III a la heparina. Sensogramas de unión A, B (curvas grises) y alineación de curvas (curvas negras) representativas de la interacción entre heparina inmovilizada y pdVWF / fragmento purificado III. Las concentraciones y el tipo de muestra se indican en el diagrama. C- Constantes de disociación (K_d) expresadas como media y SEM; n = 6.

La figura 10 muestra una comparación de los valores del tiempo de coagulación de la sangre total (WBCT) medidos en muestras de sangre de perros con hemofilia A tratados por s.c. con FVIII solo o en combinación con el fragmento III de VWF. El WBCT obtenido después de la aplicación s.c. de FVIII en combinación con un exceso molar de cinco veces el fragmento III de VWF aplicado a 200 UI de FVIII / kg de peso corporal. La línea discontinua horizontal marca el límite superior del tiempo de coagulación en perros normales (12 minutos).

La Figura 11 muestra la actividad de FVIII medida con el ensayo de actividad de FVIII cromogénico en muestras de plasma de perros con hemofilia A obtenidas después de la aplicación de FVIII o FVIII en combinación con el fragmento III de VWF. A-FVIII o FVIII con un exceso molar de cinco veces el fragmento III de VWF se aplicó por vía subcutánea a 200 UI de FVIII / kg de peso corporal; el área bajo la curva (AUC) para la muestra de FVIII sola fue 2.867, y para FVIII en combinación con el fragmento III de VWF de 4.917. B-FVIII o FVIII con un exceso molar de cinco veces el fragmento III de VWF se aplicó por vía intravenosa a 200 UI de FVIII / kg de peso corporal. El AUC para la muestra de FVIII solo fue 27,69, y para FVIII en combinación con el fragmento III de VWF de 45,72.

La figura 12 muestra la unión del monómero del fragmento III recombinante, el dímero del fragmento III recombinante y el VWF derivado de plasma (flVWF) a rFVIII. Sensogramas de unión A, B, C (curvas grises) y alineación de curvas (curvas negras) representativas de la interacción entre VWF inmovilizado o fragmentos de VWF recombinantes y FVIII. El tipo de muestra se indican en el diagrama. La concentración de FVIII aplicada fue 0, 0,2, 0,6, 1,7, 5, 15, 45 y 135 nM. D- Constantes de disociación (K_d) expresadas como media y SD; n = 4.

La figura 13 muestra la estabilización de FVIII por el fragmento III de VWF. Actividad de FVIII o FVIII solo o FVIII en complejo con el fragmento III de VWF incubado a 40 °C medida en diferentes momentos.

La figura 14 muestra la unión de heparina usando cromatografía de afinidad de heparina de dos fragmentos de VWF como se describe en el ejemplo 9.

EJEMPLOS

La invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Producción y purificación de fragmentos derivados del factor plasmático de von Willebrand.

Producción y purificación del fragmento III (SPIII, res. 764-2128)(de acuerdo con Marti y col. Identificación de subestructuras con puentes disulfuro dentro del factor von Willebrand humano. Biochemistry 1987; 26:8099-8109 con modificaciones) (SEQ ID NO: 2):

SLSCRPPMVKLVC PADNLRAEGLECTKTCQNYDLECM SMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVA

LERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKY
 LFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNV
 KRPMKDETHFEVVESGRYI I I I I I L L L G K A L S V V W D R H L S I S V V L K Q T Y Q E K V C G L C G N F D G I Q
 NNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPDSSPATCHNNIMQTMVDSSCRIL
 TSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVTVWRTA
 TLC PQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVGCHAHCPPGKIL
 DELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL
 VVPPTDAPVSPPTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVD
 MERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSLRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKY
 TLFQIFSKIDRPEASRITLLLMAEQEPQRMRSNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLK
 QIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQORDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLL
 GVSTLGPKRNSMVLDAFVLEGSDKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMVGDQSDIHVTVLQYS
 YMVTVEYFPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNL
 VYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGNANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPD
 LVLQRCSSGEGQLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFASYFDEMKSFAKAFISKANI
 GPRLTQVSVLQYGSITTTIDVPWNVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTS
 EMHGARPGASKAVVILVTDVSVDSVDAADAARSNRVTVFPVIGIGDRYDAAQLRILAGPA
 GDSNVVKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVVICMDEGNEKRPDGVWTLDPDQCHTVT
 CQPDGQTLLKSHRVNCDRGLRPSCPNSSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDG
 QNFKLTGSCSYVLFQNKQDLEVLHNGACSPGARQGCMSIEVKHSALSVELHSDMEVT
 VNGRLVSVYPVGGNMEVNVYGAIMHEVRFNHLGHI FTFTPQNNFQLQLSPKTFASKTYG
 LCGICDENGANDFMLRDGTVTTDWKTLVQEWTVQRPQGQTCQPILE

El fragmento III se prepara por digestión del factor von Willebrand derivado de plasma (pdVWF) con proteasa *S. aureus* V-8. La digestión se lleva a cabo durante 3 horas a 37 °C en un tampón de 50 mM Tris-HCl, 150 mM de NaCl, pH 7,8 a una relación en peso de enzima a proteína de 1:40.

La purificación del fragmento se lleva a cabo utilizando una fuerte columna de intercambio aniónico (MonoQ). El tampón de funcionamiento es un Tris-HCl de 20 mM, pH 7,4, y el tampón de elución (tampón B) es Tris-HCl de 20 mM, NaCl de 500 mM, pH 7,4. La proteasa *S. aureus* V-8 eluye de la columna de intercambio aniónico en aproximadamente 22 mS / cm (aproximadamente el 40 % de tampón B), por lo tanto, se requiere una larga etapa de lavado al 42 % antes de la elución del fragmento para lavar la proteasa. Alternativamente, se puede realizar una etapa SEC en Superose 6 10/300 GL para la eliminación de la proteasa. La purificación del fragmento III y el producto obtenido se representan en la figura 1. La secuencia definida por Marti y col. 1987 ha sido confirmada por análisis de EM.

15 Producción y purificación del fragmento I (III-T4, res. 764-1035) (de acuerdo con Marti y col. 1987 con modificaciones) (SEQ ID NO: 3):

SLSCRPPMVKLVC PADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMMSGCVSGCLCPPGMVRHENRCVA
 LERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKY
 LFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNV
 KRPMKDETHFEVVESGRYI I I I I L L L G K A L S V V W D R H L S I S V V L K Q T Y Q E K V C G L C G N F D G I Q
 NNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTR

20 El fragmento I se prepara a partir del fragmento III (SPIII) mediante digestión con tripsina (TPCK tratada de bovino). La digestión se lleva a cabo durante 1,5 horas en un tampón de 100 mM de NH_4HCO_3 con pH 8,0 a una relación en peso

de enzima a proteína de 1:100. La digestión se terminó mediante la adición de inhibidor de tripsina de soja.

La purificación del fragmento I se lleva a cabo utilizando una fuerte columna de intercambio aniónico (MonoQ) seguido de SEC en Superose 6, 10 / 300 GL. El tampón de funcionamiento para la columna de intercambio aniónico es Tris-HCl de 20 mM, pH 7,4, y el tampón de elución (tampón B) es Tris-HCl de 20 mM, NaCl de 500 mM, pH 7,4. El tampón de funcionamiento para el SEC es PBS (solución salina tamponada con fosfato) pH 7,0.

La purificación del fragmento I y el producto obtenido se representan en la figura 2. La secuencia definida por Marti y col. 1987 ha sido confirmada por análisis de EM.

10

Producción y purificación del fragmento II (res. 764-1673) (SEQ ID NO: 4):

SLSCRPPMVKLVCADNLRAGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVA
LERPCFHFQGKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKY
LFPGECCQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNGKCSHPSVKCKKRVITILVEGGEIELFDGEVNV
KRPMKDETHFEVVESGRYIIILLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQ
NNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRIL
TSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSESIGDCACFCDTIAAYAHVCAQHKGKVVWTRTA
TLC PQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKIL
DELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL
VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVD
MERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKY
TLFQIFSKIDRPEASRITLLLMASQEPQRMRSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLK
QIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQORDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLL
GVSTLGPKRNSMVLDAFVLEGS DKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMVDVGQDSIHVTVLQYS
YMTVTEYFPFSEAQSKGDILQVRREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNL
VYMVTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGPANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPD
LVLQRCCSGE

15 El fragmento II se prepara a partir del fragmento III mediante la segunda digestión con proteasa de *S. aureus* V8. La digestión se lleva a cabo durante 21 horas en un tampón de 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl con pH 7,8 a una relación en peso de enzima a proteína de 1:10.

La purificación del fragmento II se lleva a cabo utilizando una fuerte columna de intercambio aniónico (MonoQ). El
20 tampón de funcionamiento es un Tris-HCl de 20 mM, pH 7,4, y el tampón de elución (tampón B) es Tris-HCl de 20 mM, NaCl de 500 mM, pH 7,4. Se requirió una segunda purificación MonoQ con una larga etapa de lavado al 42 % de B para eliminar la proteasa.

La purificación del fragmento II y el producto obtenido se representan en la figura 3. El segundo sitio de escisión de V8
25 entre Glu¹⁶⁷³-Glu¹⁶⁷⁴ fue determinado por Fretto y col. 1986 y fue confirmado por análisis de EM.

Ejemplo 2

Determinación de la afinidad de unión al factor VIII.

30

El análisis se llevó a cabo utilizando el instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) de acuerdo con McCormick y col. 2004 con modificaciones. rFVIII se acopló brevemente de manera covalente al chip sensor CM5 dando como resultado un nivel de recubrimiento de ~ 200 RU. Posteriormente, se inyectaron los fragmentos del factor von Willebrand, así como el factor von Willebrand (flvWF) de longitud completa sobre la superficie del chip sensor. El tampón de
35 funcionamiento fue 20 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, Tween 20 al 0,02 %. Las constantes de afinidad de disociación se determinaron para flvWF así como para los fragmentos II y III, no hubo unión significativa del fragmento I al Factor VIII, por lo tanto, no se determinó el K_d. Los sensogramas de unión y los valores calculados de K_d se representan en la figura 4. El flvWF se unió a rFVIII con K_d de 0,67 nM, el fragmento III se unió con menor afinidad (K_d de 6,18 nM), la afinidad se redujo aún más para el fragmento II (K_d de 154,60 nM)

Ejemplo 3

Determinación de la unión del factor VIII a la monocapa fosfolípida e inhibición por el factor von Willebrand y los fragmentos derivados del factor von Willebrand.

El análisis se llevó a cabo utilizando el instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) de acuerdo con Saenko y col. 1999 con modificaciones. Se prepararon brevemente vesículas de fosfolípidos a partir de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina) y DOPS (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina). Se prepararon vesículas unilamelares de acuerdo con MacDonal y col. 1991 utilizando una extrusora y recubiertas con un chip sensor HPA. Posteriormente, se inyectaron los componentes de interés sobre la superficie de PCPS y se evaluó el nivel de unión 120 segundos después del final de la inyección.

Controles negativos; el factor von Willebrand y BSA no se unieron a la superficie de PSPC (no se muestra), en cambio, se mostró un alto nivel de unión de rFVIII. Esta unión podría inhibirse por completo con el factor von Willebrand, en cambio, la adición de alta concentración de BSA no tuvo efecto sobre la unión (figura 5).

Para evaluar si los fragmentos obtenidos por digestión limitada fueron capaces de inhibir la unión de PSPC similar a fIVWF, los fragmentos I, II y III se inyectaron sobre la superficie del chip sensor. Solo el fragmento III fue capaz de inhibir la interacción entre rFVIII y la monocapa de fosfolípidos (figura 6). Este efecto dependía de la dosis con una inhibición casi completa con un exceso de 2,5 veces el fragmento III sobre el rFVIII (figura 7).

Ejemplo 4

Determinación de la afinidad de unión al colágeno III de fIVWF y el fragmento III.

El análisis se llevó a cabo utilizando el instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) de acuerdo con Romjin y col. 2003 con modificaciones. El colágeno tipo III digerido con pepsina humana se unió brevemente de manera covalente a la superficie de un chip sensor CM5. Posteriormente, las muestras se inyectaron sobre la superficie del chip sensor. El tampón de funcionamiento fue 10 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, Tween 20 al 0,005 %. El fIVWF se unió al colágeno III con una afinidad muy alta (0,75 nM), la unión del fragmento III se redujo significativamente a 17,02 nM (figura 8).

Ejemplo 5

Determinación de la afinidad de unión a la heparina de fIVWF y el fragmento III.

El análisis se llevó a cabo utilizando el instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) de acuerdo con Sarafanov y col. 2001. La heparina de la mucosa intestinal porcina se biotiniló brevemente utilizando un kit de reactivo NHS-biotina, y se unió a la superficie de un chip sensor SA. La celda de flujo de referencia se revistió con biotina. Posteriormente, las muestras se inyectaron sobre la superficie del chip sensor. El tampón de funcionamiento fue 150 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, Tween 20 al 0,05 %. El fIVWF se unió a la heparina con una afinidad de 0,65 nM, la afinidad de unión del fragmento III se redujo significativamente a 2,43 nM (figura 9).

Ejemplo 6

Determinación de la recuperación del complejo FVIII o FVIII / VWF fragmento III y la vida media en circulación en perros con hemofilia A.

Dos perros con hemofilia A fueron sometidos a inyección subcutánea y posteriormente intravenosa de FVIII suprimido con dominio B recombinante solo o en combinación con un exceso molar de cinco veces el fragmento III de VWF. El perro 1 recibió 200 UI / kg de peso corporal de FVIII solo y el perro 2 recibió 200 UI / kg de peso corporal de FVIII en complejo con el fragmento III de VWF. Se recogieron muestras de sangre a las 0,5, 1,2, 4, 8, 12, 24, 32, 48, 72 y 96 horas después de cada administración farmacológica por vía subcutánea o intravenosa. Las muestras fueron analizadas para determinar el tiempo de coagulación de la sangre total (WBCT) y la actividad en el ensayo de actividad cromogénica de FVIII. La administración subcutánea del fragmento III de VWF en complejo con FVIII dio como resultado un aumento de 1,4 veces el tiempo requerido para exceder el tiempo de coagulación para un perro normal en comparación con la administración subcutánea de FVIII solo (figura 10). La administración del fragmento III de VWF con FVIII también dio como resultado un aumento de la actividad de FVIII en plasma de perro con el tiempo y valores en el área casi duplicada bajo la curva (AUC) para ambas aplicaciones, subcutánea e intravenosa, en comparación con la administración de FVIII solo (figura 11).

Ejemplo 7

Determinación de la afinidad de unión a FVIII del monómero y dímero del fragmento III recombinante.

- 5 El fragmento III recombinante se expresó de forma transitoria en la línea celular HEK293 con un Strep-Tag C-terminal y se purificó por cromatografía de afinidad con Strep-tactin. Los monómeros y dímeros del fragmento III se separaron por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). El análisis se realizó con el instrumento Biacore 2000. Los monómeros y dímeros del fragmento III se inmovilizaron en CM5 y se inyectaron series de concentración de FVIII sobre la superficie del chip sensor. Se usó VWF de longitud completa derivada de plasma como control. El tampón de funcionamiento fue 150 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 5 mM de CaCl₂, Tween 20 al 0,05 %. FVIII unido al dímero de fragmento III con una constante de afinidad de 1,9 nM. La afinidad del FVIII con el fragmento III monomérico fue significativamente menor ($K_d = 14,3$ nM) (figura 12).

Ejemplo 8

- 15 *Estabilización de rFVIII en solución por el fragmento III de VWF.*

2000 UI de FVIII recombinante (Nuwiq®) se reconstituyeron en 2,5 ml de agua, con o sin adición de exceso molar de cinco veces el fragmento III de VWF. Ambas preparaciones se incubaron a 40 °C y se tomaron alícuotas a las 48, 96, 192, 384, 408 y 672 horas. Las muestras se analizaron para determinar la actividad de FVIII en un ensayo de actividad cromogénica de FVIII. El fragmento III de VWF contribuyó a una actividad significativamente más larga de FVIII a 40 °C (figura 13).

Ejemplo 9

- 25 *Comparación de la unión de heparina entre el fragmento III recombinante y el fragmento NovoSeq21.*

El fragmento III recombinante y el fragmento de NovoSeq21 (SEQ ID NO: 21 del documento WO2013/160005A1) se expresaron de forma transitoria en la línea celular HEK293 con un Strep-Tag C-terminal y se purificaron por cromatografía de afinidad con Strep-tactin. La unión a heparina se probó usando cromatografía de afinidad por la heparina. Ambos fragmentos recombinantes se unieron a la columna de heparina (heparina HiTrap HP 1 ml, GE Healthcare) y se eluyeron con un gradiente lineal de sal que varía de 0 - 500 mM de NaCl. Ambos fragmentos se ejecutaron por triplicado, véase la figura 14. El pico de elución medio para el fragmento NovoSeq21 fue a $15,57 \pm 0,04$ minutos, lo que corresponde a 285,381 mM de NaCl, y para el fragmento III a $15,47 \pm 0,02$ minutos, lo que corresponde a 282,051 mM de NaCl. Esto indica una mayor afinidad por la heparina del fragmento NovoSeq21.

Procedimientos analíticos

Descripción de los procedimientos analíticos

- 40 FVIII: C, procedimiento de detección basado en Coatest

El procedimiento se basa en el principio de dos etapas y se realizó utilizando la técnica de microplacas. En la etapa uno, el factor X activado (Xa) se genera a través de la vía intrínseca donde FVIII: C actúa como un cofactor. En la etapa dos, el factor Xa se determina luego mediante el uso de un sustrato cromogénico sintético, S-2222 en presencia de un inhibidor de trombina 1-2581 para evitar la hidrólisis del sustrato por la trombina. La reacción se detiene con ácido, y el FVIII: La actividad de C, que es proporcional a la liberación de pNA (para-nitroanilina), se determina fotométricamente a 405 nm frente a un blanco reactivo.

50 El procedimiento cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea. La unidad de FVIII: C se expresa en unidades internacionales (UI) como se define en la Norma Internacional de Concentrado actual (SI) establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS). La rutina que usa tampón que contiene BSA al 1 % en lugar de plasma hemofílico severo para prediluciones ha sido validada. Véanse también referencias bibliográficas (European Pharmacopoeia Supplement 2000, general Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosen S (1984) Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate. J, Haematol, Suppl 40, vol 33, 139-145, 1984; Carlebjork G, Oswaldsson U, Rosen S (1987) A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity. Thrombosis Research 47; 5-14, 1987; Mire-Sluis AR, Gerrard T, Gaines das R, Padilla A and Thorpe R. Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products. Biological, 24, 351-362 (1996)).

- 60 Determinación de la proteína total de acuerdo con Bradford

La determinación de proteínas de acuerdo con Bradford se basa en la observación de que la absorbancia máxima para

una solución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión a la proteína. Ambas interacciones hidrofóbicas e iónicas estabilizan la forma aniónica del tinte, causando un cambio de color visible. El ensayo es útil ya que el coeficiente de extinción de una solución de complejo colorante-albúmina es constante en un rango de concentración de 10 veces. Véase también la referencia Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254. 1976, para más información.

Determinación de la proteína total de acuerdo con el análisis de aminoácidos (AAA)

- 10 Antes del AAA, todas las proteínas se hidrolizan con 6 M de HCl durante 24 horas a 110 °C. Los aminoácidos se separan por cromatografía de intercambio catiónico en resinas de poliestireno sulfonadas y se detectan continuamente en el eluyente. La detección se basa en la derivatización de ninhidrina posterior a la columna utilizando un fotómetro dual para la medición simultánea a 440 nm para prolina e hidroxiprolina y 570 nm para todos los demás aminoácidos. Los aminoácidos asparagina y glutamina se desamidán durante AAA y se determinan como ácido aspártico y ácido glutámico, respectivamente. Por lo tanto, los resultados de ácido aspártico y ácido glutámico representan la suma de ácido aspártico / asparagina (Asx) y ácido glutámico / glutamina (Glx), respectivamente, en la muestra original. El triptófano no genera una respuesta distinta utilizando este procedimiento y, por lo tanto, no está cuantificado por el AAA. La cisteína se destruye durante la hidrólisis y no se cuantifica. El AAA se describe además en la referencia: Total protein AAA analytical method. Spackman, D. H., Stein, W. H., y Moore, S. (1958) Anal. Biochem. 30: 1190-1206.

- 20 Pureza o actividad específica (FVIII: C / proteína total)

La pureza (o también llamada actividad específica) para una muestra, se calcula tomando el valor obtenido del análisis FVIII: análisis de C y su división por el valor logrado del análisis de proteína total.

- 25 SDS-PAGE (distribución de peso molecular)

- La electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) implica la separación de proteínas en función de su tamaño. Este procedimiento describe la SDS-PAGE de proteínas, que se ejecuta en condiciones reducidas. Al calentar la muestra en condiciones desnaturalizantes y reductoras, las proteínas se despliegan y se recubren con sulfato dodecil sódico de detergente aniónico (SDS), adquiriendo una carga negativa neta alta que es proporcional a la longitud de la cadena de polipéptidos. Cuando se cargan en una matriz de gel de poliacrilamida y se colocan en un campo eléctrico, las moléculas de proteína cargadas negativamente migran hacia el electrodo cargado positivamente y se separan por un efecto de tamizado molecular, es decir, por su peso molecular. Los geles de poliacrilamida impiden que las moléculas más grandes migren tan rápido como las moléculas más pequeñas. Debido a que la relación carga / masa es casi la misma entre los polipéptidos desnaturalizados con SDS, la separación final de proteínas depende casi por completo de las diferencias en la masa molecular relativa de los polipéptidos. En un gel de densidad uniforme, la distancia de migración relativa de una proteína (R_f) es negativamente proporcional al logaritmo de su masa. Si las proteínas de masa conocida se ejecutan simultáneamente con las incógnitas, se puede trazar la relación entre R_f y la masa, y estimar las masas de proteínas desconocidas. Las bandas de proteínas separadas por electroforesis se visualizan mediante tinción con plata. La evaluación se realiza visualmente juzgando las apariencias de los estándares, la referencia (muestra de control) y las muestras analizadas.

- 45 Contenido de antígeno del factor VIII (FVIII:Ag)

La cantidad de contenido de antígeno de factor VIII (FVIII: Ag) se mide con un kit ELISA (ASSERACHROM® VIII: Ag, inmunoensayo enzimático para factor VIII, kit, Diagnostica Stago (Francia), como se describe más detalladamente⁽¹⁸⁾ con el reemplazo del tampón del kit proporcionado con tampón Tris-NaCl + 1 % de albúmina de suero bovino para diluciones de muestra.

- 50 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

- El monómero, el agregado y el fragmento se miden usando una columna analítica de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) (Superdex 200, 10/300 GL, GE Healthcare) procesada en condiciones de tampón nativo (HEPES 25 mM, NaCl 0,5 M, arginina 0,3 M, CaCl₂ 50 mM, polisorbato 80 al 0,02 %, pH 7,5). La carga de muestra es aproximadamente el 1 % de la columna de exclusión por tamaño y la concentración de factor VIII: C es aproximadamente 1000 UI / ml.

- 60 Inmunotransferencia frente al factor VIII

El producto de degeneración del factor VIII basado en el tamaño se mide mediante inmunotransferencia FVIII. Las proteínas y péptidos de distribución de masa molecular de FVIII en preparaciones de factor VIII se separan de acuerdo

con la masa molecular mediante electroforesis en gel (PAGE) de poliacrilamida de sulfato dodecil sódico (SDS) en condiciones reductoras. Posteriormente, las proteínas se transfieren electroforéticamente desde la matriz de gel a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente se incuba con un agente bloqueante. A continuación, se añaden anticuerpos ovinos policlonales disponibles comercialmente dirigidos a la molécula del factor VIII humano completo
5 seguido de un anticuerpo secundario marcado con enzima como sonda. Como tercera etapa, se agrega un sustrato quimioluminiscente y cuando se combina con la enzima, la luz se produce como un subproducto. La salida de luz se captura como una imagen en tiempo real usando una cámara enfriada con dispositivo de carga acoplada. La intensidad de la señal se correlaciona con la abundancia del antígeno (FVIII) en la membrana de transferencia.

10 PAGE 2D

Se realizó una electroforesis en 2D con tinción con plata para estudiar el patrón de banda electroforética de la cadena de proteína del factor VIII. El enfoque isoeléctrico se realizó como el primer recorrido de dimensión usando un gradiente de pH lineal de pH 3 a 10. La SDS-PAGE de segunda dimensión se ejecutó usando geles de acetato de tris
15 (3 - 8 %). Los geles se tñeron con colorante plateado después del recorrido de la segunda dimensión.

Proteína total (Bradford)

La determinación de proteínas de acuerdo con Bradford se basa en la observación de que la absorbancia máxima para una solución ácida de azul brillante de Coomassie G-250 cambia de 465 nm a 595 nm cuando se produce la unión a la proteína. Ambas interacciones hidrofóbicas e iónicas estabilizan la forma aniónica del tinte, causando un cambio de color visible. El ensayo es útil ya que el coeficiente de extinción de una solución de complejo colorante-albúmina es constante en un rango de concentración de 10 veces. Véase también la referencia Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantisation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical
20 Biochemistry 72: 248-254. 1976, para más información.

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Octapharma AG
- 30 <120> Preparación que comprende péptidos de factor VIII y factor von Willebrand
- <130> 151432WO
- 35 <160> 7
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 2813
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 1

ES 2 747 815 T3

Met	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ala	Gly	Val	Leu	Leu	Ala	Leu	Ala	Leu	Ile	1	5	10	15
Leu	Pro	Gly	Thr	Leu	Cys	Ala	Glu	Gly	Thr	Arg	Gly	Arg	Ser	Ser	Thr	20	25	30	
Ala	Arg	Cys	Ser	Leu	Phe	Gly	Ser	Asp	Phe	Val	Asn	Thr	Phe	Asp	Gly	35	40	45	
Ser	Met	Tyr	Ser	Phe	Ala	Gly	Tyr	Cys	Ser	Tyr	Leu	Leu	Ala	Gly	Gly	50	55	60	
Cys	Gln	Lys	Arg	Ser	Phe	Ser	Ile	Ile	Gly	Asp	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys	65	70	75	80
Arg	Val	Ser	Leu	Ser	Val	Tyr	Leu	Gly	Glu	Phe	Phe	Asp	Ile	His	Leu	85	90	95	
Phe	Val	Asn	Gly	Thr	Val	Thr	Gln	Gly	Asp	Gln	Arg	Val	Ser	Met	Pro	100	105	110	
Tyr	Ala	Ser	Lys	Gly	Leu	Tyr	Leu	Glu	Thr	Glu	Ala	Gly	Tyr	Tyr	Lys	115	120	125	
Leu	Ser	Gly	Glu	Ala	Tyr	Gly	Phe	Val	Ala	Arg	Ile	Asp	Gly	Ser	Gly	130	135	140	
Asn	Phe	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Asp	Arg	Tyr	Phe	Asn	Lys	Thr	Cys	Gly	145	150	155	160
Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asn	Ile	Phe	Ala	Glu	Asp	Asp	Phe	Met	Thr	Gln	165	170	175	

ES 2 747 815 T3

Glu	Gly	Thr	Leu	Thr	Ser	Asp	Pro	Tyr	Asp	Phe	Ala	Asn	Ser	Trp	Ala	180	185	190	
Leu	Ser	Ser	Gly	Glu	Gln	Trp	Cys	Glu	Arg	Ala	Ser	Pro	Pro	Ser	Ser	195	200	205	
Ser	Cys	Asn	Ile	Ser	Ser	Gly	Glu	Met	Gln	Lys	Gly	Leu	Trp	Glu	Gln	210	215	220	
Cys	Gln	Leu	Leu	Lys	Ser	Thr	Ser	Val	Phe	Ala	Arg	Cys	His	Pro	Leu	225	230	235	240
Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Phe	Val	Ala	Leu	Cys	Glu	Lys	Thr	Leu	Cys	Glu	245	250	255	
Cys	Ala	Gly	Gly	Leu	Glu	Cys	Ala	Cys	Pro	Ala	Leu	Leu	Glu	Tyr	Ala	260	265	270	
Arg	Thr	Cys	Ala	Gln	Glu	Gly	Met	Val	Leu	Tyr	Gly	Trp	Thr	Asp	His	275	280	285	
Ser	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Cys	Pro	Ala	Gly	Met	Glu	Tyr	Arg	Gln	Cys	290	295	300	
Val	Ser	Pro	Cys	Ala	Arg	Thr	Cys	Gln	Ser	Leu	His	Ile	Asn	Glu	Met	305	310	315	320
Cys	Gln	Glu	Arg	Cys	Val	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Pro	Glu	Gly	Gln	Leu	325	330	335	
Leu	Asp	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Glu	Ser	Thr	Glu	Cys	Pro	Cys	Val	His	340	345	350	
Ser	Gly	Lys	Arg	Tyr	Pro	Pro	Gly	Thr	Ser	Leu	Ser	Arg	Asp	Cys	Asn	355	360	365	
Thr	Cys	Ile	Cys	Arg	Asn	Ser	Gln	Trp	Ile	Cys	Ser	Asn	Glu	Glu	Cys	370	375	380	
Pro	Gly	Glu	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Gln	Ser	His	Phe	Lys	Ser	Phe	Asp	385	390	395	400
Asn	Arg	Tyr	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Ile	Cys	Gln	Tyr	Leu	Leu	Ala	Arg	405	410	415	
Asp	Cys	Gln	Asp	His	Ser	Phe	Ser	Ile	Val	Ile	Glu	Thr	Val	Gln	Cys	420	425	430	

ES 2 747 815 T3

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu
 435 440 445
 Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
 450 455 460
 Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
 465 470 475 480
 Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
 485 490 495
 Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
 500 505 510
 Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
 515 520 525
 Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
 530 535 540
 Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
 545 550 555 560
 Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
 565 570 575
 Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
 580 585 590
 Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
 595 600 605
 Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
 610 615 620
 Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
 625 630 635 640
 Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
 645 650 655
 Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
 660 665 670
 Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

ES 2 747 815 T3

675	680	685
Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys 690 695 700		
Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp 705 710 715 720		
Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met 725 730 735		
His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val 740 745 750		
Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg 755 760 765		
Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu 770 775 780		
Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met 785 790 795 800		
Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg 805 810 815		
His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln 820 825 830		
Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr 835 840 845		
Cys Val Cys Gln Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp 850 855 860		
Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly 865 870 875 880		
Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp 885 890 895		
Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys 900 905 910		
Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu 915 920 925		

ES 2 747 815 T3

Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Lys	930	935	940
Arg	Pro	Met	Lys	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Arg	945	950	955
Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Trp	Asp	Arg	965	970	975
His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	980	985	990
Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	995	1000	1005
Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn		1010	1015	1020
Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro		1025	1030	1035
Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln		1040	1045	1050
Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe		1055	1060	1065
Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val		1070	1075	1080
Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala		1085	1090	1095
Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln		1100	1105	1110
His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln		1115	1120	1125
Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu		1130	1135	1140
Trp	Arg	Tyr	Asn	Ser	Cys	Ala	Pro	Ala	Cys	Gln	Val	Thr	Cys	Gln		1145	1150	1155
His	Pro	Glu	Pro	Leu	Ala	Cys	Pro	Val	Gln	Cys	Val	Glu	Gly	Cys		1160	1165	1170

ES 2 747 815 T3

His 1175	Ala	His	Cys	Pro	Pro	Gly 1180	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu 1185	Leu	Leu	Gln
Thr 1190	Cys	Val	Asp	Pro	Glu	Asp 1195	Cys	Pro	Val	Cys	Glu 1200	Val	Ala	Gly
Arg 1205	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys 1210	Lys	Val	Thr	Leu	Asn 1215	Pro	Ser	Asp
Pro 1220	Glu	His	Cys	Gln	Ile	Cys 1225	His	Cys	Asp	Val	Val 1230	Asn	Leu	Thr
Cys 1235	Glu	Ala	Cys	Gln	Glu	Pro 1240	Gly	Gly	Leu	Val	Val 1245	Pro	Pro	Thr
Asp 1250	Ala	Pro	Val	Ser	Pro	Thr 1255	Thr	Leu	Tyr	Val	Glu 1260	Asp	Ile	Ser
Glu 1265	Pro	Pro	Leu	His	Asp	Phe 1270	Tyr	Cys	Ser	Arg	Leu 1275	Leu	Asp	Leu
Val 1280	Phe	Leu	Leu	Asp	Gly	Ser 1285	Ser	Arg	Leu	Ser	Glu 1290	Ala	Glu	Phe
Glu 1295	Val	Leu	Lys	Ala	Phe	Val 1300	Val	Asp	Met	Met	Glu 1305	Arg	Leu	Arg
Ile 1310	Ser	Gln	Lys	Trp	Val	Arg 1315	Val	Ala	Val	Val	Glu 1320	Tyr	His	Asp
Gly 1325	Ser	His	Ala	Tyr	Ile	Gly 1330	Leu	Lys	Asp	Arg	Lys 1335	Arg	Pro	Ser
Glu 1340	Leu	Arg	Arg	Ile	Ala	Ser 1345	Gln	Val	Lys	Tyr	Ala 1350	Gly	Ser	Gln
Val 1355	Ala	Ser	Thr	Ser	Glu	Val 1360	Leu	Lys	Tyr	Thr	Leu 1365	Phe	Gln	Ile
Phe 1370	Ser	Lys	Ile	Asp	Arg	Pro 1375	Glu	Ala	Ser	Arg	Ile 1380	Thr	Leu	Leu
Leu 1385	Met	Ala	Ser	Gln	Glu	Pro 1390	Gln	Arg	Met	Ser	Arg 1395	Asn	Phe	Val
Arg 1400	Tyr	Val	Gln	Gly	Leu	Lys 1405	Lys	Lys	Lys	Val	Ile 1410	Val	Ile	Pro

ES 2 747 815 T3

Val Gly 1415	Ile Gly Pro His 1420	Ala Asn Leu Lys Gln 1425	Ile Arg Leu Ile
Glu Lys 1430	Gln Ala Pro Glu Asn 1435	Lys Ala Phe Val Leu 1440	Ser Ser Val
Asp Glu 1445	Leu Glu Gln Gln Arg 1450	Asp Glu Ile Val Ser 1455	Tyr Leu Cys
Asp Leu 1460	Ala Pro Glu Ala Pro 1465	Pro Pro Thr Leu Pro 1470	Pro Asp Met
Ala Gln 1475	Val Thr Val Gly Pro 1480	Gly Leu Leu Gly Val 1485	Ser Thr Leu
Gly Pro 1490	Lys Arg Asn Ser Met 1495	Val Leu Asp Val Ala 1500	Phe Val Leu
Glu Gly 1505	Ser Asp Lys Ile Gly 1510	Glu Ala Asp Phe Asn 1515	Arg Ser Lys
Glu Phe 1520	Met Glu Glu Val Ile 1525	Gln Arg Met Asp Val 1530	Gly Gln Asp
Ser Ile 1535	His Val Thr Val Leu 1540	Gln Tyr Ser Tyr Met 1545	Val Thr Val
Glu Tyr 1550	Pro Phe Ser Glu Ala 1555	Gln Ser Lys Gly Asp 1560	Ile Leu Gln
Arg Val 1565	Arg Glu Ile Arg Tyr 1570	Gln Gly Gly Asn Arg 1575	Thr Asn Thr
Gly Leu 1580	Ala Leu Arg Tyr Leu 1585	Ser Asp His Ser Phe 1590	Leu Val Ser
Gln Gly 1595	Asp Arg Glu Gln Ala 1600	Pro Asn Leu Val Tyr 1605	Met Val Thr
Gly Asn 1610	Pro Ala Ser Asp Glu 1615	Ile Lys Arg Leu Pro 1620	Gly Asp Ile
Gln Val 1625	Val Pro Ile Gly Val 1630	Gly Pro Asn Ala Asn 1635	Val Gln Glu
Leu Glu	Arg Ile Gly Trp Pro	Asn Ala Pro Ile Leu	Ile Gln Asp

ES 2 747 815 T3

1640	1645	1650
Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg 1655 1660 1665		
Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala 1670 1675 1680		
Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly 1685 1690 1695		
Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe Asp Glu Met Lys Ser Phe 1700 1705 1710		
Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile Gly Pro Arg Leu Thr 1715 1720 1725		
Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr Thr Ile Asp Val 1730 1735 1740		
Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu Ser Leu Val 1745 1750 1755		
Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly Asp Ala 1760 1765 1770		
Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly Ala 1775 1780 1785		
Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val 1790 1795 1800		
Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn 1805 1810 1815		
Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala 1820 1825 1830		
Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val 1835 1840 1845		
Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu 1850 1855 1860		
Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys Ser Gly Phe Val Arg Ile 1865 1870 1875		

ES 2 747 815 T3

Cys Met 1880	Asp Glu Asp Gly	Asn 1885	Glu Lys Arg Pro	Gly 1890	Asp Val Trp
Thr Leu 1895	Pro Asp Gln Cys	His 1900	Thr Val Thr Cys	Gln 1905	Pro Asp Gly
Gln Thr 1910	Leu Leu Lys Ser	His 1915	Arg Val Asn Cys	Asp 1920	Arg Gly Leu
Arg Pro 1925	Ser Cys Pro Asn	Ser 1930	Gln Ser Pro Val	Lys 1935	Val Glu Glu
Thr Cys 1940	Gly Cys Arg Trp	Thr 1945	Cys Pro Cys Val	Cys 1950	Thr Gly Ser
Ser Thr 1955	Arg His Ile Val	Thr 1960	Phe Asp Gly Gln	Asn 1965	Phe Lys Leu
Thr Gly 1970	Ser Cys Ser Tyr	Val 1975	Leu Phe Gln Asn	Lys 1980	Glu Gln Asp
Leu Glu 1985	Val Ile Leu His	Asn 1990	Gly Ala Cys Ser	Pro 1995	Gly Ala Arg
Gln Gly 2000	Cys Met Lys Ser	Ile 2005	Glu Val Lys His	Ser 2010	Ala Leu Ser
Val Glu 2015	Leu His Ser Asp	Met 2020	Glu Val Thr Val	Asn 2025	Gly Arg Leu
Val Ser 2030	Val Pro Tyr Val	Gly 2035	Gly Asn Met Glu	Val 2040	Asn Val Tyr
Gly Ala 2045	Ile Met His Glu	Val 2050	Arg Phe Asn His	Leu 2055	Gly His Ile
Phe Thr 2060	Phe Thr Pro Gln	Asn 2065	Asn Glu Phe Gln	Leu 2070	Gln Leu Ser
Pro Lys 2075	Thr Phe Ala Ser	Lys 2080	Thr Tyr Gly Leu	Cys 2085	Gly Ile Cys
Asp Glu 2090	Asn Gly Ala Asn	Asp 2095	Phe Met Leu Arg	Asp 2100	Gly Thr Val
Thr Thr 2105	Asp Trp Lys Thr	Leu 2110	Val Gln Glu Trp	Thr 2115	Val Gln Arg

ES 2 747 815 T3

Pro Gly 2120	Gln Thr Cys Gln	Pro 2125	Ile Leu Glu Glu Gln	Cys Leu Val 2130
Pro Asp 2135	Ser Ser His Cys Gln	Val Leu Leu Leu	Pro 2145	Leu Phe Ala
Glu Cys 2150	His Lys Val Leu Ala	Pro Ala Thr Phe Tyr	Ala Ile Cys 2160	
Gln Gln 2165	Asp Ser Cys His Gln	Glu Gln Val Cys Glu	Val Ile Ala 2175	
Ser Tyr 2180	Ala His Leu Cys Arg	Thr Asn Gly Val Cys	Val Asp Trp 2190	
Arg Thr 2195	Pro Asp Phe Cys Ala	Met Ser Cys Pro Pro	Ser Leu Val 2205	
Tyr Asn 2210	His Cys Glu His Gly	Cys Pro Arg His Cys	Asp Gly Asn 2220	
Val Ser 2225	Ser Cys Gly Asp His	Pro Ser Glu Gly Cys	Phe Cys Pro 2235	
Pro Asp 2240	Lys Val Met Leu Glu	Gly Ser Cys Val Pro	Glu Glu Ala 2250	
Cys Thr 2255	Gln Cys Ile Gly Glu	Asp Gly Val Gln His	Gln Phe Leu 2265	
Glu Ala 2270	Trp Val Pro Asp His	Gln Pro Cys Gln Ile	Cys Thr Cys 2280	
Leu Ser 2285	Gly Arg Lys Val Asn	Cys Thr Thr Gln Pro	Cys Pro Thr 2295	
Ala Lys 2300	Ala Pro Thr Cys Gly	Leu Cys Glu Val Ala	Arg Leu Arg 2310	
Gln Asn 2315	Ala Asp Gln Cys Cys	Pro Glu Tyr Glu Cys	Val Cys Asp 2325	
Pro Val 2330	Ser Cys Asp Leu Pro	Pro Val Pro His Cys	Glu Arg Gly 2340	
Leu Gln 2345	Pro Thr Leu Thr Asn	Pro Gly Glu Cys Arg	Pro Asn Phe 2355	

ES 2 747 815 T3

Thr Cys 2360	Ala Cys Arg Lys	Glu 2365	Glu Cys Lys Arg Val 2370	Ser Pro Pro
Ser Cys 2375	Pro Pro His Arg	Leu 2380	Pro Thr Leu Arg Lys 2385	Thr Gln Cys
Cys Asp 2390	Glu Tyr Glu Cys	Ala 2395	Cys Asn Cys Val Asn 2400	Ser Thr Val
Ser Cys 2405	Pro Leu Gly Tyr	Leu 2410	Ala Ser Thr Ala Thr 2415	Asn Asp Cys
Gly Cys 2420	Thr Thr Thr Thr	Cys 2425	Leu Pro Asp Lys Val 2430	Cys Val His
Arg Ser 2435	Thr Ile Tyr Pro	Val 2440	Gly Gln Phe Trp Glu 2445	Glu Gly Cys
Asp Val 2450	Cys Thr Cys Thr	Asp 2455	Met Glu Asp Ala Val 2460	Met Gly Leu
Arg Val 2465	Ala Gln Cys Ser	Gln 2470	Lys Pro Cys Glu Asp 2475	Ser Cys Arg
Ser Gly 2480	Phe Thr Tyr Val	Leu 2485	His Glu Gly Glu Cys 2490	Cys Gly Arg
Cys Leu 2495	Pro Ser Ala Cys	Glu 2500	Val Val Thr Gly Ser 2505	Pro Arg Gly
Asp Ser 2510	Gln Ser Ser Trp	Lys 2515	Ser Val Gly Ser Gln 2520	Trp Ala Ser
Pro Glu 2525	Asn Pro Cys Leu	Ile 2530	Asn Glu Cys Val Arg 2535	Val Lys Glu
Glu Val 2540	Phe Ile Gln Gln	Arg 2545	Asn Val Ser Cys Pro 2550	Gln Leu Glu
Val Pro 2555	Val Cys Pro Ser	Gly 2560	Phe Gln Leu Ser Cys 2565	Lys Thr Ser
Ala Cys 2570	Cys Pro Ser Cys	Arg 2575	Cys Glu Arg Met Glu 2580	Ala Cys Met
Leu Asn	Gly Thr Val Ile Gly	Pro Gly Lys Thr Val	Met Ile Asp	

ES 2 747 815 T3

2585		2590		2595
Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser				
2600		2605		2610
Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr Cys Asn Pro Cys Pro				
2615		2620		2625
Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu Cys Cys Gly Arg				
2630		2635		2640
Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln Leu Arg Gly Gly Gln Ile				
2645		2650		2655
Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu Gln Asp Gly Cys Asp Thr				
2660		2665		2670
His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly Glu Tyr Phe Trp Glu Lys				
2675		2680		2685
Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp Glu His Lys Cys Leu Ala				
2690		2695		2700
Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro Gly Thr Cys Cys Asp Thr				
2705		2710		2715
Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile Thr Ala Arg Leu Gln Tyr				
2720		2725		2730
Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu Val Glu Val Asp Ile His				
2735		2740		2745
Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys Ala Met Tyr Ser Ile Asp				
2750		2755		2760
Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser Cys Cys Ser Pro Thr Arg				
2765		2770		2775
Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His Cys Thr Asn Gly Ser Val				
2780		2785		2790
Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro				
2795		2800		2805
Arg Lys Cys Ser Lys				
2810				

ES 2 747 815 T3

<210> 2
 <211> 1365
 <212> PRT
 5 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210         215         220

```

ES 2 747 815 T3

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
 225 230 235 240
 Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
 245 250 255
 Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
 260 265 270
 Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 275 280 285
 Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
 290 295 300
 Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 305 310 315 320
 Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
 325 330 335
 Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350
 Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365
 Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430
 Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460
 Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
 465 470 475 480

ES 2 747 815 T3

Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
485 490 495

Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
500 505 510

Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala
515 520 525

Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu
530 535 540

Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
545 550 555 560

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
565 570 575

Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
580 585 590

Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
595 600 605

Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser
610 615 620

Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
625 630 635 640

Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
645 650 655

Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
660 665 670

Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
675 680 685

Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
690 695 700

Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
705 710 715 720

Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
725 730 735

ES 2 747 815 T3

Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
 740 745 750
 Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly
 755 760 765
 Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
 770 775 780
 Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
 785 790 795 800
 Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
 805 810 815
 Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
 820 825 830
 Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
 835 840 845
 Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
 850 855 860
 Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
 865 870 875 880
 Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
 885 890 895
 Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu
 900 905 910
 Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp
 915 920 925
 Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
 930 935 940
 Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
 945 950 955 960
 Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
 965 970 975
 Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu

ES 2 747 815 T3

980					985					990					
Ser	Leu	Val	Asp	Val	Met	Gln	Arg	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Gln	Ile	Gly
	995						1000					1005			
Asp	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Val	Arg	Tyr	Leu	Thr	Ser	Glu	Met	His	
	1010					1015					1020				
Gly	Ala	Arg	Pro	Gly	Ala	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Ile	Leu	Val	Thr	
	1025					1030					1035				
Asp	Val	Ser	Val	Asp	Ser	Val	Asp	Ala	Ala	Ala	Asp	Ala	Ala	Arg	
	1040					1045					1050				
Ser	Asn	Arg	Val	Thr	Val	Phe	Pro	Ile	Gly	Ile	Gly	Asp	Arg	Tyr	
	1055					1060					1065				
Asp	Ala	Ala	Gln	Leu	Arg	Ile	Leu	Ala	Gly	Pro	Ala	Gly	Asp	Ser	
	1070					1075					1080				
Asn	Val	Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	
	1085					1090					1095				
Thr	Leu	Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	
	1100					1105					1110				
Arg	Ile	Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	
	1115					1120					1125				
Val	Trp	Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	
	1130					1135					1140				
Asp	Gly	Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	
	1145					1150					1155				
Gly	Leu	Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	
	1160					1165					1170				
Glu	Glu	Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	
	1175					1180					1185				
Gly	Ser	Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	
	1190					1195					1200				
Lys	Leu	Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	
	1205					1210					1215				

ES 2 747 815 T3

Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala Cys Ser Pro Gly
1220 1225 1230

Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val Lys His Ser Ala
1235 1240 1245

Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val Thr Val Asn Gly
1250 1255 1260

Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn Met Glu Val Asn
1265 1270 1275

Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe Asn His Leu Gly
1280 1285 1290

His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu Phe Gln Leu Gln
1295 1300 1305

Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr Gly Leu Cys Gly
1310 1315 1320

Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met Leu Arg Asp Gly
1325 1330 1335

Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln Glu Trp Thr Val
1340 1345 1350

Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu Glu
1355 1360 1365

<210> 3

<211> 272

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

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

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

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

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

10

ES 2 747 815 T3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Val Val Trp Asp Arg His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr
210                             215                             220

Tyr Gln Glu Lys Val Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln
225                             230                             235                             240

Asn Asn Asp Leu Thr Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val
245                             250                             255

Asp Phe Gly Asn Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg
260                             265                             270

```

<210> 4

<211> 910

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

10

```

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

```

ES 2 747 815 T3

Asn	Leu	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Thr	Lys	Thr	Cys	Gln	Asn	Tyr	
			20					25					30			
Asp	Leu	Glu	Cys	Met	Ser	Met	Gly	Cys	Val	Ser	Gly	Cys	Leu	Cys	Pro	
		35					40					45				
Pro	Gly	Met	Val	Arg	His	Glu	Asn	Arg	Cys	Val	Ala	Leu	Glu	Arg	Cys	
	50					55					60					
Pro	Cys	Phe	His	Gln	Gly	Lys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Gly	Glu	Thr	Val	Lys	
65					70					75					80	
Ile	Gly	Cys	Asn	Thr	Cys	Val	Cys	Gln	Asp	Arg	Lys	Trp	Asn	Cys	Thr	
				85					90					95		
Asp	His	Val	Cys	Asp	Ala	Thr	Cys	Ser	Thr	Ile	Gly	Met	Ala	His	Tyr	
			100					105					110			
Leu	Thr	Phe	Asp	Gly	Leu	Lys	Tyr	Leu	Phe	Pro	Gly	Glu	Cys	Gln	Tyr	
		115					120					125				
Val	Leu	Val	Gln	Asp	Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	
	130					135					140					
Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Gly	Cys	Ser	His	Pro	Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	
145					150					155					160	
Arg	Val	Thr	Ile	Leu	Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	
				165					170					175		
Glu	Val	Asn	Val	Lys	Arg	Pro	Met	Lys	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	
			180					185					190			
Val	Glu	Ser	Gly	Arg	Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	
		195					200					205				
Val	Val	Trp	Asp	Arg	His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	
	210					215					220					
Tyr	Gln	Glu	Lys	Val	Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	
225					230					235					240	
Asn	Asn	Asp	Leu	Thr	Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	
				245					250					255		
Asp	Phe	Gly	Asn	Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	
			260					265					270			

ES 2 747 815 T3

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met
 275 280 285
 Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val
 290 295 300
 Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val
 305 310 315 320
 Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys
 325 330 335
 Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly
 340 345 350
 Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu
 355 360 365
 Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn
 370 375 380
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu
 385 390 395 400
 Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro
 405 410 415
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp
 420 425 430
 Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys
 435 440 445
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys
 450 455 460
 Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu
 465 470 475 480
 Val Val Pro Pro Thr Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val
 485 490 495
 Glu Asp Ile Ser Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu
 500 505 510
 Leu Asp Leu Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala
 515 520 525

ES 2 747 815 T3

Glu Phe Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu
 530 535 540

Arg Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp
 545 550 555 560

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser Glu
 565 570 575

Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln Val Ala
 580 585 590

Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile Phe Ser Lys
 595 600 605

Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu Leu Met Ala Ser
 610 615 620

Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val Arg Tyr Val Gln Gly
 625 630 635 640

Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro Val Gly Ile Gly Pro His
 645 650 655

Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn
 660 665 670

Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp
 675 680 685

Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro
 690 695 700

Thr Leu Pro Pro Asp Met Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu
 705 710 715 720

Gly Val Ser Thr Leu Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val
 725 730 735

Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn
 740 745 750

Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly
 755 760 765

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr

ES 2 747 815 T3

```

770              775              780

Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln
785              790              795              800

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly
805              810              815

Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly
820              825              830

Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro
835              840              845

Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro
850              855              860

Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly
865              870              875              880

Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg
885              890              895

Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu
900              905              910

<210> 5
<211> 272
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 5

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

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

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

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

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

Ile Gly Cys Asn Thr Cys Val Cys Gln Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr

```

ES 2 747 815 T3

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

<210> 6
<211> 174
5 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 747 815 T3

```

Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
1           5           10           15

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
20           25           30

Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
35           40           45

Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala His Leu Leu
50           55           60

Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro Ser Gln Ile Gly
65           70           75           80

Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr Ser Glu Met His Gly
85           90           95

Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val Ile Leu Val Thr Asp Val
100          105          110

Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg
115          120          125

Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln
130          135          140

Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu
145          150          155          160

Gln Arg Ile Glu Asp Leu Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn
165          170

```

5 <210> 7
 <211> 390
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

10 <400> 7

ES 2 747 815 T3

Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	Glu	Ala	Trp
1				5					10					15	
Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	Leu	Ser	Gly	Arg
			20					25					30		
Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	Ala	Lys	Ala	Pro	Thr
		35					40					45			
Cys	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys
	50					55					60				
Cys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro
65					70					75					80
Pro	Val	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro

ES 2 747 815 T3

85								90				95			
Gly	Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys
			100					105					110		
Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu
		115					120					125			
Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val
	130					135					140				
Asn	Ser	Thr	Val	Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr
145					150					155					160
Asn	Asp	Cys	Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys
				165				170						175	
Val	His	Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu	Gly
			180					185					190		
Cys	Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu
		195					200					205			
Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg	Ser
	210					215					220				
Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	Cys	Leu
225					230					235					240
Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	Asp	Ser	Gln
				245				250						255	
Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp	Ala	Ser	Pro	Glu	Asn	Pro
			260					265					270		
Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val	Lys	Glu	Glu	Val	Phe	Ile	Gln
		275					280					285			
Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Leu	Glu	Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser
	290					295					300				
Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Ala	Cys	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg
305					310					315					320
Cys	Glu	Arg	Met	Glu	Ala	Cys	Met	Leu	Asn	Gly	Thr	Val	Ile	Gly	Pro
				325				330						335	

ES 2 747 815 T3

Gly Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val
 340 345 350

Gln Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr Thr
 355 360 365

Cys Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr Gly Glu
 370 375 380

Cys Cys Gly Arg Cys Leu
 385 390

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un complejo de factor VIII y un péptido de factor von Willebrand,
5 donde el péptido de factor von Willebrand consiste en los aminoácidos 764 a 2128 de la SEQ ID NO: 1.
2. La composición de la reivindicación 1, donde los péptidos del factor von Willebrand tienen al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en
 - 10 (i) una constante de unión por afinidad para heparina de $K_D > 1$ nM, preferentemente $\geq 2,43$ nM;
 - (i) una constante de unión por afinidad para el colágeno III de $K_D > 5$ nM, preferentemente $\geq 17,02$ nM;
 - (iii) una constante de unión por afinidad para el factor VIII de $K_D < 100$ nM o < 10 nM, preferentemente $\leq 6,19$ nM; y
 - (iv) una inhibición de la unión a fosfolípidos de factor VIII de al menos el 70 %, preferentemente de al menos el 80 %.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, donde los péptidos del factor von Willebrand se derivan del factor von Willebrand por escisión proteolítica o escisión química, preferentemente por escisión proteolítica con proteasa *S. aureus* V-8.
- 20 4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el factor VIII es un factor VIII de longitud completa, un factor VIII con dominio B eliminado o un factor VIII en el que el dominio B ha sido reemplazado por un enlazador artificial o un fragmento del dominio B natural o una combinación de los mismos.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el factor VIII es factor VIII
25 derivado de plasma o factor VIII recombinante, donde un factor VIII recombinante se expresa preferentemente en la línea celular humana.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la composición tiene al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en
 - 30 (i) los péptidos de factor von Willebrand protegen el factor VIII de la unión del anticuerpo para minimizar la formación de inhibidores en un paciente;
 - (ii) estabiliza el factor VIII para proporcionar una actividad del factor VIII restante de al menos el 90 % después del almacenamiento durante 12 meses en forma líquida congelada a -70 °C;
 - 35 (iii) estabiliza el factor VIII para proporcionar una actividad del factor VIII restante de al menos el 90 % después del almacenamiento durante 24 meses en forma liofilizada a 5 °C;
 - (iv) estabiliza el factor VIII para proporcionar una actividad del factor VIII restante de al menos el 90 % después del almacenamiento durante 12 meses en forma liofilizada a 25 °C;
 - (v) prolonga la vida media del factor VIII in vivo en al menos un 20 %; y
 - 40 (vi) reduce la formación de inhibidores en pacientes no tratados previamente a menos del 20 %, después del tratamiento con la composición durante 6 meses.
7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en el tratamiento o prevención de un trastorno hemorrágico.
- 45 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el tratamiento o prevención comprende la administración no intravenosa de la composición, preferentemente donde la administración no intravenosa es una inyección subcutánea.
- 50 9. Un procedimiento para la reducción de virus en una preparación de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 que comprende la etapa de nanofiltrar los péptidos del factor von Willebrand antes o después de una combinación con el factor VIII, reduciendo así el parvovirus porcino, si está presente, en al menos un factor de 100.

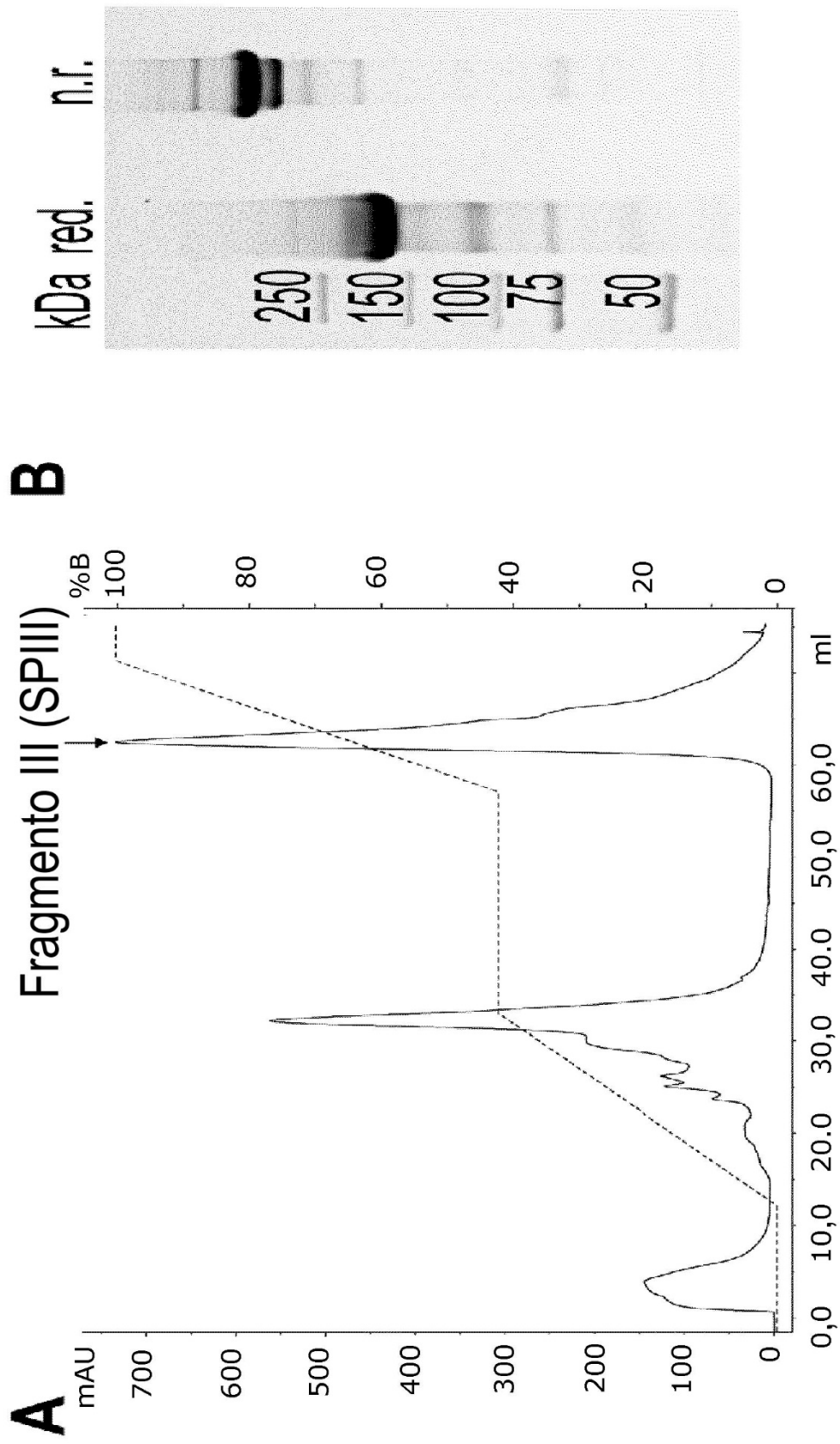


Fig. 1

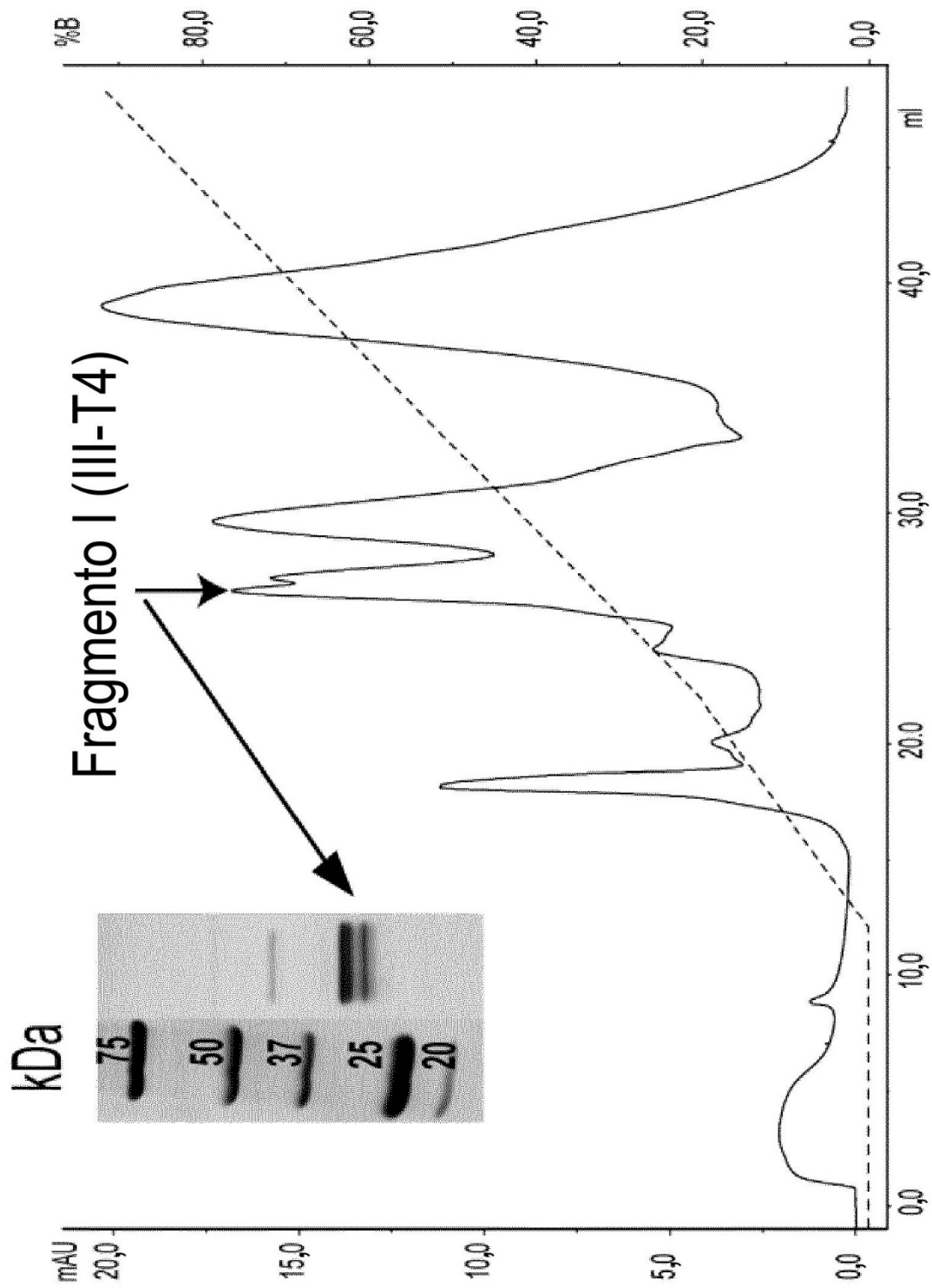


Fig. 2

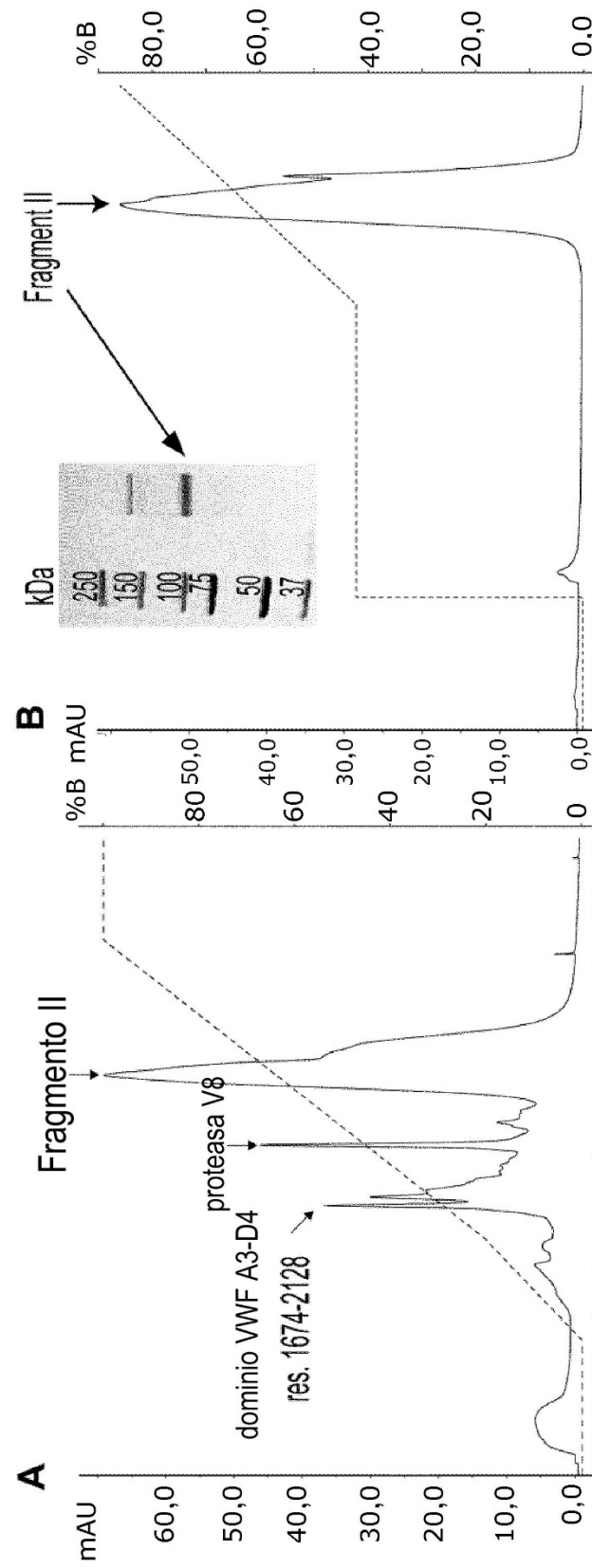


Fig. 3

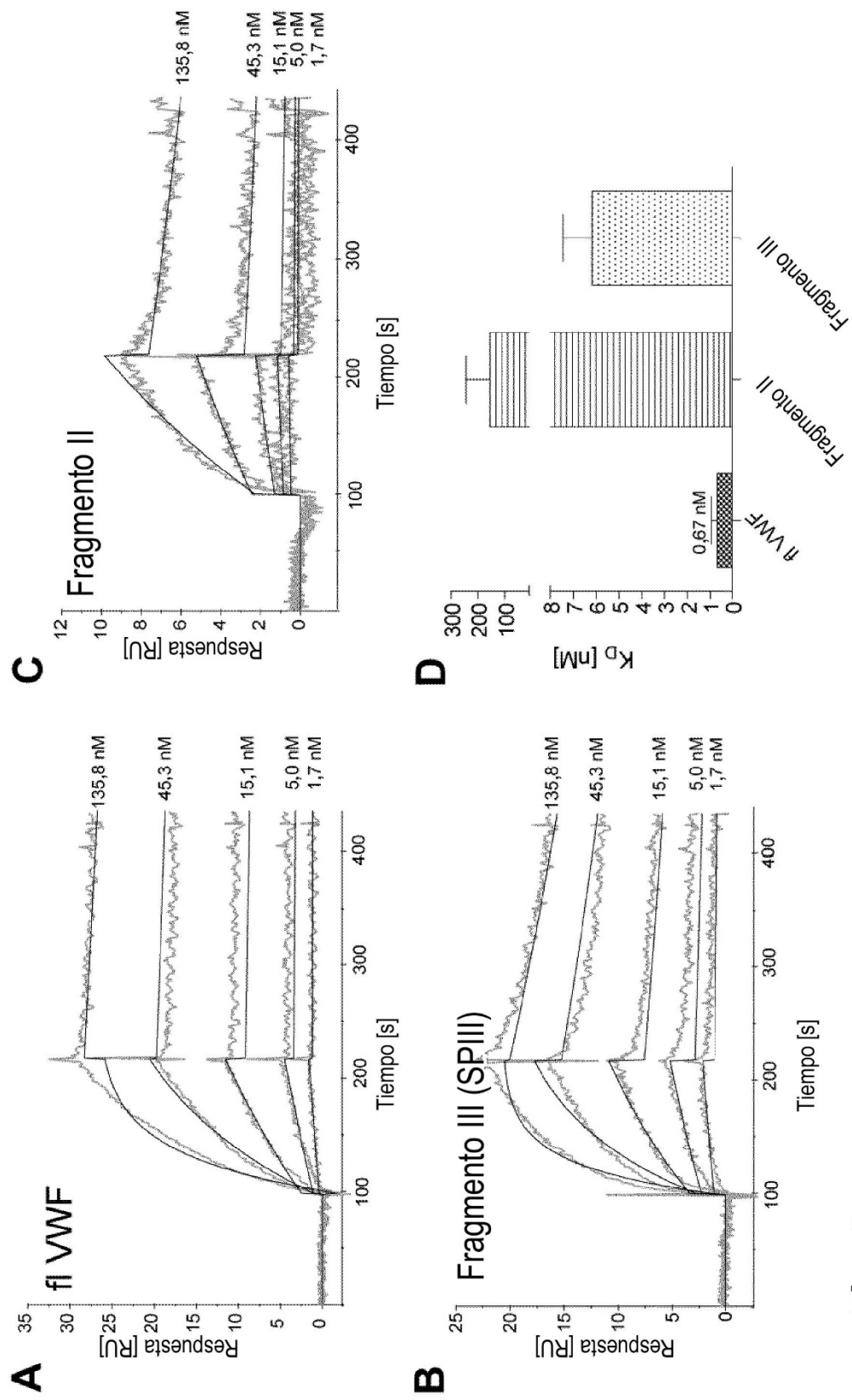


Fig. 4

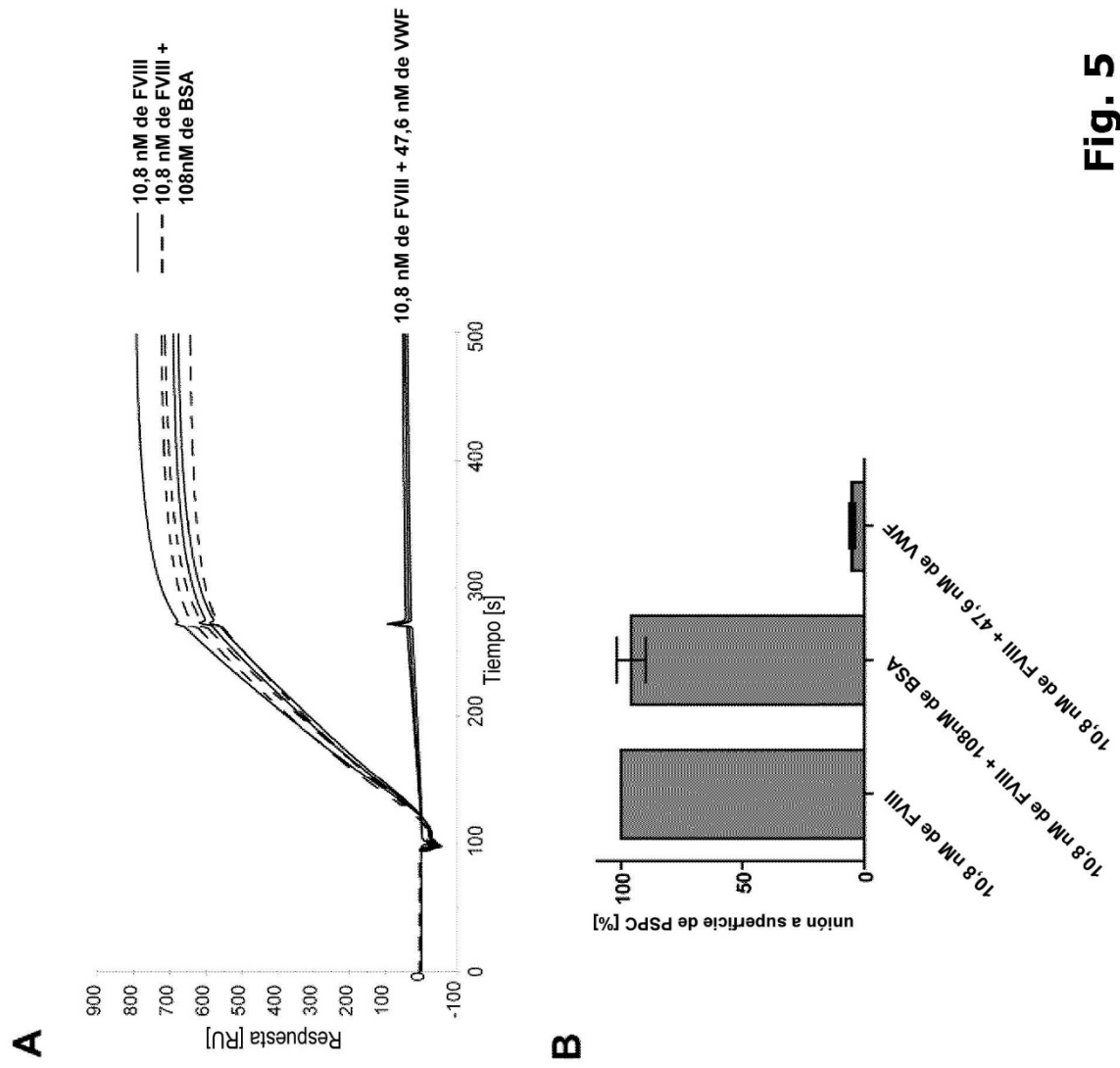


Fig. 5

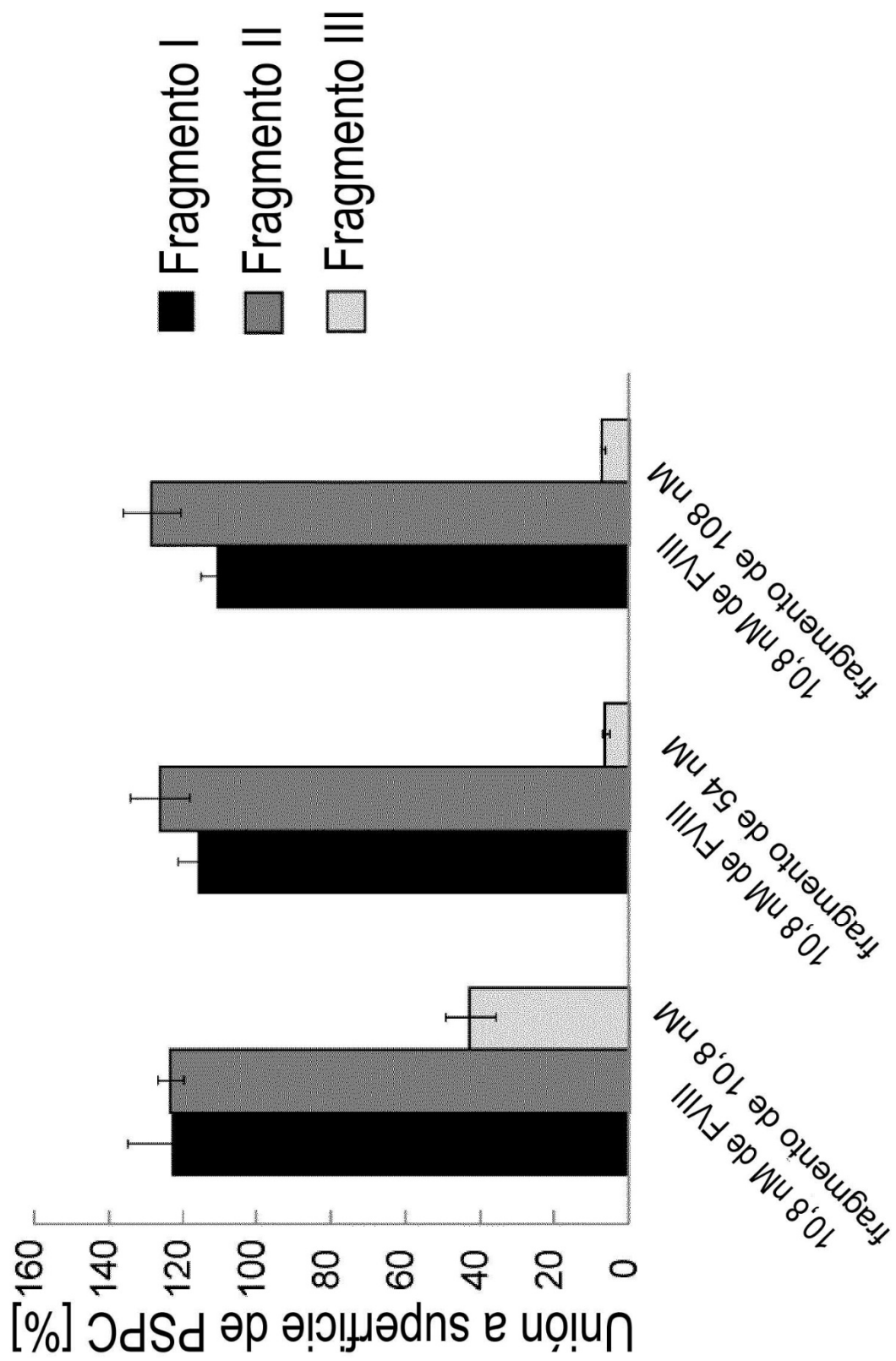


Fig. 6

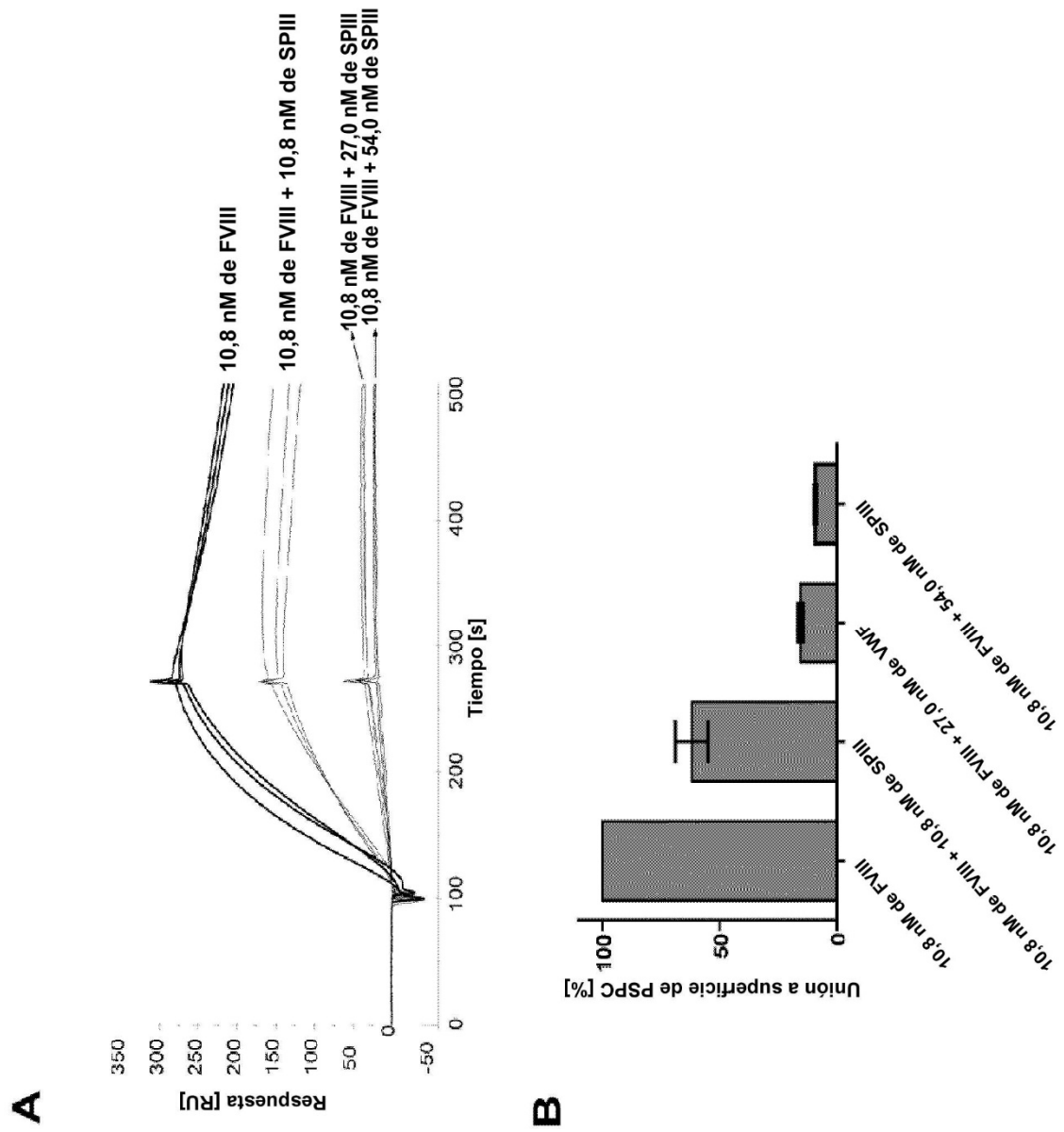


Fig. 7

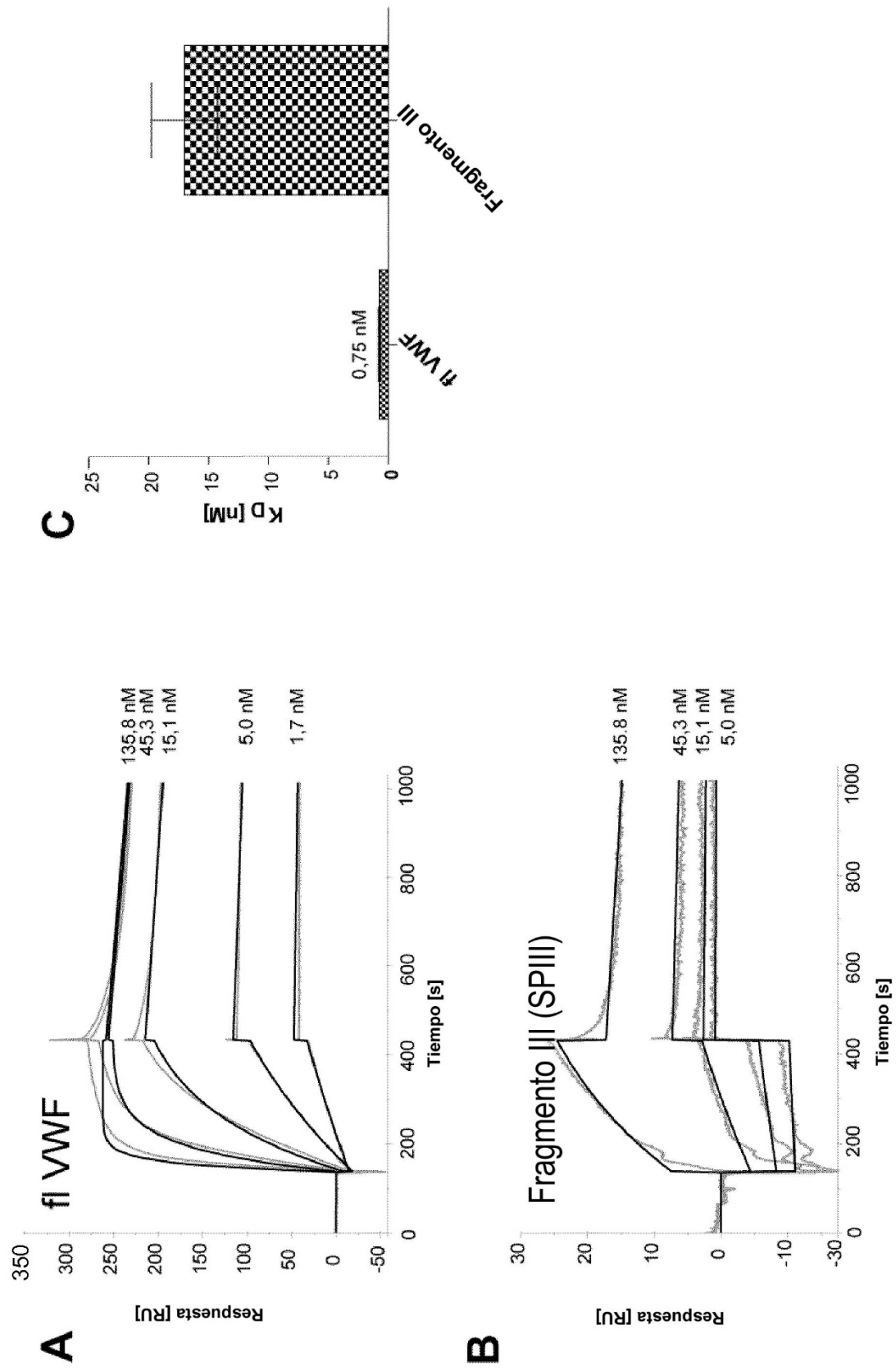


Fig. 8

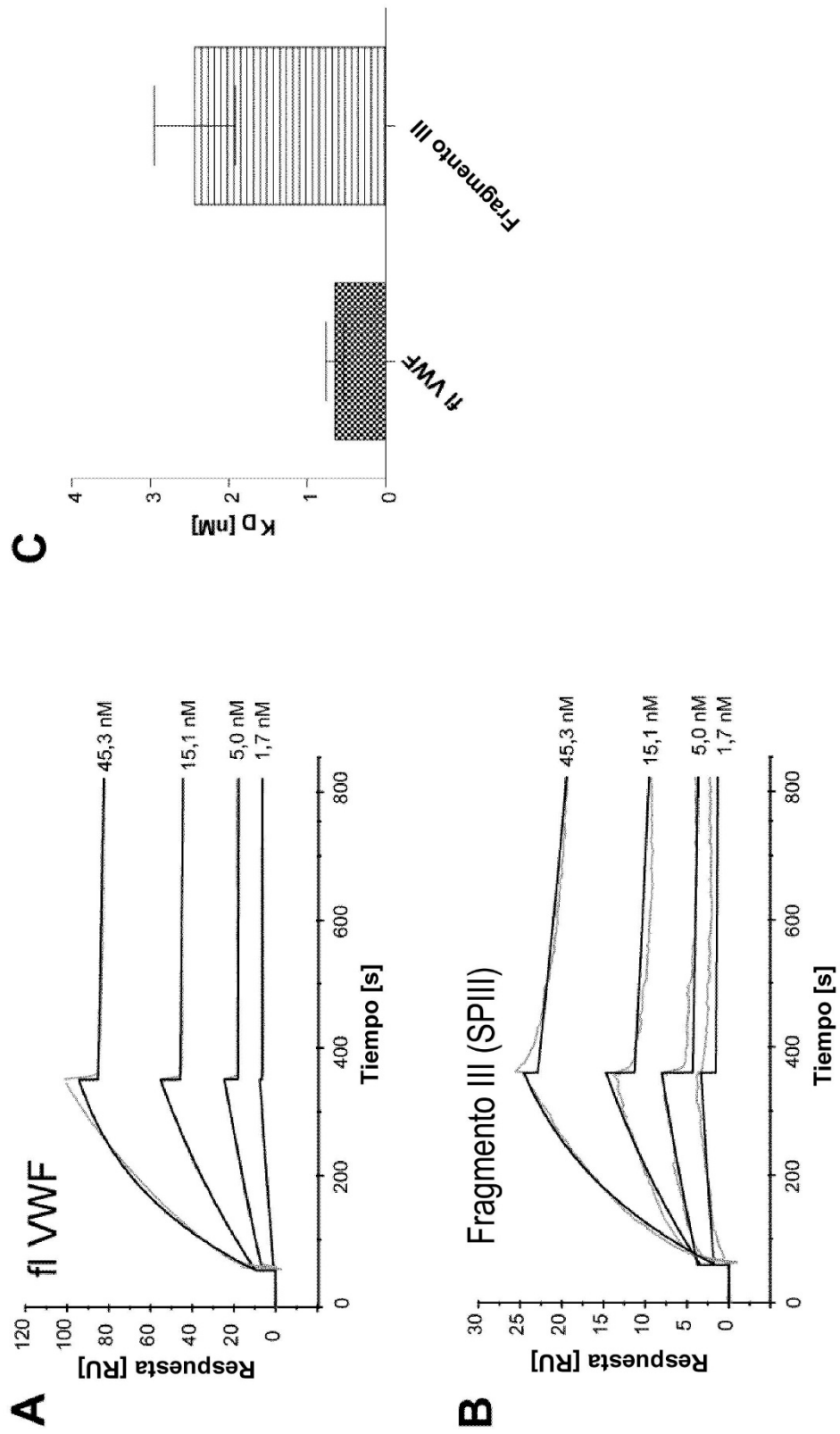


Fig. 9

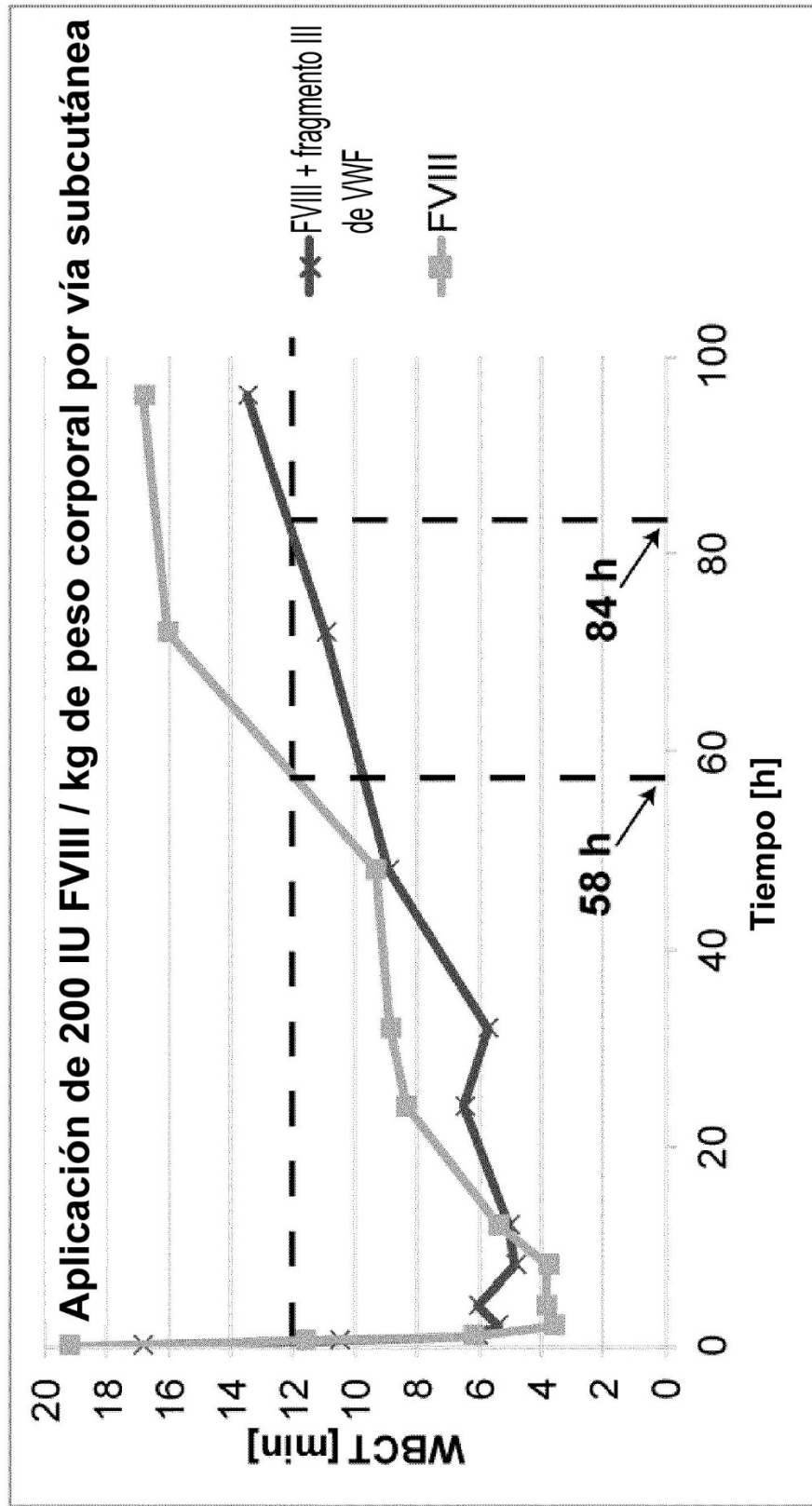


Fig. 10

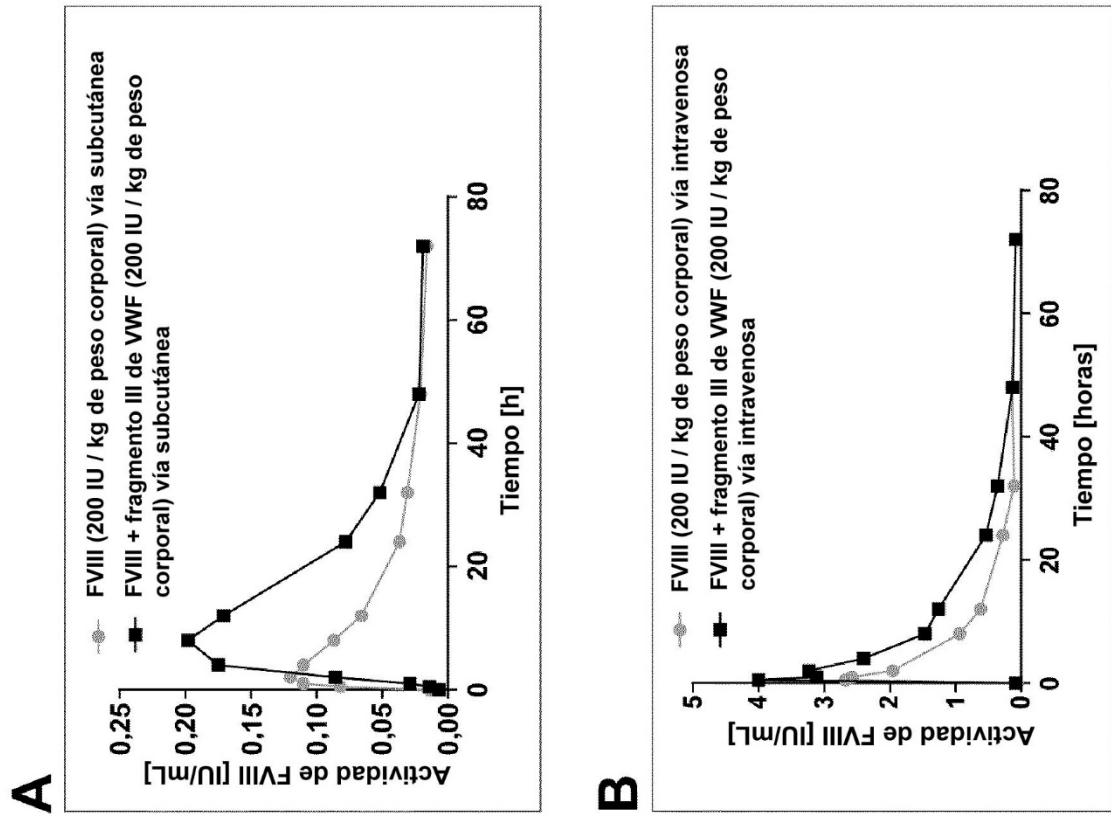


Fig. 11

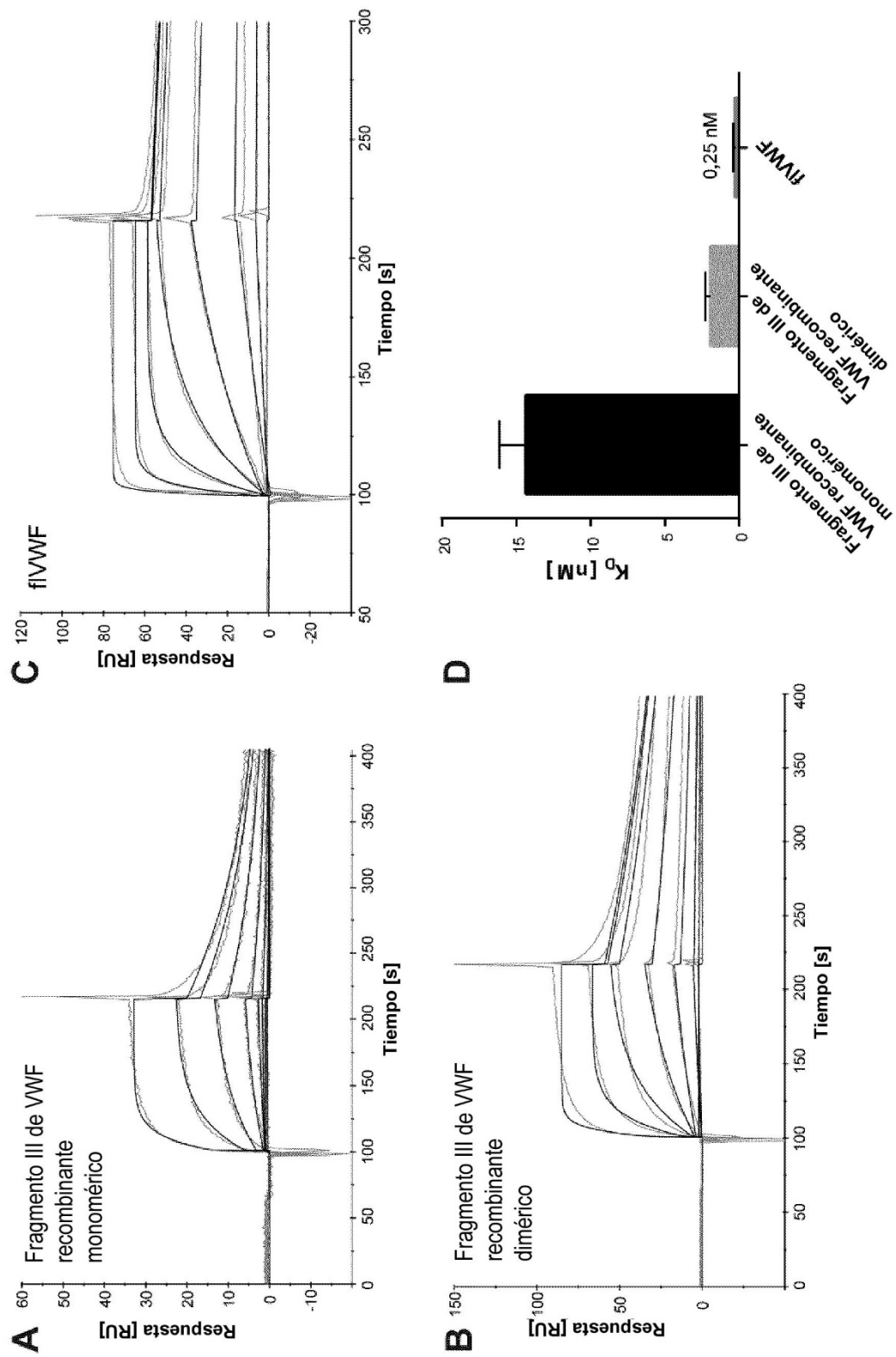


Fig. 12

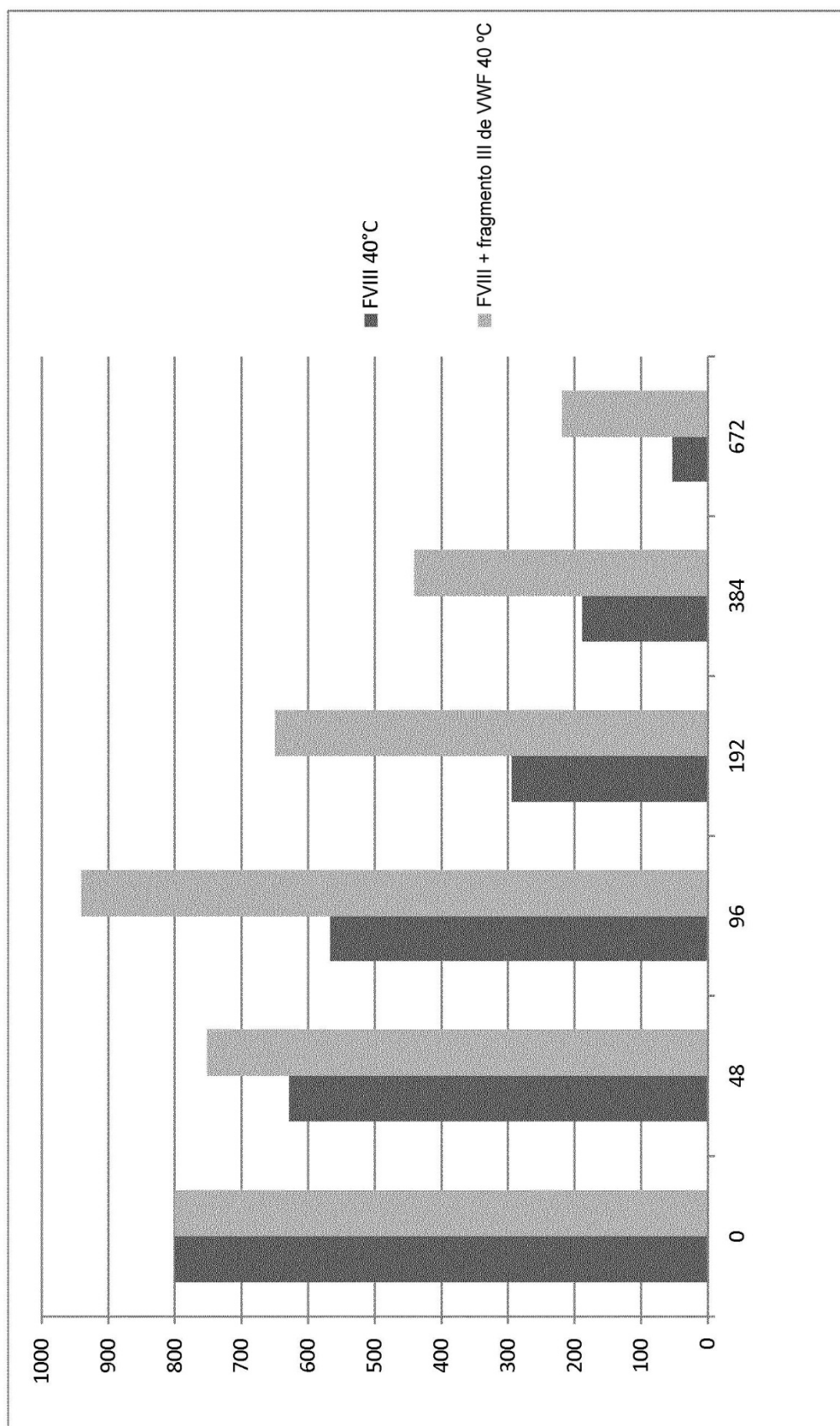


Fig. 13

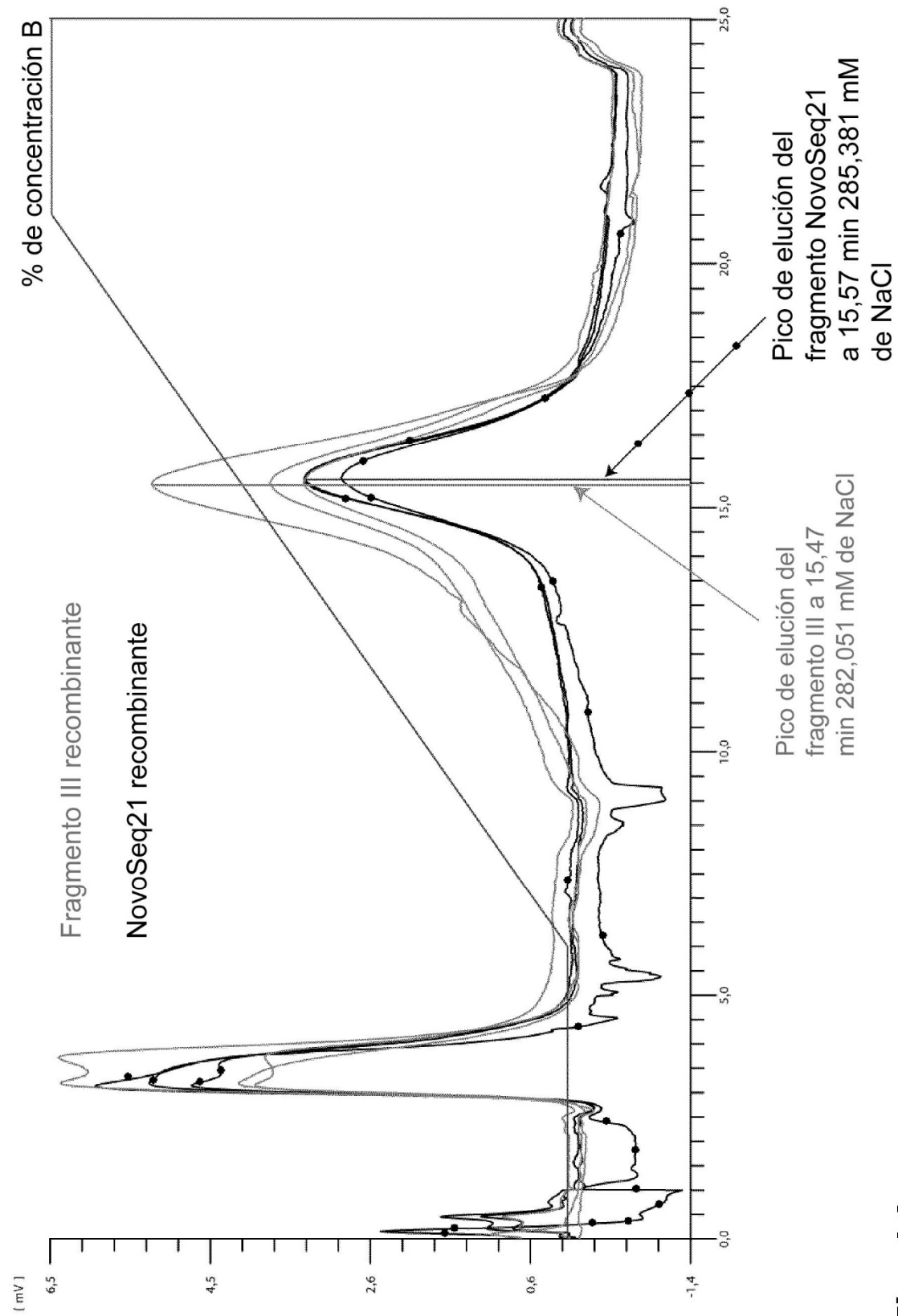


Fig. 14