

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 751 607**

51 Int. Cl.:

**C12P 21/02** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.04.2015 PCT/AU2015/050170**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.12.2015 WO15188224**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.04.2015 E 15806732 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3158055**

54 Título: **Producción mejorada de factor de von Willebrand recombinante en un biorreactor**

30 Prioridad:

**13.06.2014 EP 14172338**

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

**01.04.2020**

73 Titular/es:

**CSL LIMITED (100.0%)  
45 Poplar Road  
Parkville, VIC 3052, AU**

72 Inventor/es:

**DEBUS, STEFAN y  
LIND, HOLGER**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 751 607 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

Producción mejorada de factor de von Willebrand recombinante en un biorreactor

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a procedimientos mejorados para la producción recombinante de factor von Willebrand (vWF) en un biorreactor separando diferentes especies de multímeros de vWF durante la fermentación.

**Antecedentes**

10 La biotecnología ofrece la promesa de producir productos biofarmacéuticos de bajo coste, incluyendo proteínas recombinantes. Muchas proteínas terapéuticas, tales como los factores de coagulación, tienen potencial terapéutico si se pueden producir de forma recombinante de una manera que conserve su actividad biológica y produzca rendimientos suficientes para ser comercialmente viables. Por ejemplo, los factores de coagulación producidos de forma recombinante, tales como el factor de von Willebrand (vWF), tienen el potencial de tratar una amplia variedad de trastornos hemorrágicos. Sin embargo, este potencial no se ha alcanzado adecuadamente en parte debido a la complejidad inherente de las moléculas biológicas de origen natural y la variedad de limitaciones asociadas con la síntesis de sus contrapartidas proteicas recombinantes en células manipuladas genéticamente. Por lo tanto, existe una fuerte necesidad en la técnica de procedimientos mejorados para producir proteínas terapéuticas altamente biológicamente activas recombinantes tales como vWF.

15 Las proteínas terapéuticas recombinantes generalmente se expresan en células eucariotas que se cultivan en biorreactores de tamaño variable. En el campo se conocen varios modos de operar dichos biorreactores, como procedimientos de alimentación por lotes y procedimientos de perfusión. En dichos procedimientos de fermentación, es deseable mantener viabilidad celular y densidad celular altas para obtener la proteína recombinante deseada en una forma concentrada que facilite la purificación posterior.

20 El documento WO 2008/006494 desvela un procedimiento de perfusión en el que la acumulación de la proteína terapéutica deseada en el sobrenadante del cultivo celular se logra a altas concentraciones alimentando los componentes del medio de cultivo al cultivo celular en un biorreactor y en el que el cultivo celular que comprende las células, la proteína terapéutica y el medio de cultivo celular se hace circular sobre un sistema de separación en el que el sistema de separación separa la proteína terapéutica de sustancias de menor peso molecular que la proteína terapéutica, tales como de metabolitos. El límite de peso molecular (MWCO) de las sustancias a separar de la proteína terapéutica de interés en el documento WO 2008/006494 está entre 5.000 Da y 500.000 Da, preferentemente como máximo 100.000 Da.

25 El documento WO 2008/152075 A1 describe un procedimiento para producir un biopolímero de interés en un procedimiento de fermentación de perfusión continua, en el que el biorreactor comprende una unidad de filtro de impurezas y un módulo de recolección de producto. Se muestra además que la unidad de filtro de impurezas permite eliminar impurezas con un peso molecular (MW) por debajo del MW del biopolímero de interés mientras se retienen las células y el biopolímero de interés en el biorreactor. Además, el módulo de recolección del producto permite eliminar biopolímeros de interés e impurezas mientras se retienen las células en el biorreactor. Por lo tanto, el documento WO 2008/152075 A1 se refiere a la eliminación de impurezas mientras se retienen células y compuestos de alto peso molecular (por ejemplo, producto) en el biorreactor.

30 El documento EP2171034 desvela un procedimiento de producción de un biopolímero en un procedimiento de fermentación continua en el que se usa un filtro de impurezas que permite eliminar impurezas con un peso molecular inferior al peso molecular del biopolímero de interés del biopolímero de interés en el biorreactor. Esta patente también desvela un procedimiento de fermentación continua en el que una combinación de una unidad de filtro equipada con un filtro de impurezas se combina con una unidad de filtro equipada con un filtro de producto que permitirá que el biopolímero de interés pase para recolectar el biopolipéptido de interés. Se describen tamaños de poro de filtro de impurezas de hasta 80.000 Da por lo que el intervalo preferido es de 2.000 Da a 15.000 Da. Como biopolímeros de interés, solo se describen polipéptidos con un peso molecular dado. El biopolímero de interés más grande desvelado es el Factor VIII que tiene un peso molecular de aproximadamente 280.000 Da.

**Breve descripción de los dibujos**

La **figura 1** muestra la relación de la actividad del cofactor de ristocetina del vWF respecto al antígeno de vWF (vWF:RCoF/vWF:Ag) en el biorreactor durante el procedimiento por lotes.

50 La **figura 2** muestra la relación de la actividad del cofactor de ristocetina del vWF respecto al antígeno de vWF (vWF:RCoF/vWF:Ag) en el material retenido (biorreactor) y en el material permeado durante el procedimiento del ejemplo 2.

55 La **figura 3** muestra la acumulación de vWF de HMW en el material retenido (biorreactor) y el agotamiento de vWF de HMW en el material permeado en el día 4 en el ejemplo 2. Las intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar de las bandas 1-5, 6-10 y  $\geq 11$  se determinaron como se describe en el ejemplo

2.

La **figura 4** muestra la relación de la actividad del cofactor de ristocetina del vWF respecto al antígeno de vWF (vWF:RCoF/vWF:Ag) en el material retenido (biorreactor) y en el material permeado durante el procedimiento del ejemplo 3.

5 La **figura 5** muestra la acumulación de vWF de HMW en el material retenido (biorreactor) y el agotamiento de vWF de HMW en el material permeado en el día 9 en el ejemplo 3. Las intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar de las bandas 1-5, 6-10 y  $\geq 11$  se determinaron como se describe en el ejemplo 2.

La **figura 6** muestra un dibujo esquemático de la configuración del procedimiento hipotético del ejemplo 4.

10 La **figura 7** muestra un dibujo esquemático de la configuración del procedimiento hipotético del ejemplo 5.

La **figura 8** muestra la acumulación de vWF de HMW en el material retenido (biorreactor) y el agotamiento de vWF de HMW en el material permeado en el día 7 del ejemplo 6. Las intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar de las bandas 1-5, 6-10 y  $\geq 11$  se determinaron como se describe en el ejemplo 2.

15 La **figura 9** muestra la relación de la actividad del cofactor de ristocetina del vWF respecto al antígeno de vWF (vWF:RCoF/vWF:Ag) en el material retenido (biorreactor) y en el material permeado durante el procedimiento del ejemplo 6 como se describe en el ejemplo 2.

### **Breve resumen de la invención**

20 La presente invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que se puede usar un sistema de separación en un biorreactor durante un procedimiento de fermentación para separar determinadas formas multiméricas de vWF de otras formas multiméricas de vWF. Dichas formas multiméricas diferentes de vWF con diferente peso molecular tienen diferentes propiedades y/o diferentes actividades biológicas. Dicha separación que ya tiene lugar durante la etapa de fermentación corriente arriba de la fabricación reduce en gran medida el esfuerzo de purificación en el procesamiento corriente abajo.

25 Por lo tanto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un factor de von Willebrand (vWF) recombinante como se define en la reivindicación 1.

La presente invención se refiere a un procedimiento para fabricar un factor de von Willebrand (vWF) recombinante mediante el cultivo de células huésped en un biorreactor en un medio de cultivo celular, en el que las células huésped producen vWF recombinante que es secretado al medio de cultivo celular y en el que el vWF en el medio de cultivo celular comprende multímeros de vWF de diferente tamaño, en el que al menos un componente del medio de cultivo celular es alimentado al medio de cultivo celular y en el que el cultivo celular que comprende las células, el vWF recombinante y el medio de cultivo celular es bombeado sobre un sistema de separación que tiene un tamaño límite de peso molecular de aproximadamente 750.000 Da, y en el que el sistema de separación separa los multímeros de vWF en al menos

35 una fracción de material permeado que está enriquecida en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y reducida en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW) en comparación con los multímeros de vWF en el sobrenadante de cultivo celular antes de la separación y una fracción de material retenido que está reducida en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y enriquecida en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW) en comparación con los multímeros de vWF en el sobrenadante de cultivo celular antes de la separación.

40 En una realización de la invención, las dos fracciones del vWF tienen actividades biológicas diferentes.

En otra realización de la invención, la fracción deseada del vWF recombinante destinada a ser purificada adicionalmente es el material permeado.

45 En otra realización, el vWF recombinante en el material permeado está enriquecido en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y reducido en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW), en la que los multímeros de vWF de LMW corresponden a las bandas 1 a 5 y los multímeros de vWF de HMW corresponden a bandas 11 y superiores en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330).

50 En otra realización de la invención, la relación de multímeros de vWF de LMW en el material permeado es igual o inferior a 0,9, o en otras palabras, la relación de las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímero de vWF 1 a 5 en el material retenido divididas por las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímero de vWF 1 a 5 en el material permeado está por debajo de 0,9, en la que las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímero de vWF 1 a 5 se refieren al valor numérico que se obtiene cuando la cantidad de bandas 1 a 5 determinada en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) se divide por la cantidad de bandas 1 a 5 de un plasma humano estándar como se

determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330). Se usa preferentemente plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17).

En otra realización de la invención, la fracción deseada del vWF recombinante destinado a ser purificada adicionalmente es el material retenido.

5 En otra realización de la invención, la relación de multímeros de vWF de HMW en el material retenido es igual o superior a 1,1, o en otras palabras, la relación de las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 11 y superiores en el material retenido divididas por las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 11 y superiores en el material permeado es igual o superior a 1,1, en la que las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 11 y superiores se refieren al valor numérico que se obtiene cuando la cantidad de bandas 11 y superior se determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) se divide por la cantidad de bandas 11 y superiores de un plasma humano estándar como se determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330). Se usa preferentemente plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17).

De acuerdo con la invención, el tamaño límite de peso molecular del sistema de separación es de aproximadamente 750.000 Da.

20 En otra realización de la invención, tiene lugar una segunda separación en la que el material retenido obtenido en cualquiera de los procedimientos descritos anteriormente se somete a una segunda separación en la que los multímeros de vWF ultragrandes están enriquecidos en dicho material retenido, proporcionando un segundo material permeado en el que la proporción de los multímeros de vWF ultragrandes en la cantidad total de multímeros de vWF se reduce en comparación con la proporción de multímeros de vWF ultragrandes en la cantidad total de multímeros de vWF en el material retenido antes de dicha segunda separación.

25 En una realización, la segunda separación se realiza en paralelo con la primera separación y, en otra realización, la segunda separación se realiza después de la primera separación.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

30 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que los entendidos comúnmente en la técnica a la que pertenece la invención. Aunque cualquiera de los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento se pueden utilizar en la práctica o en el ensayo de la presente invención, se describen procedimientos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, los siguientes términos se definen a continuación.

35 Los artículos "un" y "una" se usan en el presente documento para referirse a uno o más de uno (es decir, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

40 Por "aproximadamente" se entiende una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía hasta el 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso, longitud u otra unidad de referencia descrita en el presente documento. En toda la presente memoria descriptiva, a menos que el contexto requiera otra cosa, se entenderá que las palabras "comprenden", "comprende", y "que comprende" implican la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos.

45 Por "que consiste en" se entiende que incluye, y limitado a, lo que sigue a la frase "que consiste en". Por lo tanto, la frase "que consiste en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, y que ningún otro elemento puede estar presente. Por "que consiste esencialmente en" se entiende cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieren en la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados ni contribuyen a ella. Por lo tanto, la frase "que consiste esencialmente en" indica que los elementos enumerados son requeridos u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan materialmente o no a la actividad o acción de los elementos enumerados.

50 Por "actividad biológica" se entiende una función medible de vWF que vWF realiza también *in vivo* cuando se administra a un ser humano. Como se usa en el presente documento, los términos "función" y "funcional" y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica de vWF. La actividad biológica de vWF puede ser determinada, por ejemplo, por el experto en la materia usando procedimientos para determinar la actividad del cofactor de ristocetina (vWF:RCoF) (Federici AB y col. 2004. Haematologica 89: 77-85), la unión de vWF a GP Ib del complejo de glucoproteína plaquetaria Ib-V-IX (Sucker y col. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12: 305-310), un ensayo de unión a colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80: 466-471) o un ensayo de unión a FVIII. La unión a FVIII puede determinarse, por ejemplo, mediante análisis Biacore.

Por "**biorreactor**" se entiende cualquier dispositivo o sistema fabricado o diseñado que proporciona y soporta un entorno biológicamente activo para el cultivo celular que permite que las células crezcan y produzcan el producto de interés. Los biorreactores en general miden y regulan los parámetros físicos y químicos que se necesitan para generar este entorno biológico activo. Los biorreactores se pueden operar en diferentes modos como por lotes, semicontinuo o continuo. Los biorreactores que son operados en modo continuo están equipados adicionalmente con una entrada de medios y un dispositivo para separar las células del sobrenadante. Comúnmente, los biorreactores son cilíndricos o cúbicos, que varían en tamaño desde mililitros hasta metros cúbicos, y a menudo están hechos de acero inoxidable o plástico.

La expresión "**célula huésped**" incluye una célula individual o un cultivo celular que puede ser o ha sido un receptor de un vector recombinante introducido, un polinucleótido o un polipéptido aislado. Las células huésped incluyen la progenie de una sola célula huésped, y la progenie puede no ser necesariamente completamente idéntica (en morfología o en el complemento total de ADN) a la célula madre original debido a una mutación y/o cambio natural, accidental o deliberado. Una célula huésped incluye células transfectadas o infectadas *in vivo* o *in vitro* con un vector recombinante o un polinucleótido. Una célula huésped que comprende un vector recombinante es una célula huésped recombinante. Las células huésped específicas se definen a continuación.

Un "**sistema de separación**" de acuerdo con la invención significa un dispositivo que puede usarse para retener células huésped dentro de un biorreactor durante un procedimiento de fermentación en el que al menos parte del sobrenadante del cultivo celular se separa de las células huésped por medio de un sistema de separación que comprende un filtro que tiene un determinado límite de peso molecular. Las células huésped y los multímeros de vWF por encima de un determinado peso molecular son retenidos por dicho filtro con un determinado límite de peso molecular. Las moléculas pequeñas, los nutrientes y los metabolitos, así como los multímeros de vWF por debajo de un determinado límite de peso molecular pueden pasar dicho filtro con un determinado límite de peso molecular. La retención de células dentro del recipiente de cultivo se puede lograr usando varios dispositivos de retención de células. Se pueden usar diferentes principios de separación para este procedimiento. Los procedimientos podrían basarse en sedimentación por gravedad, sedimentación acústica, sedimentación centrífuga o filtración. Los siguientes conjuntos de aparatos se pueden usar para este procedimiento: filtros internos o externos tales como filtros rotatorios internos o externos (por ejemplo, Spinfilter P de Sartorius), filtros de flujo transversal externos, filtros de cartucho de fibra hueca externos o internos (por ejemplo, flujo tangencial alterno (ATF) de Refine). El tamaño de poro del filtro con un determinado límite de peso molecular (MWCO) está, de acuerdo con la divulgación proporcionada a continuación, entre 0,05  $\mu\text{m}$  y 1,0  $\mu\text{m}$ . El MWCO de acuerdo con la divulgación proporcionada en el presente documento es igual o superior a 500.000 Da, o igual o superior a 550.000 Da, o igual o superior a 600.000 Da, o igual o superior a 650.000 Da, o igual o superior a 700.000 Da, o aproximadamente 750.000 Da, o igual o inferior a 1.000.000 Da, o igual o inferior a 950.000 Da o igual o inferior a 900.000 Da, o igual o inferior a 850.000 Da, o igual o inferior a 800.000 Da.

La parte del cultivo celular que ha pasado el dispositivo de separación se llama "**material permeado**", mientras que la parte del cultivo celular que es retenida por el dispositivo de separación se llama "**material retenido**".

Un MWCO de 500.000 usado en un sistema de separación significa que las proteínas por debajo de 500.000 Da pasan la separación y están enriquecidas en el material permeado, mientras que las proteínas por encima de 500.000 Da son retenidas por el filtro y, por lo tanto, están enriquecidas en el material retenido.

Esta separación puede usarse para enriquecer determinadas fracciones de multímeros de vWF con diferentes tamaños moleculares que tienen diferentes actividades biológicas.

"**Sustancialmente**" o "**esencialmente**" significa casi total o completamente, por ejemplo, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de alguna cantidad dada.

La expresión "**factor de von Willebrand**" o "**vWF**", como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier polipéptido que tiene la actividad biológica del vWF de tipo silvestre o al menos una actividad biológica parcial de vWF. El gen que codifica vWF de tipo silvestre se transcribe en un ARNm de 9 kb que se traduce en un prepolipéptido de 2813 aminoácidos con un peso molecular estimado de 310.000 Da. El prepolipéptido consiste en 2813 aminoácidos y contiene un péptido señal de 22 aminoácidos, un propolipéptido de 741 aminoácidos y la subunidad madura. La escisión del polipéptido de 741 aminoácidos del extremo N da como resultado vWF maduro que consiste en 2050 aminoácidos. La secuencia de ADNc de pre-pro-vWF de tipo silvestre se muestra en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de pre-pro-vWF de tipo silvestre se muestra en la SEQ ID NO: 2. El término "vWF", como se usa en el presente documento, se refiere a la forma madura de vWF a menos que se indique lo contrario.

El prepolipéptido de vWF de tipo silvestre comprende múltiples dominios que están dispuestos en el siguiente orden: D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-B1-B2-B3-C 1-C2-CK

Los dominios D1 y D2 representan el propéptido que se escinde para producir el vWF maduro. Los 90 restos carboxi terminales comprenden el dominio "CK" que es homólogo a la superfamilia de proteínas "nudo de cistina". Estos miembros de la familia tienden a dimerizarse a través de enlaces disulfuro.

Preferentemente, el vWF de tipo silvestre comprende la secuencia de aminoácidos del vWF de tipo silvestre como se muestra en la SEQ ID NO: 2. También se incluyen adiciones, inserciones, deleciones N-terminales, C-terminales o internas de vWF siempre que se mantenga al menos una actividad biológica parcial de vWF. El experto en la materia puede determinar la actividad biológica del vWF de tipo silvestre usando procedimientos para la actividad del cofactor de ristocetina (Federici AB y col. 2004. Haematologica 89: 77-85), unión de vWF a GP Iba del complejo de

glucoproteína plaquetaria Ib-V-IX (Sucker y col. 2006. Clin Appl Thromb Hemost. 12: 305-310), un ensayo de unión a colágeno (Kallas & Talpsep. 2001. Annals of Hematology 80: 466-471) o un ensayo de unión de FVIII

5 Determinadas realizaciones pueden incluir la producción recombinante de vWF de tipo silvestre como se describe, en el documento WO 2010/048275, o variantes del mismo, por ejemplo, en las que se han introducido una o más deleciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos para aumentar o disminuir al menos una actividad biológica de la proteína.

Por consiguiente, determinadas realizaciones pueden emplear una cualquiera o más de estas secuencias relacionadas con vWF, incluyendo combinaciones y variantes de las mismas. También se incluyen secuencias relacionadas con vWF de otros organismos, tales como otros mamíferos descritos en el presente documento y conocidos en la técnica.

10 En determinadas realizaciones, el término "vWF" incluye "proteínas de fusión" de vWF, preferentemente "proteínas de fusión" de una proteína de vWF y un socio de fusión "heterólogo". También se incluyen proteínas de fusión o proteínas modificadas que comprenden un sodio de fusión heterólogo o una secuencia heteróloga y al menos un fragmento o porción mínima de una proteína de vWF.

15 Como se usa en el presente documento, una "**proteína de fusión**" incluye una proteína de vWF o fragmento de la misma unida a otra proteína de vWF (por ejemplo, diferente) (por ejemplo, para crear múltiples fragmentos), a una proteína de vWF, o a ambas. Una "proteína no de vWF" se refiere a un "polipéptido heterólogo" que tiene una secuencia de aminoácidos correspondiente a una proteína que es diferente de una proteína de vWF y que puede derivarse del mismo organismo o de un organismo diferente. La proteína de vWF de la proteína de fusión puede corresponder a toda o una parte de una secuencia de aminoácidos de la proteína de vWF biológicamente activa. En determinadas realizaciones, una proteína de fusión de vWF incluye al menos una (o dos, tres, etc.) porciones biológicamente activas de una proteína de vWF.

20 De manera más general, la fusión con secuencias heterólogas, tales como albúmina o inmunoglobulinas o fragmentos derivados de inmunoglobulinas sin un dominio de unión a antígeno, tal como el fragmento Fc, puede utilizarse para eliminar características no deseadas o para mejorar las características deseadas (por ejemplo, propiedades farmacocinéticas) de un vWF. Por ejemplo, la fusión con una secuencia heteróloga puede aumentar la estabilidad química, disminuir la capacidad inmunógena, mejorar el direccionamiento *in vivo* y/o aumentar la semivida en circulación de una proteína de vWF.

25 La "albúmina", como se usa en el presente documento, incluye polipéptidos de la familia de proteínas de la albúmina tales como la albúmina de suero humano y la albúmina de suero bovino, incluyendo las variantes y derivados de las mismas, tales como las variantes y fragmentos de proteínas de la albúmina manipulados genéticamente o modificados químicamente. La porción de albúmina de una proteína de fusión puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo, ser humano, vaca, oveja o cerdo. Las albúminas no de mamífero incluyen, pero no se limitan a, gallina y salmón. La porción de albúmina del polipéptido unido a albúmina puede ser de un animal diferente que la porción de proteína de vWF de la proteína de fusión.

30 La familia de proteínas de la albúmina, incluida dentro del término "albúmina" usado en el presente documento, comprende proteínas de transporte de suero relacionadas evolutivamente, por ejemplo, albúmina, alfa-fetoproteína (AFP; Beattie y Dugaiczky, Gene. 20: 415-422, 1982), afamina (AFM; Lichenstein y col., J. Biol. Chem. 269: 18149-18154, 1994), y proteína de unión a la vitamina D (DBP; Cooke & David, J. Clin. Invest. 76: 2420-2424, 1985). Se ha reivindicado que la alfa-fetoproteína mejora la semivida de un polipéptido terapéutico unido (véase el documento WO 2005/024044). Sus genes representan un grupo multigénico con similitudes estructurales y funcionales que se mapean a la misma región cromosómica en seres humanos, ratones y ratas. Algunas realizaciones de la invención, por lo tanto, pueden usar dichos miembros de la familia de la albúmina, o fragmentos y variantes de los mismos como se definen en el presente documento, como parte de una proteína de fusión. Los miembros de la familia de la albúmina de las proteínas de fusión terapéuticas de la invención también pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de AFP, AFM y DBP.

35 La proteína de vWF, o un fragmento o variante de la misma, puede fusionarse con un polipéptido de albúmina de suero humano, o un fragmento o variante del mismo (véase, por ejemplo, el documento WO 2009/156137). La albúmina de suero humano (HSA o HA), es una proteína de 585 aminoácidos en su forma madura, y es responsable de una proporción significativa de la presión osmótica del suero y también funciona como un portador de ligandos endógenos y exógenos. Entre otros beneficios, la fusión con HSA o un fragmento o variante de la misma puede aumentar la vida útil, la semivida en suero y/o la actividad terapéutica de las proteínas de vWF descritas en el presente documento.

40 Preferentemente, una proteína de fusión comprende albúmina como la porción C-terminal, y una proteína de vWF como la porción N-terminal. En otras realizaciones, la proteína de fusión tiene proteínas de vWF fusionadas tanto en el extremo N como en el extremo C de la albúmina.

45 Se puede emplear una secuencia de enlazador peptídico para separar los componentes de una proteína de fusión. Por ejemplo, los enlazadores peptídicos pueden separar los componentes en una distancia suficiente para garantizar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias. Dicha secuencia de enlazador peptídico

puede incorporarse en la proteína de fusión usando técnicas estándar descritas en el presente documento y bien conocidas en la técnica. Las secuencias de enlazador peptídico adecuadas pueden elegirse basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que podría interactuar con epítomos funcionales en el primer y segundo polipéptido; y (3) la ausencia de restos hidrófobos o cargados que pudieran reaccionar con los epítomos funcionales del polipéptido. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse de forma útil como enlazadores incluyen las desveladas en Maratea y col., Gene 40: 39-46, 1985; Murphy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8258-8262, 1986; patente de Estados Unidos N° 4.935.233 y patente de Estados Unidos N° 4.751.180.

Uno o más de los enlazadores peptídicos o no peptídicos son opcionales. Por ejemplo, las secuencias de enlazador pueden no ser necesarias en una proteína de fusión en la que los polipéptidos primero y segundo tienen regiones de aminoácidos N-terminales y/o C-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y prevenir la interferencia estérica.

Determinadas realizaciones de la presente invención también contemplan el uso de proteínas de vWF modificadas, que incluyen modificaciones que mejoraron las características deseadas de la proteína, como se describe en el presente documento. Las modificaciones de las proteínas de vWF incluyen derivatizaciones químicas y/o enzimáticas en uno o más aminoácidos constituyentes, incluyendo modificaciones de la cadena lateral, modificaciones de la cadena principal y modificaciones de los extremos N y C, que incluyen acetilación, hidroxilación, metilación, amidación y la unión de restos de carbohidratos o lipídicos, cofactores y similares. Las modificaciones ejemplares también incluyen la PEGilación de una proteína de vWF (véase, por ejemplo, Veronese y Harris, Advanced Drug Delivery Reviews 54: 453-456, 2002, incorporado por referencia en el presente documento). Las variantes de vWF que están conjugadas químicamente con polímeros biológicamente aceptables se describen, por ejemplo, en el documento WO 2006/071801.

La invención también se puede usar con "variantes" de proteínas vWF. El término "variante" de proteína incluye proteínas que se distinguen de la SEQ ID NO: 2 por la adición, delección y/o sustitución de al menos un resto de aminoácido, y que normalmente retienen una o más actividades de la proteína de referencia. Está dentro de la habilidad de los expertos en la materia identificar aminoácidos adecuados para la sustitución y diseñar variantes con actividad sustancialmente inalterada, mejorada o disminuida, en relación con una secuencia de referencia.

Una variante de proteína se puede distinguir de una secuencia de referencia por una o más sustituciones, que pueden ser conservativas o no conservativas, como se describe en el presente documento y se conocen en la técnica. En determinadas realizaciones, la variante de proteína comprende sustituciones conservativas y, a este respecto, se entiende bien en la técnica que algunos aminoácidos pueden cambiarse a otros con propiedades ampliamente similares sin cambiar la naturaleza de la actividad de la proteína.

Las expresiones "identidad de secuencia" o, por ejemplo, que comprenden una "secuencia un 50 % idéntica a", como se usan en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas, nucleótido por nucleótido o aminoácido por aminoácido, en una ventana de comparación. Por lo tanto, se puede calcular un "porcentaje de identidad de secuencia" comparando dos secuencias óptimamente alineadas en la ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) aparece en ambas secuencias para obtener el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia.

Las expresiones usadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y, a menudo, de al menos 25 unidades monoméricas, incluidos nucleótidos y restos de aminoácidos. Debido a que dos polipéptidos pueden comprender, cada uno, (1) una secuencia (es decir, solo una porción de la secuencia completa de polipéptidos) que es similar entre los dos polipéptidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polipéptidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polipéptidos se realizan normalmente comparando secuencias de los dos polipéptidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, generalmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más generalmente de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se compara una secuencia con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de que la dos secuencias están alineadas de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o delecciones (es decir, huecos) de aproximadamente un 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o delecciones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones computarizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) O por inspección y la mejor alineación (es decir, la que da como resultado el mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos procedimientos seleccionados.

Como se ha señalado anteriormente, las proteínas variantes biológicamente activas pueden contener sustituciones conservativas de aminoácidos en diversos lugares a lo largo de su secuencia, en comparación con un resto de referencia. Una "sustitución de aminoácidos conservativa" incluye una en la que el resto de aminoácido se sustituye con un resto de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares se han definido en la técnica, que generalmente se pueden subclasificar de la siguiente manera:

Ácidos: el resto tiene una carga negativa debido a la pérdida de iones H a pH fisiológico y el resto es atraído por una solución acuosa para buscar las posiciones de la superficie en la conformación de un péptido en el que está contenido, cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral ácida incluyen ácido glutámico y ácido aspártico.

Básicos: el resto tiene una carga positiva debido a la asociación con el ion H a pH fisiológico o dentro de una o dos unidades de pH del mismo (por ejemplo, histidina) y el resto es atraído por una solución acuosa para buscar las posiciones de la superficie en la conformación de un péptido en el que está contenido, cuando el péptido está en medio acuoso a pH fisiológico. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral básica incluyen arginina, lisina e histidina.

Cargados: los restos se cargan a pH fisiológico y, por lo tanto, incluyen aminoácidos que tienen cadenas laterales ácidas o básicas (es decir, ácido glutámico, ácido aspártico, arginina, lisina e histidina).

Hidrófobos: los restos no están cargados a pH fisiológico y el resto es repelido por una solución acuosa para buscar las posiciones internas en la conformación de un péptido en el que está contenido, cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral hidrófoba incluyen tirosina, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina y triptófano.

Neutras/polares: los restos no están cargados a pH fisiológico, pero el resto no es suficientemente repelido por soluciones acuosas de modo que buscaría posiciones internas en la conformación de un péptido en el que está contenido, cuando el péptido está en medio acuoso. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral neutra/polar incluyen asparagina, glutamina, cisteína, histidina, serina y treonina.

Esta descripción también caracteriza determinados aminoácidos como "pequeños" ya que sus cadenas laterales no son lo suficientemente grandes, incluso si faltan grupos polares, para conferir hidrofobicidad. Con la excepción de la prolina, los aminoácidos "pequeños" son aquellos con cuatro carbonos o menos cuando al menos un grupo polar está en la cadena lateral y tres carbonos o menos cuando no lo está. Los aminoácidos que tienen una cadena lateral pequeña incluyen glicina, serina, alanina y treonina. La prolina de aminoácidos secundarios codificada por genes es un caso especial debido a sus efectos conocidos sobre la conformación secundaria de las cadenas peptídicas. La estructura de la prolina difiere de todos los otros aminoácidos de origen natural en que su cadena lateral está unida al nitrógeno del grupo  $\alpha$ -amino, así como al carbono  $\alpha$ . Para los fines de la presente invención, la prolina se clasifica como un aminoácido "pequeño".

El grado de atracción o repulsión requerido para la clasificación como polar o no polar es arbitrario y, por lo tanto, los aminoácidos específicamente contemplados por la invención se han clasificado como uno u otro. La mayoría de los aminoácidos no nombrados específicamente se pueden clasificar en función del comportamiento conocido.

Los restos de aminoácidos pueden subclasificarse adicionalmente como cíclicos o no cíclicos, aromáticos o no aromáticos, clasificaciones autoexplicativas con respecto a los grupos sustituyentes de cadena lateral de los restos, y como pequeños o grandes. El resto se considera pequeño si contiene un total de cuatro átomos de carbono o menos, incluido el carbono del carboxilo, siempre que esté presente un sustituyente polar adicional; tres o menos si no lo está. Los restos pequeños son, por supuesto, siempre no aromáticos. Dependiendo de sus propiedades estructurales, los restos de aminoácidos pueden estar en dos o más clases. Para los aminoácidos de proteínas de origen natural, la subclasificación de acuerdo con este esquema se presenta en la tabla 1 a continuación.

**Tabla 1: Subclasificación de aminoácidos**

Subclases	Aminoácidos
Ácidos	Ácido aspártico, Ácido glutámico
Básicos cargados pequeños	No cíclicos: Arginina, Lisina; Cíclicos: Histidina
Polares/neutros	Ácido aspártico, Ácido glutámico, Arginina, Lisina, Histidina
Polares/grandes	Glicina, Serina, Alanina, Treonina, Prolina
Hidrófobos	Asparagina, Histidina, Glutamina, Cisteína, Serina, Treonina Asparagina, Glutamina
Aromáticos	Tirosina, Valina,

La sustitución conservativa de aminoácidos también incluye agrupaciones basadas en cadenas laterales. Por ejemplo, un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas es glicina, alanina, valina, leucina e isoleucina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales alifáticas-hidroxilo es serina y treonina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen amida es asparagina y glutamina; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales aromáticas es fenilalanina, tirosina y triptófano; un grupo de aminoácidos que tienen cadenas



laterales básicas es lisina, arginina e histidina; y un grupo de aminoácidos que tienen cadenas laterales que contienen azufre es cisteína y metionina. Por ejemplo, es razonable esperar que la sustitución de una leucina con una isoleucina o valina, un aspartato con un glutamato, una treonina con una serina o una sustitución similar de un aminoácido con un aminoácido estructuralmente relacionado no tendrá un efecto importante sobre las propiedades del polipéptido variante resultante. Se puede determinar fácilmente si un cambio de aminoácido da como resultado una proteína biológicamente activa mediante el ensayo de su actividad cromógena y/o de coagulación, como se describe en el presente documento.

Las expresiones "**multímeros de vWF de bajo peso molecular**" o "**multímeros de vWF de LMW**" o "**vWF de LMW**" se usan como sinónimos y se pretende que correspondan a las bandas 1 a 5 en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330).

Las expresiones "**multímeros de vWF de alto peso molecular**" o "**multímeros de vWF HMW**" o "**vWF de HMW**" se usan como sinónimos y se pretende que correspondan a las bandas 11 y superiores en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330), en el que "superiores" significa la banda 11 y todos los multímeros de vWF más grandes.

**"Multímeros de vWF de peso molecular ultragrande"** o "**multímeros de vWF de ULMW**" se usan como sinónimos y se pretende que correspondan a las bandas 20 y superiores en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330), en el que "superiores" significa banda 20 y todos los multímeros de vWF más grandes.

La expresión "**relación de multímeros de HMW**" se refiere a la relación de las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 11 y superiores en el material retenido dividido por las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 11 y superiores en el material permeado.

La expresión "**intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar**" de las bandas de multímeros de vWF 11 y superiores se refiere al valor numérico que se obtiene cuando la cantidad de bandas 11 y superiores como se determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) se divide por la cantidad de bandas 11 y superiores de un plasma humano estándar como se determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330). Se usa preferentemente plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17).

La expresión "**Relación de multímeros de LMW**" se refiere a la relación de las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 1 a 5 en el material retenido dividida por las "intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar" de las bandas de multímeros de vWF 1 a 5 en el material permeado.

La expresión "**intensidades de píxeles acumuladas relacionadas con el plasma humano estándar**" de las bandas de multímeros de vWF 1 a 5 se refiere al valor numérico que se obtiene cuando la cantidad de bandas 1 a 5 como se determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) se divide por la cantidad de bandas 1 a 5 de un plasma humano estándar como se determina en un análisis densitométrico de vWF de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330). Se usa preferentemente plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17).

Una relación de multímeros de vWF de LMW en el material permeado "**por debajo de**" la relación de multímeros de vWF de LMW del medio de cultivo celular antes de la separación es normalmente una relación disminuida "estadísticamente significativa", y puede incluir una disminución que es 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,3, 4,4, 4,6, 4,8, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces (incluyendo todos los números enteros y decimales e intervalos entre y por encima de 1, por ejemplo, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, etc.) por debajo de la relación de multímeros de vWF de LMW del medio de cultivo celular antes de la separación.

Una relación de multímeros de vWF de HMW en el material retenido "**por encima de**" la relación de multímeros de vWF de HMW del medio de cultivo celular antes de la separación es normalmente una relación aumentada "estadísticamente significativa", y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,2, 3,4, 3,6, 3,8, 4,0, 4,2, 4,3, 4,4, 4,6, 4,8, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más veces (incluyendo todos los números enteros y decimales e intervalos entre y por encima de 1, por ejemplo, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, etc.) por encima de la relación de multímeros de vWF de HMW del medio de cultivo celular antes de la separación.

#### **Expresión y purificación de proteínas de la invención**

Las realizaciones de la presente invención incluyen procedimientos y composiciones relacionadas para expresar, recoger y opcionalmente purificar las fracciones de vWF descritas en el presente documento.

Por ejemplo, determinadas realizaciones incluyen procedimientos para producir un vWF o una variante del mismo, que comprenden cultivar una célula en un medio de cultivo celular, opcionalmente una célula de mamífero, en el que la célula comprende al menos un polinucleótido introducido que codifica el vWF, en el que dicho polinucleótido está unido

operativamente a al menos un elemento regulador y expresa la proteína y recoger la proteína a partir de la célula o medio de cultivo celular.

5 El vWF recombinante o variantes del mismo pueden prepararse convenientemente usando protocolos estándar. Como un ejemplo general, el vWF recombinante puede prepararse mediante un procedimiento que incluye uno o más de las etapas de: (a) preparar una construcción que comprende una secuencia de polinucleótidos que codifica una proteína y que está unida operativamente a al menos un elemento regulador; (b) introducir la construcción en una célula huésped; (c) cultivar la célula huésped para expresar el polipéptido y (d) recoger o aislar el polipéptido a partir de la célula huésped.

10 Para expresar un vWF, se puede insertar una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido, o un equivalente funcional, en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante insertada. Los procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia pueden usarse para construir vectores de expresión que contienen secuencias que codifican vWF y elementos de control transcripcional y traduccional apropiados. Estos procedimientos incluyen técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo* y son conocidos en la técnica.

15 Los "elementos reguladores" o "secuencias reguladoras" presentes en un vector de expresión incluyen aquellas regiones no traducidas del vector, por ejemplo, potenciadores, promotores, regiones 5' y 3' no traducidas, uno o varios sitios de unión al ribosoma, sitios de corte y empalme de ARN (si está presente ADN genómico que contiene intrones), uno o varios sitios de poliadenilación, una o varias secuencias de terminación de la transcripción, que interactúan con las proteínas celulares del huésped para llevar a cabo la transcripción y la traducción. Dichos elementos pueden variar en su fuerza y especificidad.

Dependiendo del sistema de vectores y del huésped utilizado, se puede usar cualquier número de elementos de transcripción y traducción adecuados, incluyendo los promotores constitutivos e inducibles. Por ejemplo, en sistemas de células de mamíferos, generalmente se prefieren los promotores de genes de mamíferos o de virus de mamíferos.

25 También se pueden usar señales de iniciación específicas para conseguir una traducción más eficaz de secuencias que codifican un polipéptido de interés. Dichas señales incluyen el codón de iniciación ATG y secuencias adyacentes.

30 En los casos en que las secuencias que codifican el vWF, su codón de iniciación y las secuencias corriente arriba se insertan en el vector de expresión apropiado, pueden no ser necesarias señales de control transcripcional o traduccional adicionales. Sin embargo, en los casos en que solo se inserta la secuencia codificante, o una porción de la misma, se deben proporcionar señales de control traduccional exógenas que incluyen el codón de iniciación ATG. Además, el codón de iniciación deberá estar en el correcto marco de lectura para garantizar la traducción de todo el inserto. Los elementos exógenos traduccionales y los codones de iniciación pueden tener diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión se puede potenciar mediante la inclusión de potenciadores que son adecuados para el sistema celular concreto que se use, tales como los descritos en las referencias.

35 En células huésped de mamíferos, generalmente hay disponibles numerosos sistemas de expresión basados en virus. Por ejemplo, en los casos en los que como vector de expresión se usa un adenovirus, las secuencias que codifican un polipéptido de interés se pueden ligar en un complejo de transcripción/traducción del adenovirus que consista en el promotor tardío y la secuencia líder tripartita. La inserción en una región E1 o E3 no esencial del genoma viral puede usarse para obtener un virus viable que sea capaz de expresar el polipéptido en células huésped infectadas. Además, los potenciadores de la transcripción, tales como el potenciador del virus del sarcoma de Rous (VSR) o el promotor/potenciador del CMV, pueden usarse para aumentar la expresión en células huésped de mamíferos.

40 Las células huésped adecuadas son células eucariotas superiores tales como células de mamífero. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (por ejemplo, células HEK293, células 293 subclonadas para crecimiento en cultivo en suspensión; células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10)); células de sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (células VERO, VERO-76, ATCC CRL-1587); células COS, células de carcinoma de cuello uterino humano (células Hela, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (HepG2, HB8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1; células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2).

45 Otras líneas de células huésped de mamíferos útiles incluyen ovario de hámster chino (células CHO, incluyendo células DHFR-CHO); y líneas celulares de mieloma tales como NSO y Sp2/0.

50 Otras líneas celulares adecuadas incluyen, sin limitación, Hep I de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1600), Hep II de rata (hepatoma de rata; ATCC CRL 1548), TCMK (ATCC CCL 139), de pulmón humano (ATCC HB 8065), NCTC 1469 (ATCC CCL 9.1); células DUKX (línea celular CHO) y DG44 (línea celular CHO). También son útiles las células 3T3, células de Namalwa, mielomas y fusiones de mielomas con otras células.

55 Determinados sistemas de expresión de células de mamífero preferidos incluyen sistemas de expresión basados en células CHO y HEK293. Ejemplos particulares de células CHO incluyen células CHO-K1 y CHO-S. También se incluyen células huésped que se pueden cultivar en medio sin suero, tales como determinadas células HEK293 y

células CHO.

En algunas realizaciones, las células huésped son capaces de crecer en cultivos en suspensión. Como se usa en el presente documento, las células competentes en suspensión son aquellas que pueden crecer en suspensión sin formar agregados grandes y firmes, es decir, células que son monodispersas o crecen en agregados sueltos con solo un par de células por agregado. Las células competentes en suspensión incluyen, sin limitación, células que crecen en suspensión sin adaptación o manipulación (por ejemplo, células hematopoyéticas, células linfoides) y células que se han hecho competentes en suspensión mediante la adaptación gradual de células dependientes de la unión (por ejemplo, células epiteliales, fibroblastos) para crecimiento en suspensión.

En algunas realizaciones, las células huésped pueden incluir células mutantes o recombinantes, incluyendo células que expresan un espectro de proteínas cualitativa o cuantitativamente diferente que catalizan la modificación postraduccional de proteínas (por ejemplo, enzimas de glucosilación tales como glucosil transferasas y/o glucosidasas, enzimas de procesamiento tales como propéptidos, incluyendo las enzimas que promueven la formación de vWF funcional), en relación con el tipo de célula de la que derivaron.

Como ejemplo, la célula huésped comprende un polinucleótido introducido que codifica al menos una proteína de "factor de procesamiento", en el que dicho polinucleótido está unido operativamente a al menos un elemento regulador y expresa la proteína del factor de procesamiento. La expresión "factor de procesamiento" incluye cualquier proteína, péptido, cofactor no peptídico, sustrato o ácido nucleico que promueve la formación de una proteína funcional. Los ejemplos de factores de procesamiento incluyen, pero sin limitarse a, la enzima convertidora de aminoácidos básicos emparejados (PACE), la epóxido reductasa dependiente de vitamina K (VKOR), la gamma-glutamil carboxilasa dependiente de vitamina K (VKGC), o una combinación de las mismas. Realizaciones particulares utilizan la o las secuencias humanas para PACE, VKOR y/o VKGC.

PACE, originalmente aislada de una línea celular de hígado humano, es una endopeptidasa similar a la subtilisina, es decir, una enzima propeptídica que exhibe especificidad para la escisión en los residuos básicos de una proteína (por ejemplo, -Lys-Arg-, -Arg-Arg-, o -Lys-Lys-). La coexpresión de PACE y una proproteína que requiere procesamiento para la producción de la proteína madura da como resultado una expresión de alto nivel de la proteína madura.

Para la producción a largo plazo de alto rendimiento de vWF, generalmente se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, las líneas celulares que expresan de forma estable vWF se pueden transformar usando vectores de expresión que pueden contener varios orígenes de replicación virales y/p elementos de expresión endógena y un gen de un marcador seleccionable en el mismo vector o en otro diferente. Tras la introducción del vector, se puede permitir que las células crezcan durante aproximadamente 1-2 días en medios no selectivos antes de cambiar a medios selectivos. El fin del marcador seleccionable es conferir resistencia a la selección y su presencia permite el crecimiento y recuperación de células que expresan satisfactoriamente las secuencias introducidas.

La proliferación de clones de células transformadas de forma estable se puede realizar usando técnicas de cultivo tisular adecuadas al tipo de célula. Se puede usar cualquier número de marcadores o sistemas seleccionables para recuperar o identificar líneas celulares transformadas o transducidas, ya sean transitorias o estables. Estos incluyen, pero no se limitan a, los genes de la timidina cinasa del virus del herpes simple y los genes de adenina fosforibosiltransferasa que pueden emplearse en células tk- o aprt-, respectivamente. Además, se pueden usar la resistencia antimetabolitos, a antibióticos o a herbicidas como base de la selección; por ejemplo, la dihidrofolato reductasa (DHFR) confiere resistencia al metotrexato; npt confiere resistencia a los aminoglucósidos, neomicina y G-418; y als o pat confieren resistencia al clorsulfurón y a la fosfotricina acetiltransferasa, respectivamente. Se han descrito genes seleccionables adicionales, por ejemplo, trpB, que permite a las células utilizar indol en lugar de triptófano, o hisD, que permite a las células utilizar histinol en lugar de histidina.

Las células huésped transformadas con una secuencia de polinucleótidos que codifica vWF pueden cultivarse en condiciones adecuadas para la expresión y recuperación de vWF del cultivo celular. Se puede usar cualquier medio de cultivo celular definido químicamente. Los ejemplos particulares incluyen medios de cultivo sin suero, medios libres de proteínas, medios de cultivo químicamente definidos y medios de cultivo que carecen de componentes derivados de animales.

Los medios de cultivo celular ejemplares incluyen, sin limitación, medio Eagle basal (BME); medio CMRL-1066; medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM); medio Glasgow mínimo esencial, GMEM; medio H-Y (Hybri-Max®); medio 199; medio Eagle mínimo esencial (EMEM); medio NCTC; medio S-77 de Swim; y medio E de Williams. Medio de Click; medio 131 de MCDB y medio de Dulbecco modificado por Iscove (IMDM). También se incluye DMEM/mezcla nutriente de Ham F-12 (50:50), que se usa con frecuencia como un medio base para el desarrollo de medios patentados y especializados para cultivar células CHO para la biofabricación, y medio 302 de MCDB, que se desarrolló para células CHO.

En realizaciones particulares, el medio es una formulación basada en DMEM/F12 de HAM sin suero suplementada con uno o más de los siguientes: (a) glutamina; por ejemplo, concentración final de aproximadamente 0,9 g/l, (b) sulfato férrico x7H<sub>2</sub>O, por ejemplo, a aproximadamente 0,0006 g/l, (c) putrescina, x 2HCl, por ejemplo, a aproximadamente 0,0036 g/l, (d) vitamina K1, por ejemplo, a aproximadamente 0,0025 g/l, (e) Synperonic; por ejemplo, a una

concentración final de aproximadamente 1 g/l, (f) rojo fenol, por ejemplo, a aproximadamente 0,008 g/l, (g) etanolamina, por ejemplo, a aproximadamente 0,00153 g/l, y/o (h) Na-hidrogenocarbonato, por ejemplo, a aproximadamente 2 g/l.

5 En realizaciones específicas, el medio de cultivo celular es un medio CD-CHO o un medio CD-CHO AGT™ o un medio CD OptiCHO™ AGT™, que están disponibles en el mercado (INVITROGEN®) o medios Pro-CHO™ o Power-CHO™ (LONZA®). Los medios CH-CHO, CD-CHO AGT™ y CD OptiCHO™ AGT™ pueden usarse como un medio químicamente definido, un medio libre de proteínas y/o un medio libre de suero, y pueden suplementarse con L-glutamina, si se desea. Los niveles de Ca<sup>2+</sup> del medio IX CD-CHO AGT™ sin suplementos de calcio pueden variar de aproximadamente 0,25-0,35 mM (como se determina por espectroscopía de absorción atómica).

10 Como se ha señalado anteriormente, determinadas realizaciones utilizan un medio de cultivo celular libre de suero. Un ejemplo incluye un medio libre de suero definido que es capaz de producir una amplia gama de células en suspensión y monocapa, y que incluye un sustituto del suero compuesto por fetuina, transferrina, fosfatidilcolina (por ejemplo, 1-oleoil-2-palmitoilfosfatidilcolina), ácido linoleico y colesterol. Otro ejemplo incluye un medio de cultivo celular que contiene un esteroil tal como colesterol, que es estabilizado por un tensioactivo en lugar de productos de suero o micelas de fosfolípidos, y que opcionalmente contiene ácidos carboxílicos solubles como precursores de ácidos grasos para satisfacer los requisitos de lípidos y/o alcoholes que son capaces de promover la célula.

15 Determinadas realizaciones emplean un medio de cultivo celular que carece de componentes "derivados de animales". Como se usa en el presente documento, los componentes "derivados de animales" pueden incluir cualquier componente que se produzca en un animal intacto (por ejemplo, proteínas aisladas y purificadas a partir del suero) o componentes producidos usando componentes producidos en un animal intacto (por ejemplo, un aminoácido elaborado usando una enzima aislada y purificada de un animal para hidrolizar un material de origen vegetal). Por el contrario, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, la proteína tiene un origen genómico en un animal) pero que se produce *in vitro* en cultivo celular (por ejemplo, en una levadura o célula bacteriana recombinante, o en una línea celular de mamífero, recombinante o no), en medios que carecen de componentes que se producen en, y aislados y purificados a partir de un animal intacto no es un componente "derivado de animales". Por ejemplo, una proteína que tiene la secuencia de una proteína animal (es decir, tiene un origen genómico en un animal) pero que se produce en una célula recombinante en medios que carecen de componentes derivados de animales no es un componente "derivado de animales". Por consiguiente, un medio de cultivo celular que carece de componentes derivados de animales es uno que puede contener proteínas animales que se producen de forma recombinante; dicho medio, sin embargo, no contiene, por ejemplo, suero animal o proteínas u otros productos purificados a partir de suero animal. Dicho medio puede, por ejemplo, contener uno o más componentes derivados de plantas.

20 Se puede usar cualquier medio de cultivo celular que soporte el crecimiento y mantenimiento celular en las condiciones de la invención. Normalmente, el medio contiene agua, un regulador de osmolalidad, un tampón, una fuente de energía, aminoácidos, una fuente de hierro inorgánica o recombinante, uno o más factores de crecimiento sintéticos o recombinantes, vitaminas y cofactores. Los medios que carecen de componentes y/o proteínas derivados de animales están disponibles de proveedores comerciales, tales como, por ejemplo, SIGMA®, SAFC, INVITROGEN®, GIBCO® o LONZA®.

25 Por ejemplo, determinadas realizaciones emplean técnicas de cultivo celular en suspensión. Los ejemplos de técnicas de cultivo celular en suspensión incluyen procedimientos de perfusión, procedimientos por lotes (por ejemplo, procedimientos por lotes simples, procedimientos por lotes alimentados) y procedimientos semicontinuos (draw-fill).

30 En un procedimiento de suspensión de perfusión celular, las células se inoculan normalmente en un recipiente de cultivo de semillas que contiene un medio de cultivo celular, que preferentemente carece de componentes derivados de animales y se propaga hasta que las células alcanzan una densidad mínima.

35 Posteriormente, el cultivo de semillas propagado se transfiere a un recipiente de cultivo a gran escala, que contiene del mismo modo un medio de cultivo que preferentemente carece de componentes derivados de animales. Las células se propagan hasta que se alcanza al menos una densidad celular predeterminada. En esta fase, las células crecen en suspensión para permitir que el número de células dentro del recipiente de cultivo aumente a un valor predeterminado o crítico.

40 El intercambio de medios se puede realizar perfundiendo continuamente el recipiente de cultivo con medio nuevo mientras las células recombinantes son retenidas en el recipiente de cultivo. La cantidad de medio perfundido puede depender de la densidad celular y es normalmente de aproximadamente el 10-300 %, preferentemente de aproximadamente el 10 % al 95 %, del 25 % al 80 %, del volumen del tanque por día (24 horas).

45 En la fase de crecimiento, el cultivo se propaga hasta que las células alcanzan una determinada densidad. Al alcanzar esta densidad, el cultivo entra en la fase de producción.

50 Cuando la densidad celular alcanza el valor adecuado para el inicio de la fase de producción, aproximadamente el 60-95 % del medio del tanque en el tanque se cambia cada 24 horas, preferentemente aproximadamente el 80 %. Un intercambio del 80 % del medio también se usa preferentemente en la fase de producción. Los valores establecidos

también pueden cambiarse en este momento y establecerse en valores adecuados para la producción de la proteína respectiva. La perfusión del medio se realiza preferentemente de forma continua. El caudal del medio se puede expresar en términos de porcentaje de volumen del tanque del medio por periodo de tiempo definido.

5 La perfusión del medio puede ser de aproximadamente el 10-200 % del volumen del tanque durante 10-48 horas; preferentemente, la perfusión del medio es aproximadamente el 90 % durante 10-48 horas, más preferentemente la perfusión del medio es aproximadamente el 80 % del volumen del tanque cada 24 horas.

10 La retención de células dentro del recipiente de cultivo se puede lograr usando varios dispositivos de retención de células. Se pueden usar diferentes principios de separación para este procedimiento. Los procedimientos podrían basarse en sedimentación por gravedad, sedimentación acústica, sedimentación centrífuga o filtración. Los siguientes conjuntos de aparatos se pueden usar para este procedimiento: filtros internos o externos tales como filtros rotatorios internos o externos (por ejemplo, Spinfilter P de Sartorius), filtros de flujo transversal externos, filtros de cartucho de fibra hueca externos o internos (por ejemplo, flujo tangencial alterno (ATF) de Refine).

15 Los multímeros de vWF pueden variar desde un dímero simple hasta multímeros que consisten en más de 16 monómeros de vWF unidos covalentemente. Las diferentes formas de proteínas tienen diferentes actividades biológicas. Por ejemplo, los multímeros de bajo peso molecular de vWF tienen una actividad menor de cofactor de ristocetina (vWF:RCoF), mientras que las formas de alto peso molecular de vWF tienen una mayor actividad de vWF:RCoF. Una actividad alta de vWF:RCoF de una preparación de vWF se correlaciona con una alta actividad en la hemostasia primaria, ya que las preparaciones de vWF con alto vWF:RCoF contribuyen de manera más eficiente a la aglutinación de las plaquetas y al anclaje de las plaquetas al colágeno expuesto por una lesión. La relación de vWF:RCoF respecto al contenido de antígeno (vWF:Ag) en plasma humano es, por definición, 1,0.

20 Por lo tanto, es deseable fabricar preparaciones farmacéuticas de vWF con una relación de vWF:RCoF respecto a vWF:Ag de al menos 0,5, o al menos 0,55, o al menos 0,6, o al menos 0,65 o al menos 0,7, o al menos 0,75, o al menos 0,8, o al menos 0,85, o al menos 0,9, o al menos 0,95 o al menos 1,0.

25 En determinadas situaciones terapéuticas, también es preferible fabricar preparaciones de vWF que tengan una relación vWF:RCoF/vWF:Ag aumentada superior a la presente en el plasma humano, por ejemplo de al menos 1,05, o al menos 1,1, o al menos 1,15, o al menos 1,2 o al menos 1,25, o al menos 1,3, o al menos 1,35, o al menos 1,40, o al menos 1,45 o al menos 1,50, o al menos 1,55 o al menos 1,60, o al menos 1,65 o al menos 1,70 o al menos 1,75, o al menos 1,80, o al menos 1,85 o al menos 1,90 o al menos 1,95 o al menos 2,0.

30 Para fabricar preparaciones farmacéuticas de vWF con relaciones de vWF:RCoF/vWF:Ag aumentadas, normalmente es necesario idear procedimientos de purificación corriente abajo que aumenten la cantidad de multímeros de vWF de mayor peso molecular. Esto a menudo es engorroso y puede dar como resultado una disminución del rendimiento del producto vWF ya que cada etapa de purificación corriente abajo generalmente se asocia con alguna pérdida de producto.

35 Los inventores de la presente invención han descubierto ahora sorprendentemente que el enriquecimiento de multímeros de vWF de mayor peso molecular ya se puede lograr en la etapa corriente arriba de la fabricación durante el cultivo celular mediante el uso de un dispositivo de separación que retiene las formas multiméricas deseadas de alto peso molecular de vWF en el biorreactor (material retenido) mientras que las formas menos deseadas de vWF de bajo peso molecular pasan el dispositivo de separación (material permeado). Sin embargo, como las formas de vWF de bajo peso molecular todavía son capaces de unirse a y estabilizar el Factor VIII, la fracción en el material permeado también puede ser un producto para determinados usos específicos, como para la estabilización del Factor VIII. En el último caso, la fracción de bajo peso molecular de los multímeros de vWF puede ser la forma de vWF deseada.

40 La recolección de la fracción que está enriquecida en multímeros de vWF de HMW se puede hacer i) al final del procedimiento de fermentación o ii) de forma concomitante usando un dispositivo de separación adicional. Este dispositivo de separación adicional en el caso ii) podría ser cualquier dispositivo de separación que separe las células del material retenido y que no separe más los multímeros de vWF de LMW de los multímeros de vWF de HMW. Como resultado de dicho procedimiento de fermentación en el caso ii) se obtiene una preparación de vWF que se enriquece en multímeros de vWF de HMW y el tiempo de residencia en el biorreactor se reduce en comparación con un procedimiento de fermentación como en el caso i). Acortar la residencia es beneficioso en general para minimizar los acontecimientos de degradación.

50 Sin embargo, si la relación de vWF:RCoF/vWF:Ag es mayor que 2,0, existe un riesgo creciente de complicaciones tromboembólicas cuando dichas preparaciones se administran a pacientes, ya que dichos multímeros de vWF de peso molecular ultragrande pueden conducir a la aglutinación de las plaquetas en situaciones no fisiológicas.

55 Si dichos multímeros de peso molecular ultra grande están presentes en el medio de cultivo celular, puede ser beneficioso aplicar dispositivos de separación con un límite de peso molecular (MWCO) de 10.000.000 Da que retiene los multímeros ultra grandes de vWF en el biorreactor (material retenido) mientras que las formas deseadas de vWF de alto peso molecular se separan en el filtrado.

Los inventores han descubierto un procedimiento para fabricar un factor de von Willebrand (vWF) recombinante

5 mediante el cultivo de células huésped en un biorreactor en un medio de cultivo celular, en el que las células huésped producen vWF recombinante que es secretado al medio de cultivo celular y en el que el vWF en el medio de cultivo celular comprende multímeros de vWF de diferente tamaño, en el que al menos un componente del medio de cultivo celular es alimentado al medio de cultivo celular y en el que el cultivo celular que comprende las células, el vWF recombinante y el medio de cultivo celular es bombeado sobre un sistema de separación y en el que el sistema de separación separa los multímeros de vWF en al menos una fracción de material permeado que está enriquecida en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y reducida en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW) en comparación con los multímeros de vWF en el sobrenadante del cultivo celular antes de la separación y una fracción de material retenido que está reducida en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y enriquecida en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW) en comparación con el multímeros de vWF en el sobrenadante de cultivo celular antes de la separación

La relación de multímeros de vWF de HMW preferentemente es igual o está por encima de 1,1, o por encima de 1,2, o por encima de 1,25, o por encima de 1,30, o por encima de 1,35, o por encima de 1,40 o por encima de 1,45 o por encima de 1,50 o por encima de 1,60, o por encima de 1,70, o por encima de 1,80, o por encima de 1,90.

15 En una realización preferida, la invención abarca también un biorreactor que comprende un medio de cultivo celular que comprende multímeros de vWF en un material retenido y un medio de cultivo celular que comprende multímeros de vWF en un material permeado en el que

la relación de multímeros de vWF de HMW es igual o está por encima de 1,1, o por encima de 1,2, o por encima de 1,25, o por encima de 1,30, o por encima de 1,35, o por encima de 1,40 o por encima de 1,45 o por encima de 1,50 o por encima de 1,60, o por encima de 1,70, o por encima de 1,80, o por encima de 1,90.

La relación de multímeros de vWF de LMW preferentemente es igual o está por debajo de 0,90, o por debajo de 0,85, o por debajo de 0,80, o por debajo de 0,75, o por debajo de 0,70 o por debajo de 0,65 o por debajo de 0,60, o por debajo de 0,55, o por debajo de 0,50.

25 Una realización preferida de la invención abarca también un biorreactor que comprende un medio de cultivo celular que comprende multímeros de vWF y un medio de cultivo celular que comprende multímeros de vWF en un material permeado en el que la relación de multímeros de vWF de LMF está por debajo de 0,90, o por debajo de 0,85, o por debajo de 0,80, o por debajo de 0,75, o por debajo de 0,70 o por debajo de 0,65 o por debajo de 0,60, o por debajo de 0,55, o por debajo de 0,50.

30 Al elegir los MWCO del dispositivo de separación, el experto en la materia está capacitado por la presente invención para elegir el tamaño molecular del producto de vWF que posteriormente se purifica de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica.

35 Dicha separación de los multímeros vWF de diferente peso molecular ya en la fase de fermentación, es decir, durante el procesamiento corriente arriba, facilita enormemente la separación en una posterior postfermentación o purificación corriente abajo, ya que las fracciones deseadas del multímero de vWF ya están enriquecidas en los multímeros de vWF deseados. Por lo tanto, se requieren potencialmente menos etapas de purificación en el procesamiento corriente abajo, lo que da como resultado un tiempo de procesamiento más rápido y mayores rendimientos. La invención generalmente también conduce a una mayor pureza de la preparación de vWF resultante, ya que parte de la purificación comienza ya en el biorreactor y el procesamiento corriente abajo posterior comienza con un vWF ya enriquecido para la fracción de peso molecular deseada.

40 Determinadas realizaciones pueden incluir procedimientos de cultivo que monitorizan y controlan determinados parámetros, tales como pH, tensión de oxígeno disuelto (DOT) y temperatura. Como ejemplo, el pH puede controlarse regulando la concentración de CO<sub>2</sub> en el gas de espacio superior y/o el rociador, y mediante la adición de base al medio de cultivo cuando sea necesario. Por lo tanto, determinadas realizaciones incluyen la producción a gran escala de un polipéptido recombinante en un medio de cultivo celular, en el que se monitoriza la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto en el cultivo y se emplea un rociado de aire constante o intermitente a través del medio de cultivo para mantener determinados intervalos de concentración de CO<sub>2</sub>. En algunos aspectos, el intervalo predeterminado para la concentración de CO<sub>2</sub> disuelto es de aproximadamente 80-200 mmHg, preferentemente de aproximadamente 100-180 mmHg, por ejemplo, aproximadamente 140 mmHg. En la mayoría de los casos, la velocidad de rociado del aire se controla en relación con la concentración monitorizada de CO<sub>2</sub> disuelto en el medio de cultivo. Por ejemplo, la velocidad de rociado de aire puede estar en el intervalo de aproximadamente 0,000-0,100 l/min por l de líquido de cultivo, preferentemente de aproximadamente 0,005-0,020 l/min por l de líquido de cultivo, particularmente en el que la concentración monitorizada de CO<sub>2</sub> disuelto es igual a la concentración del valor establecido (predeterminado). En algunos casos, la velocidad de rociado del aire está en el intervalo de 0,000-0,005, tal como aproximadamente 0,0 l/min por l de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO<sub>2</sub> disuelto es igual a la concentración del valor establecido -5 mmHg; y en el intervalo de 0,010-0,100 l/min por l de líquido de cultivo cuando la concentración monitorizada de CO<sub>2</sub> disuelto es igual a la concentración del valor establecido +5 mmHg (véase la solicitud de los Estados Unidos N°. 2006/0216790). Dichos procedimientos se pueden usar para mantener un pH deseado en el medio de cultivo celular, por ejemplo, en el que cualquier sustancia sólida o líquida añadida al medio de cultivo no da lugar a un valor de pH localizado superior a aproximadamente 7,5.

La tensión de oxígeno disuelto puede mantenerse, por ejemplo, rociando con aire u oxígeno puro o mezclas de los mismos. El medio de control de temperatura es normalmente agua u otro líquido, calentado o enfriado según sea necesario. En determinados aspectos, el agua puede pasar a través de una camisa que rodea el recipiente o a través de un serpentín sumergido en el cultivo.

5 El vWF producido por una célula recombinante se puede purificar y caracterizar de acuerdo con una variedad de técnicas conocidas en la técnica. Los sistemas ejemplares para realizar la purificación de proteínas y analizar la pureza de las proteínas incluyen la cromatografía líquida rápida de proteínas (FPLC) (por ejemplo, los sistemas ÄKTA y Bio-Rad FPLC), la cromatografía de interacción hidrófoba y la cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Los procesos químicos ejemplares para la purificación incluyen cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, Q, S), cromatografía de exclusión por tamaño, gradientes de sal, purificación por afinidad (por ejemplo, Ni, Co, FLAG, maltosa, glutatión, proteína A/G), filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico en cerámica HyperD®, de fase inversa y columnas de interacción hidrófoba (HIC), entre otras conocidas en la técnica. También se incluyen procedimientos analíticos tales como SDS-PAGE (por ejemplo, Coomassie, tinción de plata), enfoque isoelectrico preparativo (IEF), inmunotransferencia, Bradford, solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio) y ELISA, que pueden utilizarse durante cualquier etapa del procedimiento de producción o purificación, normalmente para medir la pureza de la composición proteica.

En determinados aspectos, el vWF recombinante puede someterse a múltiples etapas de purificación cromatográfica, incluyendo cualquier combinación de cromatografía por afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía con colorantes, cromatografía con hidroxapatito, cromatografía de exclusión por tamaño y preferentemente cromatografía por inmutofinidad, principalmente para concentrar la proteína deseada y para eliminar sustancias que pueden causar fragmentación, activación y/o degradación de la proteína recombinante durante la fabricación, almacenamiento y/o uso. Los ejemplos ilustrativos de dichas sustancias que se eliminan preferentemente por purificación incluyen otros contaminantes proteicos, tales como enzimas de modificación como PACE/furina, VKOR y VKGC; proteínas, tales como proteínas de la célula huésped, que se liberan en los medios de cultivo de tejidos desde las células de producción durante la producción de proteínas recombinantes; contaminantes no proteicos, tales como lípidos; y mezclas de contaminantes proteicos y no proteicos, tales como lipoproteínas. Los procedimientos de purificación para proteínas de vWF son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2011/022657).

Para minimizar el riesgo teórico de contaminaciones por virus, se pueden incluir etapas adicionales en el procedimiento que permitan la inactivación o eliminación efectiva de virus. Dichas etapas incluyen, por ejemplo, tratamiento térmico en estado líquido o sólido, tratamiento con disolventes y/o detergentes, radiación en el espectro visible o UV, radiación gamma y nanofiltración.

### Composiciones farmacéuticas

La divulgación de la presente invención incluye proteínas y, preferentemente, proteínas de vWF que se producen de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, y se formulan en soluciones farmacéuticamente aceptables o fisiológicamente aceptables para administración a una célula o un animal, ya solas o en combinación con una o más otras modalidades de terapia. También se entenderá que, si se desea, las composiciones de la divulgación también se pueden administrar en combinación con otros agentes, tales como, por ejemplo, otras proteínas o polipéptidos o diversos agentes farmacéuticamente activos. Prácticamente no hay límite para otros componentes que también pueden incluirse en las composiciones, siempre que los agentes adicionales no afecten negativamente a los efectos moduladores u otros que se desean lograr.

En las composiciones farmacéuticas de la divulgación, La formulación de excipientes farmacéuticamente aceptables y soluciones portadoras es bien conocida por los expertos en la materia, al igual que el desarrollo de regímenes de dosificación y tratamiento adecuados para usar las composiciones particulares descritas en el presente documento en diversos regímenes de tratamiento, incluyendo, por ejemplo, administración y formulación oral, parenteral, intravenosa, intranasal, subcutánea e intramuscular.

En determinadas aplicaciones, las composiciones farmacéuticas o terapéuticas de la divulgación no estimulan una reacción inmunitaria. En algunos aspectos, la composición farmacéutica que comprende la o las proteínas puede formularse en forma líquida estable. En otros aspectos, la composición farmacéutica puede formularse en forma liofilizada; la o las proteínas pueden liofilizarse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen normalmente antes de su uso mediante la adición de uno o más diluyentes farmacéuticamente aceptables tales como agua estéril para inyección o solución salina fisiológica estéril.

De acuerdo con la divulgación presentada en el presente documento, las proteínas pueden tener una solubilidad que es deseable para la vía de administración particular, tal como la administración intravenosa. Los ejemplos de solubilidades deseables incluyen al menos aproximadamente 1 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml, al menos aproximadamente 25 mg/ml y al menos aproximadamente 50 mg/ml.

En determinadas circunstancias, será deseable administrar las composiciones farmacéuticas desveladas en el presente documento por vía parenteral, por vía subcutánea, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía

intraarterial, por vía intratecal, por vía intraparenquimatosa, por vía intraventricular, por vía intrauretral, por vía intraesternal, por vía intracraneal, por vía intrasinoval o incluso por vía intraperitoneal). Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin agujas y técnicas de infusión.

- 5 Para la administración parenteral en una solución acuosa, por ejemplo, la solución debe tamponarse de forma adecuada, si fuera necesario, y el diluyente líquido en primer lugar se hace isotónico con suficiente solución salina o glucosa. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

- 10 Pueden prepararse soluciones inyectables estériles mediante la incorporación de los compuestos activos en la cantidad requerida en el disolvente apropiado con diversos otros ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan mediante la incorporación de diversos principios activos esterilizados en un vehículo estéril que contiene el medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son las técnicas de secado a vacío y las técnicas de criodesecación que dan como resultado un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una de sus soluciones anteriormente esterilizadas por filtración.

- 15 Las composiciones desveladas en el presente documento se pueden formular en una forma neutra o sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libres de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas con los grupos carboxilo libres también pueden derivar de bases inorgánicas tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o hierro y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares. Tras la formulación, las soluciones se pueden administrar de un modo compatible con la formulación de dosificación y una cantidad tal que sea terapéuticamente eficaz. Las formulaciones se administran con facilidad mediante diversas formas de dosificación, tales como soluciones inyectables, cápsulas de liberación de fármacos y similares.

- 20 Como se usa en el presente documento, "portador" incluye todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, vehículos, recubrimientos, diluyentes, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, tampones, soluciones portadoras, suspensiones, coloides y similares. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional es incompatible con el principio activo, se contempla su uso en las composiciones terapéuticas. En las composiciones también pueden incorporarse principios activos suplementarios.

- 25 La frase "farmacéuticamente aceptable" se refiere a entidades moleculares y composiciones que no producen reacciones adversas, alérgicas o perjudiciales cuando se administran a un ser humano. La preparación de una composición acuosa que contiene una proteína como principio activo es bien entendida en la materia.

- 30 Normalmente, dichas composiciones se preparan como inyectables, como suspensiones o soluciones líquidas; también se pueden preparar las formas sólidas adecuadas para la solución en o la suspensión en líquido antes de la inyección. La preparación también puede emulsionarse.

- 35 Las composiciones farmacéuticas pueden formularse para ser de liberación inmediata y/o sostenida. Las composiciones de liberación sostenida incluyen liberación retardada, modificada, pulsada, controlada, dirigida y programada.

- 40 Los procedimientos de formulación son bien conocidos en la técnica. Las proteínas recombinantes proporcionadas en el presente documento pueden administrarse de acuerdo con cualquier régimen de dosificación terapéuticamente eficaz. La cantidad y frecuencia de dosificación se pueden seleccionar para crear una cantidad efectiva de las proteínas y minimizar los efectos nocivos. La cantidad efectiva dependerá de una variedad de factores, que incluyen la vía de administración, el tipo de sujeto a tratar y las características físicas del sujeto en consideración, tales como el peso, la dieta, la medicación concurrente y otros factores que los expertos en la técnica médica reconocerán.

45 Las formulaciones de vWF se han descrito, por ejemplo, en el documento WO 2010/048275.

- 50 Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto nivel de detalle a modo de ilustración y ejemplo a efectos de claridad de comprensión, será fácilmente evidente para un experto en la materia a la luz de las enseñanzas de la presente invención que se pueden realizar determinados cambios y modificaciones de la misma. Los ejemplos siguientes se proporcionan a modo de ilustración únicamente y no como limitación. Los expertos en la materia reconocerán fácilmente varios parámetros no críticos que podrían modificarse o cambiarse para dar esencialmente resultados similares.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- 55 La presente solicitud se presenta con un listado de secuencias en formato electrónico. Todo el contenido del listado de secuencias se incorpora en el presente documento por referencia.



**Ejemplos**

5 Todas las fermentaciones se realizaron usando un controlador Biostat B-DCU de Sartorius para controlar el pH a 7,0, el DO al 30 % de saturación de aire, la temperatura y una velocidad de agitador de 150 rpm. El procedimiento se ejecutó en un recipiente Sartorius B con un volumen de trabajo de 5 l. Después de la inoculación del reactor, se realizó una fase de crecimiento a 37 °C, seguida de una fase de producción a 33 °C. Todos los procedimientos se realizaron con la misma línea de células CHO que expresan un vWF de longitud completa de tipo silvestre fusionado en su extremo C-terminal a la proteína de albúmina de longitud completa de tipo silvestre humana. La línea celular se obtuvo como se describe en el documento WO 2009/156137.

**Ejemplo 1 (procedimiento por lotes, ejemplo comparativo)**

10 Se inició un procedimiento por lotes que se ejecuta con medios CSL-DBM-PFCMD (SAFC) con una densidad celular de  $4,4 \cdot 10^5$  células/ml. Después de 7 días, se alcanzó una densidad celular de  $6,9 \cdot 10^6$  células/ml. Se tomó una muestra del biorreactor diariamente y se determinó la actividad de vWF (vWF:RCoF) y el antígeno (vWF:Ag). A partir de estas mediciones, se calculó la relación vWF:RCoF/vWF:Ag. La figura 1 muestra que esta relación está disminuyendo ligeramente después de alcanzar un nivel máximo aproximadamente el día 2.

15 **Ejemplo 2 (Procedimiento de la invención)**

El módulo de retención, un ATF 4 (Refine Technology) se operó con un caudal de escape de 3 l/min y un caudal de presión de 3 l/min. Se usó una membrana de fibra hueca de límite de peso molecular (MWCO) de 750 kDa obtenida de GE Healthcare Life Sciences operada en modo de flujo ATF para enriquecer el vWF de alto peso molecular (HMW) en el biorreactor y para reducir el vWF de bajo peso molecular (LMW) en el biorreactor. Se usó un medio de cultivo basado en CD CHO (Gibco) durante la fase de crecimiento y también como medio de alimentación. El cultivo se inició con  $5 \cdot 10^5$  células/ml. Después de una fase de crecimiento (datos no mostrados) de 4 días, se inició el ATF con una tasa de recolección de material permeado de aproximadamente el 100 % del volumen del tanque por día. En este momento, la densidad celular en el biorreactor era  $3,8 \cdot 10^6$  células/ml. Cuando la densidad celular alcanzó  $7 \cdot 10^6$  células/ml, la temperatura se cambió de 37 °C a 33 °C para la fase de producción.

25 Se tomó diariamente una muestra del biorreactor y del material permeado y se determinó la actividad del cofactor de ristocetina de vWF (vWF:RCoF) y el antígeno de vWF (vWF:Ag). A partir de estas mediciones, se calculó la relación vWF:RCoF/vWF:Ag. Se demostró que debido a la eliminación de vWF de LMW, la relación vWF:RCoF/vWF:Ag en el material retenido (biorreactor) estaba aumentando, mientras que la relación vWF:RCoF/vWF:Ag en el material permeado disminuía debido a la eliminación de vWF de HMW (figura 2).

30 Se realizó un análisis de multímeros de vWF (electroforesis de multímeros) en el día 4 de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) para mostrar el enriquecimiento de vWF de alto peso molecular en el material retenido (biorreactor) y la separación y eliminación de vWF de bajo peso molecular en el material permeado. Además del análisis de multímeros de muestras del material retenido y del material permeado, se realizó un análisis de multímeros de una muestra de plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17) de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) y se usó como referencia en cada transferencia individual. La "intensidad de píxeles acumulada relacionada con el plasma humano estándar" se calculó dividiendo la intensidad de píxeles por separado para cada una de las secciones de banda 1-5, 6-10 y  $\geq 11$  en la muestra respectiva por la intensidad de píxeles promedio de las secciones de banda correspondientes del plasma humano estándar, en el que ambas intensidades de píxeles individuales acumuladas se determinaron de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) (tabla 2, figura 3).

**Tabla 2 (análisis de multímeros de vWF):**

	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas $\geq 11$	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas 6-10	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas 1-5
Material retenido	148,1	89,3	93,7
Material permeado	26,6	102,8	111,9
Relación material retenido/material permeado	5,568	0,869	0,837

**Ejemplo 3 (Procedimiento de la invención)**

45 El módulo de retención, un ATF 4 (Refine Technology) se operó con un caudal de escape de 3 l/min y un caudal de presión de 3 l/min. Se usó una membrana de fibra hueca de límite de peso molecular (MWCO) de 750 kDa obtenida de GE Healthcare Life Sciences operada en modo de flujo ATF para enriquecer el vWF HMW en el biorreactor y para reducir el vWF de LMW en el biorreactor. Se usó un medio de cultivo celular basado en PowerCHO-3 (Lonza) para todo el procedimiento. El cultivo se inició con  $4 \cdot 10^5$  células/ml. Después de una fase de crecimiento (datos no

mostrados) de 3 días, se inició el ATF con una tasa de recolección de material permeado de aproximadamente el 100 % del volumen del tanque por día. En este momento, la densidad celular en el biorreactor era  $1,4 \cdot 10^6$  células/ml. Cuando la densidad celular alcanzó  $1,7 \cdot 10^6$  células/ml, la temperatura se cambió de 37 °C a 33 °C para la fase de producción.

5 Se tomó diariamente una muestra del biorreactor y del material permeado y se determinaron la actividad (vWF:RCoF) y el antígeno (vWF:Ag) como se describe en el ejemplo 1. A partir de estas mediciones, se calculó la relación vWF:RCoF/vWF:Ag. Se demostró que debido a la eliminación de vWF de LMW, la relación vWF:RCoF/vWF:Ag en el material retenido (biorreactor) estaba aumentando, mientras que la relación vWF:RCoF/vWF:Ag en el material permeado disminuía debido a la eliminación de vWF de HMW (figura 4).

10 Al final del procedimiento, se realizó una electroforesis de multímeros para mostrar la acumulación de vWF de alto peso molecular en el biorreactor y la separación/eliminación de vWF de bajo peso molecular con el material permeado. La intensidad de píxeles acumulada relacionada con el plasma humano estándar se calculó como anteriormente.

Se realizó un análisis de multímeros de vWF (electroforesis de multímeros) en el día 9 de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) para mostrar el enriquecimiento de vWF de alto peso molecular en el material retenido (biorreactor) y la separación y eliminación de vWF de bajo peso molecular en el material permeado. Además del análisis de multímeros de muestras del material retenido y del material permeado, se realizó un análisis de multímeros de una muestra de plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17) de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) y se usó como referencia en cada transferencia individual. La "intensidad de píxeles acumulada relacionada con el plasma humano estándar" se calculó entonces como se describe en el ejemplo 2 (tabla 3, figura 5).

**Tabla 3 (análisis de multímeros de vWF):**

	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas $\geq 11$	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas 6-10	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas 1-5
Material retenido	111,9	80,9	105,0
Material permeado	80,8	84,4	117,3
Relación material retenido/material permeado	1,385	0,959	0,895

**Ejemplo 4**

Otro aspecto de las invenciones es un procedimiento en el que el material retenido como se obtiene en cualquiera de los ejemplos 2 y 3 se recolecta directamente del biorreactor usando un dispositivo de separación adicional. El dispositivo de separación en este caso podría ser cualquier dispositivo de separación que separe las células del material retenido y que no separe más los multímeros de vWF de LMW de los multímeros de vWF de HMW. Las condiciones y los medios del biorreactor son como se describen en ejemplos anteriores.

Como resultado de dicho procedimiento de fermentación, se obtiene una preparación de vWF que está enriquecida en multímeros de vWF de HMW y reducida el tiempo de residencia en el biorreactor. Además, este tipo de procedimiento no está limitado en el tiempo de procedimiento debido a que no se produce acumulación de multímeros de vWF.

**Ejemplo 5**

Otro aspecto de las invenciones es un procedimiento en el que el material retenido como se obtiene en cualquiera de los ejemplos 2 y 3 se somete adicionalmente a una segunda separación en la que ahora los multímeros de vWF ultragrandes (multímeros de vWF de ULMW) se enriquecen en el material retenido, proporcionando un segundo material permeado en el que la proporción de los multímeros de vWF ultragrandes en la cantidad total de multímeros de vWF se reduce en comparación con la proporción de multímeros de vWF ultragrandes en la cantidad total de multímeros de vWF en el material retenido antes de dicha segunda separación. Las condiciones y los medios del biorreactor son como se describen en ejemplos anteriores. Un segundo sistema ATF está conectado al biorreactor (figura 6) que está equipado con una membrana de fibra hueca de MWCO de aproximadamente 10.000.000 Da o 0,1  $\mu\text{m}$ . Al recolectar el material permeado del segundo sistema de separación con un caudal del 20-200 % del volumen del tanque, se eliminan los multímeros de vWF de ULMW.

Como resultado de dicha fermentación que comprende una primera separación que conduce a un enriquecimiento de los multímeros de vWF de HMW con una segunda separación que conduce al agotamiento de los multímeros de HMW a partir de los multímeros de vWF de ULMW genera una preparación de vWF en el material permeado de la segunda separación que está agotado tanto para los multímeros de vWF de LMW como para los multímeros de vWF de ULMW, teniendo entonces una alta actividad en la hemostasia primaria pero evitando posibles efectos adversos por la

presencia de multímeros vWF de ULMW.

Las dos separaciones se pueden realizar en paralelo o secuencialmente.

**Ejemplo 6 (Procedimiento de la invención)**

5 La fermentación se realizó usando un controlador Biostat B-DCU de Sartorius para controlar el pH a 7,0, el DO al 30 % de saturación de aire, la temperatura y una velocidad de agitador de 150 rpm. El procedimiento se ejecutó en un recipiente Sartorius B con un volumen de trabajo de 5 l.

10 Después de la inoculación del reactor, se realizó una fase de crecimiento a 37 °C, seguida de una fase de producción a 33,5 °C. El procedimiento se realizó con una línea de células CHO que expresa un vWF de longitud completa de tipo silvestre (Secuencia NCBI NP\_000543). La línea celular se obtuvo como se describe en el documento WO 2009/156137.

El módulo de retención, un ATF 4 (Refine Technology) se operó con un caudal de escape de 3 l/min y un caudal de presión de 3 l/min. Se usó una membrana de fibra hueca de límite de peso molecular (MWCO) de 750 kDa obtenida de GE Healthcare Life Sciences operada en modo de flujo ATF para enriquecer el vWF de alto peso molecular (HMW) en el biorreactor y para reducir el vWF de bajo peso molecular (LMW) en el biorreactor.

15 Se usó un medio de cultivo basado en CD CHO (Gibco) durante la fase de crecimiento y también como medio de alimentación. El cultivo se inició con  $7,6 \times 10^5$  células/ml.

20 Después de una fase de crecimiento (datos no mostrados) de 1 día, se inició el ATF con una tasa de recolección de material permeado de aproximadamente el 100 % del volumen del tanque por día. Además, la temperatura se cambió de 37 °C a 33,5 °C durante toda la fase de producción. En este momento, la densidad celular en el biorreactor era  $10,9 \times 10^5$  células/ml. En el día 7 la densidad celular alcanzó las  $70,0 \times 10^5$  células/ml

25 Se tomó diariamente una muestra del biorreactor y del material permeado y se determinó la actividad del cofactor de ristocetina de vWF (vWF:RCoF) y el antígeno de vWF (vWF:Ag). A partir de estas mediciones, se calculó la relación vWF:RCoF/vWF:Ag. Se demostró que debido a la eliminación de vWF de LMW, la relación vWF:RCoF/vWF:Ag en el material retenido (biorreactor) estaba aumentando, mientras que la relación vWF:RCoF/vWF:Ag en el material permeado disminuía debido a la eliminación de vWF de HMW (figura 9).

30 Se realizó un análisis de multímeros de vWF (electroforesis de multímeros) en el día 7 de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) para mostrar el enriquecimiento de vWF de alto peso molecular en el material retenido (biorreactor) y la separación y eliminación de vWF de bajo peso molecular en el material permeado. Además del análisis de multímeros de muestras del material retenido y del material permeado, se realizó un análisis de multímeros de una muestra de plasma humano estándar (SHP) (Siemens, Standard Human Plasma, ORKL17) de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) y se usó como referencia en cada transferencia individual. La "intensidad de píxeles acumulada relacionada con el plasma humano estándar" se calculó dividiendo la intensidad de píxeles por separado para cada una de las secciones de banda 1-5, 6-10 y  $\geq 11$  en la muestra respectiva por la intensidad de píxeles promedio de las secciones de banda correspondientes del plasma humano estándar, en el que 35 ambas intensidades de píxeles individuales acumuladas se determinaron de acuerdo con Ott y col. (Am J Clin Pathol 2010; 133: 322-330) (tabla 4, figura 8).

**Tabla 4 (análisis de multímeros de vWF):**

	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas $\geq 11$	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas 6-10	Intensidad acumulada de píxeles relacionada con el plasma humano estándar de bandas 1-5
Material retenido	111,54	92,2	97,9
Material permeado	96,44	86,0	108,4
Relación material retenido/material permeado	1,16	1,07	0,90

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CSL Ltd.
- 40 <120> Producción mejorada de factor de von Willebrand recombinante en un biorreactor
- <130> 2014\_P002\_A227

ES 2 751 607 T3

<150> EP 14172338.7  
 <151> 13-06-2014

<160> 3

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 8442  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>  
 <221> CDS  
 <222> (1)..(8442)

<400> 1

atg att cct gcc aga ttt gcc ggg gtg ctg ctt gct ctg gcc ctc att	48
Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile	
1 5 10 15	
ttg cca ggg acc ctt tgt gca gaa gga act cgc ggc agg tca tcc acg	96
Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr	
20 25 30	
gcc cga tgc agc ctt ttc gga agt gac ttc gtc aac acc ttt gat ggg	144
Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly	
35 40 45	
agc atg tac agc ttt gcg gga tac tgc agt tac ctc ctg gca ggg ggc	192
Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly	
50 55 60	
tgc cag aaa cgc tcc ttc tcg att att ggg gac ttc cag aat ggc aag	240
Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys	
65 70 75 80	
aga gtg agc ctc tcc gtg tat ctt ggg gaa ttt ttt gac atc cat ttg	288
Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu	
85 90 95	
ttt gtc aat ggt acc gtg aca cag ggg gac caa aga gtc tcc atg ccc	336
Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro	
100 105 110	
tat gcc tcc aaa ggg ctg tat cta gaa act gag gct ggg tac tac aag	384
Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys	
115 120 125	
ctg tcc ggt gag gcc tat ggc ttt gtg gcc agg atc gat ggc agc ggc	432
Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly	
130 135 140	

ES 2 751 607 T3

aac ttt caa gtc ctg ctg tca gac aga tac ttc aac aag acc tgc ggg Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly 145 150 155 160	480
ctg tgt ggc aac ttt aac atc ttt gct gaa gat gac ttt atg acc caa Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln 165 170 175	528
gaa ggg acc ttg acc tcg gac cct tat gac ttt gcc aac tca tgg gct Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala 180 185 190	576
ctg agc agt gga gaa cag tgg tgt gaa cgg gca tct cct ccc agc agc Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser 195 200 205	624
tca tgc aac atc tcc tct ggg gaa atg cag aag ggc ctg tgg gag cag Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln 210 215 220	672
tgc cag ctt ctg aag agc acc tcg gtg ttt gcc cgc tgc cac cct ctg Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu 225 230 235 240	720
gtg gac ccc gag cct ttt gtg gcc ctg tgt gag aag act ttg tgt gag Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu 245 250 255	768
tgt gct ggg ggg ctg gag tgc gcc tgc cct gcc ctc ctg gag tac gcc Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala 260 265 270	816
cgg acc tgt gcc cag gag gga atg gtg ctg tac gcc tgg acc gac cac Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His 275 280 285	864
agc gcg tgc agc cca gtg tgc cct gct ggt atg gag tat agg cag tgt Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys 290 295 300	912
gtg tcc cct tgc gcc agg acc tgc cag agc ctg cac atc aat gaa atg Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met 305 310 315 320	960
tgt cag gag cga tgc gtg gat ggc tgc agc tgc cct gag gga cag ctc Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu 325 330 335	1008
ctg gat gaa ggc ctc tgc gtg gag agc acc gag tgt ccc tgc gtg cat Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His 340 345 350	1056
tcc gga aag cgc tac cct ccc ggc acc tcc ctc tct cga gac tgc aac Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn 355 360 365	1104
acc tgc att tgc cga aac agc cag tgg atc tgc agc aat gaa gaa tgt Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys 370 375 380	1152
cca ggg gag tgc ctt gtc aca ggt caa tca cac ttc aag agc ttt gac Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp 385 390 395 400	1200

ES 2 751 607 T3

aac aga tac ttc acc ttc agt ggg atc tgc cag tac ctg ctg gcc cgg	1248
Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg	
405 410 415	
gat tgc cag gac cac tcc ttc tcc att gtc att gag act gtc cag tgt	1296
Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys	
420 425 430	
gct gat gac cgc gac gct gtg tgc acc cgc tcc gtc acc gtc cgg ctg	1344
Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu	
435 440 445	
cct ggc ctg cac aac agc ctt gtg aaa ctg aag cat ggg gca gga gtt	1392
Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val	
450 455 460	
gcc atg gat ggc cag gac gtc cag ctc ccc ctc ctg aaa ggt gac ctc	1440
Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu	
465 470 475 480	
cgc atc cag cat aca gtg acg gcc tcc gtg cgc ctc agc tac ggg gag	1488
Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu	
485 490 495	
gac ctg cag atg gac tgg gat ggc cgc ggg agg ctg ctg gtg aag ctg	1536
Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu	
500 505 510	
tcc ccc gtc tat gcc ggg aag acc tgc ggc ctg tgt ggg aat tac aat	1584
Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn	
515 520 525	
ggc aac cag ggc gac gac ttc ctt acc ccc tct ggg ctg gcg gag ccc	1632
Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro	
530 535 540	
cgg gtg gag gac ttc ggg aac gcc tgg aag ctg cac ggg gac tgc cag	1680
Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln	
545 550 555 560	
gac ctg cag aag cag cac agc gat ccc tgc gcc ctc aac ccg cgc atg	1728
Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met	
565 570 575	
acc agg ttc tcc gag gag gcg tgc gcg gtc ctg acg tcc ccc aca ttc	1776
Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe	
580 585 590	
gag gcc tgc cat cgt gcc gtc agc ccg ctg ccc tac ctg cgg aac tgc	1824
Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys	
595 600 605	
cgc tac gac gtg tgc tcc tgc tcg gac ggc cgc gag tgc ctg tgc ggc	1872
Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly	
610 615 620	
gcc ctg gcc agc tat gcc gcg gcc tgc gcg ggg aga gcc gtg cgc gtc	1920
Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val	
625 630 635 640	
gcg tgg cgc gag cca ggc cgc tgt gag ctg aac tgc ccg aaa ggc cag	1968
Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln	



ES 2 751 607 T3

Tyr	Cys	Gly	Ser	Asn	Pro	Gly	Thr	Phe	Arg	Ile	Leu	Val	Gly	Asn	Lys		
			900					905					910				
gga	tgc	agc	cac	ccc	tca	gtg	aaa	tgc	aag	aaa	cgg	gtc	acc	atc	ctg		2784
Gly	Cys	Ser	His	Pro	Ser	Val	Lys	Cys	Lys	Lys	Arg	Val	Thr	Ile	Leu		
		915					920					925					
gtg	gag	gga	gga	gag	att	gag	ctg	ttt	gac	ggg	gag	gtg	aat	gtg	aag		2832
Val	Glu	Gly	Gly	Glu	Ile	Glu	Leu	Phe	Asp	Gly	Glu	Val	Asn	Val	Lys		
	930						935					940					
agg	ccc	atg	aag	gat	gag	act	cac	ttt	gag	gtg	gtg	gag	tct	ggc	cgg		2880
Arg	Pro	Met	Lys	Asp	Glu	Thr	His	Phe	Glu	Val	Val	Glu	Ser	Gly	Arg		
945					950					955					960		
tac	atc	att	ctg	ctg	ctg	ggc	aaa	gcc	ctc	tcc	gtg	gtc	tgg	gac	cgc		2928
Tyr	Ile	Ile	Leu	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Leu	Ser	Val	Val	Trp	Asp	Arg		
			965						970						975		
cac	ctg	agc	atc	tcc	gtg	gtc	ctg	aag	cag	aca	tac	cag	gag	aaa	gtg		2976
His	Leu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Leu	Lys	Gln	Thr	Tyr	Gln	Glu	Lys	Val		
			980					985						990			
tgt	ggc	ctg	tgt	ggg	aat	ttt	gat	ggc	atc	cag	aac	aat	gac	ctc	acc		3024
Cys	Gly	Leu	Cys	Gly	Asn	Phe	Asp	Gly	Ile	Gln	Asn	Asn	Asp	Leu	Thr		
		995					1000						1005				
agc	agc	aac	ctc	caa	gtg	gag	gaa	gac	cct	gtg	gac	ttt	ggg	aac			3069
Ser	Ser	Asn	Leu	Gln	Val	Glu	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Phe	Gly	Asn			
		1010					1015					1020					
tcc	tgg	aaa	gtg	agc	tcg	cag	tgt	gct	gac	acc	aga	aaa	gtg	cct			3114
Ser	Trp	Lys	Val	Ser	Ser	Gln	Cys	Ala	Asp	Thr	Arg	Lys	Val	Pro			
		1025					1030					1035					
ctg	gac	tca	tcc	cct	gcc	acc	tgc	cat	aac	aac	atc	atg	aag	cag			3159
Leu	Asp	Ser	Ser	Pro	Ala	Thr	Cys	His	Asn	Asn	Ile	Met	Lys	Gln			
		1040					1045					1050					
acg	atg	gtg	gat	tcc	tcc	tgt	aga	atc	ctt	acc	agt	gac	gtc	ttc			3204
Thr	Met	Val	Asp	Ser	Ser	Cys	Arg	Ile	Leu	Thr	Ser	Asp	Val	Phe			
		1055					1060					1065					
cag	gac	tgc	aac	aag	ctg	gtg	gac	ccc	gag	cca	tat	ctg	gat	gtc			3249
Gln	Asp	Cys	Asn	Lys	Leu	Val	Asp	Pro	Glu	Pro	Tyr	Leu	Asp	Val			
		1070					1075					1080					
tgc	att	tac	gac	acc	tgc	tcc	tgt	gag	tcc	att	ggg	gac	tgc	gcc			3294
Cys	Ile	Tyr	Asp	Thr	Cys	Ser	Cys	Glu	Ser	Ile	Gly	Asp	Cys	Ala			
		1085					1090					1095					
tgc	ttc	tgc	gac	acc	att	gct	gcc	tat	gcc	cac	gtg	tgt	gcc	cag			3339
Cys	Phe	Cys	Asp	Thr	Ile	Ala	Ala	Tyr	Ala	His	Val	Cys	Ala	Gln			
		1100					1105					1110					
cat	ggc	aag	gtg	gtg	acc	tgg	agg	acg	gcc	aca	ttg	tgc	ccc	cag			3384
His	Gly	Lys	Val	Val	Thr	Trp	Arg	Thr	Ala	Thr	Leu	Cys	Pro	Gln			
		1115					1120					1125					
agc	tgc	gag	gag	agg	aat	ctc	cgg	gag	aac	ggg	tat	gag	tgt	gag			3429
Ser	Cys	Glu	Glu	Arg	Asn	Leu	Arg	Glu	Asn	Gly	Tyr	Glu	Cys	Glu			
		1130					1135					1140					



ES 2 751 607 T3

tgg cgc tat aac agc tgt gca cct gcc tgt caa gtc acg tgt cag	3474
Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln	
1145 1150 1155	
cac cct gag cca ctg gcc tgc cct gtg cag tgt gtg gag ggc tgc	3519
His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys	
1160 1165 1170	
cat gcc cac tgc cct cca ggg aaa atc ctg gat gag ctt ttg cag	3564
His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln	
1175 1180 1185	
acc tgc gtt gac cct gaa gac tgt cca gtg tgt gag gtg gct ggc	3609
Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly	
1190 1195 1200	
cgg cgt ttt gcc tca gga aag aaa gtc acc ttg aat ccc agt gac	3654
Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp	
1205 1210 1215	
cct gag cac tgc cag att tgc cac tgt gat gtt gtc aac ctc acc	3699
Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr	
1220 1225 1230	
tgt gaa gcc tgc cag gag ccg gga ggc ctg gtg gtg cct ccc aca	3744
Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr	
1235 1240 1245	
gat gcc ccg gtg agc ccc acc act ctg tat gtg gag gac atc tog	3789
Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser	
1250 1255 1260	
gaa ccg ccg ttg cac gat ttc tac tgc agc agg cta ctg gac ctg	3834
Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu	
1265 1270 1275	
gtc ttc ctg ctg gat ggc tcc tcc agg ctg tcc gag gct gag ttt	3879
Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe	
1280 1285 1290	
gaa gtg ctg aag gcc ttt gtg gtg gac atg atg gag cgg ctg cgc	3924
Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg	
1295 1300 1305	
atc tcc cag aag tgg gtc cgc gtg gcc gtg gtg gag tac cac gac	3969
Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp	
1310 1315 1320	
ggc tcc cac gcc tac atc ggg ctc aag gac cgg aag cga ccg tca	4014
Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser	
1325 1330 1335	
gag ctg cgg cgc att gcc agc cag gtg aag tat gcg ggc agc cag	4059
Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln	
1340 1345 1350	
gtg gcc tcc acc agc gag gtc ttg aaa tac aca ctg ttc caa atc	4104
Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile	
1355 1360 1365	
ttc agc aag atc gac cgc cct gaa gcc tcc cgc atc gcc ctg ctc	4149
Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu	
1370 1375 1380	

ES 2 751 607 T3

ctg atg gcc agc cag gag ccc caa cgg atg tcc cgg aac ttt gtc	4194
Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val	
1385 1390 1395	
cgc tac gtc cag ggc ctg aag aag aag aag gtc att gtg atc ccg	4239
Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro	
1400 1405 1410	
gtg ggc att ggg ccc cat gcc aac ctc aag cag atc cgc ctc atc	4284
Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile	
1415 1420 1425	
gag aag cag gcc cct gag aac aag gcc ttc gtg ctg agc agt gtg	4329
Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val	
1430 1435 1440	
gat gag ctg gag cag caa agg gac gag atc gtt agc tac ctc tgt	4374
Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys	
1445 1450 1455	
gac ctt gcc cct gaa gcc cct cct cct act ctg ccc ccc cac atg	4419
Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met	
1460 1465 1470	
gca caa gtc act gtg ggc ccg ggg ctc ttg ggg gtt tcg acc ctg	4464
Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu	
1475 1480 1485	
ggg ccc aag agg aac tcc atg gtt ctg gat gtg gcg ttc gtc ctg	4509
Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu	
1490 1495 1500	
gaa gga tcg gac aaa att ggt gaa gcc gac ttc aac agg agc aag	4554
Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys	
1505 1510 1515	
gag ttc atg gag gag gtg att cag cgg atg gat gtg ggc cag gac	4599
Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp	
1520 1525 1530	
agc atc cac gtc acg gtg ctg cag tac tcc tac atg gtg acc gtg	4644
Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val	
1535 1540 1545	
gag tac ccc ttc agc gag gca cag tcc aaa ggg gac atc ctg cag	4689
Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln	
1550 1555 1560	
cgg gtg cga gag atc cgc tac cag ggc ggc aac agg acc aac act	4734
Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr	
1565 1570 1575	
ggg ctg gcc ctg cgg tac ctc tct gac cac agc ttc ttg gtc agc	4779
Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser	
1580 1585 1590	
cag ggt gac cgg gag cag gcg ccc aac ctg gtc tac atg gtc acc	4824
Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr	
1595 1600 1605	
gga aat cct gcc tct gat gag atc aag agg ctg cct gga gac atc	4869
Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile	



ES 2 751 607 T3

Val	Lys	Leu	Gln	Arg	Ile	Glu	Asp	Leu	Pro	Thr	Met	Val	Thr	Leu			
	1850					1855					1860						
ggc	aat	tcc	ttc	ctc	cac	aaa	ctg	tgc	tct	gga	ttt	gtt	agg	att			5634
Gly	Asn	Ser	Phe	Leu	His	Lys	Leu	Cys	Ser	Gly	Phe	Val	Arg	Ile			
	1865					1870					1875						
tgc	atg	gat	gag	gat	ggg	aat	gag	aag	agg	ccc	ggg	gac	gtc	tgg			5679
Cys	Met	Asp	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Lys	Arg	Pro	Gly	Asp	Val	Trp			
	1880					1885					1890						
acc	ttg	cca	gac	cag	tgc	cac	acc	gtg	act	tgc	cag	cca	gat	ggc			5724
Thr	Leu	Pro	Asp	Gln	Cys	His	Thr	Val	Thr	Cys	Gln	Pro	Asp	Gly			
	1895					1900					1905						
cag	acc	ttg	ctg	aag	agt	cat	cgg	gtc	aac	tgt	gac	cgg	ggg	ctg			5769
Gln	Thr	Leu	Leu	Lys	Ser	His	Arg	Val	Asn	Cys	Asp	Arg	Gly	Leu			
	1910					1915					1920						
agg	cct	tcg	tgc	cct	aac	agc	cag	tcc	cct	gtt	aaa	gtg	gaa	gag			5814
Arg	Pro	Ser	Cys	Pro	Asn	Ser	Gln	Ser	Pro	Val	Lys	Val	Glu	Glu			
	1925					1930					1935						
acc	tgt	ggc	tgc	cgc	tgg	acc	tgc	ccc	tgc	gtg	tgc	aca	ggc	agc			5859
Thr	Cys	Gly	Cys	Arg	Trp	Thr	Cys	Pro	Cys	Val	Cys	Thr	Gly	Ser			
	1940					1945					1950						
tcc	act	cgg	cac	atc	gtg	acc	ttt	gat	ggg	cag	aat	ttc	aag	ctg			5904
Ser	Thr	Arg	His	Ile	Val	Thr	Phe	Asp	Gly	Gln	Asn	Phe	Lys	Leu			
	1955					1960					1965						
act	ggc	agc	tgt	tct	tat	gtc	cta	ttt	caa	aac	aag	gag	cag	gac			5949
Thr	Gly	Ser	Cys	Ser	Tyr	Val	Leu	Phe	Gln	Asn	Lys	Glu	Gln	Asp			
	1970					1975					1980						
ctg	gag	gtg	att	ctc	cat	aat	ggt	gcc	tgc	agc	cct	gga	gca	agg			5994
Leu	Glu	Val	Ile	Leu	His	Asn	Gly	Ala	Cys	Ser	Pro	Gly	Ala	Arg			
	1985					1990					1995						
cag	ggc	tgc	atg	aaa	tcc	atc	gag	gtg	aag	cac	agt	gcc	ctc	tcc			6039
Gln	Gly	Cys	Met	Lys	Ser	Ile	Glu	Val	Lys	His	Ser	Ala	Leu	Ser			
	2000					2005					2010						
gtc	gag	ctg	cac	agt	gac	atg	gag	gtg	acg	gtg	aat	ggg	aga	ctg			6084
Val	Glu	Leu	His	Ser	Asp	Met	Glu	Val	Thr	Val	Asn	Gly	Arg	Leu			
	2015					2020					2025						
gtc	tct	gtt	cct	tac	gtg	ggt	ggg	aac	atg	gaa	gtc	aac	gtt	tat			6129
Val	Ser	Val	Pro	Tyr	Val	Gly	Gly	Asn	Met	Glu	Val	Asn	Val	Tyr			
	2030					2035					2040						
ggt	gcc	atc	atg	cat	gag	gtc	aga	ttc	aat	cac	ctt	ggt	cac	atc			6174
Gly	Ala	Ile	Met	His	Glu	Val	Arg	Phe	Asn	His	Leu	Gly	His	Ile			
	2045					2050					2055						
ttc	aca	ttc	act	cca	caa	aac	aat	gag	ttc	caa	ctg	cag	ctc	agc			6219
Phe	Thr	Phe	Thr	Pro	Gln	Asn	Asn	Glu	Phe	Gln	Leu	Gln	Leu	Ser			
	2060					2065					2070						
ccc	aag	act	ttt	gct	tca	aag	acg	tat	ggt	ctg	tgt	ggg	atc	tgt			6264
Pro	Lys	Thr	Phe	Ala	Ser	Lys	Thr	Tyr	Gly	Leu	Cys	Gly	Ile	Cys			
	2075					2080					2085						

ES 2 751 607 T3

gat	gag	aac	gga	gcc	aat	gac	ttc	atg	ctg	agg	gat	ggc	aca	gtc	6309
Asp	Glu	Asn	Gly	Ala	Asn	Asp	Phe	Met	Leu	Arg	Asp	Gly	Thr	Val	
	2090					2095					2100				
acc	aca	gac	tgg	aaa	aca	ctt	gtt	cag	gaa	tgg	act	gtg	cag	cgg	6354
Thr	Thr	Asp	Trp	Lys	Thr	Leu	Val	Gln	Glu	Trp	Thr	Val	Gln	Arg	
	2105					2110					2115				
cca	ggg	cag	acg	tgc	cag	ccc	atc	ctg	gag	gag	cag	tgt	ctt	gtc	6399
Pro	Gly	Gln	Thr	Cys	Gln	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Gln	Cys	Leu	Val	
	2120					2125					2130				
ccc	gac	agc	tcc	cac	tgc	cag	gtc	ctc	ctc	tta	cca	ctg	ttt	gct	6444
Pro	Asp	Ser	Ser	His	Cys	Gln	Val	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Phe	Ala	
	2135					2140					2145				
gaa	tgc	cac	aag	gtc	ctg	gct	cca	gcc	aca	ttc	tat	gcc	atc	tgc	6489
Glu	Cys	His	Lys	Val	Leu	Ala	Pro	Ala	Thr	Phe	Tyr	Ala	Ile	Cys	
	2150					2155					2160				
cag	cag	gac	agt	tgc	cac	cag	gag	caa	gtg	tgt	gag	gtg	atc	gcc	6534
Gln	Gln	Asp	Ser	Cys	His	Gln	Glu	Gln	Val	Cys	Glu	Val	Ile	Ala	
	2165					2170					2175				
tct	tat	gcc	cac	ctc	tgt	cgg	acc	aac	ggg	gtc	tgc	gtt	gac	tgg	6579
Ser	Tyr	Ala	His	Leu	Cys	Arg	Thr	Asn	Gly	Val	Cys	Val	Asp	Trp	
	2180					2185					2190				
agg	aca	cct	gat	ttc	tgt	gct	atg	tca	tgc	cca	cca	tct	ctg	gtt	6624
Arg	Thr	Pro	Asp	Phe	Cys	Ala	Met	Ser	Cys	Pro	Pro	Ser	Leu	Val	
	2195					2200					2205				
tat	aac	cac	tgt	gag	cat	ggc	tgt	ccc	cgg	cac	tgt	gat	ggc	aac	6669
Tyr	Asn	His	Cys	Glu	His	Gly	Cys	Pro	Arg	His	Cys	Asp	Gly	Asn	
	2210					2215					2220				
gtg	agc	tcc	tgt	ggg	gac	cat	ccc	tcc	gaa	ggc	tgt	ttc	tgc	cct	6714
Val	Ser	Ser	Cys	Gly	Asp	His	Pro	Ser	Glu	Gly	Cys	Phe	Cys	Pro	
	2225					2230					2235				
cca	gat	aaa	gtc	atg	ttg	gaa	ggc	agc	tgt	gtc	cct	gaa	gag	gcc	6759
Pro	Asp	Lys	Val	Met	Leu	Glu	Gly	Ser	Cys	Val	Pro	Glu	Glu	Ala	
	2240					2245					2250				
tgc	act	cag	tgc	att	ggt	gag	gat	gga	gtc	cag	cac	cag	ttc	ctg	6804
Cys	Thr	Gln	Cys	Ile	Gly	Glu	Asp	Gly	Val	Gln	His	Gln	Phe	Leu	
	2255					2260					2265				
gaa	gcc	tgg	gtc	ccg	gac	cac	cag	ccc	tgt	cag	atc	tgc	aca	tgc	6849
Glu	Ala	Trp	Val	Pro	Asp	His	Gln	Pro	Cys	Gln	Ile	Cys	Thr	Cys	
	2270					2275					2280				
ctc	agc	ggg	cgg	aag	gtc	aac	tgc	aca	acg	cag	ccc	tgc	ccc	acg	6894
Leu	Ser	Gly	Arg	Lys	Val	Asn	Cys	Thr	Thr	Gln	Pro	Cys	Pro	Thr	
	2285					2290					2295				
gcc	aaa	gct	ccc	acg	tgt	ggc	ctg	tgt	gaa	gta	gcc	cgc	ctc	cgc	6939
Ala	Lys	Ala	Pro	Thr	Cys	Gly	Leu	Cys	Glu	Val	Ala	Arg	Leu	Arg	
	2300					2305					2310				
cag	aat	gca	gac	cag	tgc	tgc	ccc	gag	tat	gag	tgt	gtg	tgt	gac	6984
Gln	Asn	Ala	Asp	Gln	Cys	Cys	Pro	Glu	Tyr	Glu	Cys	Val	Cys	Asp	
	2315					2320					2325				

ES 2 751 607 T3

cca	gtg	agc	tgt	gac	ctg	ccc	cca	gtg	cct	cac	tgt	gaa	cgt	ggc	7029
Pro	Val	Ser	Cys	Asp	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	His	Cys	Glu	Arg	Gly	
	2330					2335					2340				
ctc	cag	ccc	aca	ctg	acc	aac	cct	ggc	gag	tgc	aga	ccc	aac	ttc	7074
Leu	Gln	Pro	Thr	Leu	Thr	Asn	Pro	Gly	Glu	Cys	Arg	Pro	Asn	Phe	
	2345					2350					2355				
acc	tgc	gcc	tgc	agg	aag	gag	gag	tgc	aaa	aga	gtg	tcc	cca	ccc	7119
Thr	Cys	Ala	Cys	Arg	Lys	Glu	Glu	Cys	Lys	Arg	Val	Ser	Pro	Pro	
	2360					2365					2370				
tcc	tgc	ccc	ccg	cac	cgt	ttg	ccc	acc	ctt	cgg	aag	acc	cag	tgc	7164
Ser	Cys	Pro	Pro	His	Arg	Leu	Pro	Thr	Leu	Arg	Lys	Thr	Gln	Cys	
	2375					2380					2385				
tgt	gat	gag	tat	gag	tgt	gcc	tgc	aac	tgt	gtc	aac	tcc	aca	gtg	7209
Cys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Cys	Ala	Cys	Asn	Cys	Val	Asn	Ser	Thr	Val	
	2390					2395					2400				
agc	tgt	ccc	ctt	ggg	tac	ttg	gcc	tca	acc	gcc	acc	aat	gac	tgt	7254
Ser	Cys	Pro	Leu	Gly	Tyr	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Thr	Asn	Asp	Cys	
	2405					2410					2415				
ggc	tgt	acc	aca	acc	acc	tgc	ctt	ccc	gac	aag	gtg	tgt	gtc	cac	7299
Gly	Cys	Thr	Thr	Thr	Thr	Cys	Leu	Pro	Asp	Lys	Val	Cys	Val	His	
	2420					2425					2430				
cga	agc	acc	atc	tac	cct	gtg	ggc	cag	ttc	tgg	gag	gag	ggc	tgc	7344
Arg	Ser	Thr	Ile	Tyr	Pro	Val	Gly	Gln	Phe	Trp	Glu	Glu	Gly	Cys	
	2435					2440					2445				
gat	gtg	tgc	acc	tgc	acc	gac	atg	gag	gat	gcc	gtg	atg	ggc	ctc	7389
Asp	Val	Cys	Thr	Cys	Thr	Asp	Met	Glu	Asp	Ala	Val	Met	Gly	Leu	
	2450					2455					2460				
cgc	gtg	gcc	cag	tgc	tcc	cag	aag	ccc	tgt	gag	gac	agc	tgt	cgg	7434
Arg	Val	Ala	Gln	Cys	Ser	Gln	Lys	Pro	Cys	Glu	Asp	Ser	Cys	Arg	
	2465					2470					2475				
tcg	ggc	ttc	act	tac	gtt	ctg	cat	gaa	ggc	gag	tgc	tgt	gga	agg	7479
Ser	Gly	Phe	Thr	Tyr	Val	Leu	His	Glu	Gly	Glu	Cys	Cys	Gly	Arg	
	2480					2485					2490				
tgc	ctg	cca	tct	gcc	tgt	gag	gtg	gtg	act	ggc	tca	ccg	cgg	ggg	7524
Cys	Leu	Pro	Ser	Ala	Cys	Glu	Val	Val	Thr	Gly	Ser	Pro	Arg	Gly	
	2495					2500					2505				
gac	tcc	cag	tct	tcc	tgg	aag	agt	gtc	ggc	tcc	cag	tgg	gcc	tcc	7569
Asp	Ser	Gln	Ser	Ser	Trp	Lys	Ser	Val	Gly	Ser	Gln	Trp	Ala	Ser	
	2510					2515					2520				
ccg	gag	aac	ccc	tgc	ctc	atc	aat	gag	tgt	gtc	cga	gtg	aag	gag	7614
Pro	Glu	Asn	Pro	Cys	Leu	Ile	Asn	Glu	Cys	Val	Arg	Val	Lys	Glu	
	2525					2530					2535				
gag	gtc	ttt	ata	caa	caa	agg	aac	gtc	tcc	tgc	ccc	cag	ctg	gag	7659
Glu	Val	Phe	Ile	Gln	Gln	Arg	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Gln	Leu	Glu	
	2540					2545					2550				
gtc	cct	gtc	tgc	ccc	tcg	ggc	ttt	cag	ctg	agc	tgt	aag	acc	tca	7704
Val	Pro	Val	Cys	Pro	Ser	Gly	Phe	Gln	Leu	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	



ES 2 751 607 T3

Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro  
 2795 2800 2805

agg aag tgc agc aag tga  
 Arg Lys Cys Ser Lys  
 2810

8442

<210> 2  
 <211> 2813  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

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

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala  
 180 185 190



ES 2 751 607 T3

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  
 Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu  
 435 440 445

ES 2 751 607 T3

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  
 675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys  
 690 695 700

ES 2 751 607 T3

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 Arg 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

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



ES 2 751 607 T3

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly  
 1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp  
 1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr  
 1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr  
 1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser  
 1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu  
 1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe  
 1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg  
 1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp  
 1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser  
 1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln  
 1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile  
 1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu  
 1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val  
 1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro  
 1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile  
 1415 1420 1425

ES 2 751 607 T3

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val  
 1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys  
 1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met  
 1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu  
 1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu  
 1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys  
 1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp  
 1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val  
 1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln  
 1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr  
 1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser  
 1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr  
 1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile  
 1610 1615 1620

Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu  
 1625 1630 1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp  
 1640 1645 1650

Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro Asp Leu Val Leu Gln Arg  
 1655 1660 1665

ES 2 751 607 T3

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

Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp  
 1880 1885 1890

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly

ES 2 751 607 T3

1895						1900						1905			
Gln Thr	Leu Leu Lys Ser	His	Arg Val Asn Cys Asp	Arg Gly Leu											
1910					1915							1920			
Arg Pro	Ser Cys Pro Asn Ser	Gln Ser Pro Val Lys	Val Glu Glu												
1925					1930							1935			
Thr Cys	Gly Cys Arg Trp Thr	Cys Pro Cys Val Cys	Thr Gly Ser												
1940					1945							1950			
Ser Thr	Arg His Ile Val Thr	Phe Asp Gly Gln Asn	Phe Lys Leu												
1955					1960							1965			
Thr Gly	Ser Cys Ser Tyr Val	Leu Phe Gln Asn Lys	Glu Gln Asp												
1970					1975							1980			
Leu Glu	Val Ile Leu His Asn	Gly Ala Cys Ser Pro	Gly Ala Arg												
1985					1990							1995			
Gln Gly	Cys Met Lys Ser Ile	Glu Val Lys His Ser	Ala Leu Ser												
2000					2005							2010			
Val Glu	Leu His Ser Asp Met	Glu Val Thr Val Asn	Gly Arg Leu												
2015					2020							2025			
Val Ser	Val Pro Tyr Val Gly	Gly Asn Met Glu Val	Asn Val Tyr												
2030					2035							2040			
Gly Ala	Ile Met His Glu Val	Arg Phe Asn His Leu	Gly His Ile												
2045					2050							2055			
Phe Thr	Phe Thr Pro Gln Asn	Asn Glu Phe Gln Leu	Gln Leu Ser												
2060					2065							2070			
Pro Lys	Thr Phe Ala Ser Lys	Thr Tyr Gly Leu Cys	Gly Ile Cys												
2075					2080							2085			
Asp Glu	Asn Gly Ala Asn Asp	Phe Met Leu Arg Asp	Gly Thr Val												
2090					2095							2100			
Thr Thr	Asp Trp Lys Thr Leu	Val Gln Glu Trp Thr	Val Gln Arg												
2105					2110							2115			
Pro Gly	Gln Thr Cys Gln Pro	Ile Leu Glu Glu Gln	Cys Leu Val												
2120					2125							2130			



ES 2 751 607 T3

Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu Leu Leu Pro Leu Phe Ala  
 2135 2140 2145

Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala Thr Phe Tyr Ala Ile Cys  
 2150 2155 2160

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala  
 2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp  
 2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
 2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn  
 2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro  
 2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala  
 2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu  
 2255 2260 2265

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys  
 2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr  
 2285 2290 2295

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg  
 2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp  
 2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly  
 2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe  
 2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro  
 2360 2365 2370

ES 2 751 607 T3

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys  
 2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val  
 2390 2395 2400

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys  
 2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His  
 2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys  
 2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu  
 2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg  
 2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly  
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser  
 2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu  
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu  
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser  
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met  
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp  
 2585 2590 2595

Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val Gln Val Gly Val Ile Ser  
 2600 2605 2610

ES 2 751 607 T3

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

<210> 3  
 <211> 2813  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> PÉPTIDO



ES 2 751 607 T3

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

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

ES 2 751 607 T3

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  
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

ES 2 751 607 T3

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  
 785 790 800  
 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 Arg 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  
 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  
 945 950 955 960  
 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

ES 2 751 607 T3

		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						
His	Ala	His	Cys	Pro	Pro	Gly	Lys	Ile	Leu	Asp	Glu	Leu	Leu	Gln			
	1175					1180					1185						
Thr	Cys	Val	Asp	Pro	Glu	Asp	Cys	Pro	Val	Cys	Glu	Val	Ala	Gly			
	1190					1195					1200						
Arg	Arg	Phe	Ala	Ser	Gly	Lys	Lys	Val	Thr	Leu	Asn	Pro	Ser	Asp			
	1205					1210					1215						



ES 2 751 607 T3

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr  
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr  
1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser  
1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu  
1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe  
1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg  
1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp  
1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser  
1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln  
1340 1345 1350

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile  
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Thr Leu Leu  
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val  
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro  
1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile  
1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val  
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys  
1445 1450 1455

ES 2 751 607 T3

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro Asp Met  
 1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Leu Gly Val Ser Thr Leu  
 1475 1480 1485

Gly Pro Lys Arg Asn Ser Met Val Leu Asp Val Ala Phe Val Leu  
 1490 1495 1500

Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala Asp Phe Asn Arg Ser Lys  
 1505 1510 1515

Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg Met Asp Val Gly Gln Asp  
 1520 1525 1530

Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr Val  
 1535 1540 1545

Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser Lys Gly Asp Ile Leu Gln  
 1550 1555 1560

Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly Gly Asn Arg Thr Asn Thr  
 1565 1570 1575

Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp His Ser Phe Leu Val Ser  
 1580 1585 1590

Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn Leu Val Tyr Met Val Thr  
 1595 1600 1605

Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys Arg Leu Pro Gly Asp Ile  
 1610 1615 1620

Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro Asn Ala Asn Val Gln Glu  
 1625 1630 1635

Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala Pro Ile Leu Ile Gln Asp  
 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

ES 2 751 607 T3

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

Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys Arg Pro Gly Asp Val Trp  
 1880 1885 1890

Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val Thr Cys Gln Pro Asp Gly  
 1895 1900 1905

Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val Asn Cys Asp Arg Gly Leu  
 1910 1915 1920

Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser Pro Val Lys Val Glu Glu

ES 2 751 607 T3

1925						1930						1935			
Thr Cys Gly Cys Arg Trp	Thr Cys Pro Cys Val	Cys Thr Gly Ser													
1940	1945	1950													
Ser Thr Arg His Ile Val	Thr Phe Asp Gly Gln	Asn Phe Lys Leu													
1955	1960	1965													
Thr Gly Ser Cys Ser Tyr	Val Leu Phe Gln Asn	Lys Glu Gln Asp													
1970	1975	1980													
Leu Glu Val Ile Leu His	Asn Gly Ala Cys Ser	Pro Gly Ala Arg													
1985	1990	1995													
Gln Gly Cys Met Lys Ser	Ile Glu Val Lys His	Ser Ala Leu Ser													
2000	2005	2010													
Val Glu Leu His Ser Asp	Met Glu Val Thr Val	Asn Gly Arg Leu													
2015	2020	2025													
Val Ser Val Pro Tyr Val	Gly Gly Asn Met Glu	Val Asn Val Tyr													
2030	2035	2040													
Gly Ala Ile Met His Glu	Val Arg Phe Asn His	Leu Gly His Ile													
2045	2050	2055													
Phe Thr Phe Thr Pro Gln	Asn Asn Glu Phe Gln	Leu Gln Leu Ser													
2060	2065	2070													
Pro Lys Thr Phe Ala Ser	Lys Thr Tyr Gly Leu	Cys Gly Ile Cys													
2075	2080	2085													
Asp Glu Asn Gly Ala Asn	Asp Phe Met Leu Arg	Asp Gly Thr Val													
2090	2095	2100													
Thr Thr Asp Trp Lys Thr	Leu Val Gln Glu Trp	Thr Val Gln Arg													
2105	2110	2115													
Pro Gly Gln Thr Cys Gln	Pro Ile Leu Glu Glu	Gln Cys Leu Val													
2120	2125	2130													
Pro Asp Ser Ser His Cys	Gln Val Leu Leu Leu	Pro Leu Phe Ala													
2135	2140	2145													
Glu Cys His Lys Val Leu	Ala Pro Ala Thr Phe	Tyr Ala Ile Cys													
2150	2155	2160													

ES 2 751 607 T3

Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln Val Cys Glu Val Ile Ala  
 2165 2170 2175

Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn Gly Val Cys Val Asp Trp  
 2180 2185 2190

Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser Cys Pro Pro Ser Leu Val  
 2195 2200 2205

Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro Arg His Cys Asp Gly Asn  
 2210 2215 2220

Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser Glu Gly Cys Phe Cys Pro  
 2225 2230 2235

Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser Cys Val Pro Glu Glu Ala  
 2240 2245 2250

Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly Val Gln His Gln Phe Leu  
 2255 2260 2265

Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro Cys Gln Ile Cys Thr Cys  
 2270 2275 2280

Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr Thr Gln Pro Cys Pro Thr  
 2285 2290 2295

Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys Glu Val Ala Arg Leu Arg  
 2300 2305 2310

Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu Tyr Glu Cys Val Cys Asp  
 2315 2320 2325

Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val Pro His Cys Glu Arg Gly  
 2330 2335 2340

Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly Glu Cys Arg Pro Asn Phe  
 2345 2350 2355

Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys Lys Arg Val Ser Pro Pro  
 2360 2365 2370

Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr Leu Arg Lys Thr Gln Cys  
 2375 2380 2385

Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn Cys Val Asn Ser Thr Val  
 2390 2395 2400

ES 2 751 607 T3

Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser Thr Ala Thr Asn Asp Cys  
 2405 2410 2415

Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro Asp Lys Val Cys Val His  
 2420 2425 2430

Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln Phe Trp Glu Glu Gly Cys  
 2435 2440 2445

Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu Asp Ala Val Met Gly Leu  
 2450 2455 2460

Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro Cys Glu Asp Ser Cys Arg  
 2465 2470 2475

Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu Gly Glu Cys Cys Gly Arg  
 2480 2485 2490

Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val Thr Gly Ser Pro Arg Gly  
 2495 2500 2505

Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val Gly Ser Gln Trp Ala Ser  
 2510 2515 2520

Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu Cys Val Arg Val Lys Glu  
 2525 2530 2535

Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val Ser Cys Pro Gln Leu Glu  
 2540 2545 2550

Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln Leu Ser Cys Lys Thr Ser  
 2555 2560 2565

Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu Arg Met Glu Ala Cys Met  
 2570 2575 2580

Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly Lys Thr Val Met Ile Asp  
 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

ES 2 751 607 T3

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

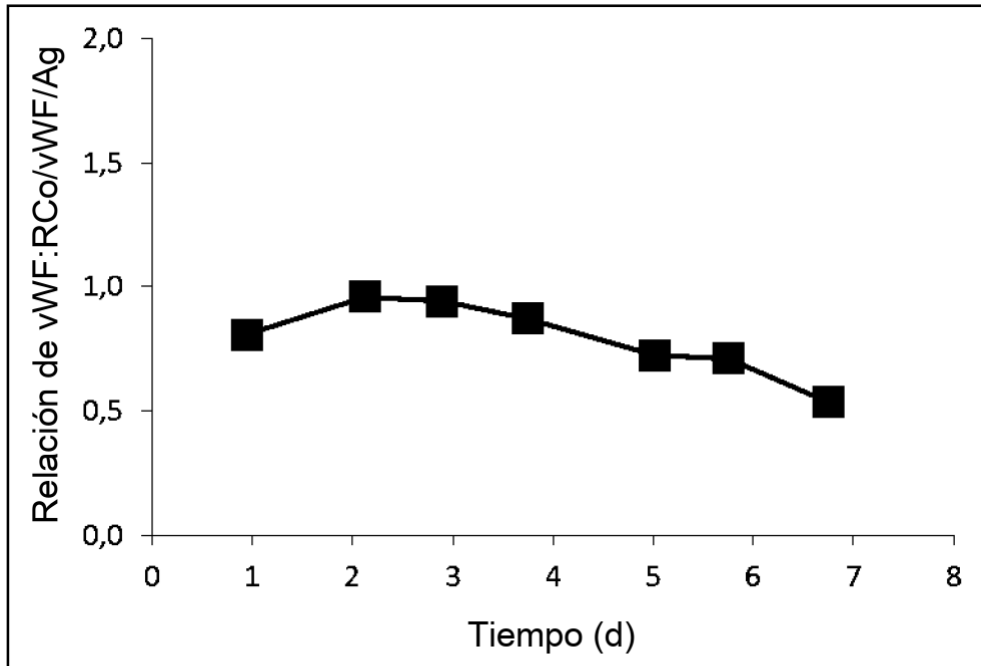
Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met Glu Cys Lys Cys Ser Pro  
 2795 2800 2805

Arg Lys Cys Ser Lys  
 2810

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Procedimiento de fabricación de un factor de von Willebrand (vWF) recombinante mediante el cultivo de células huésped en un biorreactor en un medio de cultivo celular, en el que las células huésped producen vWF recombinante que es secretado al medio de cultivo celular y en el que el vWF en el medio de cultivo celular comprende multímeros de vWF de diferente tamaño, en el que al menos un componente del medio de cultivo celular es alimentado al medio de cultivo celular y en el que el cultivo celular que comprende las células, el vWF recombinante y el medio de cultivo celular es bombeado sobre un sistema de separación que tiene un tamaño límite de peso molecular de aproximadamente 750.000 Da, y en el que el sistema de separación separa los multímeros de vWF en al menos
  - 10 (i) una fracción de material permeado que está enriquecida en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y reducida en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW) en comparación con los multímeros de vWF en el sobrenadante del cultivo celular antes de la separación y
  - (ii) una fracción de material retenido que está reducida en multímeros de vWF de bajo peso molecular (LMW) y enriquecida en multímeros de vWF de alto peso molecular (HMW) en comparación con los multímeros de vWF en el sobrenadante del cultivo celular antes de la separación.
- 15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fracción deseada del vWF recombinante destinada a ser purificada adicionalmente es el material permeado.
3. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 2, en el que la relación de multímeros de vWF de LMW es igual o inferior a 0,9.
- 20 4. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la fracción deseada del vWF recombinante destinada a ser purificada adicionalmente es el material retenido.
5. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 y 4, en el que la relación de multímeros vWF de HMW es igual o superior a 1,1.
6. Procedimiento según las reivindicaciones 1, 4 y 5, en el que el vWF recombinante en el material retenido tiene una relación vWF:RCoF/vWF:Ag superior a 1,2.
- 25 7. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, en el que el vWF recombinante es una proteína de fusión en la que el vWF está fusionado con albúmina o con un fragmento Fc de una inmunoglobulina.
8. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el material retenido obtenido de este modo se somete a una segunda separación en la que los multímeros de vWF ultragrandes se enriquecen en dicho material retenido, proporcionando un segundo material permeado en el que la proporción de los multímeros de vWF ultragrandes en la cantidad total de multímeros de vWF se reduce en comparación con la proporción de multímeros de vWF ultragrandes en la cantidad total de multímeros de vWF en el material retenido antes de dicha segunda separación.
- 30 9. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la segunda separación se realiza en paralelo con la primera separación.
- 35 10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que la segunda separación se realiza después de la primera separación.
11. Procedimiento de acuerdo con las reivindicaciones 9 a 10, en el que el tamaño límite de peso molecular del segundo sistema de separación es de aproximadamente 10.000.000 Da.





**FIGURA 1**

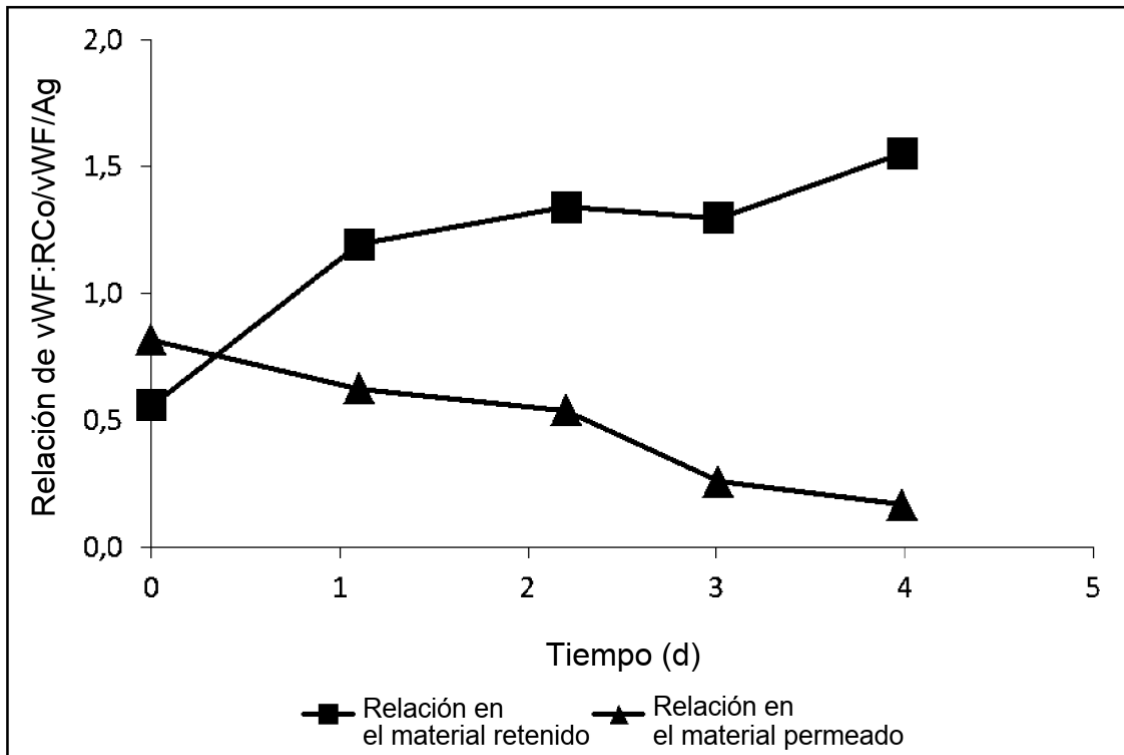


FIGURA 2

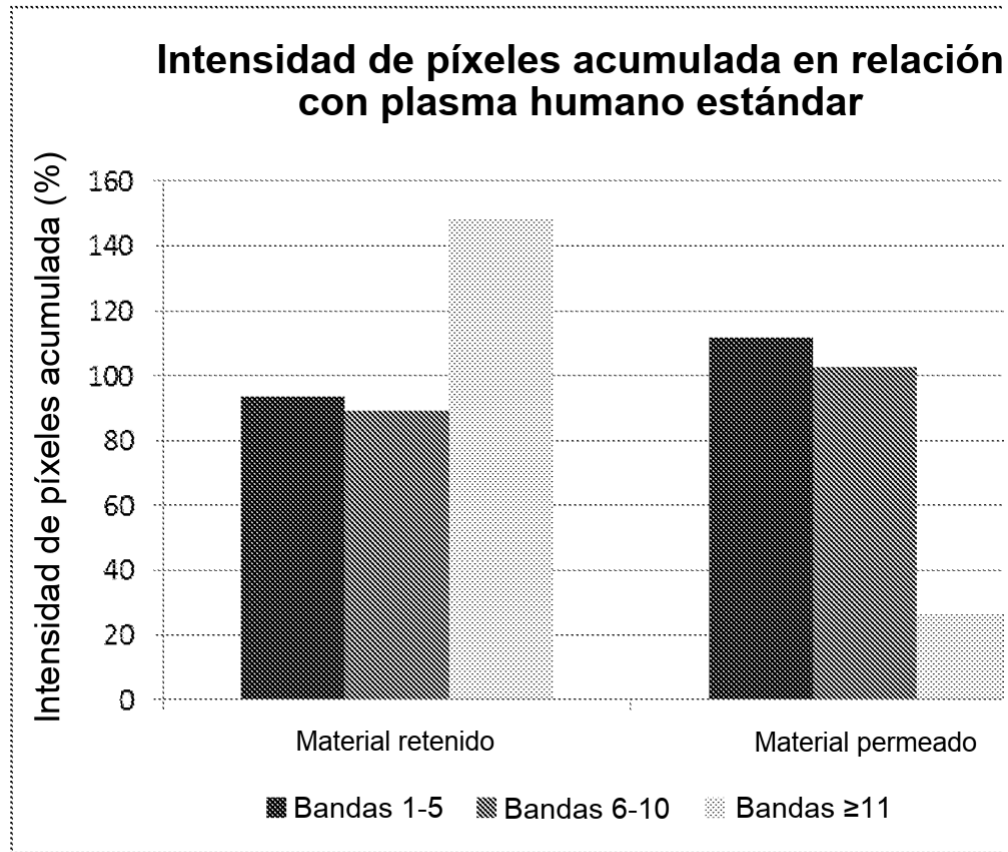


FIGURA 3

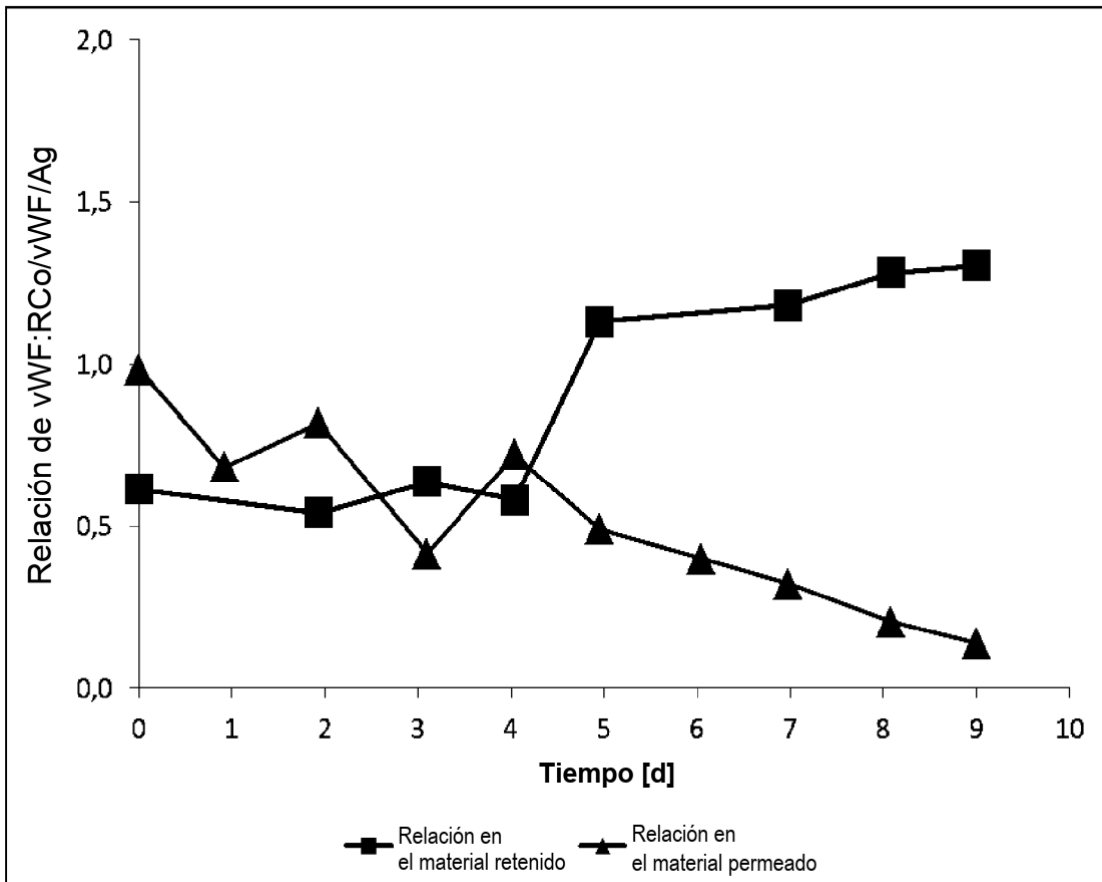
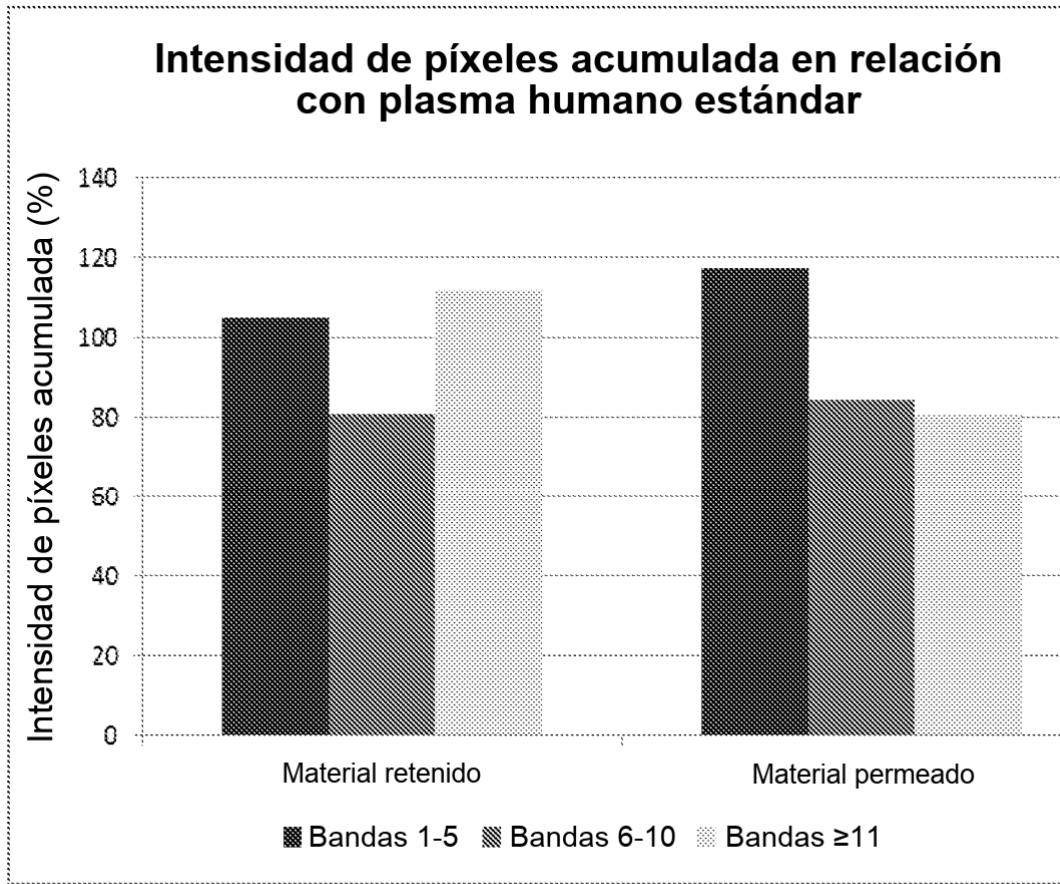


FIGURA 4



**FIGURA 5**

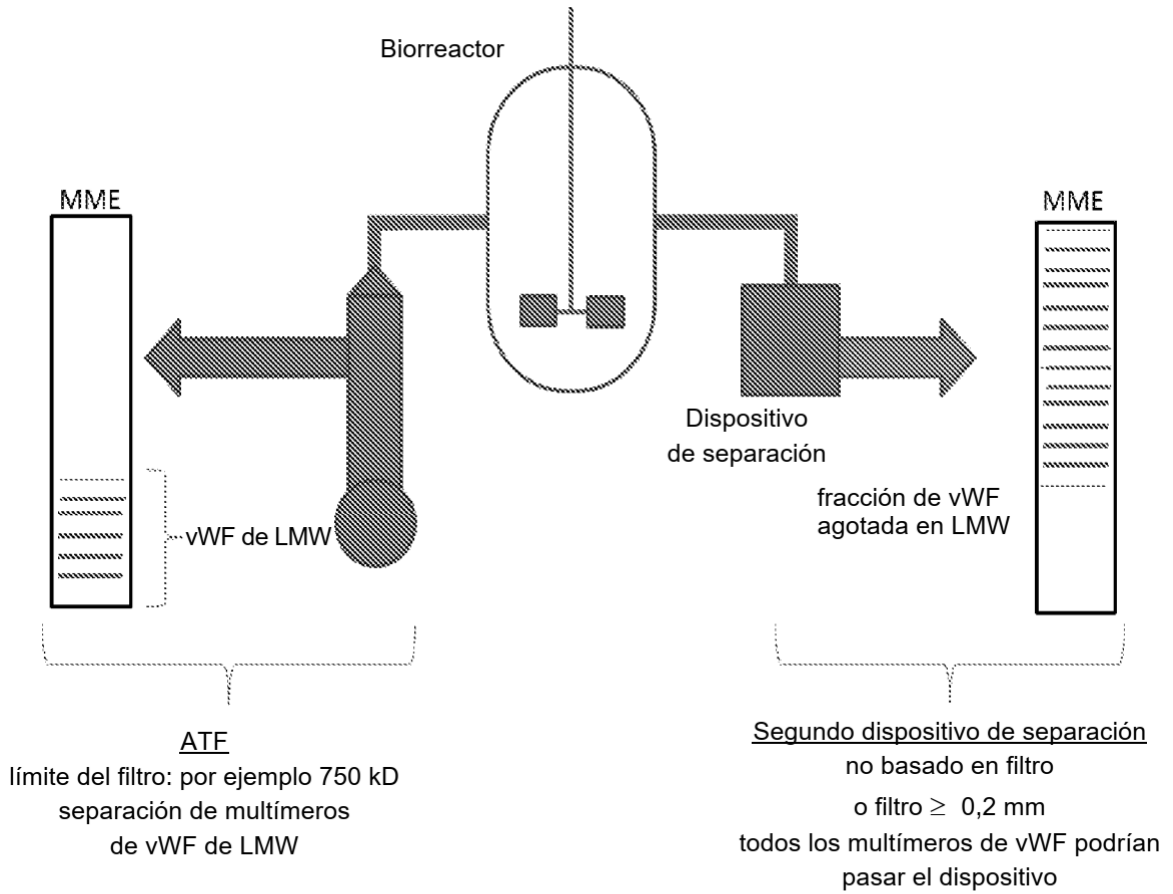


FIGURA 6

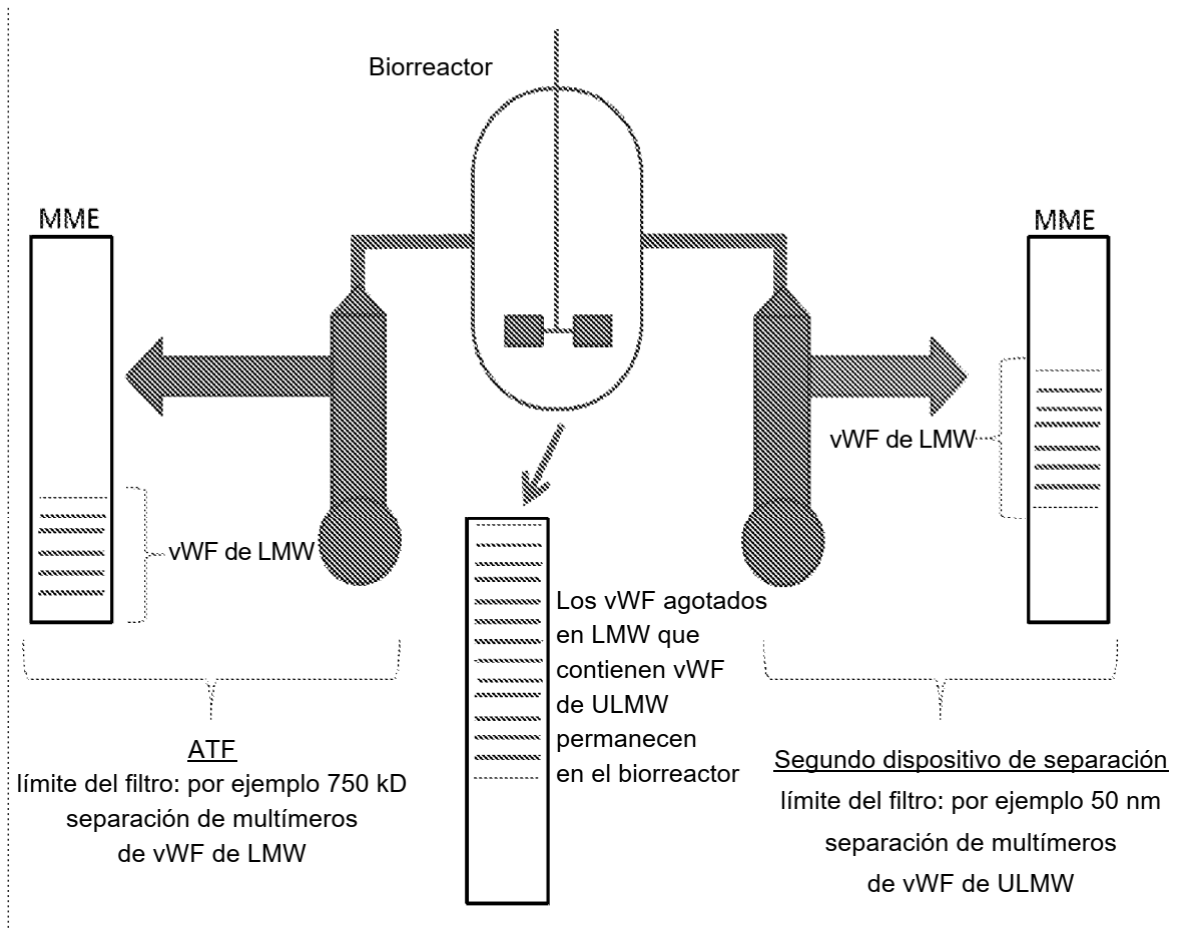
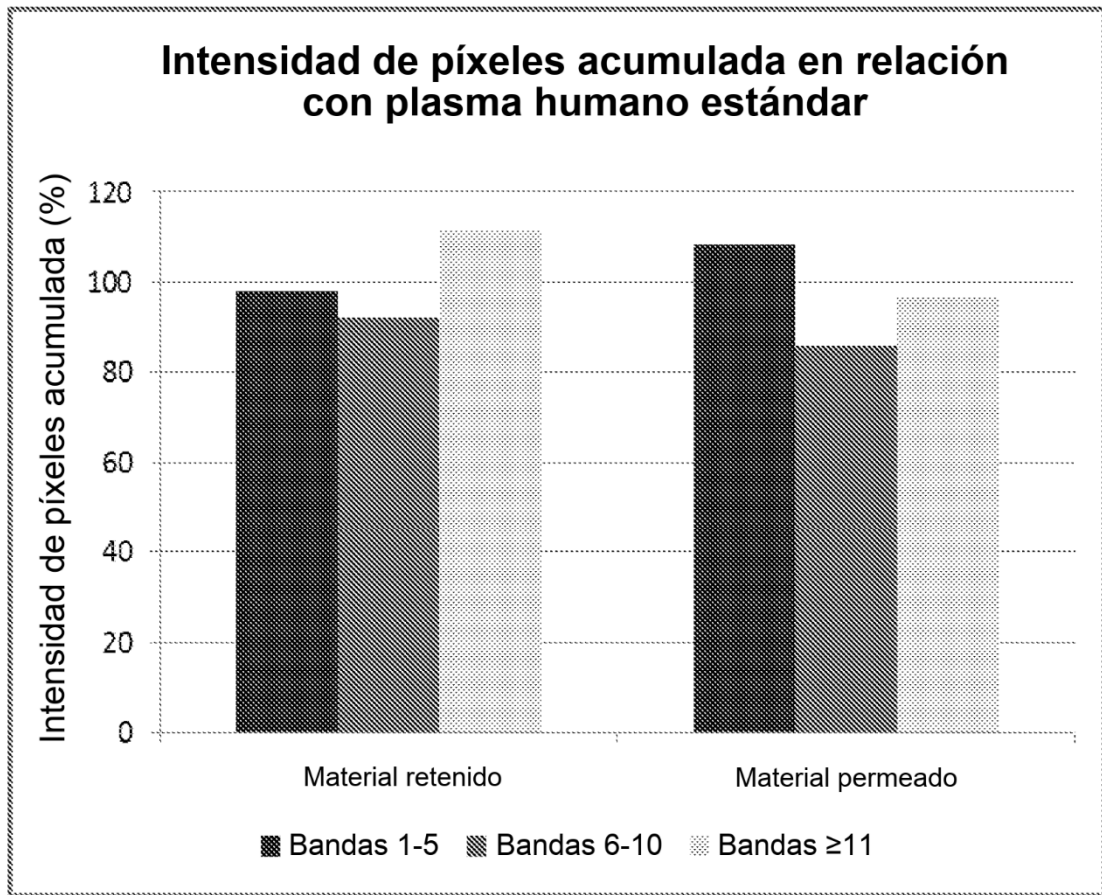


FIGURA 7



**FIGURA 8**



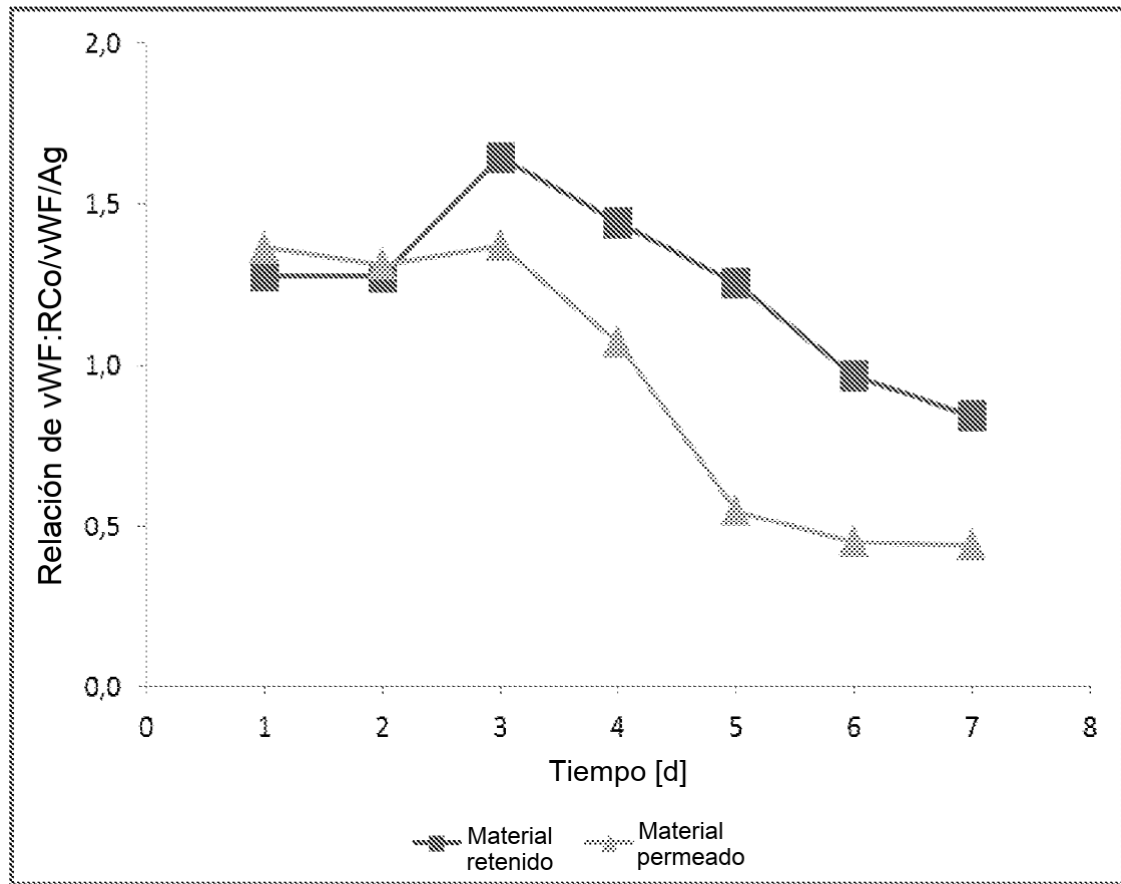


FIGURA 9