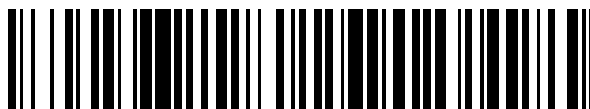


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 011**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/37** (2006.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2016 PCT/EP2016/061443**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16188907**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2016 E 16723776 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020 EP 3297656**

54 Título: **Polipéptidos del factor de von Willebrand truncado para tratar la hemofilia**

30 Prioridad:

**22.05.2015 EP 15168930**

**31.03.2016 EP 16163239**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**16.07.2020**

73 Titular/es:

**CSL BEHRING LENGNAU AG (100.0%)**

**Industriestrasse 11  
2543 Lengnau BE, CH**

72 Inventor/es:

**SCHULTE, STEFAN;  
METZNER, HUBERT;  
PESTEL, SABINE y  
WEIMER, THOMAS**

74 Agente/Representante:

**GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo**

ES 2 774 011 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

Polipéptidos del factor de von Willebrand truncado para tratar la hemofilia

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a composiciones y procedimientos para el tratamiento de trastornos de la coagulación de la sangre.

### Antecedentes de la invención

Existen varios trastornos hemorrágicos causados por deficiencias de los factores de coagulación sanguínea. Los trastornos más comunes son la hemofilia A y B, resultado de deficiencias del factor VIII de coagulación sanguínea (FVIII) y IX, respectivamente. Otro trastorno hemorrágico conocido es la enfermedad de von Willebrand (VWD).

En el plasma, el FVIII existe principalmente como un complejo no covalente con el factor von Willebrand (VWF) y su función coagulante es acelerar la conversión dependiente del factor IXa del factor X en Xa.

La hemofilia clásica o hemofilia A es un trastorno hemorrágico hereditario. Es el resultado de una deficiencia ligada al cromosoma X del FVIII de la coagulación sanguínea y afecta casi exclusivamente a varones con una incidencia de entre uno y dos individuos por cada 10.000. El defecto del cromosoma X es transmitido por portadoras que no son hemofílicas. La manifestación clínica de la hemofilia A es una mayor tendencia al sangrado.

En pacientes con hemofilia A grave que reciben tratamiento profiláctico, el FVIII debe administrarse por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces a la semana debido a la corta semivida plasmática del FVIII de aproximadamente 12 a 14 horas. Cada administración i.v. es engorrosa, asociada con dolor y conlleva el riesgo de una infección, especialmente porque esto se hace principalmente en casa por los propios pacientes o por los padres de los niños que han sido diagnosticados con hemofilia A.

Por lo tanto, sería altamente deseable aumentar la semivida del FVIII de modo que las composiciones farmacéuticas que contienen dicho FVIII tengan que administrarse con menos frecuencia.

Se han realizado varios intentos para prolongar la semivida del FVIII no activado, ya sea reduciendo su interacción con los receptores celulares (documentos WO 03/093313 A2, WO 02/060951 A2), uniendo covalentemente polímeros al FVIII (documentos WO 94/15625, WO 97/11957 y US 4970300), mediante encapsulación del FVIII (documento WO 99/55306), mediante la introducción de nuevos sitios de unión de metales (documento WO 97/03193), mediante la unión covalente del dominio A2 al dominio A3 ya sea por enlace peptídico (documentos WO 97/40145 y WO 03/087355) o disulfuro (documento WO 02/103024A2) o uniendo covalentemente el dominio A1 al dominio A2 (documento WO2006/108590).

Otro enfoque para mejorar la semivida funcional de FVIII o VWF es mediante PEGilación de FVIII (documentos WO 2007/126808, WO 2006/053299, WO 2004/075923) o mediante PEGilación del VWF (documento WO 2006/071801). La semivida aumentada del VWF pegilado indirectamente también aumentaría la semivida del FVIII presente en el plasma. También se han descrito proteínas de fusión de FVIII (documentos WO 2004/101740, WO2008/077616 y WO 2009/156137).

El VWF, que falta, es funcionalmente defectuoso o solo está disponible en cantidad reducida en diferentes formas de la enfermedad de von Willebrand (VWD), es una glicoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, el VWF actúa como mediador entre los receptores específicos en la superficie de las plaquetas y los componentes de la matriz extracelular, tal como colágeno. Además, El VWF sirve como vehículo y proteína estabilizadora para el procoagulante FVIII. El VWF se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos y la secuencia de ADNc del VWF de tipo salvaje se desvelan en Collins y col., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:4393-4397. El polipéptido precursor, pre-pro-VWF, consiste en un péptido señal de 22 restos en N-terminal, seguido de un pro-péptido de 741 restos y el polipéptido de 2050 restos encontrado en el VWF plasmático maduro VWF (Fischer y col., FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Después de la escisión del péptido señal en el retículo endoplasmático, se forma un puente disulfuro C-terminal entre dos monómeros de VWF. Durante el transporte adicional a través de la vía secretora, se añaden 12 cadenas laterales de carbohidrato unidas a N y 10 unidas a O. Más importante, los dímeros de VWF se multimerizan a través de puentes disulfuro N-terminales y el propéptido de 741 aminoácidos de longitud se separa mediante la enzima PACE/furina en el aparato de Golgi tardío.

Una vez secretada en plasma, la proteasa ADAMTS13 puede escindir multímeros de VWF de alto peso molecular dentro del dominio A1 del VWF. Por lo tanto, el VWF en plasma consiste en una gama completa de multímeros que van desde dímeros individuales de 500 kDa hasta multímeros que consisten en hasta más de 20 dímeros de un peso molecular de más de 10.000 kDa. El VWF-HMW que tiene la actividad hemostática más fuerte, que se puede medir en la actividad del cofactor de ristocetina (VWF:RCo). Cuanto mayor sea la relación de VWF:antígeno RCo/VWF, mayor es la cantidad relativa de multímeros de alto peso molecular.

En plasma, el FVIII se une con alta afinidad al VWF, que lo protege de la eliminación prematura y, por lo tanto, desempeña además de su papel en la hemostasia primaria, un papel crucial para estabilizar el FVIII, regular los niveles plasmáticos de FVIII y, como consecuencia, también es un factor central para controlar la hemostasia secundaria. La semivida del FVIII no activado unido al VWF es de aproximadamente 12 a 14 horas en plasma. En la enfermedad de von Willebrand de tipo 3, donde no hay o casi no hay VWF, la semivida del FVIII es de solo aproximadamente 2 a 6 horas, que conduce a síntomas de hemofilia A leve a moderada en tales pacientes debido a la disminución de las concentraciones de FVIII. El efecto estabilizador del VWF sobre el FVIII también se ha usado para ayudar a la expresión recombinante de FVIII en células CHO (Kaufman y col., 1989, Mol Cell Biol 9:1233-1242).

Los polipéptidos derivados del VWF, en particular fragmentos de VWF, se han descrito para estabilizar el FVIII *in vitro* e *in vivo*. El documento WO 2013/106787 A1 se refiere a proteínas quiméricas que comprenden ciertos fragmentos de VWF y una proteína FVIII. Dichos heterodímeros quiméricos de FVIII y fragmento de VWF tienen una relación molar fija de VWF a FVIII de 1:1. Los documentos WO 2014/198699 A2 y WO 2013/083858 A2 describen fragmentos de VWF y su uso en el tratamiento de la hemofilia. Se descubrió que la biodisponibilidad de los FVIII puede mejorarse significativamente con la administración conjunta extravascular con cantidades molares similares de fragmentos de VWF. Se ha dicho que el alto exceso molar de VWF sobre FVIII no era deseable y en experimentos con fragmentos de VWF coadministrados s.c. con FVIII se descubrió que la dosis de VWF no era crítica para la biodisponibilidad de FVIII. Por lo tanto, las relaciones molares de fragmentos de VWF sobre FVIII se limitaron a un máximo de 50:1 y los intervalos preferidos a un máximo de 1,5:1. El documento WO 2011/060242 A2 desvela polipéptidos de fusión que comprenden ciertos fragmentos de VWF y una región Fc de anticuerpo que propone relaciones molares específicas del fragmento de VWF sobre el FVIII de hasta 10:1. El documento WO2013/093760 A2 describe un procedimiento para preparar una proteína, que comprende coexpresar los polipéptidos FVIII o VWF, incluyendo las formas truncadas del VWF, con una  $\alpha$ -2,3-sialiltransferasa recombinante. Yee y col., (2014) Blood 124(3):445-452 descubrió que un fragmento de VWF que contenía los dominios D'D3 es suficiente para estabilizar el Factor VIII en ratones con deficiencia de VWF. Sin embargo, aunque una proteína de fusión VWF D'D3-Fc exhibía una supervivencia marcadamente prolongada cuando se transfundió a ratones con deficiencia de FVIII, la proteína de fusión VWF D'D3-Fc no prolongó la supervivencia del FVIII co-transfundido. La técnica anterior no menciona el beneficio de exceder ciertas proporciones de fragmentos de VWF administrados sobre el VWF endógeno con el fin de prolongar la semivida *in vivo* del FVIII coadministrado.

En el documento WO 2008/151817 A1 se muestra que el VWF de longitud completa se puede incorporar al torrente sanguíneo cuando se administra por vía extravascular sin modificaciones covalentes estabilizadoras y que el VWF se puede usar para mejorar la absorción del FVIII cuando se administra conjuntamente con FVIII de forma no intravenosa. El VWF se aplica sin ninguna modificación que extienda la semivida. No se muestra ni se sugiere ninguna modificación del VWF mediante el uso de un resto prolongador de la semivida. Por el contrario, el documento WO 2008/151817 A1 excluye explícitamente cualquier conjugación de VWF.

Existe una necesidad continua de procedimientos que aumenten la semivida de los productos FVIII y FVIII con una frecuencia de administración reducida.

### **Sumario de la invención**

Los inventores han descubierto que la semivida *in vivo* del Factor VIII se puede prolongar mediante la administración conjunta de un alto exceso molar de un polipéptido de VWF truncado (polipéptido de la invención). El VWF truncado comprende un resto prolongador de la semivida. El alto exceso molar es relativo a la concentración de Factor VIII coadministrado y, opcionalmente, además, en relación con la concentración de VWF endógeno presente en el sujeto tratado. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, se cree que es importante lograr un alto excedente del VWF truncado administrado de semivida prolongada para minimizar la unión del FVIII coadministrado al VWF endógeno que tiene una estructura molecular más grande que probablemente conduzca a un catabolismo aumentado en comparación al VWF truncado. Este efecto técnico se logra cuando el VWF truncado no solo se administra en una proporción superior a 50 sobre un Factor VIII coadministrado, sino que también comprende un resto que prolonga la semivida.

Por lo tanto, la presente invención se refiere a las siguientes realizaciones [1] a [70]:

[1] Un polipéptido que comprende un factor de von Willebrand (VWF) truncado para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y un Factor VIII (FVIII), en el que el polipéptido es capaz de unirse a dicho FVIII, y en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 50, en el que el polipéptido comprende un resto que prolonga la semivida.

[2] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [1], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 100.

[3] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [1], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es de al menos 200.

[4] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [1], en el que la relación molar entre el polipéptido a

administrar y el FVIII a administrar es de al menos 300.

[5] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [1], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es de al menos 400.

5 [6] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [1], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es de al menos 500.

[7] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 0,5.

[8] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 1.

10 [9] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 2.

[10] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 4.

15 [11] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 5.

[12] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 7.

[13] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 10.

20 [14] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 25.

[15] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [6], en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 50.

25 [16] Un polipéptido que comprende un factor de von Willebrand (VWF) truncado para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación sanguínea como se define en el punto [1], comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y un Factor VIII (FVIII), en el que el polipéptido es capaz de unirse a dicho FVIII y en el que la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 0,5.

30 [17] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [16], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 10.

[18] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [16], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 20.

[19] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [16], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 40.

35 [20] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [16], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 50.

[21] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [16], en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 100.

40 [22] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, que se une al FVIII con una afinidad caracterizada por una constante de disociación  $K_D$  de menos de 1 nM.

[23] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [22], en el que la  $K_D$  varía de 1 pM a 500 pM.

[24] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [22], en el que la  $K_D$  varía de 10 pM a 200 pM.

[25] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [22], en el que la  $K_D$  varía de 60 pM a 100 pM.

45 [26] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el polipéptido se administra por vía intravenosa.

[27] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [25], en el que el polipéptido se administra por vía subcutánea.

- [28] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [25], en el que el polipéptido se administra por vía intramuscular.
- 5 [29] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el VWF truncado comprende (a) los aminoácidos 776 a 805 de SEQ ID NO: 4 o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 90 % con los aminoácidos 776 a 805 de SEQ ID NO: 4.
- [30] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el VWF truncado comprende (a) los aminoácidos 766 a 864 de SEQ ID NO: 4 o (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con los aminoácidos 766 a 864 de la SEQ ID NO: 4.
- 10 [31] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el VWF truncado comprende los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4.
- [32] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el VWF truncado consiste en (a) los aminoácidos 764 a 1242 de SEQ ID NO: 4, (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con respecto a los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4 o (c) un fragmento de (a) o (b).
- 15 [33] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el VWF truncado carece de los aminoácidos 1243 a 2813 de la SEQ ID NO: 4.
- [34] El polipéptido para su uso de acuerdo con cualquiera de los puntos anteriores comprende un resto que prolonga la semivida.
- 20 [35] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [34], en el que dicho resto que prolonga la semivida es una secuencia de aminoácidos heteróloga fusionada al VWF truncado.
- [36] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [35], en el que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en regiones constantes de inmunoglobulina y porciones de las mismas, por ejemplo, el fragmento Fc, transferrina y fragmentos de la misma, el péptido C-terminal de la gonadotropina coriónica humana, cadenas aleatorias solvatadas con gran volumen hidrodinámico conocido como XTEN, repeticiones de homo-aminoácidos (HAP), repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS), albúmina, afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a albúmina o regiones constantes de inmunoglobulina, y combinaciones de las mismas.
- 25 [37] El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de los puntos [34], en el que dicho resto que prolonga la semivida se conjuga con el polipéptido.
- 30 [38] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [37], en el que dicho resto que prolonga la semivida se selecciona del grupo que consiste en hidroxietilalmidón (HES), polietilenglicol (PEG), ácidos polisialícos (PSA), polipéptidos similares a elastina, polímeros de heparosano, ligandos de unión al ácido hialurónico y albúmina, por ejemplo, cadenas de ácidos grasos y sus combinaciones.
- 35 [39] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el polipéptido es una glucoproteína que comprende N-glucanos y en el que al menos el 75 % de dichos N-glucanos comprende, en promedio, al menos un resto de ácido siálico.
- [40] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [39], en el que al menos el 85 % de dichos N-glucanos comprende, en promedio, al menos un resto de ácido siálico.
- 40 [41] El polipéptido para su uso de acuerdo con los puntos [39], en el que al menos el 95 % de dichos N-glucanos comprende, en promedio, al menos un resto de ácido siálico.
- 45 [42] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores en el que el polipéptido comprende N-glucanos, en el que menos del 35 %, preferentemente, menos del 34 %, preferentemente, menos del 33 %, preferentemente, menos del 32 %, preferentemente, menos del 31 %, preferentemente, menos del 30 %, preferentemente, menos del 29 %, preferentemente, menos del 28 %, preferentemente, menos del 27 %, y preferentemente, menos del 26 %, preferentemente, menos del 25 %, preferentemente, menos del 24 %, preferentemente, menos del 23 %, preferentemente, menos del 22 %, preferentemente, menos del 21 %, preferentemente, menos del 20 %, preferentemente, menos del 19 %, preferentemente, menos del 18 %, preferentemente, menos del 17 %, preferentemente, menos del 16 %, preferentemente, menos del 15 %, preferentemente, menos del 14 %, preferentemente, menos del 13 %, preferentemente, menos del 12 %, preferentemente, menos del 11 %, preferentemente, menos del 10 %, preferentemente, menos del 9 %, preferentemente, menos del 8 %, preferentemente, menos del 7 %, preferentemente, menos del 6 % y, preferentemente, menos del 5 % de dichos N-glucanos comprenden, en promedio, dos o más restos de galactosa terminales y no sialilados.
- 50 [43] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores en el que el polipéptido

comprende N-glucanos, en el que menos del 6 %, preferentemente, menos del 5 %, preferentemente, menos del 4 %, preferentemente, menos del 3 %, preferentemente menos del 2 % y, preferentemente, menos del 1 % de dichos N-glucanos comprenden, en promedio, tres o más restos de galactosa terminales y no sialilados.

5 [44] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el polipéptido es un dímero.

[45] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [44], en el que los dos monómeros que forman el dímero están unidos covalentemente entre sí a través de uno o más puentes disulfuro formados por restos de cisteína dentro del VWF truncado.

10 [46] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [45], en el que los restos de cisteína que forman los uno o más puentes disulfuro se seleccionan del grupo que consiste en Cys-1099, Cys-1142, Cys-1222, Cys-1225, Cys-1227 y combinaciones de los mismos, en el que la numeración de aminoácidos se refiere a la SEQ ID NO: 4.

15 [47] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [44] a [46], en el que la afinidad de dicho dímero por el FVIII es mayor que la afinidad de un polipéptido monomérico por dicho FVIII, teniendo dicho polipéptido monomérico la misma secuencia de aminoácidos que una subunidad monomérica del polipéptido dimérico.

20 [48] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el tiempo medio de residencia (TMR) y/o la semivida terminal del FVIII se incrementa mediante la administración conjunta del polipéptido en comparación con un tratamiento de referencia, en el que dicho tratamiento de referencia es idéntico a dicho tratamiento, excepto que el polipéptido y el FVIII se administran en cantidades equimolares en dicho tratamiento de referencia.

[49] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [48], en el que dicho aumento en el TMR y/o la semivida terminal es de al menos el 50 %.

25 [50] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el tiempo medio de residencia (TMR) y/o la semivida terminal del FVIII se incrementa por la administración conjunta del polipéptido en comparación con un tratamiento de referencia con el FVIII solo.

[51] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [50], en el que dicho aumento en el TMR y/o la semivida terminal es de al menos el 50 %.

[52] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [50], en el que dicho aumento en el TMR y/o la semivida terminal es de al menos el 100 %.

30 [53] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el aclaramiento del FVIII disminuye por la administración conjunta del polipéptido en comparación con un tratamiento de referencia con el FVIII solo.

35 [54] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el aclaramiento del FVIII disminuye por la administración conjunta del polipéptido en comparación con un tratamiento de referencia, en el que dicho tratamiento de referencia es idéntico a dicho tratamiento, excepto que el polipéptido y el FVIII se administran en cantidades equimolares en dicho tratamiento de referencia.

[55] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [53] o [54], en el que dicha disminución es de al menos el 25 %.

40 [56] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [53] o [54], en el que dicha disminución es de al menos el 50 %.

[57] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [53] o [54], en el que dicha disminución es de al menos el 100 %.

45 [58] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la recuperación *in vivo* del FVIII se incrementa mediante la administración conjunta del polipéptido en comparación con un tratamiento de referencia con el FVIII solo.

[59] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que la frecuencia de administración del FVIII se reduce en comparación con un tratamiento con el FVIII solo.

50 [60] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el TMR y/o la semivida en plasma del polipéptido es mayor que la de un polipéptido de referencia, en el que dicho polipéptido de referencia es VWF endógeno.

[61] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en el que el TMR y/o la

semivida en plasma del polipéptido es mayor que la de un polipéptido de referencia que es idéntico a dicho polipéptido, excepto que carece de la fracción que prolonga la semivida.

[62] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [60] o [61], en el que el TMR y/o la semivida en plasma del polipéptido es al menos un 25 % mayor que la del polipéptido de referencia.

5 [63] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [60] o [61], en el que el TMR y/o la semivida en plasma del polipéptido es al menos un 50 % mayor que la del polipéptido de referencia.

[64] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [60] o [61], en el que el TMR y/o la semivida en plasma del polipéptido es al menos un 75 % mayor que la del polipéptido de referencia.

10 [65] El polipéptido para su uso de acuerdo con el punto [60] o [61], en el que el TMR y/o la semivida en plasma del polipéptido es al menos un 100 % mayor que la del polipéptido de referencia.

[66] El polipéptido para su uso de acuerdo con uno cualquiera de los puntos anteriores, en la que el sujeto es un ser humano.

15 [67] Una composición farmacéutica que comprende (i) un FVIII y (ii) un polipéptido como se define en uno cualquiera de los puntos [1] a [66], en la que la relación molar entre el polipéptido y el FVIII en la composición es mayor que 50.

[68] Una composición farmacéutica que comprende (i) un FVIII y (ii) un polipéptido como se define en uno cualquiera de los puntos [1] a [66] para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y el FVIII, en el que además la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 0,5.

20 [69] Un kit farmacéutico que comprende (i) un FVIII y (ii) un polipéptido como se define en uno cualquiera de los puntos [1] a [66] para el uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 50 y el polipéptido comprende un resto que prolonga la semivida.

25 [70] El uso de un polipéptido como se define en uno cualquiera de los puntos [1] a [66] para mejorar la semivida en plasma del Factor VIII y/o para reducir la frecuencia de administración del Factor VIII.

### **Descripción de los dibujos**

Figura 1: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (media) de D'D3-FP cuantificado determinando el resto de albúmina en ratas (Ejemplo 1).  
Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

30 Figura 2: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (media) de rVIII-cadena sencilla cuantificado determinando el antígeno del FVIII en ratas (Ejemplo 1).  
Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

Figura 3: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (media) de D'D3-FP cuantificado determinando el resto de albúmina en ratas (Ejemplo 2).  
35 Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

Figura 4: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (media) de rVIII-Cadena sencilla cuantificado determinando el antígeno del FVIII en rata (Ejemplo 2).  
Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

40 Figura 5: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (datos individuales de animales y media) de D'D3-FP cuantificado determinando el resto de albúmina en conejos (Ejemplo 3).  
Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

Figura 6: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (datos individuales de animales y media) de rVIII-cadena sencilla cuantificado determinando el antígeno del FVIII en conejos (Ejemplo 3).  
Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

45 Figura 7: Tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento (datos de animales individuales y media) de diferentes productos del FVIII recombinantes cuantificado determinando el antígeno de FVIII en conejos (Ejemplo 4).  
Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

50 Figura 8: Cambios del tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento del FVIII en dependencia de la relación molar de D'D3-FP sobre rVIII-cadena sencilla (rVIII-SC administrado solo se define como un cambio de 1 vez) en ratas y conejos.

Abreviatura: rVIII-SC: rVIII-Cadena sencilla

Figura 9: Cambios del tiempo medio de residencia, semivida terminal y aclaramiento del FVIII en dependencia de la relación molar de D'D3-FP sobre VWF endógeno (rVIII-SC administrado solo se define como un cambio de 1 vez) en ratas y conejos.

## 5 Descripción detallada

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un factor de von Willebrand (VWF) truncado para su uso en el tratamiento de un trastorno de coagulación de la sangre, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y un Factor VIII (FVIII), en el que el polipéptido es capaz de unirse a dicho FVIII, y en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 50, en el que el polipéptido comprende un resto que prolonga la semivida.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende un polipéptido que comprende un factor de von Willebrand (VWF) truncado, para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre como se define en el primer aspecto, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y un Factor VIII (FVIII), en el que el polipéptido es capaz de unirse a dicho FVIII y en el que además del primer aspecto, la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 0,5. El polipéptido comprende un resto que prolonga la semivida.

El polipéptido que comprende un factor von Willebrand (VWF) truncado se denominará en el presente documento "polipéptido de la invención". El polipéptido de la invención comprende un resto que prolonga la semivida.

### Relaciones

Tal como se describe con más detalle más adelante, el polipéptido de la invención puede ser un monómero, un dímero o una mezcla de los mismos. Cualquier relación molar de acuerdo la invención se refiere a una relación de la concentración molar de la subunidad monomérica del polipéptido de la invención, si realmente está presente como monómero o dímero. Las relaciones se forman sobre la concentración molar del FVIII coadministrado o sobre la concentración molar de las subunidades monoméricas endógenas de VWF. Cualquier relación entre el polipéptido de la invención sobre FVIII en la presente solicitud se refiere a la cantidad de polipéptido de la invención a administrar (en moles) dividida por la cantidad de FVIII a administrar (en moles), a menos que se indique lo contrario. El VWF endógeno es el VWF que está presente de forma natural en el plasma del animal o ser humano a dosificar con el polipéptido de la invención y con el FVIII coadministrado. Por lo general, consiste en una serie de diferentes oligómeros de aproximadamente 2 a 40 subunidades monoméricas de VWF. A menos que se indique otra cosa, cualquier relación del polipéptido de la invención sobre VWF endógeno en la presente solicitud se refiere a la concentración molar en plasma del polipéptido de la invención inmediatamente después de la administración del polipéptido de la invención, dividida por la concentración molar en plasma de las subunidades monoméricas endógenas de VWF (VWF endógena). La concentración molar en plasma del polipéptido de la invención inmediatamente después de la administración del polipéptido de la invención se calcula suponiendo una dilución del polipéptido de la invención administrada directamente después de la administración en un volumen plasmático de 40 ml/kg. Se supone que, para los fines de la invención, la cantidad del polipéptido de la invención inmediatamente después de la administración cuando se administra por vía intravenosa es idéntica a la cantidad administrada.

Según un aspecto de la invención, la relación molar entre el polipéptido de la invención y el VWF endógeno es mayor que 0,5. La concentración de VWF endógeno en el plasma del sujeto a tratar se puede determinar mediante un ELISA o un ensayo de la actividad, por ejemplo, como se describe en los ejemplos. Normalmente, la concentración medida se administrará en U/ml. Este valor puede convertirse en una molaridad como se describe a continuación.

El plasma humano normal (PHN) contiene VWF en una concentración de 1 U/ml o 100 % por definición. Esto corresponde a una concentración de proteínas de aproximadamente 10 µg/ml (Haberichter S.L. y Montgomery R.R., Structure and function of von Willebrand factor; en: Hemostasis and Thrombosis, eds. Marder, Aird, Bennett, Schulman y White, Lippincott Williams & Wilkins 2013, pp 197-207). Según esta concentración de VWF en PHN y un peso molecular del monómero de VWF maduro de aproximadamente 267.500 Da incluyendo un 18-19 % de glicosilación, se puede calcular una concentración molar en plasma de la unidad de monómero de VWF de aproximadamente  $37 \times 10^{-9}$  Mol/l para PHN.

Para el cálculo de las concentraciones molares de las subunidades de VWF de rata o conejo en plasma normal de rata o conejo, respectivamente, se usó un peso molecular de la subunidad monomérica comparable al VWF humano (267.500 Da) junto con una actividad específica comparable asumida (100 U/mg) y las actividades de VWF endógeno medidas en plasma de rata o conejo (consulte también los ejemplos).

La concentración de VWF en la población humana varía de aproximadamente 60 % a aproximadamente 200 % de la concentración de VWF en PHN. En ciertas realizaciones de la invención, la concentración de VWF endógeno se define como la concentración en PHN. En otras realizaciones, la concentración de VWF endógeno se determina en el sujeto a tratar y la dosis del polipéptido se basa en este valor individual.



La relación molar entre el polipéptido de la invención administrada al VWF endógeno es, preferentemente, al menos 2, o al menos 3, o al menos 4, o al menos 5, o al menos 6, o al menos 7, o al menos 8, o al menos 9, o al menos 10, más preferentemente al menos 15, o al menos 20, o al menos 25, o al menos 30, lo más preferentemente al menos 40, o al menos 50, o al menos 75.

- 5 La relación molar entre el polipéptido de la invención a administrar y el VWF endógeno puede variar de 0,5 a 1.000, o de 1 a 500, o de 2 a 400, o de 3 a 300, o de 4 a 250, o de 5 a 200, o de 6 a 150, o de 7 a 140, o de 8 a 130, o de 9 a 120, o de 10 a 110. Preferentemente, la relación molar entre el polipéptido de la invención administrado y el VWF endógeno varía de 3 a 100, o de 4 a 90, o de 5 a 80, o de 6 a 75, o de 10 a 60.

- 10 La relación molar entre el polipéptido de la invención a administrar y el FVIII a administrar es al menos 50, más preferentemente, la relación es mayor que 50, o al menos 75, al menos 100, o más de 100, o al menos 200, más preferentemente al menos 300, o al menos 400, o al menos 500, o al menos 600, o al menos 700, o al menos 800, o al menos 900, o al menos 1.000, o al menos 1.100, o al menos 1.200, o al menos 1.300, o al menos 1.400, o al menos 1.500, o al menos 1.600, o al menos 1.700, o al menos 1.800, o al menos 1.900, o al menos 2.000, o al menos 2.500, o al menos 3.000 o al menos 5.000, o al menos 8.000 o hasta 10.000.

- 15 Preferentemente, la relación molar entre el polipéptido de la invención a administrar y el FVIII a administrar varía de 60 a 2.500, o de 110 a 2.000, o de 150 a 1.500, o de 200 a 1.000.

La Tabla 1 resume varias realizaciones del tratamiento de acuerdo con la presente invención. En una realización dada, ambos requisitos de las columnas 2 y 3, respectivamente, deben cumplirse. Las realizaciones desveladas en el presente documento están de acuerdo con la invención en la medida en que se refieren a una relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar mayor que 50.

20

**Tabla 1:**

| <b>N.º de realización</b> | <b>Relación molar del polipéptido de la invención: VWF endógeno</b> | <b>Relación molar del polipéptido de la invención: FVIII administrado</b> |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|
| 1                         | al menos 1                                                          | al menos 2                                                                |
| 2                         | al menos 1                                                          | al menos 5                                                                |
| 3                         | al menos 1                                                          | al menos 10                                                               |
| 4                         | al menos 1                                                          | al menos 40                                                               |
| 5                         | al menos 1                                                          | al menos 50                                                               |
| 6                         | al menos 1                                                          | al menos 80                                                               |
| 7                         | al menos 1                                                          | al menos 100                                                              |
| 6                         | al menos 1                                                          | al menos 150                                                              |
| 7                         | al menos 1                                                          | al menos 250                                                              |
| 8                         | al menos 1                                                          | al menos 400                                                              |
| 9                         | al menos 1                                                          | al menos 800                                                              |
| 10                        | al menos 1                                                          | al menos 1.000                                                            |
| 11                        | al menos 3                                                          | al menos 2                                                                |
| 12                        | al menos 3                                                          | al menos 5                                                                |
| 13                        | al menos 3                                                          | al menos 10                                                               |
| 14                        | al menos 3                                                          | al menos 40                                                               |
| 15                        | al menos 3                                                          | al menos 50                                                               |
| 16                        | al menos 3                                                          | al menos 80                                                               |
| 17                        | al menos 3                                                          | al menos 100                                                              |
| 18                        | al menos 3                                                          | al menos 150                                                              |
| 19                        | al menos 3                                                          | al menos 250                                                              |
| 20                        | al menos 3                                                          | al menos 400                                                              |
| 21                        | al menos 3                                                          | al menos 800                                                              |
| 22                        | al menos 3                                                          | al menos 1.000                                                            |
| 23                        | al menos 5                                                          | al menos 2                                                                |
| 24                        | al menos 5                                                          | al menos 5                                                                |
| 25                        | al menos 5                                                          | al menos 10                                                               |
| 26                        | al menos 5                                                          | al menos 40                                                               |
| 27                        | al menos 5                                                          | al menos 50                                                               |
| 28                        | al menos 5                                                          | al menos 80                                                               |
| 29                        | al menos 5                                                          | al menos 100                                                              |

(continuación)

| N.º de realización | Relación molar del polipéptido de la invención: VWF endógeno | Relación molar del polipéptido de la invención: FVIII administrado |
|--------------------|--------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------|
| 30                 | al menos 5                                                   | al menos 150                                                       |
| 31                 | al menos 5                                                   | al menos 250                                                       |
| 32                 | al menos 5                                                   | al menos 400                                                       |
| 33                 | al menos 5                                                   | al menos 800                                                       |
| 34                 | al menos 5                                                   | al menos 1.000                                                     |
| 35                 | al menos 10                                                  | al menos 2                                                         |
| 36                 | al menos 10                                                  | al menos 5                                                         |
| 37                 | al menos 10                                                  | al menos 10                                                        |
| 38                 | al menos 10                                                  | al menos 40                                                        |
| 39                 | al menos 10                                                  | al menos 50                                                        |
| 40                 | al menos 10                                                  | al menos 80                                                        |
| 41                 | al menos 10                                                  | al menos 100                                                       |
| 42                 | al menos 10                                                  | al menos 150                                                       |
| 43                 | al menos 10                                                  | al menos 250                                                       |
| 44                 | al menos 10                                                  | al menos 400                                                       |
| 45                 | al menos 10                                                  | al menos 800                                                       |
| 46                 | al menos 10                                                  | al menos 1.000                                                     |
| 47                 | al menos 20                                                  | al menos 2                                                         |
| 48                 | al menos 20                                                  | al menos 5                                                         |
| 49                 | al menos 20                                                  | al menos 10                                                        |
| 50                 | al menos 20                                                  | al menos 40                                                        |
| 51                 | al menos 20                                                  | al menos 50                                                        |
| 52                 | al menos 20                                                  | al menos 80                                                        |
| 53                 | al menos 20                                                  | al menos 100                                                       |
| 54                 | al menos 20                                                  | al menos 150                                                       |
| 55                 | al menos 20                                                  | al menos 250                                                       |
| 56                 | al menos 20                                                  | al menos 400                                                       |
| 57                 | al menos 20                                                  | al menos 800                                                       |
| 58                 | al menos 20                                                  | al menos 1.000                                                     |
| 59                 | al menos 50                                                  | al menos 2                                                         |
| 60                 | al menos 50                                                  | al menos 5                                                         |
| 61                 | al menos 50                                                  | al menos 10                                                        |
| 62                 | al menos 50                                                  | al menos 40                                                        |
| 63                 | al menos 50                                                  | al menos 50                                                        |
| 64                 | al menos 50                                                  | al menos 80                                                        |
| 65                 | al menos 50                                                  | al menos 100                                                       |
| 66                 | al menos 50                                                  | al menos 150                                                       |
| 67                 | al menos 50                                                  | al menos 250                                                       |
| 68                 | al menos 50                                                  | al menos 400                                                       |
| 69                 | al menos 50                                                  | al menos 800                                                       |
| 70                 | al menos 50                                                  | al menos 1.000                                                     |
| 71                 | al menos 50                                                  | al menos 2.000                                                     |
| 72                 | al menos 50                                                  | al menos 4.000                                                     |

Las realizaciones 1 a 72 mostradas en la Tabla 1 pueden combinarse con cualquier otra realización y aspecto de la invención descritos en el presente documento. Más detalles del tratamiento de acuerdo con la invención se describen más adelante.

#### *El VWF truncado*

- 5 El término "Factor de von Willebrand" (VWF), como se usa en el presente documento, incluye VWF de origen natural (nativo), pero también variantes de los mismos que retienen al menos la actividad de unión al FVIII del VWF de origen natural, por ejemplo, variantes de secuencia donde se han insertado, delecionado o sustituido uno o más restos. La actividad de unión a FVIII se determina mediante un ensayo de unión a FVIII-VWF como se describe en el Ejemplo 6.

- 10 El VWF preferido de acuerdo con la presente invención es el VWF humano representado por la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4. El ADNc que codifica la SEQ ID NO: 4 se muestra en la SEQ ID NO: 3.

- El gen que codifica el VWF nativo humano se transcribe en un ARNm de 9 kb que se traduce en un pre-polipéptido de 2813 aminoácidos con un peso molecular estimado de 310.000 Da. El pre-propolipéptido contiene un péptido señal de 22 aminoácidos en N-terminal, seguido de un pro-polipéptido de 741 aminoácidos (aminoácidos 23-763 de SEQ ID NO: 4) y la subunidad madura (aminoácidos 764-2813 de la SEQ ID NO: 4). La escisión del pro-polipéptido de 741 aminoácidos del N-terminal da como resultado un VWF maduro que consiste en 2050 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos del pre-pro-polipéptido del VWF nativo humano se muestra en la SEQ ID NO: 4. A menos que se indique otra cosa, la numeración de aminoácidos de los restos de VWF en la presente solicitud se refiere a la SEQ ID NO: 4, incluso si la molécula de VWF no comprende todos los restos de la SEQ ID NO: 4.
- El propolipéptido del VWF nativo comprende múltiples dominios. Se pueden encontrar diferentes anotaciones de dominio en la literatura (véase, por ejemplo, Zhou y col., (2012) Blood 120(2): 449-458). La siguiente anotación de dominio del prepropolipéptido nativo de VWF se aplica en la presente solicitud:  
D1-D2-D'-D3-A1-A2-A3-D4-C1-C2-C3-C4-C5-C6-CK  
Con referencia a la SEQ ID NO: 4, el dominio D' consiste en los aminoácidos 764-865; y el dominio D3 consiste en los aminoácidos 866-1242.
- La característica de "truncado" significa que el polipéptido no comprende toda la secuencia de aminoácidos del VWF maduro (aminoácidos 764-2813 de SEQ ID NO: 4). Normalmente, el VWF truncado no comprende todos los aminoácidos 764-2813 de la SEQ ID NO: 4, sino solo un fragmento de los mismos. Un VWF truncado también puede denominarse fragmento de VWF o, en plural, fragmentos de VWF.
- El VWF truncado es capaz de unirse a un Factor VIII. Preferentemente, el VWF truncado es capaz de unirse a la forma madura del Factor VIII nativo humano. En otra realización, el VWF truncado es capaz de unirse al Factor VIII de cadena sencilla que consiste en la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5. La unión del VWF truncado al Factor VIII se puede determinar mediante un ensayo de unión de FVIII-VWF como se describe en el Ejemplo 6.
- El VWF truncado de la presente invención comprende, preferentemente, o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con los aminoácidos 776 a 805 de la SEQ ID NO: 4 y es capaz de unirse al FVIII. En realizaciones preferentes, el VWF truncado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, con los aminoácidos 776 a 805 de la SEQ ID NO: 4 y es capaz de unirse al FVIII. Mucho más preferentemente, el VWF truncado comprende o consiste en los aminoácidos 776 a 805 de la SEQ ID NO: 4. A menos que se indique lo contrario en el presente documento, las identidades de secuencia se determinan a lo largo de toda la secuencia de referencia (por ejemplo, los aminoácidos 776 a 805 de la SEQ ID NO: 4).
- El VWF truncado de la presente invención comprende, preferentemente, o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con los aminoácidos 766 a 864 de la SEQ ID NO: 4 y es capaz de unirse al FVIII. En realizaciones preferentes, el VWF truncado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, con los aminoácidos 766 a 864 de SEQ ID NO: 4 y es capaz de unirse al FVIII. Mucho más preferentemente, el VWF truncado comprende o consiste en los aminoácidos 766 a 864 de la SEQ ID NO: 4.
- En otra realización preferida, el VWF truncado consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4 o (b) un fragmento del mismo, siempre que el VWF truncado todavía sea capaz de unirse al FVIII. Más preferentemente, el VWF truncado consiste en (a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, con los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4, o (b) un fragmento de la misma, siempre que el VWF truncado todavía sea capaz de unirse al FVIII. Mucho más preferentemente, el VWF truncado consiste en (a) los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4 o (b) un fragmento del mismo, siempre que el VWF truncado todavía sea capaz de unirse al FVIII.
- Tal como se describe con más detalle más adelante, el polipéptido puede prepararse mediante un procedimiento que usa células que comprenden un ácido nucleico que codifica el polipéptido que comprende el VWF truncado. El ácido nucleico se introduce en las células huésped adecuadas mediante técnicas que se conocen *per se*.
- En una realización preferida, el ácido nucleico en la célula huésped codifica (a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90% con los aminoácidos 1 a 1242 de la SEQ ID NO: 4 o (b) un fragmento de la misma, siempre que el VWF maduro truncado todavía sea capaz de unirse al FVIII. Más preferentemente, el ácido nucleico codifica (a) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, con los aminoácidos 1 a 1242 de la SEQ ID NO: 4, o (b) un fragmento de la misma, siempre que el VWF truncado todavía sea capaz de unirse al FVIII. Mucho más preferentemente, el ácido nucleico codifica (a) los aminoácidos 1 a 1242 de la SEQ ID NO: 4, o (b) un fragmento del mismo, siempre que el VWF truncado todavía sea capaz de unirse al FVIII. Especialmente si el polipéptido de acuerdo con la presente invención es un dímero, el ácido nucleico comprenderá una secuencia que codifica los aminoácidos 1 a 763 del VWF (por ejemplo, SEQ ID NO: 4), incluso si el VWF truncado en el polipéptido no comprende los aminoácidos 1 a 763 del VWF (por ejemplo, SEQ ID NO: 4).

En otras realizaciones, el VWF truncado comprende o consiste en una de las siguientes secuencias de aminoácidos, cada uno de los cuales hace referencia a la SEQ ID NO: 4:

776-805; 766-805; 764-805; 776-810; 766-810; 764-810; 776-815; 766-815; 764-815; 776-820; 766-820; 764-820; 776-825; 766-825; 764-825; 776-830; 766-830; 764-830; 776-835; 766-835; 764-835; 776-840; 766-840; 764-840; 776-845; 766-845; 764-845; 776-850; 766-850; 764-850; 776-855; 766-855; 764-855; 776-860; 766-860; 764-860; 776-864; 766-864; 764-864; 776-865; 766-865; 764-865; 776-870; 766-870; 764-870; 776-875; 766-875; 764-875; 776-880; 766-880; 764-880; 776-885; 766-885; 764-885; 776-890; 766-890; 764-890; 776-895; 766-895; 764-895; 776-900; 766-900; 764-900; 776-905; 766-905; 764-905; 776-910; 766-910; 764-910; 776-915; 766-915; 764-915; 776-920; 766-920; 764-920; 776-925; 766-925; 764-925; 776-930; 766-930; 764-930; 776-935; 766-935; 764-935; 776-940; 766-940; 764-940; 776-945; 766-945; 764-945; 776-950; 766-950; 764-950; 776-955; 766-955; 764-955; 776-960; 766-960; 764-960; 776-965; 766-965; 764-965; 776-970; 766-970; 764-970; 776-975; 766-975; 764-975; 776-980; 766-980; 764-980; 776-985; 766-985; 764-985; 776-990; 766-990; 764-990; 776-995; 766-995; 764-995; 776-1000; 766-1000; 764-1000; 776-1005; 766-1005; 764-1005; 776-1010; 766-1010; 764-1010; 776-1015; 766-1015; 764-1015; 776-1020; 766-1020; 764-1020; 776-1025; 766-1025; 764-1025; 776-1030; 766-1030; 764-1030; 776-1035; 766-1035; 764-1035; 776-1040; 766-1040; 764-1040; 776-1045; 766-1045; 764-1045; 776-1050; 766-1050; 764-1050; 776-1055; 766-1055; 764-1055; 776-1060; 766-1060; 764-1060; 776-1065; 766-1065; 764-1065; 776-1070; 766-1070; 764-1070; 776-1075; 766-1075; 764-1075; 776-1080; 766-1080; 764-1080; 776-1085; 766-1085; 764-1085; 776-1090; 766-1090; 764-1090; 776-1095; 766-1095; 764-1095; 776-1100; 766-1100; 764-1100; 776-1105; 766-1105; 764-1105; 776-1110; 766-1110; 764-1110; 776-1115; 766-1115; 764-1115; 776-1120; 766-1120; 764-1120; 776-1125; 766-1125; 764-1125; 776-1130; 766-1130; 764-1130; 776-1135; 766-1135; 764-1135; 776-1140; 766-1140; 764-1140; 776-1145; 766-1145; 764-1145; 776-1150; 766-1150; 764-1150; 776-1155; 766-1155; 764-1155; 776-1160; 766-1160; 764-1160; 776-1165; 766-1165; 764-1165; 776-1170; 766-1170; 764-1170; 776-1175; 766-1175; 764-1175; 776-1180; 766-1180; 764-1180; 776-1185; 766-1185; 764-1185; 776-1190; 766-1190; 764-1190; 776-1195; 766-1195; 764-1195; 776-1200; 766-1200; 764-1200; 776-1205; 766-1205; 764-1205; 776-1210; 766-1210; 764-1210; 776-1215; 766-1215; 764-1215; 776-1220; 766-1220; 764-1220; 776-1225; 766-1225; 764-1225; 776-1230; 766-1230; 764-1230; 776-1235; 766-1235; 764-1235; 776-1240; 766-1240; 764-1240; 776-1242; 766-1242; 764-1242; 764-1464; 764-1250; 764-1041; 764-828; 764-865; 764-1045; 764-1035; 764-1128; 764-1198; 764-1268; 764-1261; 764-1264; 764-1459; 764-1463; 764-1464; 764-1683; 764-1873; 764-1482; 764-1479; 764-1672; y 764-1874.

En ciertas realizaciones, el VWF truncado tiene una delección interna en relación con el VWF de tipo salvaje maduro. Por ejemplo, los dominios A1, A2, A3, D4, C1, C2, C3, C4, C5, C6 o combinaciones de los mismos pueden deleccionarse y el dominio D', el dominio D3 y el dominio CK se retienen. En realizaciones adicionales, el VWF truncado no comprende los sitios de unión para la glucoproteína plaquetaria Ib $\alpha$  (GPIb $\alpha$ ), el colágeno y/o la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ III (secuencia RGDS dentro del dominio C1). En otras realizaciones, el VWF truncado no comprende el sitio de escisión (Tyr1605-Met1606) para ADAMTS13 que se encuentra en el dominio central A2 del VWF. En otra realización más, el VWF truncado no comprende los sitios de unión para GPIb $\alpha$  y/o no comprende el sitio de unión para colágeno y/o no comprende el sitio de unión para integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ III y/o no comprende el sitio de escisión (Tyr1605-Met1606) para ADAMTS13 que se encuentra en el dominio central A2 del VWF.

En otras realizaciones, el VWF truncado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 %, o al menos un 91 %, o al menos un 92 %, o al menos un 93 %, o al menos un 94 %, o al menos un 95 %, o al menos un 96 %, o al menos un 97 %, o al menos un 98 %, o al menos un 99 %, con una de las secuencias de aminoácidos mencionadas en el párrafo anterior, siempre que el VWF truncado sea capaz de unirse al FVIII.

Un polipéptido de la invención se denomina "dímero" en la presente invención si dos monómeros del polipéptido de la invención están unidos covalentemente. Preferentemente, las dos subunidades monoméricas están unidas covalentemente a través de al menos un puente disulfuro, por ejemplo, por uno, dos, tres o cuatro puentes disulfuro. Los restos de cisteína que forman el al menos un puente disulfuro se ubican, preferentemente, dentro de la porción truncada del VWF del polipéptido de la invención. En una realización, estos restos de cisteína son Cys-1099, Cys-1142, Cys-1222, Cys-1225 o Cys-1227 o combinaciones de los mismos.

Si el polipéptido de la invención es un dímero, el VWF truncado comprende, preferentemente, o consiste en dos polipéptidos, cada uno con una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con los aminoácidos 764 a 1099, los aminoácidos 764 a 1142, los aminoácidos 764 a 1222, los aminoácidos 764 a 1225 o los aminoácidos 764 a 1227 de la SEQ ID NO: 4 y es capaz de unirse al FVIII. En realizaciones preferentes, el VWF truncado comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, a los aminoácidos 764 a 1099, los aminoácidos 764 a 1142, los aminoácidos 764 a 1222, los aminoácidos 764 a 1225 o los aminoácidos 764 a 1227 de la SEQ ID NO: 4 y es capaz de unirse al FVIII. Mucho más preferentemente, el VWF truncado comprende o consiste en los aminoácidos 764 a 1099, los aminoácidos 764 a 1142, los aminoácidos 764 a 1222, los aminoácidos 764 a 1225 o los aminoácidos 764 a 1227 de la SEQ ID NO: 4.

El VWF truncado puede ser uno cualquiera de los fragmentos del VWF desvelados en los documentos WO 2013/106787 A1, WO 2014/198699 A2, WO 2011/060242 A2 o WO 2013/093760 A2.

El término "VWF endógeno" como se usa en el presente documento se refiere a las subunidades monoméricas del

VWF, independiente de su grado de di- u oligomerización. Por ejemplo, en la determinación de las relaciones de acuerdo con la presente invención, una relación formada por un cierto número de moléculas de un polipéptido de la invención dividida por 1.000 moléculas de multímeros decaméricos del VWF sería la misma que una relación formada por el mismo número de moléculas de polipéptidos de la invención dividido por 2.000 multímeros pentaméricos del VWF.

#### *Resto de extensión de la semivida*

Además del VWF truncado, El polipéptido de la invención comprende además un resto que prolonga la semivida. El resto que prolonga la semivida puede ser una secuencia de aminoácidos heteróloga fusionada al VWF truncado. Como alternativa, el resto que prolonga la semivida puede estar conjugado químicamente con el polipéptido que comprende el VWF truncado mediante un enlace covalente diferente de un enlace peptídico.

En determinadas realizaciones de la invención, la semivida del polipéptido de la invención se prolonga por modificación química, por ejemplo, fijación de un resto que prolonga la semivida, tal como polietilenglicol (PEGilación), PEG glicosilado, hidroxiletilalmidón (HESilación), ácidos polisilícicos, polipéptidos similares a elastina, polímeros de heparosano o ácido hialurónico. En otra realización, el polipéptido de la invención se conjuga con un HLEP, tal como albúmina a través de un enlazador químico. El principio de esta tecnología de conjugación se ha descrito de manera ejemplar por Conjuchem LLC (ver, por ejemplo, la patente de los Estados Unidos n.º 7.256.253).

En otras realizaciones, el resto que prolonga la semivida es una proteína que mejora la semivida (HLEP). Preferentemente, la HLEP es una albúmina o un fragmento de la misma. El extremo N de la albúmina se puede fusionar con el extremo C del VWF truncado. Como alternativa, el extremo C de la albúmina se puede fusionar con el extremo N del VWF truncado. Se pueden fusionar una o más HLEP a la parte N o C-terminal del VWF, siempre que no interfieran o eliminen la capacidad de unión del VWF truncado al FVIII.

En una realización, el polipéptido tiene la siguiente estructura:

tVWF-L1-H, [fórmula 1]

en el que tVWF es el VWF truncado, L1 es un enlace químico o una secuencia enlazadora y H es una HLEP.

L1 puede ser un enlace químico o una secuencia enlazadora que consiste en uno o más aminoácidos, por ejemplo, de 1 a 50, 1 a 30, 1 a 20, 1 a 15, 1 a 10, 1 a 5 o 1 a 3 (por ejemplo, 1, 2 o 3) aminoácidos y que pueden ser iguales o diferentes entre sí. Habitualmente, las secuencias enlazadoras no están presentes en la posición correspondiente en el VWF de tipo salvaje. Los ejemplos de aminoácidos adecuados presentes en L1 incluyen Gly y Ser. El enlazador debe ser no inmunogénico y puede ser un enlazador no escindible o escindible. Los enlazadores no escindibles pueden estar compuestos de restos alternos de glicina y serina como se ilustra en el documento WO2007/090584. En otra realización de la invención, el enlazador peptídico entre el resto VWF truncado y el resto albúmina consiste en secuencias peptídicas, que sirven como enlazadores interdominios naturales en proteínas humanas. Preferentemente, tales secuencias peptídicas en su entorno natural están ubicadas cerca de la superficie de la proteína y son accesibles para el sistema inmunológico de modo que se puede asumir una tolerancia natural contra esta secuencia. Se dan ejemplos en el documento WO2007/090584. Se describen secuencias enlazadoras escindibles, por ejemplo, en el documento WO 2013/120939 A1.

Las secuencias de HLEP preferidas se describen a continuación. Del mismo modo, la invención abarca fusiones al "aminoácido N-terminal" exacto o al "aminoácido C-terminal" exacto de la HLEP respectiva, o fusiones a la "parte N-terminal" o "parte C-terminal" de la HLEP respectiva, que incluye delecciones en N-terminal de uno o más aminoácidos de la HLEP. El polipéptido puede comprender más de una secuencia de HLEP, por ejemplo, dos o tres secuencias de HLEP. Estas múltiples secuencias de HLEP pueden fusionarse a la parte C-terminal del VWF en tándem, por ejemplo, como repeticiones sucesivas.

#### *Polipéptidos que mejoran la semivida (HLEP)*

Preferentemente, el resto que prolonga la semivida es un polipéptido que prolonga la semivida (HLEP), más preferentemente, el HLEP se selecciona de entre albúmina o fragmentos de los mismos, región constante de inmunoglobulina y porciones de la misma, por ejemplo, el fragmento Fc, cadenas aleatorias solvatadas con gran volumen hidrodinámico (por ejemplo, XTEN (Schellenberger y col., 2009; Nature Biotechnol. 27: 1186-1190), repeticiones de homo-aminoácidos (HAP) o repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS), afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, transferrina o variantes de la misma, péptido carboxilo terminal (CTP) de la subunidad β de gonadotropina coriónica humana, polipéptidos o lípidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a la albúmina o la región constante de inmunoglobulina.

Un "polipéptido que mejora la semivida" como se usa en el presente documento se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en albúmina, un miembro de la familia de la albúmina, la región constante de inmunoglobulina G y sus fragmentos, la región y los polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a la albúmina, a miembros de la familia de la albúmina, así como a porciones de una región constante de inmunoglobulina. Puede ser una proteína que mejora la semivida de longitud completa descrita en el presente documento (por ejemplo, albúmina, un miembro

de la familia de la albúmina o la región constante de inmunoglobulina G) o uno o más fragmentos de la misma que son capaces de estabilizar o prolongar la actividad terapéutica o la actividad biológica del factor de coagulación. Dichos fragmentos pueden tener 10 o más aminoácidos de longitud o pueden incluir al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 25, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100 o más aminoácidos contiguos de la secuencia HLEP o pueden incluir parte o la totalidad de los dominios específicos del HLEP respectivo, siempre que el fragmento de HLEP proporcione una extensión de la semivida funcional de al menos el 25 % en comparación con el polipéptido respectivo sin el HLEP.

La porción de HLEP del polipéptido de la invención puede ser una variante de un HLEP de tipo salvaje. El término "variantes" incluye inserciones, deleciones y sustituciones, ya sea conservadoras o no conservadoras, donde tales cambios no alteran sustancialmente la actividad de unión a FVIII del VWF truncado.

En particular, las construcciones de fusión de HLEP de VWF propuestas de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de HLEP y fragmentos de HLEP. El HLEP puede derivarse de cualquier vertebrado, especialmente cualquier mamífero, por ejemplo seres humanos, monos, vacas, ovejas o cerdos. Los HLEP no mamíferos incluyen, aunque sin limitación, gallina y salmón.

#### Albúmina como HLEP

Los términos, "seroalbúmina" (HSA) y "albúmina humana" (HA) y "albúmina" (ALB) se usan indistintamente en la presente solicitud. Los términos "albúmina" y "seroalbúmina" son más amplios y abarcan seroalbúmina humana (y fragmentos y variantes de las mismas), así como albúmina de otra especie (y fragmentos y variantes de los mismos).

Como se usa en el presente documento, "albúmina" se refiere colectivamente a un polipéptido de albúmina o secuencia de aminoácidos, o un fragmento o variante de albúmina, que tiene una o más actividades funcionales (por ejemplo, actividades biológicas) de albúmina. En particular, "albúmina" se refiere a la albúmina humana o fragmentos de la misma, especialmente la forma madura de albúmina humana como se muestra en la SEQ ID NO: 6 en el presente documento o albúmina de otros vertebrados o fragmentos de las mismas, o análogos o variantes de estas moléculas o fragmentos de los mismos.

En particular, los polipéptidos propuestos de la invención pueden incluir variantes polimórficas de origen natural de la albúmina humana y fragmentos de albúmina humana. Hablando en general, un fragmento o variante de albúmina tendrá al menos 10, preferentemente al menos 40, más preferentemente más de 70 aminoácidos de longitud.

Las realizaciones preferidas de la invención incluyen variantes de albúmina usadas como un HLEP del polipéptido de la invención con unión mejorada al receptor FcRn. Dichas variantes de albúmina pueden conducir a una semivida plasmática más larga de una proteína de fusión variante de albúmina de VWF truncado en comparación con una fusión de VWF truncado con una albúmina de tipo salvaje.

La porción de albúmina de los polipéptidos de la invención puede comprender al menos un subdominio o dominio de HA o modificaciones conservadoras del mismo.

#### Inmunoglobulinas como HLEP

Las regiones constantes de inmunoglobulina G (IgG) (Fc) son conocidas en la técnica por aumentar la semivida de las proteínas terapéuticas (Dumont J A y col., 2006. BioDrugs 20:151-160). La región constante de IgG de la cadena pesada consiste en 3 dominios (CH1-CH3) y una región bisagra. La secuencia de inmunoglobulina puede derivarse de cualquier mamífero, o de las subclases IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, respectivamente. Los fragmentos de IgG y IgG sin un dominio de unión a antígeno también se pueden usar como HLEP. La porción de polipéptido terapéutico está conectada a la IgG o los fragmentos de IgG preferentemente a través de la región de bisagra del anticuerpo o un enlazador peptídico, que incluso puede ser escindible. Varias patentes y solicitudes de patentes describen la fusión de proteínas terapéuticas con regiones constantes de inmunoglobulina para mejorar la semivida *in vivo* de la proteína terapéutica. Los documentos US 2004/0087778 y WO 2005/001025 describen las proteínas de fusión de dominios Fc o al menos porciones de regiones constantes de inmunoglobulina con péptidos biológicamente activos que aumentan la semivida del péptido, que, de lo contrario, se eliminarían rápidamente *in vivo*. Se describieron proteínas de fusión Fc-IFN- $\beta$  que lograron una mayor actividad biológica, semivida circulante prolongada y mayor solubilidad (documento WO 2006/000448). Se han desvelado proteínas Fc-EPO con una semivida en suero prolongada y una mayor potencia *in vivo* (documento WO 2005/063808), así como fusiones de Fc con G-CSF (documento WO 2003/076567), péptido 1 similar al glucagón (documento WO 2005/000892), factores de coagulación (documento WO 2004/101740) e interleucina-10 (patente de Estados Unidos Núm. 6,403,077), todos con propiedades de mejora de la semivida.

Diversos HLEP que pueden usarse de acuerdo con la presente invención se describen con detalle en el documento WO 2013/120939 A1.

#### N-glucanos y sialilación del polipéptido de la invención

El polipéptido de la invención comprende, preferentemente, N-glucanos, y al menos un 75 %, preferentemente al menos un 85 %, más preferentemente al menos un 90 % de dichos N-glucanos, comprende, en promedio, al menos

un resto de ácido siálico. En realizaciones preferidas, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, de dichos N-glucanos comprenden, en promedio, al menos un resto de ácido siálico. Los inventores descubrieron que los polipéptidos que comprenden fragmentos de VWF altamente sialilados no solo tienen una semivida prolongada, sino que también prolongan la semivida del FVIII coadministrado. En otras palabras, la administración del polipéptido de la invención conduce a una semivida prolongada y/o a un aclaramiento reducido del FVIII coadministrado.

El polipéptido de la invención comprende, preferentemente, N-glucanos, y al menos el 50 % de los grupos sialilo de los N-glucanos de las glucoproteínas son grupos sialilo unidos en  $\alpha$ -2,6. En general, los grupos sialilo terminales pueden unirse a los grupos galactosa mediante un enlace  $\alpha$ -2,3- o mediante un enlace  $\alpha$ -2,6. Normalmente, los N-glucanos del polipéptido de la invención comprenden más grupos sialilo unidos en  $\alpha$ -2,6 que grupos sialilo unidos en  $\alpha$ -2,3. Preferentemente, al menos el 60 % o al menos el 70 % o al menos el 80 % o al menos el 90 % de los grupos sialilo de los N-glucanos son grupos sialilo unidos en  $\alpha$ -2,6. Estas realizaciones se pueden obtener mediante, por ejemplo, coexpresión de  $\alpha$ -2,6-sialiltransferasa humana en células de mamífero.

En una realización, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, de los N-glucanos del polipéptido de la invención comprende al menos un grupo de ácido siálico. En otra realización, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, de los N-glucanos del polipéptido de la invención comprende al menos un grupo de ácido siálico.

En otra realización, menos del 15 %, menos del 12 %, menos del 10 % o menos del 8 % o menos del 6 % o menos del 5 % o menos del 4 % o menos del 3 % o menos del 2 % o incluso menos del 1 % de los N-glucanos del polipéptido de la invención son asialo-N-glucanos, es decir, son N-glucanos que carecen de un grupo de ácido siálico. En otra realización, menos del 15 %, menos del 12 %, menos del 10 % o menos del 8 % o menos del 6 % o menos del 5 % o menos del 4 % o menos del 3 % o menos del 2 % o incluso menos del 1 % de los N-glucanos del polipéptido de la invención son asialo-N-glucanos, es decir, no tienen un grupo de ácido siálico.

Otras realizaciones de la invención comprenden un factor de von Willebrand (VWF) truncado, en el que dicho VWF truncado es capaz de unirse a un Factor VIII (FVIII), y en el que dicha glucoproteína comprende N-glucanos, en el que menos del 35 %, preferentemente, menos del 34 %, preferentemente, menos del 33 %, preferentemente, menos del 32 %, preferentemente, menos del 31 %, preferentemente, menos del 30 %, preferentemente, menos del 29 %, preferentemente, menos del 28 %, preferentemente, menos del 27 %, y preferentemente, menos del 26 %, preferentemente, menos del 25 %, preferentemente, menos del 24 %, preferentemente, menos del 23 %, preferentemente, menos del 22 %, preferentemente, menos del 21 %, preferentemente, menos del 20 %, preferentemente, menos del 19 %, preferentemente, menos del 18 %, preferentemente, menos del 17 %, preferentemente, menos del 16 %, preferentemente, menos del 15 %, preferentemente, menos del 14 %, preferentemente, menos del 13 %, preferentemente, menos del 12 %, preferentemente, menos del 11 %, preferentemente, menos del 10 %, preferentemente, menos del 9 %, preferentemente, menos del 8 %, preferentemente, menos del 7 %, preferentemente, menos del 6 % y, preferentemente, menos del 5 % de dichos N-glucanos comprenden, en promedio, dos o más restos de galactosa terminales y no sialilados.

Todavía otras realizaciones de la invención comprenden un factor de von Willebrand (VWF) truncado, en el que dicho VWF truncado es capaz de unirse a un Factor VIII (FVIII) y en el que dicho VWF truncado comprende N-glucanos, en el que menos del 6 %, preferentemente, menos del 5 %, preferentemente, menos del 4 %, preferentemente, menos del 3 %, preferentemente, menos del 2 % y, preferentemente, menos del 1 % de dichos N-glucanos comprenden, en promedio, tres o más restos de galactosa terminales y no sialilados.

Las realizaciones descritas anteriormente se pueden combinar entre sí. Cualquier porcentaje de N-glucanos mencionado anteriormente, o cualquier indicación del grado de sialilación, deben entenderse como porcentajes o grados promedio, es decir, se refieren a una población de moléculas, no a una sola molécula. Está claro que la glucosilación o sialilación de las moléculas de glucoproteína individuales dentro de una población de glucoproteínas mostrará cierta heterogeneidad.

#### *Dímeros*

Se ha descubierto además que los polipéptidos de la presente invención tienen una alta proporción de dímeros. Por lo tanto, el polipéptido de la invención está presente preferentemente como dímero. En una realización, al menos el 50 % o al menos el 60 % o al menos el 70 % o al menos el 80 % o al menos el 90 % o al menos el 95 % o aproximadamente el 100 % de los polipéptidos están presentes como dímeros. En otra realización, la relación dímero: monómero del polipéptido de la invención es al menos 1,5, preferentemente al menos 2, más preferentemente al menos 2,5 o al menos 3. Lo más preferentemente, todos los polipéptidos de la invención están presentes como dímeros. El uso de dímeros es favorable, ya que el dímero tiene una afinidad mejorada al factor VIII en comparación con el monómero. El contenido de dímero y la relación entre dímero y monómero del polipéptido de la invención se pueden determinar como se describe en el Ejemplo 1.

En una realización, la afinidad del polipéptido de la invención con el factor VIII es mayor que la del VWF nativo humano

con la misma molécula de factor VIII. La afinidad del factor VIII puede referirse al factor VIII nativo humano o a la molécula del factor VIII caracterizada por la SEQ ID NO: 5.

Se ha descubierto que las preparaciones del polipéptido de la presente invención con una alta proporción de dímeros tienen una mayor afinidad por el factor VIII. Tal afinidad incrementada al factor VIII conduce a una estabilización mejorada del factor VIII por los polipéptidos de la presente invención. Alternativamente o en combinación con una proporción aumentada de dímero, también los polipéptidos de acuerdo con la invención con mutaciones dentro del dominio de unión al factor VIII que aumentan la afinidad al factor VIII son realizaciones preferidas de la invención. Se desvelan mutaciones adecuadas, por ejemplo, en el documento WO 2013/120939 A1.

#### *Preparación del polipéptido*

El ácido nucleico que codifica el polipéptido de la invención puede prepararse de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Según la secuencia de ADNc de VWF (SEQ ID NO: 3), se puede diseñar y generar ADN recombinante que codifica las construcciones o polipéptidos del VWF truncado mencionadas anteriormente.

Incluso si el polipéptido que es secretado por las células huésped no comprende los aminoácidos 1 a 763 del VWF, se prefiere que el ácido nucleico (por ejemplo, el ADN) que codifica el precursor intracelular del polipéptido comprenda una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 %, con los aminoácidos 23 a 763 o, preferentemente, con los aminoácidos 1 a 763 de la SEQ ID NO: 4. Mucho más preferentemente, el ácido nucleico (por ejemplo, el ADN) que codifica el precursor intracelular del polipéptido comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los aminoácidos 23 a 763 de la SEQ ID NO: 4 o los aminoácidos 1 a 763 de la SEQ ID NO: 4.

Las construcciones en las que el ADN contiene el marco de lectura abierto completo insertado en la orientación correcta en un plásmido de expresión se pueden usar para la expresión de proteínas. Los vectores de expresión típicos contienen promotores que dirigen la síntesis de grandes cantidades de ARNm correspondientes al ácido nucleico insertado en las células portadoras de plásmido. También pueden incluir una secuencia de origen de replicación que permita su replicación autónoma dentro del organismo huésped y secuencias que aumenten la eficiencia con la que se traduce el ARNm sintetizado. Los vectores estables a largo plazo pueden mantenerse como entidades que se replican libremente mediante el uso de puntos reguladores de, por ejemplo, virus (por ejemplo, las secuencias OriP del genoma del virus de Epstein Barr). También se pueden producir líneas celulares que han integrado el vector en el ADN genómico y, de esta manera, el producto génico se produce de forma continua.

Normalmente, las células a proporcionar se obtienen mediante la introducción del ácido nucleico que codifica un polipéptido de la invención en células huésped de mamífero.

Cualquier célula huésped susceptible al cultivo celular y a la expresión de glicoproteínas, puede utilizarse de acuerdo con la presente invención. En ciertas realizaciones, una célula huésped es de mamífero. Los ejemplos no limitantes de células de mamífero que pueden usarse de acuerdo con la presente invención incluyen la línea de mieloma de ratón BALB/c (NSO/1, N.º ECACC: 85110503); retinoblastos humanos (PER.C6 (CruCell, Leiden, Países Bajos)); línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham y col., J. Gen Virol., 36:59, 1977); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL10); células de ovario de hámster chino +/-DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216, 1980); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243 251, 1980); células de riñón de mono (CV1, ATCC CCL70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma cervical humano (HELA, ATCC, CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL75); células hepáticas humanas (HepG2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather y col., Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68, 1982); células MCR 5; células PS4; células de amniocitos humanos (CAP); y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferentemente, la línea celular es una línea celular de roedores, especialmente una línea celular de hámster como CHO o BHK.

En la técnica se conocen procedimientos adecuados para introducir ácidos nucleicos suficientes para lograr la expresión de una glucoproteína de interés en células huésped de mamífero. Véase, por ejemplo, Gething y col., Nature, 293:620-625, 1981; Mantei y col., Nature, 281:40-46, 1979; Levinson y col. Patentes EP 117,060; y EP 117.058. Para células de mamífero, los procedimientos comunes para introducir material genético en células de mamífero incluyen el procedimiento de precipitación con fosfato de calcio de Graham y van der Erb (Virology, 52:456-457, 1978) o el procedimiento lipofectamine™ (Gibco BRL) de Hawley-Nelson (Focus 15:73, 1993). Axel ha descrito aspectos generales de las transformaciones del sistema huésped de células de mamífero en la patente de Estados Unidos n.º 4,399,216. Para diversas técnicas para introducir material genético en células de mamífero, véase Keown y col., Methods in Enzymology, 1989, Keown y col., Methods in Enzymology, 185:527-537, 1990, y Mansour y col., Nature, 336:348-352, 1988.

Las células se cultivan en condiciones que permiten la expresión del polipéptido. El polipéptido puede recuperarse y purificarse usando procedimientos que son conocidos por el experto en la materia.



*Semivida terminal, TMR y aclaramiento*

Otro aspecto de la invención es el uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente para aumentar la semivida terminal o el tiempo medio de residencia (TMR) o reducir el aclaramiento del factor VIII. Para la evaluación de los datos farmacocinéticos se aplicó un modelo de farmacocinética lineal (eliminación de compuestos a través del compartimento central). En consecuencia, cualquier parámetro farmacocinético utilizado en el presente documento se basa en un modelo de farmacocinética lineal (eliminación de compuestos a través del compartimento central), a menos que se indique lo contrario.

La "semivida"  $T_{1/2}$  (t) a un tiempo t determinado es el tiempo que se tarda en reducir a la mitad la concentración plasmática  $C(t)$  que está presente a tiempo t, es decir,  $C[t + T_{1/2}(t)] = C(t)/2$ . La "semivida terminal" es el límite de  $T_{1/2}$  (t) cuando t tiende al infinito.

La semivida terminal del FVIII administrado aumenta al menos en un 25 %, preferentemente, en al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 75 %, más preferentemente en al menos un 100 %, lo más preferente, en al menos un 150 %, si se coadministra una cantidad eficaz del polipéptido de la presente invención, relativo a la administración del FVIII solo. Otro aspecto de la invención es el uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente para aumentar la semivida terminal del factor VIII.

El término "TMR", como se usa en el presente documento, significa el tiempo promedio que una molécula de fármaco (por ejemplo, el polipéptido de la invención o un FVIII) reside en el cuerpo. En un sistema farmacocinético lineal con aclaramiento constante, el TMR se puede calcular como el área bajo la curva del primer momento (AUMC) dividida por el área bajo la curva de concentración plasmática-tiempo (AUC). La curva del primer momento es el tiempo multiplicado por la concentración plasmática a dicho tiempo.

El TMR del FVIII administrado aumenta en al menos un 25 %, preferentemente, en al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 75 %, más preferentemente en al menos un 100 %, lo más preferente, en al menos un 150 %, si se coadministra una cantidad eficaz del polipéptido de la presente invención, relativo a la administración del FVIII solo. Otro aspecto de la invención es el uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente para aumentar la semivida terminal o el tiempo medio de residencia (TMR) o reducir el aclaramiento del factor VIII.

El término "aclaramiento", como se usa en el presente documento, se refiere a la velocidad a la que el plasma se elimina del fármaco. De manera específica, es la tasa de eliminación actual de un fármaco dividida por su concentración plasmática actual. En un sistema farmacocinético lineal después de una única administración intravenosa, el aclaramiento puede calcularse como la relación de dosis sobre el área bajo la curva de la concentración plasmática-tiempo (AUC), siempre que el aclaramiento sea constante. Cuanto menor sea el aclaramiento, más tiempo llevará hasta que el plasma se aclare del medicamento.

El aclaramiento del FVIII administrado se reduce al menos en un 10 %, preferentemente, en al menos un 25 %, más preferentemente en al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 60 %, lo más preferente, en al menos un 70 %, si se coadministra una cantidad eficaz del polipéptido de la presente invención, relativo a la administración del FVIII solo.

La invención se refiere además a un procedimiento para aumentar el TMR o la semivida, o a un procedimiento para reducir el aclaramiento del Factor VIII *in vivo*, que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un polipéptido como se ha definido anteriormente en el presente documento.

El término "recuperación *in vivo* del FVIII", como se usa en el presente documento, se define como el porcentaje de FVIII, que está en la circulación extrapolada a  $t = 0$  en relación con la cantidad total del FVIII administrado. Como base para el cálculo de la concentración esperada de FVIII en la circulación, se supone en general un volumen de plasma de 40 ml por kg.

La invención se refiere además al uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente en el presente documento, por ejemplo, aunque sin limitaciones, a las realizaciones [01] a [72] detalladas en la Tabla 1 anterior, para aumentar la recuperación *in vivo* del FVIII. La recuperación *in vivo* del FVIII se incrementa en al menos un 5 %, preferentemente, en al menos un 10 %, más preferentemente en al menos un 15 %, 18 %, 20 %, 25 %, incluso más preferentemente en al menos un 26 %, 27 %, 28 %, 29 % o 30 %, más preferentemente en más del 35 % o incluso más del 40 % con respecto a la recuperación de FVIII sin administración del polipéptido.

Un aspecto adicional de la presente invención es un procedimiento para tratar un trastorno de la coagulación de la sangre, que comprende administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de un polipéptido como se ha definido anteriormente en el presente documento.

Un aspecto adicional es el uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente en el presente documento, por ejemplo, mediante, aunque sin limitaciones, las realizaciones [01] a [72] en la Tabla 1 anterior, para reducir la frecuencia de administración del FVIII en un tratamiento de la hemofilia A. La frecuencia de administración intravenosa o subcutánea del FVIII puede reducirse a dos veces por semana. Como alternativa, la frecuencia de la administración intravenosa o subcutánea del FVIII puede reducirse a una vez por semana, o incluso más baja, por ejemplo, a una vez

cada 10 días o una vez cada 14 días. El FVIII puede administrarse dos veces por semana, cada 5 días, una vez a la semana, cada 10 días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas o una vez al mes, o en cualquier intervalo entre dos de los valores anteriores, por ejemplo, de cada cuatro días a cada mes, de cada 10 días a cada dos semanas, o de dos a tres veces por semana, etc.

- 5 Otro aspecto es el uso de un polipéptido como se ha definido anteriormente para reducir la dosis del FVIII a administrar en un tratamiento de la hemofilia A.

#### *Tratamiento del trastorno de coagulación*

Los polipéptidos de la invención son útiles para tratar trastornos de la coagulación que incluyen hemofilia A. El término "hemofilia A" se refiere a una deficiencia en el FVIII de coagulación funcional, que generalmente se hereda.

- 10 El tratamiento de una enfermedad abarca el tratamiento de pacientes ya diagnosticados con cualquier forma de la enfermedad en cualquier etapa clínica o manifestación; el retraso del inicio o evolución o agravamiento o deterioro de los síntomas o signos de la enfermedad; y/o la prevención y/o reducción de la gravedad de la enfermedad.

Un "sujeto" o "paciente" al que se administra un polipéptido de la invención preferentemente es un ser humano. En determinados aspectos, el ser humano es un paciente pediátrico. En otros aspectos, el ser humano es un paciente adulto.

- 15 Las composiciones que comprenden un polipéptido de la invención y, opcionalmente FVIII, se describen en el presente documento. Las composiciones típicamente se suministran como parte de una composición farmacéutica estéril que incluye un vehículo farmacéuticamente aceptable. Esta composición farmacéutica puede estar en cualquier forma adecuada (dependiendo del procedimiento deseado de administración a un paciente).

- 20 Los términos "Factor VIII" y "FVIII" se usan indistintamente en el presente documento y abarcan tanto FVIII derivado de plasma como FVIII recombinante. El FVIII recombinante abarca, sin limitación, FVIII de longitud completa, así como variantes delecionadas o truncadas del dominio B de dos cadenas, así como variantes delecionadas o truncadas del dominio B de cadena sencilla, por ejemplo, las descritas en el documento WO 2004/067566 y otras variantes del FVIII con mutaciones. fuera del dominio B pero que tienen la actividad biológica de FVIII.

- 25 El polipéptido de la invención puede administrarse a un paciente mediante diversas vías, tales como por vía oral, transdérmica, subcutánea, intranasal, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, tópica o localmente. La vía más adecuada para la administración en cualquier caso dado dependerá del polipéptido particular, el sujeto y la naturaleza y gravedad de la enfermedad y la condición física del sujeto. Normalmente, un polipéptido de la invención se administrará por vía intravenosa.

- 30 El polipéptido y el FVIII se administran, preferentemente, por vía intravenosa o subcutánea.

En una primera realización, tanto el polipéptido como el FVIII se administran por vía intravenosa. En una segunda realización, tanto el polipéptido como el FVIII se administran por vía subcutánea.

En otra realización, el FVIII se administra por vía intravenosa y el polipéptido se administra por una vía diferente. En realizaciones adicionales, el polipéptido se administra por vía subcutánea y el FVIII se administra por una vía diferente.

- 35 Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse por vía subcutánea y el FVIII puede administrarse por vía intravenosa.

En realizaciones adicionales, el FVIII se administra por vía subcutánea y el polipéptido se administra por una vía diferente. En realizaciones adicionales, el polipéptido se administra por vía intravenosa y el FVIII se administra por una vía diferente. Por ejemplo, el polipéptido puede administrarse por vía intravenosa y el FVIII puede administrarse por vía subcutánea.

- 40 La determinación del número total de dosis y la duración del tratamiento con un polipéptido de la invención está dentro de las capacidades de los expertos en la materia. La posología del polipéptido de la invención a administrar depende de las concentraciones del FVIII a administrar, la concentración del VWF endógeno en el paciente a tratar, o ambos. Un experto en la técnica puede determinar una posología efectiva en función de las proporciones definidas por los inventores de la presente solicitud, teniendo en cuenta el peso molecular del polipéptido de la invención. Las posologías típicas para FVIII pueden variar de aproximadamente 20 U/kg de peso corporal a aproximadamente 100 U/kg de peso corporal.

- 45 De acuerdo con la presente invención, el paciente que está siendo tratado con el polipéptido de la invención también es tratado con el factor VIII de coagulación sanguínea. El polipéptido de la invención y el factor VIII pueden administrarse de forma simultánea o secuencial, estando ambos modos de administración comprendidos dentro de la expresión "terapia de combinación" y "coadministración". El polipéptido de la invención y el factor VIII pueden administrarse como una mezcla, es decir, dentro de la misma composición, o por separado, es decir, como composiciones separadas.

La concentración de factor VIII en la composición utilizada está típicamente en el intervalo de 10-10.000 UI/ml. En diferentes realizaciones, la concentración de FVIII en las composiciones de la invención está en el intervalo de 10-

8.000 UI/ml, o 10-5.000 UI/ml, o 20-3.000 UI/ml, o 50-1.500 UI/ml, o 3.000 UI/ml, o 2.500 UI/ml, o 2.000 UI/ml, o 1.500 UI/ml, o 1.200 UI/ml, o 1.000 UI/ml, u 800 UI/ml, o 750 UI/ml, o 600 UI/ml, o 500 UI/ml, o 400 UI/ml, o 300 UI/ml, o 250 UI/ml, o 200 UI/ml, o 150 UI/ml, o 125 UI/ml, o 100 UI/ml, o 62,5 UI/ml, o 50 UI/ml, siempre que se cumplan los requisitos con respecto a la relación con respecto al polipéptido de VWF de la invención tal como se define en el presente documento.

"Unidad internacional", o "UI", es una unidad de medida de la actividad de coagulación de la sangre (potencia) del FVIII medida por un ensayo de actividad de FVIII como un ensayo de coagulación de una etapa o un ensayo de actividad de FVIII de sustrato cromogénico utilizando un estándar calibrado contra una preparación estándar internacional calibrada en "UI". Los ensayos de coagulación de una etapa son conocidos en la técnica, tal como se describe en N Lee, Martin L y col., An Effect of Predilution on Potency Assays of FVIII Concentrates, Thrombosis Research (Pergamon Press Ltd.) 30, 511 519 (1983). Principio del ensayo de una etapa: La prueba se ejecuta como una versión modificada del ensayo de Tiempo parcial de tromboplastina (aPTT) activado: La incubación de plasma con fosfolípidos y un activador de superficie conduce a la activación de factores del sistema de coagulación intrínseco. La adición de iones de calcio desencadena la cascada de coagulación. Se determina el tiempo de formación de un coágulo de fibrina medible. El ensayo se ejecuta en presencia de plasma deficiente en factor VIII. La capacidad de coagulación del plasma deficiente se restablece mediante el factor VIII de coagulación incluido en la muestra a analizar. El acortamiento del tiempo de coagulación es proporcional a la cantidad de factor VIII presente en la muestra. La actividad del factor VIII de la coagulación se cuantifica por comparación directa con una preparación estándar con una actividad conocida del factor VIII en unidades internacionales.

Otro ensayo estándar es un ensayo de sustrato cromogénico. Los ensayos de sustrato cromogénico se pueden comprar comercialmente, tal como el kit de prueba coamatic FVIII (Chromogenix-Instrumentation Laboratory SpA V. le Monza 338-20128 Milano, Italia). Principio del ensayo cromogénico: En presencia de calcio y fosfolípidos, el Factor X es activado por el Factor IXa en el Factor Xa. Esta reacción es estimulada por el Factor VIIIa como cofactor. El FVIIIa está formado por bajas cantidades de trombina en la mezcla de reacción del FVIII en la muestra a medir. Cuando se usan las concentraciones óptimas de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos y Factor IXa y una cantidad en exceso de Factor X, la activación del Factor X es proporcional a la potencia del Factor VIII. El Factor X activado libera el pNA cromóforo del sustrato cromogénico S-2765. La liberación de pNA, medida a 405 nm, es, por lo tanto, proporcional a la cantidad de FXa formado, y, por lo tanto, también a la actividad del Factor VIII de la muestra.

#### *Composiciones farmacéuticas*

Las formulaciones terapéuticas del polipéptido de la invención adecuadas en los procedimientos descritos en el presente documento pueden prepararse para almacenamiento como formulaciones liofilizadas o soluciones acuosas mezclando el polipéptido que tiene el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales, que normalmente se usan en la técnica (todos los cuales se denominan en el presente documento "vehículos"), es decir, agentes tamponadores, agentes estabilizantes, conservantes, isotonicificadores, detergentes no iónicos, antioxidantes y otros aditivos varios. Véase, Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición (Osol, ed. 1980). Dichos aditivos no deben ser tóxicos para los receptores a las posologías y concentraciones empleadas.

Los agentes tampón ayudan a mantener el pH en el intervalo que se aproxima a las condiciones fisiológicas. Pueden presentarse a concentraciones que varían de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 50 mM. Los agentes tampón adecuados incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos, tales como tampones de citrato (por ejemplo, mezcla de citrato monosódico-citrato disódico, mezcla de ácido cítrico y citrato trisódico, mezcla de ácido cítrico y citrato monosódico, etc.), tampones de succinato (por ejemplo, mezcla de ácido succínico y succinato monosódico, mezcla de ácido succínico e hidróxido sódico, mezcla de ácido succínico y succinato disódico, etc.), tampones de tartrato (por ejemplo, mezcla de ácido tartárico y tartrato de sodio, mezcla de ácido tartárico y tartrato de potasio, mezcla de ácido tartárico e hidróxido de sodio, etc.), tampones de fumarato (por ejemplo, mezcla de ácido fumárico y fumarato monosódico, mezcla de ácido fumárico-fumarato disódico, mezcla de fumarato monosódico-fumarato disódico, etc.), tampones de gluconato (por ejemplo, mezcla de ácido glucónico y gluconato de sodio, mezcla de ácido glucónico e hidróxido de sodio, mezcla de ácido glucónico y gluconato de potasio, etc.), tampón de oxalato (por ejemplo, mezcla de ácido oxálico y oxalato de sodio, mezcla de ácido oxálico-hidróxido de sodio, mezcla de ácido oxálico-oxalato de potasio, etc.), tampones de lactato (por ejemplo, mezcla de ácido láctico y lactato de sodio, mezcla de ácido láctico e hidróxido de sodio, mezcla de ácido láctico y lactato de potasio, etc.) y tampones de acetato (por ejemplo, mezcla de ácido acético y acetato de sodio, mezcla de ácido acético-hidróxido de sodio, etc.). Adicionalmente, se pueden usar tampones fosfato, tampones de histidina y sales de trimetilamina, tales como Tris.

Se pueden añadir conservantes para retardar el crecimiento microbiano y se pueden añadir en cantidades que varían de 0,2 % -1 % (p/v). Los conservantes adecuados incluyen fenol, alcohol bencílico, metacresol, metilparabeno, propilparabeno, cloruro de octadecildimetilbencilamonio, haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro y yoduro), cloruro de hexametonio y alquilparabenos, tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol y 3-pentanol. Se pueden añadir isotonicificadores a veces conocidos como "estabilizadores" para asegurar la isotonicidad de las composiciones líquidas e incluir alcoholes de azúcar polihídricos, preferentemente alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, tal como glicerina, eritritol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol. Los estabilizadores se refieren a una amplia categoría de excipientes que pueden variar en función de un agente de carga a un aditivo que

- solubiliza el agente terapéutico o ayuda a prevenir la desnaturalización o la adherencia a la pared del recipiente. Los estabilizadores típicos pueden ser alcoholes de azúcar polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos, tales como arginina, lisina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, alanina, ornitina, L-leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc., azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactosa, trehalosa, estaquiosa, manitol, sorbitol, xilitol, ribitol, mioinisol, galactitol, glicerol y similares, incluyendo ciclitos, tales como inositol; polietilenglicol; polímeros de aminoácidos; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol,  $\alpha$ -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; polipéptidos de bajo peso molecular (por ejemplo, péptidos de 10 restos o menos); proteínas, tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos, tales como monosacáridos de polivinilpirrolidona, tal como xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos, tales como lactosa, maltosa, sacarosa y trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrano. Los estabilizadores pueden estar presentes en el intervalo de 0,1 a 10.000 pesos por parte de proteína activa en peso.
- Se pueden añadir tensioactivos o detergentes no iónicos (también conocidos como "agentes humectantes") para ayudar a solubilizar el agente terapéutico, así como para proteger la proteína terapéutica contra la agregación inducida por agitación, que también permite que la formulación se exponga a la superficie de cizallamiento estresada sin causar desnaturalización de la proteína. Los tensioactivos no iónicos adecuados incluyen polisorbatos (20, 80, etc.), polioxámeros (184, 188, etc.), polioles plurónicos, monoéteres de polioxietilensorbitán (TWEEN®-20, TWEEN®-80, etc.). Los tensioactivos no iónicos pueden estar presentes en un intervalo de aproximadamente 0,05 mg/ml a aproximadamente 1,0 mg/ml, o en un intervalo de aproximadamente 0,07 mg/ml a aproximadamente 0,2 mg/ml.
- Los excipientes varios adicionales incluyen agentes de carga (por ejemplo, almidón), agentes quelantes (por ejemplo, EDTA), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metionina, vitamina E) y codisolventes.
- La formulación del presente documento también puede contener un segundo agente terapéutico además de un polipéptido de la invención. A continuación se proporcionan ejemplos de segundos agentes terapéuticos adecuados.
- La pauta posológica puede variar de una vez al mes a diario dependiendo de una serie de factores clínicos, incluyendo el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la sensibilidad del paciente al polipéptido de la invención. En realizaciones específicas, se administra un polipéptido de la invención, dos veces a la semana, cada 5 días, una vez a la semana, cada 10 días, cada dos semanas, cada tres semanas, cada cuatro semanas o una vez al mes, o en cualquier intervalo entre dos de los valores anteriores, por ejemplo de cada cuatro semanas a cada mes, de cada 10 días a cada dos semanas, o de dos a tres veces por semana, etc.
- La posología de un polipéptido de la invención a administrar variará de acuerdo con el polipéptido particular, el sujeto y la naturaleza y la gravedad de la enfermedad, la condición física del sujeto, el régimen terapéutico (por ejemplo, si se usa un segundo agente terapéutico) y la vía de administración seleccionada; la posología apropiada puede determinarla fácilmente un experto en la materia.
- Un experto en la materia reconocerá que la cantidad óptima y el espaciamiento de las dosificaciones individuales de un polipéptido de la invención se determinarán mediante la naturaleza y la extensión de la afección que se está tratando, la forma, la ruta y lugar de administración, y la edad y el estado del sujeto en particular que se está tratando, y que un médico finalmente determinará las dosis apropiadas que se utilizarán. Esta posología puede repetirse tan a menudo como sea apropiado. Si se desarrollan efectos secundarios, la cantidad y/o frecuencia de la dosis puede alterarse o reducirse, de acuerdo con la práctica clínica habitual.
- Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos que se muestran en el listado de secuencias se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2:

| SEQ ID NO: | Comentarios                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | Secuencia de ADN que codifica un polipéptido que comprende los ácidos 1 a 1242 del VWF humano, un enlazador de glicina/serina y albúmina humana; posiciones de nucleótidos (nt):<br>nt 1-6: Sitio de escisión de la enzima de restricción EcoRI<br>nt 32-3757: secuencia de codificación para los aminoácidos 1 a 1242 del VWF<br>nt 3758-3850: secuencia de codificación para el enlazador de glicina/serina<br>nt 3851-5608: secuencia de codificación para la albúmina humana<br>nt 5609-5616: sitio de escisión de la enzima de restricción NotI |
| 2          | Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 1 (forma madura): posiciones de aminoácidos (aa):<br>aa 1-479: Región D'D3 del de VWF (aminoácidos de VWF 764-1242)<br>aa 480-510: enlazador de glicina/serina<br>aa 511-1095: albúmina humana                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 3          | Secuencia de ADN que codifica la forma pre-pro del VWF nativo humano                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 4          | Secuencia de aminoácidos codificada por la SEQ ID NO: 3                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| 5          | Secuencia de aminoácidos de una molécula de Factor VIII de cadena sencilla                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| 6          | Secuencia de aminoácidos de seroalbúmina humana madura                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 7          | Secuencia de aminoácidos de D'D3-His8<br>aa 1-479: Región D'D3 del de VWF (aminoácidos de VWF 764-1242)<br>aa 480-511: enlazador de glicina/serina<br>aa 512-519: marcador de polihistidina                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 8          | Secuencia de aminoácidos de D'D3-CTP<br>aa 1-479: Región D'D3 del de VWF (aminoácidos de VWF 764-1242)<br>aa 480-511: enlazador de glicina/serina<br>aa 512-576: Péptido C-terminal de la subunidad $\beta$ de gonadotropina coriónica humana<br>aa 577-584: marcador de polihistidina                                                                                                                                                                                                                                                               |

Los siguientes ejemplos ilustran la invención a modo de ejemplo.

### Ejemplos

#### Objetivo

- 5 El objetivo fue investigar el impacto de la relación de un polipéptido que comprende un VWF truncado y un resto que prolonga la semivida ("polipéptido de la invención") y FVIII y VWF endógeno, respectivamente, sobre la farmacocinética (PK) del fragmento y FVIII.

Una visión general de los experimentos se da en la siguiente tabla.

Tabla 3:

| N.º de ej. | Animal | Dosis del polipéptido de la invención                                     | Dosis de FVIII | Relación de dosis del polipéptido de la invención: FVIII | Relación de dosis del polipéptido de la invención: VWF endógeno |
|------------|--------|---------------------------------------------------------------------------|----------------|----------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| 1          | Rata   | Creciente (D'D3-FP)                                                       | constante      | creciente                                                | creciente                                                       |
| 2          | Rata   | Creciente (D'D3-FP)                                                       | creciente      | constante                                                | creciente                                                       |
| 3          | conejo | Creciente (D'D3-FP)                                                       | constante      | creciente                                                | creciente                                                       |
| 4          | conejo | Dosis única con diferentes productos de FVIII recombinante                |                |                                                          |                                                                 |
| 5          | Rata   | D'D3 sin resto que prolonga la semivida y D'D3-CTP en una proporción fija |                |                                                          |                                                                 |

- 10 En los ejemplos farmacocinéticos, se calcularon diferentes relaciones molares. Por lo tanto, se hicieron las siguientes suposiciones:

- Los fármacos se diluyen en 40 ml de plasma por kg de peso corporal después de su administración
- Peso molecular del polipéptido de la invención utilizado: Peso molecular D'D3-FP de la subunidad monomérica (incluida glucosilación): 127.000 Da (HLEM = albúmina humana)
- 15 - Peso molecular del FVIII utilizado: Peso molecular de rVIII-cadena sencilla (con glicosilación): 180.000 Da y actividad específica: 11.000 UI/mg
- Peso molecular de la albúmina como parte del D'D3-FP: 66.000 Da
- Se utilizó la misma actividad molar de FVIII de los productos de FVIII recombinante (rVIII-cadena sencilla, Advate®, NovoEight®), calculando las relaciones molares idénticas cuando se administra a las mismas dosis de actividad
- 20 - Peso molecular del monómero del VWF endógeno humano, de rata o de conejo (con 18-19 % de glicosilación): 267.500 Da
- Se supone que el VWF endógeno de rata o conejo tiene la misma actividad específica que el VWF humano, es decir, se supone que una U/ml (o el 100 % de la norma) son 10  $\mu$ g/ml (concentración humana publicada relacionada

- con una U/ml o el 100 % de la norma)
- Actividad de VWF endógeno en plasma de rata medida como  $0,946 \pm 0,181$  U/ml y calculada a  $35,36 \times 10^{-9}$  mol/l de 12 ratas CD usando el kit INNOVANCE® VWF Ac (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Alemania) calibrado contra plasma humano estándar (calibrado contra el estándar respectivo de la OMS, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH)
  - Actividad de VWF endógeno en plasma de conejo medida como  $0,242 \pm 0,056$  U/ml y calculada a  $9,05 \times 10^{-9}$  mol/l de 5 conejos del ejemplo 3 usando el kit INNOVANCE® VWF Ac (Siemens Healthcare Diagnostics GmbH, Eschborn, Alemania) calibrado contra plasma humano estándar (calibrado contra el estándar respectivo de la OMS, Siemens Healthcare Diagnostics GmbH).

## 10 **Ejemplo 1: Prolongación de la farmacocinética de FVIII mediante la coadministración de rVIII-cadena sencilla (dosis constante) y el aumento de las dosis de D'D3-FP en la rata**

### Material y procedimientos

Generación de proteína de fusión de albúmina D'D3 (D'D3-FP):

El casete de expresión para D'D3-FP que consiste en ADNc que codifica los aminoácidos de VWF 1 a 1242, se preparó un enlazador de glicina/serina y el ADNc de la albúmina humana mediante síntesis de genes personalizada (Eurofins Genomics, Ebersberg, Alemania). A través de sitios de restricción flanqueantes (EcoRI, NotI), el casete de expresión se cortó del vector de clonación suministrado y se insertó en un vector pIRESneo3 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) linealizado con EcoRI y NotI. El plásmido de expresión resultante contenía secuencias de nucleótidos que codifican el propéptido VWF, D 'y D3 (aminoácidos de VWF 1 a 1242 de la SEQ ID NO: 4) fusionados a la secuencia de codificación de albúmina a través de una secuencia de codificación de enlazador corto bajo control del promotor de CMV. La secuencia de nucleótidos de la secuencia de codificación se muestra como SEQ ID NO: 1, la secuencia de aminoácidos del D'D3-FP maduro se muestra como SEQ ID NO: 2.

Se utilizó un enfoque similar para generar un plásmido de expresión para una proteína D'D3 etiquetada con His (D'D3 e His8 unida por un enlazador de glicina/serina) y una proteína de fusión D'D3 al péptido C-terminal de la subunidad-β de la gonadotropina coriónica humana, también unida a través de un enlazador de glicina/serina y marcado por 8 histidinas en el extremo C de la proteína de fusión. La secuencia de aminoácidos de D'D3-His8 madura se muestra como la SEQ ID NO: 7 y la secuencia de aminoácidos de D'D3-CTP madura se muestra como la SEQ ID NO: 8.

Los plásmidos de expresión como se ha descrito anteriormente se cultivaron en XL10 Gold (Agilent Technologies) y se purificaron usando protocolos estándar (Qiagen, Hilden, Alemania).

Las células CHO K1 se transfectaron usando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y se cultivaron en medio sin suero (CD-CHO, Invitrogen) en presencia de 500-1000 µg/ml de geneticina. Un plásmido de expresión que codifica PACE/furina (pFu-797) como se describe en el documento WO2007/144173 se cotransfectó para maximizar la eficacia de la escisión del propéptido. Los clones derivados de células individuales se cultivaron y se seleccionaron de acuerdo con su rendimiento de expresión de D'D3-FP cuantificado por un inmunoensayo enzimático específico de albúmina (véase más adelante). La línea celular finalmente seleccionada para la fermentación de D'D3-FP se denominó T2050-CL3.

La producción de D'D3-FP se realizó en biorreactores aplicando un proceso de fermentación en modo de perfusión. El proceso de fermentación para la producción de polipéptidos que contienen D'D3 comenzó con la descongelación de la línea celular T2050-CL3, seguido de la expansión celular en matraces de agitación y, finalmente, un proceso de fermentación en modo de perfusión utilizando el biorreactor Sartorius BioStat B-DCU de 5 l y biorreactores de solo uso BioStat STR de 50 l. BioSeps de 10 l o 200 l (Applikon), respectivamente, se usaron como dispositivos de retención celular. Los medios de cultivo celular fueron PowerCHO3 (Lonza BEP1204) con L-glutamina 8 mM y CuSO<sub>4</sub> 1 µM o ProCHO5 (Lonza BEP1072) con L-glutamina 10 mM y CuSO<sub>4</sub> 1 µM.

Los trenes de siembra en matraces de agitación se realizaron a 37 °C, 7,5 % de CO<sub>2</sub> a una velocidad del agitador de 160 rpm.

El biorreactor de 5 l se inoculó con un VCD objetivo de  $2,5 \times 10^5$  células/ml. Las células se cultivaron en PowerCHO3 con L-glutamina 8 mM y CuSO<sub>4</sub> 1 µM a una temperatura de +37,0 °C, un pH de 7,00 y una saturación de oxígeno del 30 %. Se realizó un cambio de temperatura a +34,0 °C (intervalo evaluado +31 °C a +35 °C) después de tomar las cosechas iniciales del biorreactor a +37 °C. El pH se controló usando CO<sub>2</sub> pulverizado como ácido y NaHCO<sub>3</sub> como base. El caudal de aire superpuesto se ajustó a 0,5 l/min. Se usó un rociador de anillo como una unidad de rociado. La velocidad de agitación fue de 150 rpm con un impulsor de cuchilla de paso doble en modo de tracción descendente.

El biorreactor de 50 l se inoculó con un VCD objetivo de  $3,0 \times 10^5$  células/ml. Las células se cultivaron en medio ProCHO5 con L-glutamina 10 mM y CuSO<sub>4</sub> 1 µM a una temperatura de +37,0 °C, un pH de 6,90 y una saturación de oxígeno del 30 %. Se realizó un cambio de temperatura a +34,0 °C después de la una o dos cosechas iniciales. Control de pH como anteriormente, el caudal de aire superpuesto se ajustó a 2 l/min. Se usó un microrociador como unidad de rociado. La velocidad de agitación fue de 90 rpm con un impulsor de cuchilla de paso doble en modo de tracción descendente.

La perfusión se inició cuando el VCD en el biorreactor fue  $\geq 1,0 \times 10^6$  células/ml. La velocidad de perfusión se fijó a 1,0 volumen/volumen/día. El BioSep se accionó en modo de retrolavado con 5 (10) minutos de tiempo de ejecución y 10 segundos de retrolavado a una entrada de potencia de 7 (30) W (los números entre paréntesis se refieren al biorreactor de 50 l). El perfundido y el sangrado se filtraron en línea y se recogieron en bolsas durante 48 horas a +2 a +8 °C. El VCD se controló mediante sangrado activo usando una sonda de turbidez usando el consumo de glucosa como parámetro con un objetivo de 2 g/l de glucosa. La cosecha y el sangrado se filtraron en línea, el sistema de cosecha que consiste en un filtro desechable y una bolsa desechable se cambió cada dos días.

Para preparar el material para los análisis PK descritos a continuación, las cosechas de proteínas de fusión de albúmina D'D3 se purificaron por cromatografía de exclusión por afinidad y tamaño. Brevemente, la cosecha libre de células del biorreactor se concentró 30 veces usando un sistema TFF (por ejemplo, Pall Centramate 500 S) con una membrana de 30 kD (por ejemplo, Pall Centramate OS030T12). Dicho concentrado se añadió con NaCl y EDTA a una concentración final de NaCl 0,75 M y EDTA 5 mM y se cargó durante la noche en una columna CaptureSelect Human Albumin (Life Technologies) que se equilibró previamente con tampón Tris 20 mM pH 7,4. Después de lavar la columna con tampón de equilibrado, D'D3-FP se eluyó con tampón de elución (Tris 20 mM,  $MgCl_2$  2 M, pH 7,4). El eluato se concentró después 10 veces y se dializó contra Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4 utilizando filtros de ultracentrifuga con un límite de corte de 30 kD (por ejemplo, Amicon. UFC903024). Para separar el dímero D'D3-FP de la porción de monómero, ese material se cargó en una columna Superdex de 200 pg (Código GE Healthcare: 17-1069-01) preequilibrada con Tris 50 mM, NaCl 150 mM, a pH 7,4 y se agruparon las fracciones pico que contenían el dímero D'D3-FP. El área bajo la curva para las fracciones pico de dímero y monómero se utilizó para calcular la relación entre el dímero y el monómero. Se usaron preparaciones de dímero de D'D3-FP para los experimentos farmacocinéticos en los Ejemplos 1-4.

Las proteínas D'D3 marcadas con His se purificaron por cromatografía de afinidad de quelato de Ni y cromatografía de exclusión por tamaño. Brevemente, la cosecha de biorreactor concentrada sin células TFF (véase anteriormente para más detalles) se cargó en una columna preequilibrada (fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM, pH 7,4) de Ni-Sepharose (HisTrap™, GE Healthcare) durante la noche. Después de lavar la columna con fosfato de sodio 20 mM/NaCl 500 mM/Imidazol 30 mM, a pH 7,4, la proteína se eluyó con fosfato de sodio 20 mM + NaCl 500 mM + Imidazol 500 mM, pH 7,4. El eluato se concentró después y se dializó (TBS, pH 7,4) usando un filtro de ultracentrifuga Amicon (véase anteriormente). A continuación, el producto final se cargó en una columna SEC (véase anteriormente), las fracciones pico que contenían el dímero se agruparon y se concentraron hasta aproximadamente 7 mg/ml de DO<sub>280-320</sub>.

#### Animales:

Ratas hembra Crl:CD (Sprague Dawley) en un intervalo de peso de 240-300 g se criaron en Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Internamente, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento, es decir, a 21-22 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar para ratas (Sniff-Versuchsdieten, Soest, Alemania). Se suministró agua corriente *ad libitum*. La cría de animales y los procedimientos de estudio cumplieron con la ley alemana de bienestar animal y las regulaciones de la Unión Europea. El tamaño del grupo fue n = 6, dividido en 2 cohortes. Por consiguiente, se utilizaron n = 3 animales por punto de tiempo.

#### Evaluaciones de laboratorio:

Los artículos de prueba se administraron i.v. mediante una inyección única en la vena lateral de la cola a un volumen total de 3 ml/kg. Las preparaciones de D'D3-FP se aplicaron a niveles de dosis de 50 a 10.000 µg/kg según los valores de albúmina humana, y se administraron conjuntamente con 200 UI/kg de rVIII-cadena sencilla (rVIII-cadena sencilla, actividad cromogénica) después de incubar durante aproximadamente 30 minutos a + 37 °C. Los animales que recibieron solo rVIII-cadena sencilla sirvieron como control (Tabla 4) Esto condujo a relaciones molares administradas de D'D3-FP (calculadas como monómero) sobre rVIII-cadena sencilla que varían entre 7,5 y 1.500, así como a una relación molar de D'D3-FP sobre VWF de rata endógeno (ambos como monómeros para ajustar para los sitios de unión a FVIII) de 0,54 a 107,1.

Se tomaron muestras de sangre retroorbitalmente bajo anestesia a corto plazo a 5 minutos, 3, 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas después de la inyección intravenosa en bolo utilizando un esquema de muestreo alternativo. El perfil PK se tomó de dos cohortes de ratas por grupo. Las muestras de sangre se anticoagularon con citrato de sodio (2 partes de citrato de sodio al 3,13 % + 8 partes de sangre), se procesaron en plasma y se almacenaron a -20 °C para la determinación del antígeno de FVIII y/o albúmina.

La exposición a D'D3-FP se determinó midiendo la parte de albúmina de la construcción usando un ELISA de albúmina humana. En consecuencia, cualquier cantidad o dosis de D'D3-FP se indica como la cantidad o dosis de albúmina. Se detectaron otros polipéptidos que contenían D'D3 con un Elisa específico de D'D3. Los niveles plasmáticos de FVIII:Ag se detectaron con el kit de prueba FVIII Asserachrom ELISA de Stago, S.A.S., Francia.

Las fusiones de D'D3-albúmina se midieron en muestras de plasma en un Elisa con una preparación comercial de anticuerpos policlonales. Para la captura y detección se usaron los mismos anticuerpos, excepto que los anticuerpos

de detección estaban marcados con POD. Brevemente, cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc Immuno-Plate Maxisorp, número de producto 449824) se recubrió con 100 µl de solución de recubrimiento (albúmina-IgG anti-humana de cabra, n.º de catálogo n.º A80-129A, Bethyl Laboratories, diluido a 2 µg/ml en tampón de recubrimiento 50 mM (cápsulas de carbonato de bicarbonato, Producto Sigma N.º: C-3041)) y se incubó +21 °C durante 2-20 horas. Al procedimiento de recubrimiento le siguió 3 Etapas de lavado utilizando tampón de lavado (solución salina tamponada con fosfato con Tween 20, número de producto Sigma: P3563). El bloqueo posterior se realizó durante 1,5 h a +21 °C, con solución de bloqueo (Candor Bioscience, n.º de cat. 110500) seguido de otras 3 etapas de lavado. Posteriormente, se aplicaron 100 µl de cada muestra a la placa y se incubaron durante 1 h a +37 °C. Como estándar, las soluciones de inyección respectivas de las sustancias ensayadas se diluyeron con tampón de muestra (Low Cross Buffer, Candor Bioscience, n.º de catálogo N.º 100500) a concentraciones de 50 ng/ml a 0,78 ng/ml en decrementos de 2 etapas. Las muestras de plasma citrado, tomadas de los animales, también se diluyeron con tampón de muestra al menos 1:30, el tampón de muestra también se aplicó como blanco. Después de otras cuatro etapas de lavado, 100 µl de solución de detección (albúmina-IgG anti-humana marcada con POD, n.º de cat. A80-129P, Bethyl Laboratories, diluidos a 1:40000 en solución de solución de bloqueo) se aplicó a cada pocillo durante 45 minutos a +37 °C. Después de otras cuatro etapas de lavado, se aplicaron 100 µl por pocillo de sustrato cromogénico (TMB, Siemens Healthcare product OUVF, OUVG) durante 20 minutos, seguido de la adición de otra solución de parada de 100 µl (OSFA, Siemens Healthcare) por pocillo. Las placas se midieron en un lector de placas a 450/650 nm.

Los polipéptidos que contienen D'D3 sin albúmina se midieron en muestras de plasma con un ELISA de tipo sándwich anti-D'D3 con anticuerpos anti-D'D3 patentados. Brevemente, cada pocillo de una placa de 96 pocillos (Nunc Immuno-Plate Maxisorp, número de producto 449824) se recubrió con 100 µl de solución de recubrimiento (anticuerpo de captura D'D3 diluido a 1 µg/ml en tampón de recubrimiento 50 mM (cápsulas de carbonato-bicarbonato, Producto Sigma N.º: C-3041)) y se incubaron a +21 °C durante 16 horas. El procedimiento de recubrimiento fue seguido por 3 etapas de lavado usando tampón de lavado (solución salina tampón Tris con Tween 20, número de producto Sigma: T9039). El bloqueo se realizó durante 1,5 h a +21 °C, con solución de bloqueo (Candor Bioscience, n.º de car. 110500), seguido de otras 3 etapas de lavado. Posteriormente, se aplicaron 100 µl de cada muestra a la placa y se incubaron durante 1,5 h a +21 °C. Como estándar, las soluciones de inyección respectivas de las sustancias probadas se diluyeron con tampón de muestra (solución salina tampón Tris con Tween 20, número de producto Sigma: T9039) a concentraciones de 70 ng/ml a 1,1 ng/ml en decrementos de 2 etapas. Las muestras de plasma citrado también se diluyeron con tampón de muestra al menos 1:30, el tampón de muestra también se aplicó como blanco. Después de otras tres etapas de lavado, se aplicaron 100 µl de solución de detección (anticuerpo de detección anti D'D3 marcado con POD (preparación patentada de calidad de investigación), diluido a 0,2 µg/ml en tampón de muestra) a cada pocillo y se incubaron durante 1 h a +21 °C. Después de otras tres etapas de lavado, 100 µl por pocillo de sustrato cromogénico (TMB, número de producto de Siemens Healthcare: OUVF, OUVG) se aplicaron durante 30 minutos, seguido de otra solución de parada de 100 µl (OSFA, Siemens Healthcare) por pocillo. Las placas se midieron en un lector de placas a 450/650 nm.

La estimación del tiempo medio de residencia (TMR), el aclaramiento (CL) y la semivida terminal (t1/2) se realizó por procedimientos no compartimentales.

**Tabla 4: Grupos de tratamiento**

| n.º | Tratamiento        | Dosis de D'D3-FP [mg de albúmina/kg] | Dosis de FVIII [UI de FVIII: C/kg] | Relación molar D'D3-FP*: rVIII-SC | Relación molar D'D3-FP* sobre VWF de rata** |
|-----|--------------------|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------------|
| 1   | rVIII-SC           | -                                    | 200                                | -                                 | -                                           |
| 3   | D'D3-FP y rVIII-SC | 0,05                                 | 200                                | 7,5                               | 0,54                                        |
| 4   | D'D3-FP y rVIII-SC | 0,10                                 | 200                                | 15                                | 1,07                                        |
| 5   | D'D3-FP y rVIII-SC | 0,20                                 | 200                                | 30                                | 2,14                                        |
| 6   | D'D3-FP y rVIII-SC | 0,50                                 | 200                                | 75                                | 5,36                                        |
| 7   | D'D3-FP y rVIII-SC | 1,00                                 | 200                                | 150                               | 10,7                                        |
| 8   | D'D3-FP y rVIII-SC | 2,00                                 | 200                                | 300                               | 21,4                                        |
| 9   | D'D3-FP y rVIII-SC | 5,00                                 | 200                                | 750                               | 53,6                                        |
| 10  | D'D3-FP y rVIII-SC | 10,00                                | 200                                | 1500                              | 107,1                                       |

FVIII:C = actividad cromogénica de FVIII; rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

\*D'D3-FP calculado como monómero

\*\*D'D3-FP calculado como monómero sobre monómero de VWF endógeno para comparar los mismos números de los sitios de unión a FVIII. Para el cálculo del VWF de rata endógeno se asumió la misma actividad específica que el VWF humano, es decir, se supone que una U/ml (o el 100 % de la norma) es de 10 µg/ml (concentración plasmática medida en rata 0,946 U/ml)

## Resultados

D'D3-FP se cuantificó determinando el componente de albúmina, seguido por el cálculo de la concentración de D'D3-FP y todos los datos medidos (hasta 72 h p.a.) estaban muy por encima del límite de detección del ensayo. El ELISA utilizado detectó específicamente albúmina humana. El tiempo medio de residencia (TMR) y el aclaramiento de D'D3-



FP no se vieron afectados por la dosis dada en un intervalo de 0,05 a 10 mg/kg i.v. (Fig. 1 y Tabla 5).

La exposición del FVIII coadministrado (200 UI/kg de actividad cromogénica del FVIII), cuantificado como FVIII:Ag mediante ELISA, se prolongó en presencia de D'D3-FP (Fig. 2 y Tabla 5). Por consiguiente, en el grupo rVIII-cadena sencilla, FVIII: Ag alcanzó el límite de detección de 117 mUI/ml a las 24-32 h p.a., mientras que los grupos tratados conjuntamente con D'D3-FP tuvieron concentraciones plasmáticas aumentadas de forma dependiente de la dosis y no alcanzaron el límite de detección hasta 72 h p.a. en los grupos tratados conjuntamente con 5 y 10 mg/kg.

Ya la dosis más baja de 0,05 mg/kg i.v. de D'D3-FP aumentó el TMR y la semivida terminal y redujo ligeramente el aclaramiento de rVIII-cadena sencilla. Hasta 0,2 mg/kg solo se observaron cambios menores en el TMR, la semivida terminal y el aclaramiento, y de 0,5 a 10 mg/kg se observó un aumento dependiente de la dosis para el TMR y la semivida terminal o disminución del aclaramiento. Por lo tanto, se concluye que en este entorno experimental se necesita un exceso de aproximadamente 75 veces de D'D3-FP (la dosis de 0,5 mg/kg) sobre rVIII-cadena sencilla para prolongar significativamente la semivida de FVIII.

Se supone que a dosis más bajas de D'D3-FP, el VWF endógeno de rata compite con D'D3-FP para unirse al FVIII coadministrado de manera más relevante que a dosis más altas, explicando de este modo la dependencia de la dosis de la dosis de D'D3-FP en FVIII PK.

En la Tabla 5 se presenta el cálculo de los aumentos del TMR y la semivida terminal y las disminuciones del aclaramiento en comparación con rVIII-cadena sencilla administrado solo. La coadministración de rVIII-cadena sencilla con 0,05-0,2 mg/kg de D'D3-FP redujo el aclaramiento y prolongó el TMR y la semivida terminal en menos de un factor de 2. A partir de 0,5 mg/kg (relación molar D'D3-FP sobre rVIII-cadena sencilla = 75; relación molar sobre VWF endógeno de rata = 5,36), se puede ver una reducción del aclaramiento dependiente de la dosis y un aumento del TMR y la semivida terminal. Incluso a una dosis de 10 mg/kg de D'D3-FP (relación molar D'D3-FP sobre rVIII-cadena sencilla = 1500; relación molar sobre VWF endógeno de rata = 107,1), se observó un cambio adicional sobre la dosis más baja, lo que sugiere que la meseta del efecto aún no se había alcanzado.

**Tabla 5:** Parámetros farmacocinéticos de D'D3-FP y FVIII: Ag después de la coadministración de rVIII-cadena sencilla y D'D3-FP en ratas (análisis no compartimental) Dosis D'D3-FP 0,05 a 10 mg/kg, dosis de rVIII-cadena sencilla 200 UI/kg

| n.º             | Tratamiento*              | C <sub>máx</sub> , extrap.<br>µg/ml (D'D3-FP c) UI/ml<br>(FVIII:Ag) | Aclaramiento<br>ml/kg/h        | TMR<br>h                       | Semivida,<br>terminal<br>h     |
|-----------------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>D'D3-FP</b>  |                           |                                                                     |                                |                                |                                |
| 3               | D'D3-FP (0,05) y rVIII-SC | 1,27                                                                | 1,00                           | 56,6                           | 40,2                           |
| 4               | D'D3-FP (0,1) y rVIII-SC  | 2,33                                                                | 1,09                           | 59,5                           | 42,4                           |
| 5               | D'D3-FP (0,2) y rVIII-SC  | 5,15                                                                | 1,07                           | 55,4                           | 39,7                           |
| 6               | D'D3-FP (0,5) y rVIII-SC  | 9,47                                                                | 1,11                           | 64,1                           | 45,5                           |
| 7               | D'D3-FP (1) y rVIII-SC    | 23,80                                                               | 1,29                           | 47,7                           | 34,0                           |
| 8               | D'D3-FP (2) y rVIII-SC    | 36,24                                                               | 1,22                           | 56,4                           | 39,3                           |
| 9               | D'D3-FP (5) y rVIII-SC    | 115,17                                                              | 1,28                           | 46,8                           | 33,8                           |
| 10              | D'D3-FP (10) y rVIII-SC   | 221,84                                                              | 1,25                           | 54,0                           | 38,6                           |
| <b>FVIII:Ag</b> |                           |                                                                     |                                |                                |                                |
| 1               | rVIII-SC                  | 3,36                                                                | 8,25                           | 7,4                            | 5,2                            |
| 3               | D'D3-FP (0,05) y rVIII-SC | 4,41                                                                | 4,93 (1,7 veces <sup>a</sup> ) | 10,5 (1,4 veces <sup>b</sup> ) | 7,1 (1,4 veces <sup>b</sup> )  |
| 4               | D'D3-FP (0,1) y rVIII-SC  | 4,52                                                                | 4,72 (1,7 veces <sup>a</sup> ) | 10,8 (1,5 veces <sup>b</sup> ) | 7,7 (1,5 veces <sup>b</sup> )  |
| 5               | D'D3-FP (0,2) y rVIII-SC  | 4,35                                                                | 4,72 (1,7 veces <sup>a</sup> ) | 11,9 (1,6 veces <sup>b</sup> ) | 8,4 (1,6 veces <sup>b</sup> )  |
| 6               | D'D3-FP (0,5) y rVIII-SC  | 3,93                                                                | 3,78 (2,2 veces <sup>a</sup> ) | 15,1 (2,0 veces <sup>b</sup> ) | 10,5 (2,0 veces <sup>b</sup> ) |

(continuación)

| FVIII:Ag |                         |                                    |                                |                                |                                |
|----------|-------------------------|------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| n.º      | Tratamiento*            | Cmáx, extrap.                      | Aclaramiento                   | TMR                            | Semivida, terminal             |
|          |                         | µg/ml (D'D3-FP c) UI/ml (FVIII:Ag) | ml/kg/h                        | h                              | h                              |
| 7        | D'D3-FP (1) y rVIII-SC  | 4,28                               | 2,83 (2,9 veces <sup>a</sup> ) | 16,7 (2,3 veces <sup>b</sup> ) | 11,0 (2,1 veces <sup>b</sup> ) |
| 8        | D'D3-FP (2) y rVIII-SC  | 4,62                               | 2,18 (3,8 veces <sup>a</sup> ) | 19,9 (2,7 veces <sup>b</sup> ) | 13,9 (2,7 veces <sup>b</sup> ) |
| 9        | D'D3-FP (5) y rVIII-SC  | 4,82                               | 1,85 (4,5 veces <sup>a</sup> ) | 25,8 (3,5 veces <sup>b</sup> ) | 17,6 (3,4 veces <sup>b</sup> ) |
| 10       | D'D3-FP (10) y rVIII-SC | 4,63                               | 1,68 (4,9 veces <sup>a</sup> ) | 29,6 (4,0 veces <sup>b</sup> ) | 20,3 (3,9 veces <sup>b</sup> ) |

rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla  
<sup>a</sup> veces de disminución sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solo  
<sup>b</sup> veces de incremento sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solos  
<sup>c</sup> determinación de albúmina en µg/ml

### Ejemplo 2: Prolongación de la farmacocinética de FVIII mediante la administración conjunta de rVIII-cadena sencilla y D'D3-FP a diferentes dosis (constante en D'D3-FP: rVIII-cadena sencilla ratio) en ratas

#### Material y procedimientos

- 5 Animales: Ratas hembra Crl:CD (Sprague Dawley) en un intervalo de peso de 220-270 g se criaron en Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Internamente, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento, es decir, a 21-22 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar para ratas (Ssniff-Versuchsdieten, Soest, Alemania). Se suministró agua corriente *ad libitum*. La cría de animales y los procedimientos de estudio cumplieron con la ley alemana de bienestar animal y las regulaciones de la Unión Europea.
- 10 El tamaño del grupo fue n = 6, dividido en 2 cohortes. Por consiguiente, se utilizaron n = 3 animales por punto de tiempo.
- 15 Evaluaciones de laboratorio: Los artículos de prueba se administraron i.v. mediante una sola inyección en la vena lateral de la cola a un volumen total de 4,5 ml/kg. Las preparaciones de D'D3-FP se aplicaron a niveles de dosis de 1 a 10 mg/kg en función de los valores de albúmina humana y se coadministraron con 100 a 1000 UI/kg de rVIII-cadena sencilla (rVIII-cadena sencilla, actividad cromogénica) a relaciones de D'D3-FP y rVIII-cadena sencilla constantes después de incubar durante aproximadamente 30 minutos a +37 °C. Los animales que recibieron solo rVIII-cadena sencilla sirvieron como control (Tabla 6).
- 20 Se tomaron muestras de sangre retroorbitalmente con anestesia a corto plazo a los 5 minutos, 3, 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas después de la inyección intravenosa en bolo utilizando un esquema de muestreo alternativo. El perfil PK se tomó de dos cohortes de ratas por grupo. Las muestras de sangre se anticoagularon con citrato de sodio (2 partes de citrato de sodio al 3,13 % + 8 partes de sangre), se procesaron en plasma y se almacenaron a -20 °C para la determinación del antígeno de FVIII y/o albúmina.
- 25 La exposición a D'D3-FP se determinó midiendo la parte de albúmina de la construcción usando un ELISA de albúmina humana. En consecuencia, cualquier cantidad o dosis de D'D3-FP se indica como la cantidad o dosis de albúmina. Los niveles plasmáticos de FVIII:Ag se detectaron con el kit de prueba FVIII Asserachrom ELISA de Stago, S.A.S., Francia.
- La estimación del tiempo medio de residencia (TMR), el aclaramiento (CL) y la semivida terminal (t<sub>1/2</sub>) se realizó por procedimientos no compartimentales.

**Tabla 6:** Grupos de tratamiento

| No | Tratamiento                  | Dosis de D'D3-FP [mg de albúmina/kg] | Dosis de FVIII [UI de FVIII: C/kg] | Relación molar D'D3-FP* sobre rVIII-SC | Relación molar D'D3-FP* sobre VWF de rata** |
|----|------------------------------|--------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------------|
| 1  | rVIII-SC (100)               | -                                    | 100                                | -                                      | -                                           |
| 2  | D'D3-FP (1) y rVIII-SC (100) | 1                                    | 100                                | 300                                    | 10,7                                        |
| 3  | rVIII-SC (300)               | -                                    | 300                                | -                                      | -                                           |
| 4  | D'D3-FP (3) y rVIII-SC (300) | 3                                    | 300                                | 300                                    | 32,1                                        |

(continuación)

| No | Tratamiento                       | Dosis de D'D3-FP<br>[mg de<br>albúmina/kg] | Dosis de FVIII<br>[UI de FVIII:<br>C/kg] | Relación molar<br>D'D3-FP* sobre<br>rVIII-SC | Relación molar D'D3-<br>FP* sobre VWF de<br>rata** |
|----|-----------------------------------|--------------------------------------------|------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 5  | rVIII-SC (1000)                   | -                                          | 1000                                     | -                                            | -                                                  |
| 6  | D'D3-FP (10) y rVIII-SC<br>(1000) | 10                                         | 1000                                     | 300                                          | 107,1                                              |

FVIII:C = actividad cromogénica de FVIII; rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

\*D'D3-FP calculado como monómero

\*\*D'D3-FP calculado como monómero sobre monómero de VWF endógeno para comparar los mismos números de los sitios de unión a FVIII. Para el cálculo del VWF de rata endógeno se asumió la misma actividad específica que el VWF humano, es decir, se supone que una U/ml (o el 100 % de la norma) es de 10 µg/ml (concentración plasmática medida en rata 0,946 U/ml)

### Resultados

D'D3-FP se cuantificó a través de su componente de albúmina y todos los datos medidos (hasta 72 h p.a.) estaban muy por encima del límite de detección del ensayo. El tiempo medio de residencia (TMR) y el aclaramiento de D'D3-FP no se vieron afectados por la dosis dada en el intervalo de 1 a 10 mg/kg i.v. (Fig. 3 y Tabla 7, compare la Fig. 1 y la Tabla 5).

La exposición del FVIII coadministrado (actividad cromogénica de FVIII de 100 a 1000 UI/kg), cuantificado como FVIII:Ag mediante ELISA, se prolongó en presencia de D'D3-FP (Fig. 4 y Tabla 7). Con la dependencia de la dosis de la exposición a FVIII, el grupo de dosis baja de rVIII-cadena sencilla alcanzó el límite de detección de FVIII:Ag de 117 mUI/ml ya a las 24 h p.a., mientras que las dosis más altas alcanzaron el límite de detección más tarde y se observaron perfiles más largos con el tratamiento conjunto con D'D3-FP, especialmente los dos grupos tratados con dosis altas de D'D3-FP no alcanzaron el límite de detección hasta 72 h p.a.

Las características farmacocinéticas de FVIII no se vieron afectadas por la dosis de FVIII. Como se ha indicado anteriormente, la farmacocinética de D'D3-FP tampoco se vio afectada por la dosis de D'D3-FP.

**Tabla 7:** Parámetros farmacocinéticos de D'D3-FP y FVIII: Ag después de la coadministración de rVIII-cadena sencilla y D'D3-FP en ratas (análisis no compartimental) Dosis de D'D3-FP 1 a 10 mg/kg, dosis de rVIII-cadena sencilla 100 a 1000 UI/kg, relación D'D3-FP a rVIII-cadena sencilla constante.

| Tratamiento*                                                     | C <sub>máx</sub> , extrap.<br>µg/ml (D'D3-FP <sup>c</sup> )<br>UI/ml (FVIII:Ag) | Aclaramiento<br>ml/kg/h                 | TMR<br>h                              | Semivida,<br>terminal<br>h            |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| <b>D'D3-FP</b>                                                   |                                                                                 |                                         |                                       |                                       |
| D'D3-FP (1 mg/kg) y rVIII-SC (100 UI/kg)                         | 18,0                                                                            | 1,26                                    | 67,1                                  | 48,0                                  |
| D'D3-FP (3 mg/kg) y rVIII-SC (300 UI/kg)                         | 67,3                                                                            | 1,22                                    | 52,8                                  | 37,7                                  |
| D'D3-FP (10 mg/kg) y rVIII-SC (1000 UI/kg)                       | 234,6                                                                           | 1,09                                    | 58,4                                  | 42,3                                  |
| <b>FVIII:Ag</b>                                                  |                                                                                 |                                         |                                       |                                       |
| rVIII-SC (100 UI/kg) D'D3-FP (1 mg/kg) y rVIII-SC (100 UI/kg)    | 1,50<br>2,03                                                                    | 9,99<br>3,42 (2,9 veces <sup>a</sup> )  | 6,4<br>15,7 (2,5 veces <sup>b</sup> ) | 4,5<br>10,8 (2,4 veces <sup>b</sup> ) |
| rVIII-SC (300 UI/kg) D'D3-FP (3 mg/kg) y rVIII-SC (300 UI/kg)    | 5,45<br>6,04                                                                    | 8,78<br>2,41 (3,6 veces <sup>a</sup> )  | 7,9<br>23,0 (2,9 veces <sup>b</sup> ) | 5,8<br>15,7 (2,7 veces <sup>b</sup> ) |
| rVIII-SC (1000 UI/kg) D'D3-FP (10 mg/kg) y rVIII-SC (1000 UI/kg) | 19,03<br>24,46                                                                  | 12,42<br>1,64 (7,6 veces <sup>a</sup> ) | 6,8<br>30,2 (4,4 veces <sup>b</sup> ) | 5,2<br>20,5 (3,9 veces <sup>b</sup> ) |

rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

<sup>a</sup>veces de disminución sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solo<sup>b</sup>veces de incremento sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solo<sup>c</sup> determinación de albúmina en µg/ml

### Ejemplo 3: Prolongación de la farmacocinética de FVIII mediante la coadministración de rVIII-cadena sencilla (dosis constante) y el aumento de las dosis de D'D3-FP en conejo

#### Material y procedimientos

Animales: Conejos hembra CHB en un intervalo de peso de 2,2-2,8 kg (Bauer, Neuental, Alemania) se alojaron uno por jaula en jaulas de alambre de acero en condiciones estándar de vivienda, es decir, a 21-23 °C y 50 % de humedad relativa en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h. Los animales recibieron agua corriente a voluntad y se alimentaron con pellas de conejo (Deukanin®, Deutsche Tiernahrung Cremer GmbH & Co. KG, Düsseldorf, Alemania). La cría de

animales y los procedimientos de estudio cumplieron con la ley alemana de bienestar animal y las regulaciones de la Unión Europea.

Evaluaciones de laboratorio: Los artículos de prueba se administraron i.v. mediante una inyección única en la vena lateral de la cola, con un tamaño de grupo de  $n = 3$  animales por grupo. Las preparaciones de D'D3-FP se aplicaron a un nivel de dosis de 0,5 a 3 mg/kg en función de los valores de albúmina humana y se coadministraron con 150 UI/kg de rVIII-cadena sencilla (rVIII-cadena sencilla, actividad cromogénica) después de incubar durante aproximadamente 30 minutos a  $+37^{\circ}\text{C}$ . Los animales que recibieron solo rVIII-cadena sencilla sirvieron como control (Tabla 8).

Se tomaron muestras de sangre de la arteria del oído antes de la dosis, 5 y 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48, 72 y 96 h (rVIII-cadena sencilla) o antes de la dosis, 5 minutos, 1, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h (rVIII-cadena sencilla co-tratada con D'D3-FP) después de la inyección intravenosa en bolo. Las muestras de sangre se anticoagularon con citrato de sodio (2 partes de citrato de sodio al 3,13 % + 8 partes de sangre), se procesaron en plasma y se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la determinación del antígeno de FVIII y/o D'D3-FP. La exposición a D'D3-FP se determinó midiendo la parte de albúmina de la construcción usando un ELISA específico de albúmina humana. En consecuencia, cualquier cantidad o dosis de D'D3-FP se indica como la cantidad o dosis de albúmina. Los niveles plasmáticos de FVIII:Ag se detectaron mediante ELISA (Asserachrom Stago, S.A.S., Francia).

La estimación del tiempo medio de residencia (TMR), el aclaramiento (CL) y la semivida terminal ( $t_{1/2}$ ) se realizó por procedimientos no compartimentales.

**Tabla 8:** Grupos de tratamiento

| Tratamiento*       | Dosis de D'D3-FP<br>[mg de albúmina/kg] | Dosis de FVIII<br>[UI de FVIII:<br>C/kg] | Volumen<br>[ml/kg] | Relación molar<br>D'D3-FP* sobre<br>rVIII-SC | Relación molar D'D3-<br>FP* sobre VWF de<br>conejo** |
|--------------------|-----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| rVIII-SC           | -                                       | 150                                      | 0,434              | -                                            | -                                                    |
| D'D3-FP y rVIII-SC | 0,5                                     | 150                                      | 0,519              | 100                                          | 20,9                                                 |
| D'D3-FP y rVIII-SC | 1,5                                     | 150                                      | 0,688              | 300                                          | 62,8                                                 |
| D'D3-FP y rVIII-SC | 3,0                                     | 150                                      | 0,943              | 600                                          | 125,6                                                |

FVIII:C = actividad cromogénica de FVIII; rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

\*D'D3-FP calculado como monómero

\*\*D'D3-FP calculado como monómero sobre monómero de VWF endógeno para comparar los mismos números de los sitios de unión a FVIII. Para el cálculo del VWF endógeno de conejo se asumió la misma actividad específica que el VWF humano, es decir, se supone que una U/ml (o el 100 % de la norma) es 10  $\mu\text{g/ml}$  (concentración plasmática de conejo medida 0,242 U/ml)

## Resultados

En general, los resultados en ratas y conejos son muy comparables. Se hicieron las siguientes observaciones con detalle: D'D3-FP se cuantificó a través de su componente de albúmina; y las mediciones estaban muy por encima del límite de detección del ensayo hasta las 168 h p.a. medidas. El incremento en la dosis en el intervalo de 0,5 a 3 mg/kg no afectó al TMR y el aclaramiento (Fig. 5) o la semivida terminal (Tabla 9).

La exposición del FVIII coadministrado (150 UI/kg de actividad cromogénica del FVIII), cuantificado como FVIII:Ag mediante ELISA, se prolongó significativamente en presencia de D'D3-FP (Fig. 6). En el conejo, los niveles plasmáticos de FVIII: Ag pudieron medirse como máximo hasta 48 h p.a. cuando rVIII-cadena sencilla se administró solo (límite de detección de 117 mUI/ml), y como máximo hasta el último punto de tiempo de 168 h p.a. después del tratamiento conjunto con 3 mg/kg de D'D3-FP. Como en la rata, esta prolongación de la PK dependía de la dosis.

**Tabla 9:** Parámetros farmacocinéticos de D'D3-FP y FVIII: Ag después de la coadministración de rVIII-cadena sencilla y D'D3-FP en conejos (análisis no compartimental) Dosis de D'D3-FP 0,5-3 mg/kg, dosis de rVIII-cadena sencilla 150 UI/kg

| Tratamiento*                   | C <sub>máx</sub> , extrap.<br>$\mu\text{g/ml}$ (D'D3-FP c) UI/ml<br>(FVIII: Ag) | Aclaramiento<br>ml/kg/h | TMR<br>h | Semivida,<br>terminal<br>h |
|--------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|----------|----------------------------|
| <b>D'D3-FP</b>                 |                                                                                 |                         |          |                            |
| D'D3-FP (0,5 mg/kg) y rVIII-SC | 7,0                                                                             | 0,516                   | 181      | 126                        |
| D'D3-FP (1,5 mg/kg) y rVIII-SC | 22,0                                                                            | 0,638                   | 154      | 107                        |
| D'D3-FP (3 mg/kg) y rVIII-SC   | 48,2                                                                            | 0,493                   | 150      | 104                        |

(continuación)

| FVIII:Ag                       |      |                                |                                |                                |
|--------------------------------|------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| rVIII-SC                       | 2,51 | 3,71                           | 23,2                           | 17,3                           |
| D'D3-FP (0,5 mg/kg) y rVIII-SC | 2,59 | 1,79 (2,1 veces <sup>a</sup> ) | 33,0 (1,4 veces <sup>b</sup> ) | 21,2 (1,2 veces <sup>b</sup> ) |
| D'D3-FP (1,5 mg/kg) y rVIII-SC | 2,84 | 1,37 (2,7 veces <sup>a</sup> ) | 47,3 (2,0 veces <sup>b</sup> ) | 32,6 (1,9 veces <sup>b</sup> ) |
| D'D3-FP (3 mg/kg) y rVIII-SC   | 2,38 | 0,98 (3,8 veces <sup>a</sup> ) | 64,2 (2,8 veces <sup>b</sup> ) | 43,9 (2,5 veces <sup>b</sup> ) |

rVIM-SC = rVIII-cadena sencilla  
<sup>a</sup> veces de disminución sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solo  
<sup>b</sup> veces de incremento sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solos  
<sup>c</sup> determinación de albúmina en µg/ml

El cálculo de los incrementos del aclaramiento, el TMR y la semivida terminal de FVIII: Ag se presenta en la Tabla 9. La dosis más baja coadministrada de 0,5 mg/kg (relación molar D'D3-FP sobre rVIII-cadena sencilla = 100) ya prolonga de manera relevante la exposición a FVIII: Ag. El aumento de la dosis de D'D3-FP a 3 mg/kg (relación molar D'D3-FP sobre rVIII-cadena sencilla = 600) condujo a una prolongación de al menos 2,5 veces de FVIII: Ag, el TMR Ag y la semivida terminal y un reducción 2,5 veces del aclaramiento de FVIII:Ag.

#### Ejemplo 4: Prolongación de la farmacocinética de FVIII mediante la coadministración de diferentes productos de FVIII recombinante con D'D3-FP en el conejo

##### Material y procedimientos

Animales: Conejos hembra CHB en un intervalo de peso de 2,2-2,8 kg (Bauer, Neumental, Alemania) se alojaron uno por jaula en jaulas de alambre de acero en condiciones estándar de vivienda, es decir, a 21-23 °C y 50 % de humedad relativa en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h. Los animales recibieron agua corriente a voluntad y se alimentaron con pellas de conejo (Deukanin®, Deutsche Tiernahrung Cremer GmbH & Co. KG, Dusseldorf, Alemania). La cría de animales y los procedimientos de estudio cumplieron con la ley alemana de bienestar animal y las regulaciones de la Unión Europea.

Evaluaciones de laboratorio: Los artículos de prueba se administraron i.v. mediante una inyección única en la vena lateral de la cola, con un tamaño de grupo de n = 3 animales por grupo. Las preparaciones de D'D3-FP se aplicaron a un nivel de dosis de 1,5 mg/kg basado en los valores de albúmina humana, y se coadministraron 150 UI/kg de rVIII-cadena sencilla (rVIII-cadena sencilla, dosificado de acuerdo con la actividad cromogénica medida), 150 UI/kg de Advate® (FVIII recombinante de longitud completa, dosificado de acuerdo con el marcador) o 150 UI/kg de NovoEight® (FVIII recombinante con dominio B delecionado, dosificado de acuerdo con el marcador) después de incubar durante aproximadamente 30 minutos a +37 °C. Los animales que recibieron solo 150 UI/kg de rVIII-cadena sencilla, Advate® o NovoEight® sirvieron como control (Tabla 10).

Se tomaron muestras de sangre de la arteria del oído antes de la dosis, 5 y 30 minutos, 1, 2, 4, 6, 8, 24, 32, 48, 72 y 96 h (productos de FVIII recombinante solos) o antes de la dosis, 5 minutos, 1, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96, 120, 144 y 168 h (productos de FVIII recombinante tratados conjuntamente con D'D3-FP) después de la inyección intravenosa en bolo. Las muestras de sangre se anticoagularon con citrato de sodio (2 partes de citrato de sodio al 3,13 % + 8 partes de sangre), se procesaron en plasma y se almacenaron a -20 °C para la determinación del antígeno de FVIII y/o D'D3-FP. La exposición a D'D3-FP se determinó midiendo la parte de albúmina de la construcción usando un ELISA de albúmina humana. En consecuencia, cualquier cantidad o dosis de D'D3-FP se indica como la cantidad o dosis de albúmina. Los niveles plasmáticos de FVIII:Ag se detectaron mediante ELISA (Asserachrom Stago, S.A.S., Francia).

La estimación del tiempo medio de residencia (TMR), el aclaramiento (CL) y la semivida terminal (t<sub>1/2</sub>) se realizó por procedimientos no compartimentales.

**Tabla 10: Grupos de tratamiento**

| Tratamiento*       | Dosis de D'D3-FP [mg de albúmina/kg] | Dosis de FVIII [UI/kg] | Volumen [ml/kg] | Relación molar D'D3-FP* sobre rFVIII | Relación molar D'D3-FP* sobre VWF de conejo** |
|--------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| rVIII-SC           | -                                    | 150                    | 0,434           | -                                    | -                                             |
| Advate®            | -                                    | 150                    | 1,920           | -                                    | -                                             |
| NovoEight®         | -                                    | 150                    | 1,536           | -                                    | -                                             |
| D'D3-FP y rVIII-SC | 1,5                                  | 150                    | 0,688           | 300                                  | 62,8                                          |
| D'D3-FP y Advate®  | 1,5                                  | 150                    | 2,174           | 300                                  | 62,8                                          |

(continuación)

| Tratamiento*         | Dosis de D'D3-FP [mg de albúmina/kg] | Dosis de FVIII [UI/kg] | Volumen [ml/kg] | Relación molar D'D3-FP* sobre rFVIII | Relación molar D'D3-FP* sobre VWF de conejo** |
|----------------------|--------------------------------------|------------------------|-----------------|--------------------------------------|-----------------------------------------------|
| D'D3-FP y NovoEight® | 1,5                                  | 150                    | 1,790           | 300                                  | 62,8                                          |

rFVIII = factor VIII recombinante; rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

\*D'D3-FP calculado como monómero

\*\*D'D3-FP calculado como monómero sobre monómero de VWF endógeno para comparar los mismos números de los sitios de unión a FVIII. Para el cálculo del VWF endógeno de conejo se asumió la misma actividad específica que el VWF humano, es decir, se supone que una U/ml (o el 100 % de la norma) es 10 µg/ml (concentración plasmática medida en conejo 0,242 U/ml) Supuesto: misma actividad específica de todos los productos, calculando así relaciones molares idénticas

## Resultados

En general, los resultados entre los diferentes productos de FVIII recombinante son muy comparables. Se realizaron con detalle las siguientes observaciones con respecto a la prolongación del FVIII en plasma debido a la coadministración de D'D3-FP:

- 5 La exposición del FVIII coadministrado (150 UI/kg de actividad cromogénica del FVIII), cuantificado como FVIII:Ag mediante ELISA, se prolongó significativamente en presencia de D'D3-FP (Fig. 7). Los niveles plasmáticos de FVIII:Ag se pudieron medir como máximo hasta 32 h p.a. (Advate®) o 48 h p.a. (rVIII-cadena sencilla y NovoEight®) cuando los productos de FVIII recombinante se administraron solos (límite de detección de 117 mUI/ml), y, como máximo,
- 10 hasta el último punto temporal de 96 h p.a. (Advate®) o 120 h p.a. (rVIII-cadena sencilla y NovoEight®) después del tratamiento conjunto con D'D3-FP.

**Tabla 11:** Parámetros farmacocinéticos de D'D3-FP y FVIII:Ag tras la coadministración de diferentes productos de rFVIII y D'D3-FP en conejos (análisis no compartimentales) Dosis de D'D3-FP 1,5 mg/kg, dosis de rFVIII 150 UI/kg

| Tratamiento*         | C <sub>máx</sub> , extrap.<br>µg/ml (D-D3-FP <sup>c</sup> ) UI/ml<br>(FVIII:Ag) | Aclaramiento<br>ml/kg/h        | TMR<br>h                       | Semivida,<br>terminal<br>h     |
|----------------------|---------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| <b>D'D3-FP</b>       |                                                                                 |                                |                                |                                |
| D'D3-FP y rVIII-SC   | 22,0                                                                            | 0,638                          | 154                            | 107                            |
| D'D3-FP y Advate®    | 22,2                                                                            | 0,615                          | 126                            | 86                             |
| D'D3-FP y NovoEight® | 20,2                                                                            | 0,643                          | 137                            | 94                             |
| <b>FVIII:Ag</b>      |                                                                                 |                                |                                |                                |
| rVIII-SC             | 2,51                                                                            | 3,71                           | 23,2                           | 17,3                           |
| Advate®              | 1,52                                                                            | 9,93                           | 17,8                           | 13,4                           |
| NovoEight®           | 2,48                                                                            | 4,42                           | 23,0                           | 18,5                           |
| D'D3-FP y rVIII-SC   | 2,84                                                                            | 1,37 (2,7 veces <sup>a</sup> ) | 47,3 (2,0 veces <sup>b</sup> ) | 32,6 (1,9 veces <sup>b</sup> ) |
| D'D3-FP y Advate®    | 1,34                                                                            | 3,82 (2,6 veces <sup>a</sup> ) | 57,5 (3,2 veces <sup>b</sup> ) | 40,5 (3,0 veces <sup>b</sup> ) |
| D'D3-FP y NovoEight® | 2,22                                                                            | 1,88 (2,4 veces <sup>a</sup> ) | 44,1 (1,9 veces <sup>b</sup> ) | 31,1 (1,7 veces <sup>b</sup> ) |

rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

<sup>a</sup>veces de disminución sobre los datos de cada producto de rFVIII administrado solo<sup>b</sup>veces de incremento sobre los datos de cada producto de rFVIII administrado solo<sup>c</sup>determinación de albúmina en µg/ml

- 15 El cálculo de las disminuciones del aclaramiento, así como de los incrementos del TMR y la semivida terminal de FVIII:Ag se presenta en la Tabla 11. Las disminuciones en el aclaramiento fueron muy comparables para los tres productos, es decir, entre cambios de 2,4 veces a 2,7 veces. En función de la diferencia en el t<sub>1/2</sub> y el TMR de los tres productos de FVIII recombinante solos, el aumento relativo en el TMR y la t<sub>1/2</sub> mostró una mayor variabilidad y varió de 3,0 a 3,2 veces para Advate®, que tiene la farmacocinética más corta cuando se administra solo a 1,7-2,0 veces para rVIII-cadena sencilla y NovoEight®, que mostró una farmacocinética aproximadamente comparable cuando se administró solo. Tomados en conjunto y con una gran visión de las disminuciones relativas en el aclaramiento, la
- 20 prolongación de la farmacocinética de los tres productos de FVIII recombinante fue muy comparable.

**Ejemplo 5: Prolongación de la farmacocinética de FVIII mediante la coadministración de rVIII-cadena sencilla con D'D3-His8, así como la proteína de fusión D'D3-CTP en la rata**

## Material y procedimientos

Animales: Se criaron ratas hembra Crl:CD (Sprague Dawley) en un intervalo de peso de 230-300 g en Charles River Laboratories (Sulzfeld, Alemania). Internamente, los animales se mantuvieron en condiciones estándar de alojamiento, es decir, a 21-22 °C en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h/12 h. Los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta estándar para ratas (Ssniff-Versuchsdieten, Soest, Alemania). Se suministró agua corriente *ad libitum*. La cría de animales y los procedimientos de estudio cumplieron con la ley alemana de bienestar animal y las regulaciones de la Unión Europea.

El tamaño del grupo fue n = 6, dividido en 2 cohortes. Por consiguiente, se utilizaron n = 3 animales por punto de tiempo.

Evaluaciones de laboratorio: Los artículos de prueba se administraron i.v. mediante una sola inyección en la vena lateral de la cola a un volumen total de 3,0 ml/kg. Las proteínas que comprenden D'D3 se aplicaron a un nivel de dosis de 1 mg/kg en función de los valores de la DO y se administraron conjuntamente con 200 UI/kg de rVIII-cadena sencilla (rVIII-cadena sencilla, actividad cromogénica) después de incubar durante aproximadamente 30 minutos a +37 °C. Esto conduce a que la D'D3 comprenda proporciones de proteínas sobre rVIII-cadena sencilla de 78 y sobre VWF endógeno de 5.6 (Tabla 12); los animales que recibieron solo rVIII-cadena sencilla sirvieron como control.

Se tomaron muestras de sangre retroorbitalmente con anestesia a corto plazo a los 5 minutos, 3, 8, 24, 32, 48, 56 y 72 horas después de la inyección intravenosa en bolo utilizando un esquema de muestreo alternativo. El perfil PK se tomó de dos cohortes de ratas por grupo. Las muestras de sangre se anticoagularon con citrato de sodio (2 partes de citrato de sodio al 3,13 % + 8 partes de sangre), se procesaron en plasma y se almacenaron a -20 °C para la determinación del antígeno FVIII y/o la proteína de fusión D'D3.

La exposición a la proteína de fusión D'D3-His8 y D'D3-CTP se determinó mediante un procedimiento ELISA usando D'D3-FP como estándar (véase anteriormente). Los niveles plasmáticos de FVIII:Ag se detectaron con el kit de prueba FVIII Asserachrom ELISA de Stago, S.A.S., Francia.

La estimación del tiempo medio de residencia (TMR), el aclaramiento (CL) y la semivida terminal (t<sub>1/2</sub>) se realizó mediante procedimientos de un compartimento.

**Tabla 12: Grupos de tratamiento**

| No | Tratamiento          | Dosis de proteína D'D3-His8 y D'D3-CTP [mg/kg]* | Dosis de FVIII [UI de FVIII: C/kg] | Relación molar D'D3-His8 y proteína D'D3-CTP** sobre rVIII-SC | Relación molar de D'D3-His8 y proteína D'D3-CTP** sobre VWF de rata*** |
|----|----------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 1  | rVIII-SC             | -                                               | 200                                | -                                                             | -                                                                      |
| 2  | D'D3-His8 y rVIII-SC | 1                                               | 200                                | 78                                                            | 5,6                                                                    |
| 4  | D'D3-CTP y rVIII-SC  | 1                                               | 200                                | 78                                                            | 5,6                                                                    |

FVIII:C = actividad cromogénica de FVIII; rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla

\*Dosis de proteína D'D3-His8 y D'D3-CTP basada en la DO

\*\*Dosis de proteína D'D3-His8 y D'D3-CTP corregida por peso molecular

\*\*\*D'D3-His8 y D'D3-CTP calculados como monómero sobre monómero sobre el monómero de VWF endógeno para comparar los mismos números de sitios de unión a FVIII. Para el cálculo del VWF de rata endógeno se asumió la misma actividad específica que el VWF humano, es decir, se supone que una U/ml (o el 100 % de la norma) es de 10 µg/ml (concentración plasmática medida en rata 0,946 U/ml)

## Resultados

Todos los datos medidos (hasta 72 h p.a.) estaban muy por encima del límite de detección del ensayo. El TMR, la t<sub>1/2</sub> y el aclaramiento sugieren que D'D3-CTP tuvo una semivida más larga y un tiempo de residencia medio, así como un aclaramiento reducido en comparación con D'D3-8His, pero incluso D'D3-8His mostró un TMR y una semivida ligeramente más largos así como un aclaramiento reducido (Tabla 13).

Los parámetros farmacocinéticos del FVIII coadministrado (200 UI/kg de actividad cromogénica del FVIII), cuantificado como FVIII:Ag mediante ELISA, se mejoraron en presencia de ambas proteínas D'D3 (Tabla 13). La diferencia en la exposición de las proteínas que comprenden D'D3 se traduce en la diferencia en la exposición de FVIII:Ag, es decir, D'D3-CTP condujo a una exposición a FVIII:Ag mayor que D'D3-8His.

**Tabla 13:** Parámetros farmacocinéticos de las proteínas que comprenden D'D3 y FVIII:Ag tras la coadministración de rVIII-cadena sencilla y proteínas D'D3 en ratas (análisis no compartimentales). Dosis de D'D3 que comprende 1 mg/kg de proteína, dosis de rVIII-cadena sencilla 200 UI/kg.

|                    | <sup>máx,</sup><br>µg/ml (proteína de fusión)<br><sub>c</sub> | ml/kg/h           | h                 | h                 |
|--------------------|---------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| D'D3-His8 y rVIII- | 31,6                                                          | 6,80              | 10,3              | 7,2               |
| D'D3-CTP y rVIII-  | 19,7                                                          | 2,43              | 34,9              | 26,9              |
| rVIII-SC           | 3,02                                                          | 6,45              | 10,3              | 7,1               |
| D'D3-His8 y rVIII- | 3,84                                                          | 4,61 (1,4 veces ) | 11,3 (1,1 veces ) | 7,8 (1,1 veces )  |
| D'D3-CTP y rVIII-  | 3,35                                                          | 3,58 (1,8 veces ) | 16,7 (1,6 veces ) | 11,6 (1,6 veces ) |

rVIII-SC = rVIII-cadena sencilla  
<sup>a</sup> veces de disminución sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solo  
<sup>b</sup> veces de incremento sobre los datos de rVIII-cadena sencilla administrado solos  
<sup>c</sup> determinación basada en la DO

### Conclusión de los resultados del estudio PK

Estos estudios demostraron que la coadministración de D'D3-FP con productos de FVIII prolongaba el TMR en plasma de FVIII:Ag y la semivida y disminuía el aclaramiento de FVIII:Ag independiente de si la molécula de FVIII contenía el dominio B es un dominio B deletado o está presente como un producto de una o dos cadenas. Esta prolongación solo dependía de la proporción de D'D3-FP sobre FVIII coadministrado, así como sobre VWF endógeno.

Los efectos en la rata tienden a ser más fuertes que en el conejo, cuando el aumento de la semivida terminal y el TMR o la reducción del aclaramiento se representan sobre la relación molar de D'D3-FP sobre rVIII-Cadena sencilla administrado (Fig. 8), así como VWF endógeno (Fig. 9). En cuanto a la relación molar sobre rVIII-cadena sencilla, en la rata, relaciones ≤30 veces conducen a cambios menores que el doble, mientras que se pueden lograr efectos más favorables a relaciones > 50 veces, y se puede lograr una mejora igual o superior a 2,7 veces a partir de relaciones aproximadamente 300 veces. Incluso relaciones superiores a 750 o preferentemente 1000 o más preferentemente 1250 o incluso más preferentemente 1500 conducen a una mejora aún mayor de la semivida terminal y el TMR o la reducción del aclaramiento.

En cuanto a las relaciones sobre el VWF endógeno, las diferencias específicas de especie son mayores, lo que sugiere que se puede lograr una mejora de 2 veces en la rata (y en seres humanos asumiendo niveles de VWF endógeno similares a los de las ratas) en aproximadamente relaciones ≥5 y en el conejo a aproximadamente > 60. se lograron mejoras por tres veces en la rata en proporciones de aproximadamente > 50.

Sorprendentemente, podría demostrarse que D'D3-His8 que no tiene un resto que prolonga la semivida también prolongó ligeramente los parámetros farmacocinéticos de FVIII cuando se administró en una relación de 78 sobre el FVIII coadministrado y/o una relación de 5,6 sobre el VWF endógeno. Se obtuvo una mejor prolongación de la semivida del FVIII y el tiempo medio de residencia y un aclaramiento reducido en estas proporciones con una proteína de fusión D'D3-CTP que comprende el péptido C-terminal de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana como un resto que prolonga la semivida en lugar de la albúmina comprendida en D'D3-FP.

Dado que en la rata y el conejo (en contraste con los pacientes con hemofilia A humana), el FVIII administrado y endógeno humano compite con los sitios de unión de D'D3-FP y VWF, cabe esperar que el efecto sobre el FVIII en el paciente con hemofilia A humana sea aún más fuerte.

### Ejemplo 6: Determinación de la afinidad del FVIII con el dímero y el monómero del fragmento de VWF

Se expresó un fragmento de VWF (1-1242) fusión de albúmina (D'D3-FP) en un biorreactor; después de la purificación como se ha descrito anteriormente y el aislamiento del monómero y el dímero, la afinidad del FVIII con estas preparaciones se evaluó mediante resonancia de plasmón superficial mediante un instrumento Biacore (T200, GE Healthcare).

Un anticuerpo anti-albúmina (MA1-20124, Thermo Scientific) se acopló covalentemente a través de su extremo N a un chip CM 3 activado por NHS (N-hidroxisuccinimida) y EDC (clorhidrato de etanolamina), ambos contenidos en el kit de acoplamiento de amina (BR1000-50) de GE Healthcare. Para la inmovilización, se diluyeron 3 µg/ml del anticuerpo en tampón de acetato de sodio (10 mM, pH 5,0) y la solución de anticuerpo se hizo fluir sobre el chip durante 7 minutos a un caudal de 10 µl/min. Después del procedimiento de inmovilización, los filamentos de dextrano no acoplados se saturaron haciendo fluir una solución de etanolamina (1 M, pH 8,3) sobre el chip durante 5 minutos (a una velocidad de flujo de 10 µl/min). El objetivo de saturar la celda de flujo era minimizar la unión inespecífica de los analitos al chip. Se estableció una celda de flujo de referencia saturando una celda de flujo vacía con etanolamina usando el mismo procedimiento que anteriormente.



Las proteínas D'D3-FP diméricas y monoméricas, respectivamente, se inmovilizaron al anticuerpo anti-albúmina acoplado covalentemente mediante un flujo de las proteínas D'D3-FP (5 µg/ml) sobre el chip durante 3 minutos (caudal de 10 µl/min). La masa capturada de D'D3-FP dimérico fue 335 UR y para D'D3-FP 147 monomérico UR, suponiendo un sitio de unión tanto en el monómero como en el dímero DE D'D3-FP para FVIII.

- 5 Para crear curvas de unión para FVIII, la preparación de cada proteína D'D3-FP se diluyó en tampón de carrera (HBS-P+: HEPES 0,1 M, NaCl 1,5 M y 0,5 % v/v de tensioactivo P20, pH 7,4; código de producto BR100671, GE Healthcare) a concentraciones de 0,25 nM, 0,5 nM, 1 nM, 3 nM y 4 nM. Al realizar una cinética de ciclo único, las muestras con concentraciones ascendentes de cada dilución se pasaron sobre el chip durante 2 minutos (caudal de 30 µl/min), seguido de un tiempo de disociación de 10 minutos con tampón de carrera HBS-P+. Todas las mediciones se realizaron dos veces. La temperatura para el procedimiento de medición se ajustó a +25 °C.

- 10 Los parámetros de unión se calcularon utilizando el software BiaEvaluation. Los procedimientos de ajuste de las curvas se basaron en ecuaciones de Langmuir. Los datos de entrada para los cálculos fueron la masa molar del analito FVIII (rVIII-cadena sencilla), otros parámetros como la UR máxima y las pendientes se extrajeron automáticamente de las curvas de asociación y disociación ajustadas. Las salidas del software BiaEvaluation son las constantes de velocidad de asociación y las constantes de velocidad de disociación, a partir de las cuales se calcularon las constantes de afinidad. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

Tabla 12: Datos de afinidad del FVIII para dímero y monómero de D'D3-FP

| Preparación de D'D3-FP | ka [1/Ms] | kd [1/s] | KD [M]   |
|------------------------|-----------|----------|----------|
| Dímero de D'D3-FP      | 2,33E+07  | 1,37E-03 | 5,90E-11 |
| Monómero de D'D3-FP    | 4,41 E+07 | 3,96E-03 | 8,99E-11 |

- 20 La constante de velocidad de asociación aumentó ligeramente para rVIII-cadena sencilla al D'D3-FP monomérico, mientras que la constante de velocidad de disociación de rVIII-cadena sencilla al dímero de D'D3-FP fue tres veces más lenta que la del monómero. El cociente de la constante de velocidad de disociación y la constante de velocidad de asociación indica la afinidad de rVIII-cadena sencilla por D'D3-FP. El D'D3-FP dimérico, por lo tanto, muestra una mayor afinidad por el FVIII en comparación con el monómero de D'D3-FP.

#### LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> CSL Behring Recombinant Facility AG
- 25 <120> Polipéptidos de factor de von Willebrand truncados para el tratamiento de la hemofilia
- <130> A222
- <150> EP 15168930.4
- <151> 22/05/2015
- 30 <150> EP 16163239.3
- <151> 31/03/2016
- <160> 8
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 35 <211> 5616
- <212> ADN
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> ADN que codifica la construcción del fragmento de VWF-enlazador G/S-albúmina
- <220>
- 40 <221> misc\_feature
- <222> (1)..(6)
- <223> Sitio de escisión de la enzima de restricción EcoRI
- <220>
- 45 <221> misc\_feature
- <222> (32)..(3757)
- <223> secuencia de codificación para los aminoácidos 1 a 1242 del VWF
- <220>
- <221> misc\_feature

|    |                                                                     |
|----|---------------------------------------------------------------------|
|    | <222> (3758)..(3850)                                                |
|    | <223> secuencia de codificación para el enlazador de glicina/serina |
|    | <220>                                                               |
| 5  | <221> misc_feature                                                  |
|    | <222> (3851)..(5608)                                                |
|    | <223> secuencia de codificación para la albúmina humana             |
|    | <220>                                                               |
|    | <221> misc_feature                                                  |
|    | <222> (5609)..(5616)                                                |
| 10 | <223> Sitio de escisión de la enzima de restricción NotI            |
|    | <400> 1                                                             |

gaattccgc agccctcatt tgcaggggaa gatgattcct gccagatttg ccggggtgct 60  
 gcttgctctg gccctcattt tgccaggac cctttgtgca gaaggaaactc gcggcaggtc 120  
 atccacggcc cgatgcagcc ttttcggaag tgacttcgtc aacacctttg atgggagcat 180  
 gtacagcttt gcgggatact gcagttacct cctggcaggg ggctgccaga aacgctcctt 240  
 ctcgattatt ggggacttcc agaatggcaa gagagtgagc ctctccgtgt atcttgggga 300  
 atttttgac atccatttgt ttgtcaatgg taccgtgaca cagggggacc aaagagtctc 360  
 catgccctat gcctccaaag ggctgtatct agaaactgag gctgggtact acaagctgtc 420  
 cggtagaggcc tatggctttg tggccaggat cgatggcagc ggcaactttc aagtctgtct 480  
 gtcagacaga tacttcaaca agacctgcgg gctgtgtggc aactttaaca tctttgctga 540  
 agatgacttt atgaccaag aaggacctt gacctcggac ccttatgact ttgccaactc 600  
 atgggctctg agcagtggag aacagtggg tgaacgggca tctctccca gcagctcatg 660  
 caacatctcc tctggggaaa tgcagaaggg cctgtgggag cagtgccagc ttctgaagag 720  
 cacctcggtg ttgcccgtc gccaccctct ggtggacccc gagccctttg tggccctgtg 780  
 tgagaagact ttgtgtagat gtgctggggg gctggagtgc gcctgccctg ccctcctgga 840  
 gtacgcccgg acctgtgcc aggagggaaat ggtgctgtac ggctggaccg accacagcgc 900  
 gtgcagccca gtgtgccctg ctggtatgga gtataggcag tgtgtgtccc cttgcgccag 960  
 gacctgccag agcctgcaca tcaatgaaat gtgtcaggag cgatgcgtgg atggctgcag 1020  
 ctgccctgag ggacagctcc tggatgaagg cctctgcgtg gagagcaccg agtgtccctg 1080  
 cgtgcattcc ggaaagcgt accctcccgg cacctccctc tctcgagact gcaacacctg 1140  
 catttgccga aacagccagt ggatctgcag caatgaagaa tgtccagggg agtgccttgt 1200  
 cacaggtaaa tcacacttca agagctttga caacagatac ttcaccttca gtgggatctg 1260  
 ccagtacctg ctggcccggg attgccagga ccactccttc tccattgtca ttgagactgt 1320

ccagtgtgct gatgaccgcg acgctgtgtg caccgctcc gtcaccgtcc ggctgcctgg 1380  
cctgcacaac agccttgtga aactgaagca tggggcagga gttgccatgg atggccagga 1440  
cgtccagctc cccctcctga aagggtacct ccgcatccag catacagtga cggcctccgt 1500  
gcgctcagc tacggggagg acctgcagat ggactgggat ggccgcggga ggctgttgt 1560  
gaagctgtcc cccgtctatg ccgggaagac ctgcggcctg tgtgggaatt acaatggcaa 1620  
ccagggcgac gacttcctta cccctctgg gctggcggag ccccggttg aggacttcgg 1680  
gaacgcctgg aagctgcacg gggactgcca ggacctgcag aagcagcaca gcgatccctg 1740  
cgccctcaac ccgcgcatga ccaggttctc cgaggaggcg tgcgcggtcc tgacgtcccc 1800  
cacattcgag gcctgccatc gtgccgtcag cccgctgccc tacctgcgga actgccgcta 1860  
cgacgtgtgc tctgtctgg acggccgcga gtgcctgtgc ggccgcttg ccagctatgc 1920  
cgcggcctgc gcggggagag gcgtgcgct gcgtggcgc gagccaggcc gctgtgagct 1980  
gaactgcccg aaaggccagg tgtacctgca gtgcgggacc cctgcaacc tgacctgccg 2040  
ctctctctt taccggatg aggaatgcaa tgaggcctgc ctggagggt gcttctgcc 2100  
cccagggtc tacatggatg agagggggga ctgcgtgccc aaggcccagt gccctgtta 2160  
ctatgacgt gagatctcc agccagaaga catcttctca gaccatcaca ccatgtgcta 2220  
ctgtgaggat ggcttcatgc actgtacat gagtggagtc cccggaagct tgctgcctga 2280  
cgctgtctc agcagtcccc tgttcatcg cagcaaaagg agcctatcct gtcggcccc 2340  
catgtcaag ctggtgtgc ccgtgacaa cctgcgggct gaagggtcg agtgtacca 2400  
aacgtgccag aactatgacc tggagtgcag gagcatgggc tgtgtctctg gctgcctctg 2460  
cccccgggc atgtccggc atgagaacag atgtgtggcc ctggaaagg gtccctgctt 2520  
ccatcagggc aaggagtatg cccctggaga aacagtgaag attggctgca acacttgtt 2580  
ctgtcgggac cggaagtga actgcacaga ccatgtgtg gatgccacgt gctccacgat 2640  
cggcatggc cactacctca ccttcgacg gctcaaatc ctgtccccg gggagtgcc 2700  
gtacgttctg gtgcaggatt actgcggcag taaccctgg accttcgga tcctagtgg 2760  
gaataaggga tgcagccacc cctcagtga atgcaagaaa cgggtcacca tcctggtga 2820

gggaggagag attgagctgt ttgacgggga ggtgaatgtg aagaggccca tgaaggatga 2880  
 gactcacttt gaggtgggtg agtctggccg gtacatcatt ctgctgctgg gcaaagccct 2940  
 ctccgtggtc tgggaccgcc acctgagcat ctccgtggtc ctgaagcaga cataccagga 3000  
 gaaagtgtgt ggctgtgtg ggaatttga tggcatccag aacaatgacc tcaccagcag 3060  
 caacctcaa gtggaggaag accctgtgga ctttggaac tcctggaaag tgagctcgca 3120  
 gtgtgctgac accagaaaag tgcctctgga ctcatcccct gccacctgcc ataacaacat 3180  
 catgaagcag acgatgggtg attcctcctg tagaatcctt accagtacg tcttcagga 3240  
 ctgcaacaag ctggtggacc ccgagccata tctggatgac tgcatttacg acacctgctc 3300  
 ctgtgagtc attggggact gcgcctgctt ctgcgacacc attgctgcct atgccacgt 3360  
 gtgtgcccag catggcaagg tggtagctg gaggacggcc acattgtgcc ccagagctg 3420  
 cgaggagagg aatctccggg agaacgggta tgagtgtgag tggcgctata acagctgtgc 3480  
 acctgcctgt caagtcacgt gtcagcacc tgagccactg gcctgccctg tgcagtgtgt 3540  
 ggagggctgc catgccact gccctccagg gaaaatcctg gatgagcttt tgcagacctg 3600  
 cgttgaccct gaagactgtc cagtgtgtga ggtggctggc cggcgtttg cctcaggaaa 3660  
 gaaagtcacc ttgaatcca gtgacctga gcactgccag atttgccact gtgatgtgt 3720  
 caacctcacc tgtgaagcct gccaggagcc gggaggctcg agcgggggat ctggcgggtc 3780  
 tggaggctct ggagggctcg gaggctctgg aggctctggg ggatctggcg ggtctggagg 3840  
 gtcgggatcc gatgcacaca agagttaggt tgctcatcg tttaaagatt tgggagaaga 3900  
 aaatttcaa gccttgggtg tgattgcctt tgctcagat cttcagcagt gtccattga 3960  
 agatcatgta aaattagtga atgaagtaac tgaattgca aaaacatgtg ttgctgatga 4020  
 gtcagctgaa aattgtgaca aatcacttca taccctttt ggagacaaat tatgcacagt 4080  
 tgcaactctt cgtgaaacct atggtgaaat ggctgactgc tgtgcaaac aagaacctga 4140  
 gagaaatgaa tgcttctgc aacacaaaga tgacaacca aacctcccc gattggtgag 4200  
 accagaggtt gatgtgatgt gcactgctt tcatgacaat gaagagacat tttgaaaaa 4260

atacttatat gaaattgccga gaagacatcc ttacttttat gccccggaac tccttttctt 4320  
 tgctaaaagg tataaagctg cttttacaga atgttgccaa gctgctgata aagctgcctg 4380  
 cctgttgcca aagctcgatg aacttcggga tgaagggaag gcttcgtctg ccaaacagag 4440  
 actcaagtgt gccagtctcc aaaaatttgg agaaagagct ttcaaagcat gggcagtagc 4500  
 tcgcctgagc cagagatttc ccaaagctga gtttcagaa gttccaagt tagtgacaga 4560  
 tcttaccaaa gtccacacgg aatgctgccga tggagatctg cttgaatgtg ctgatgacag 4620  
 ggcggacctt gccaagtata tctgtgaaaa tcaagattcg atctccagta aactgaagga 4680  
 atgctgtgaa aaacctctgt tggaaaaatc cactgcatt gccgaagtgg aaaatgatga 4740  
 gatgcctgct gacttgcctt cattagctgc tgattttgtt gaaagtaagg atgtttgcaa 4800  
 aaactatgct gaggcaaagg atgtcttctt gggcatgttt ttgtatgaat atgcaagaag 4860  
 gcatcctgat tactctgtcg tgctgctgct gagacttgcc aagacatatg aaaccactct 4920  
 agagaagtgc tgtgccgctg cagatcctca tgaatgctat gccaaagtgt tcgatgaatt 4980  
 taaacctctt gtggaagagc ctcagaattt aatcaaacaa aattgtgagc ttttgagca 5040  
 gcttgagagag tacaaattcc agaatgcgct attagttcgt tacaccaaga aagtacccca 5100  
 agtgtcaact ccaactcttg tagaggcttc aagaaaccta ggaaaagtgg gcagcaaatg 5160  
 ttgtaaacad cctgaagcaa aaagaatgcc ctgtgcagaa gactatctat ccgtggctct 5220  
 gaaccagtta tgtgtgttc atgagaaaac gccagtaagt gacagagtca ccaaatgctg 5280  
 cacagaatcc ttggtgaaca ggcgacctg ctttcagct ctggaagtgc atgaaacata 5340  
 cgttccaaa gagtttaatg ctgaaacatt caccttccat gcagatatat gcacacttc 5400  
 tgagaaggag agacaaatca agaaacaaac tgcacttgtt gagctcgtga aacacaagcc 5460  
 caaggcaaca aaagagcaac tgaaagctgt tatggatgat ttcgcagctt tttagagaa 5520  
 gtgctgcaag gctgacgata aggagacctg ctttgccgag gagggtaaaa aactgtgtgc 5580  
 tgcaagtcaa gctgccttag gcttataggc ggccgc 5616

<210> 2  
 <211> 1095  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
<223> polipéptido codificado por la SEQ ID NO: 1

5 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(479)  
<223> Región D'D3 del VWF (aminoácidos 764-1242 del VWF)

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (480)..(510)  
<223> enlazador de glicina/serina

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (511)..(1095)  
<223> albúmina humana

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

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

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

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

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

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

Asp His Val Cys Asp Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr

# ES 2 774 011 T3

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



# ES 2 774 011 T3

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys  
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly  
340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu  
355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn  
370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu  
385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro  
405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp  
420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys  
435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys  
450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Ser  
465 470 475 480

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
485 490 495

ES 2 774 011 T3

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Asp Ala  
500 505 510

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

Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln Gln Cys  
530 535 540

Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu Phe Ala  
545 550 555 560

Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys Ser Leu  
565 570 575

His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu Arg Glu  
580 585 590

Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro Glu Arg  
595 600 605

Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu Pro Arg  
610 615 620

Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His Asp Asn  
625 630 635 640

Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg Arg His  
645 650 655

Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg Tyr Lys  
660 665 670

Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu  
675 680 685

# ES 2 774 011 T3

Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala  
690 695 700

Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala  
705 710 715 720

Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala  
725 730 735

Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys Val His  
740 745 750

Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala  
755 760 765

Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys  
770 775 780

Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His Cys Ile  
785 790 795 800

Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala  
805 810 815

Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala  
820 825 830

Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His  
835 840 845

Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu  
850 855 860

Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr  
865 870 875 880

Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro Gln Asn

# ES 2 774 011 T3

885

890

895

Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu Tyr Lys  
900 905 910

Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro Gln Val  
915 920 925

Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys Val Gly  
930 935 940

Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys Ala Glu  
945 950 955 960

Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His Glu Lys  
965 970 975

Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser Leu Val  
980 985 990

Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr Tyr Val  
995 1000 1005

Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp Ile  
1010 1015 1020

Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
1025 1030 1035

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln  
1040 1045 1050

Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys  
1055 1060 1065

Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys  
1070 1075 1080

Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
1085 1090 1095

5 <210> 3  
<211> 8442  
<212> ADN  
<213> Homo Sapiens  
<400> 3

atgattctg ccagattgc cggggtgctg ctgctctgg ccctcattt gccagggacc 60  
ctttgtgcag aaggaactcg cggcagggtca tccacggccc gatgcagcct ttccggaagt 120  
gacttcgtca acaccttga tgggagcatg tacagctttg cgggatactg cagttacctc 180  
ctggcagggg gctgccagaa acgctccttc tcgattattg gggacttcca gaatggcaag 240  
agagtgaacc tctccgtgta tcttggggaa tttttgaca tccatttgt tgtcaatggt 300  
accgtgacac agggggacca aagagtctcc atgccctatg cctccaaagg gctgtatcta 360  
gaaactgagg ctgggtacta caagctgtcc ggtgaggcct atggctttgt ggccaggatc 420  
gatggcagcg gcaacttca agtctctgtg tcagacagat acttcaacaa gacctgcggg 480  
ctgtgtggca actttaacat ctttctgaa gatgacttta tgaccaaga agggaccttg 540  
acctcggacc cttatgactt tgccaactca tgggctctga gcagtggaga acagtgggtg 600  
gaacgggcat ctctcccag cagctcatgc aacatctcct ctggggaaat gcagaagggc 660  
ctgtgggagc agtgccagct tctgaagagc acctcgggtg ttgcccgctg ccaccctctg 720  
gtggaccccg agccttttgt ggccctgtgt gagaagactt tgtgtgagtg tgctgggggg 780  
ctggagtgcg cctgccctgc cctcctggag tacgcccga cctgtgccca ggagggaatg 840  
gtgctgtacg gctggaccga ccacagcgcg tgcagcccag tgtgccctgc tggatggag 900  
tataggcagt gtgtgtcccc ttgcgccagg acctgccaga gcctgcacat caatgaaatg 960  
tgtcaggagc gatgcgtgga tggctgcagc tgcctgagg gacagctcct ggatgaaggc 1020  
ctctgcgtgg agagcaccga gtgtccctgc gtgcattccg gaaagcgcta cctcccggc 1080  
acctccctct ctgagactg caacacctgc attgccgaa acagccagtg gatctgcagc 1140

aatgaagaat gtccagggga gtgccttgac acaggtcaat cacactcaa gagcttgac 1200  
aacagatact tcaccttcag tgggatctgc cagtacctgc tggcccggga ttgccaggac 1260  
cactccttct ccattgtcat tgagactgtc cagtgtgctg atgaccgca cgctgtgtgc 1320  
acccgctccg tcaccgtccg gctgcctggc ctgcacaaca gccttgtaa actgaagcat 1380  
ggggcaggag ttgcatgga tggccaggac gtccagctcc ccctcctgaa aggtgacctc 1440  
cgcatccagc atacagtac ggctccgtg cgcctcagct acggggagga cctgcagatg 1500  
gactgggatg gccgcgggag gctgctggtg aagctgtccc ccgtctatgc cggaagacc 1560  
tgccgctgt gtgggaatta caatggcaac cagggcgacg acttcttac cccctctggg 1620  
ctggcggagc cccgggtgga ggacttcggg aacgcctgga agctgcacgg ggactgccag 1680  
gacctgcaga agcagcacag cgatccctgc gccctcaacc cgcgcatgac caggttctcc 1740  
gaggaggcgt gcgcggtcct gacgtcccc acattcgagg cctgccatcg tgccgtcagc 1800  
ccgtgccct acctgcgga ctgccgtac gacgtgtgct cctgctcgga cggccgag 1860  
tgctgtgag gcgcctggc cagctatgcc gcggcctgag cggggagagg cgtgcgcgtc 1920  
gctggcgcg agccaggccg ctgtgagctg aactgcccga aaggccagggt gtacctgag 1980  
tgccggaccc cctgcaacct gacctgccgc tctctctctt acccgatga ggaatgcaat 2040  
gaggcctgcc tggagggtg cttctgcccc ccagggtctt acatggatga gaggggggac 2100  
tgctgcccga agggcagtg cccctgttac tatgacgggt agatctcca gccagaagac 2160  
atcttctcag accatcacac catgtgtac tgtgaggatg gcttcatgca ctgtaccatg 2220  
agtggagtcc ccggaagctt gctgcctgac gctgtcctca gcagtcctt gtctcatgac 2280  
agcaaaagga gcctatctg tcggcccccc atggtaagc tgggtgtcc cgctgacaac 2340  
ctgcgggctg aagggtcga gtgtacaaa acgtgccaga actatgacct ggagtgcag 2400  
agcatgggct gtgtctctgg ctgcctctgc cccccggga tggccggca tgagaacaga 2460  
tgtgtggccc tgaaaggtg tccctgctc catcaggga aggagtatgc cctggagaa 2520  
acagtgaaga ttggctgaa cactgtgtc tgcgggacc ggaagtggaa ctgcacagac 2580

catgtgtgtg atgccacgtg ctccacgac ggcatggccc actacctcac ctgcagcggg 2640  
 ctcaaatacc tgttccccgg ggagtgccag tacgttctgg tgcaggatta ctgcggcagt 2700  
 aaccctggga cctttcggat cctagtgggg aataagggat gcagccaccc ctcagtga aa 2760  
 tgcaagaaac gggtcacat cctggtggag ggaggagaga ttgagctgtt tgacggggag 2820  
 gtgaatgtga agaggcccat gaaggatgag actcactttg aggtggtgga gtctggccgg 2880  
 tacatcattc tgctgctggg caaagccctc tccgtggtct gggaccgcca cctgagcatc 2940  
 tccgtggtcc tgaagcagac ataccaggag aaagtgtgtg gcctgtgtgg gaattttgat 3000  
 ggcatccaga acaatgacct caccagcagc aacctccaag tggaggaaga ccctgtggac 3060  
 tttgggaact cctggaaagt gagctcgcag tgtctgaca ccagaaaagt gcctctggac 3120  
 tcacccccg ccacctgcca taacaacatc atgaagcaga cgatggtgga ttctctctgt 3180  
 agaatcctta ccagtacgt ctccaggac tgcaacaagc tggaggaccc cgagccatat 3240  
 ctggatgtct gcatttacga cacctgctcc tgtgagtcca ttggggactg cgctgtctc 3300  
 tgcgacacca ttgtgccta tgcccacgtg tgtgccagc atggcaaggt ggtgacctgg 3360  
 aggacggcca catttgccc ccagagctgc gaggagagga atctccggga gaacgggtat 3420  
 gagtgtgagt ggcgtataa cagctgtgca cctgcctgtc aagtcacgtg tcagcaccct 3480  
 gagccactgg cctgcctgt gcagtgtgtg gagggctgcc atgccactg ccctccaggg 3540  
 aaaatcctgg atgagcttt gcagacctgc gttgacctg aagactgtcc agtgtgtgag 3600  
 gtggctggcc ggcgtttgc ctcaaggaaag aaagtcacct tgaatcccag tgacctgag 3660  
 cactgccaga ttgccactg tgatgtgtc aacctcacct gtgaagcctg ccaggagccg 3720  
 ggaggcctgg tggtgctcc cacagatgcc ccggtgagcc ccaccactct gtatgtggag 3780  
 gacatctcgg aaccgccgt gcacgattc tactgcagca ggctactgga cctggtctc 3840  
 ctgctggatg gctcctccag gctgtccgag gctgagttg aagtgtgaa ggcctttgtg 3900  
 gtggacatga tggagcggct gcgcatctcc cagaagtggg tccgcgtggc cgtggtggag 3960  
 taccacgacg gctcccacgc ctacatcggg ctcaaggacc ggaagcgacc gtcagagctg 4020  
 cggcgcattg ccagccagg gtgaagtgcg ggcagccagg tggcctccac cagcgaggct 4080

ttgaaataca cactgttcca aatcttcagc aagatcgacc gccctgaagc ctcccgcac 4140  
 gccctgctcc tgatggccag ccaggagccc caacggatgt cccggaactt tgtccgctac 4200  
 gtccagggcc tgaagaagaa gaaggtcatt gtgatcccgg tgggcattgg gccccatgcc 4260  
 aacctcaagc agatccgcct catcgagaag caggccccctg agaacaaggc ctctgtgctg 4320  
 agcagtgtgg atgagctgga gcagcaaagg gacgagatcg ttagctacct ctgtgacctt 4380  
 gccctgaag cccctctcc tactctgccc ccccatatgg cacaagtcac tgtgggcccg 4440  
 gggctcttg gggtttcgac cctggggccc aagaggaact ccatggttct ggatgtggcg 4500  
 ttctgcttg aaggatcgga caaatgtgt gaagccgact tcaacaggag caaggagttc 4560  
 atggaggagg tgattcagcg gatggatgtg ggccaggaca gcatccacgt cacggtgctg 4620  
 cagtactcct acatggtgac cgtggagtac ccttcagcg aggcacagtc caaaggggac 4680  
 atctgcagc ggggtgcgaga gatccgctac cagggcggca acaggaccaa cactgggctg 4740  
 gccctgcggg acctctctga ccacagcttc ttggtcagcc agggtgaccg ggagcaggcg 4800  
 cccaacctgg tctacatggg caccggaaat cctgcctctg atgagatcaa gaggtgcct 4860  
 ggagacatcc aggtggtgcc cattggagtg ggccctaatg ccaacgtgca ggagctggag 4920  
 aggattggct ggcccaatgc ccctatctc atccaggact ttgagacgct cccccgagag 4980  
 gctctgacc tgggtctgca gaggtgctgc tccggagagg ggctgcagat cccaccctc 5040  
 tccctgcac ctgactgcag ccagcccctg gacgtgatcc ttctctgga tggctctcc 5100  
 agttccag ctcttattt tgatgaaatg aagagttcg ccaaggctt cattcaaaa 5160  
 gccaatatag ggctctgtct cactcaggtg ttagtgctgc agtatggaag catcaccacc 5220  
 attgacgtgc catggaacgt ggtcccggag aaagcccatt tgctgagcct tgtggacgtc 5280  
 atgcagcggg agggaggccc cagccaaatc ggggatgcct tgggcttgc tgtcgatac 5340  
 ttgactcag aatgcatgg ggcgcgccc ggagcctcaa aggcggtgt catctggctc 5400  
 acggacgtct ctgtggattc agtggatgca gcagctgatg ccgccaggtc caacagagtg 5460  
 acagtgtcc ctattggaat tggagatgcg tacgatgcag ccagctacg gatcttgga 5520



ggcccagcag gcgactccaa cgtggtgaag ctccagcgaa tcgaagacct ccctaccatg 5580  
 gtcaccttgg gcaattcctt cctccacaaa ctgtgctctg gatttgtag gatttgcattg 5640  
 gatgaggatg ggaatgagaa gaggcccggg gacgtctgga ccttgccaga ccagtgccac 5700  
 accgtgactt gccagccaga tggccagacc ttgtgaaga gtcacgggt caactgtgac 5760  
 cgggggctga ggccttcgtg ccctaacagc cagtccccg ttaaagtga agagacctgt 5820  
 ggctgccgtt ggacctgcc ctgcgtgtgc acaggcagct ccactcggca catcgtgacc 5880  
 ttgatgggc agaattcaa gctgactggc agctgttctt atgtctatt taaaacaag 5940  
 gagcaggacc tggaggatg tctcataat ggtgcctgca gccctggagc aaggcagggc 6000  
 tgcataaat ccatcgaggt gaagcacagt gccctctcg tcgagctgca cagtacatg 6060  
 gaggtagcgg tgaatgggag actggctctt gttccttacg tgggtgggaa catggaagtc 6120  
 aacgtttatg gtgcatcat gcatgaggtc agattcaatc accttggta catcttaca 6180  
 ttactccac aaaacaatga gttccaactg cagctcagcc ccaagacttt tgctcaaag 6240  
 acgtatggc tgtgtgggat ctgtgatgag aacggagcca atgacttcat gctgaggat 6300  
 ggcacagtca ccacagactg gaaaacactt gttcaggaat ggactgtgca gcggccaggg 6360  
 cagacgtgcc agccatcct ggaggagcag tgtctgtcc ccgacagctc cactgccag 6420  
 gtctctctt taccactgtt tgctgaatgc cacaaggctc tggctccagc cacattctat 6480  
 gccatctgcc agcaggacag ttgccaccag gagcaagtgt gtgaggatg cgctcttat 6540  
 gccacctct gtcggacca cggggctctg gttgactgga ggacacctga tttctgtct 6600  
 atgtcatgcc caccatctt ggtttataac cactgtgagc atggctgtcc ccggcactgt 6660  
 gatggcaacg tgagctcctg tggggacat cctccgaag gctgtttctg cctccagat 6720  
 aaagtcatgt tggaaggcag ctgtgtccct gaagaggcct gcactcagt cattggtgag 6780  
 gatggagtcc agcaccagtt cctggaagcc tgggtcccg accaccagcc ctgtcagatc 6840  
 tgcacatgcc tcagcgggag gaaggtaac tgcacaacgc agccctgcc cacggccaaa 6900  
 gctccacgt gtggcctgtg tgaagtagcc cgctccgcc agaatgcaga ccagtgtctg 6960  
 cccgagtatg agtgtgtgtg tgaccagtg agctgtgacc tgccccagt gcctcactgt 7020

gaacgtggcc tccagcccac actgaccaac cctggcgagt gcagacccaa cttcacctgc 7080  
 gcctgcagga aggaggagtg caaaagagtg tccccaccct cctgcccccc gcaccgtttg 7140  
 cccacccttc ggaagaccca gtgctgtgat gagtatgagt gtgcctgcaa ctgtgtcaac 7200  
 tccacagtga gctgtcccct tgggtacttg gcctcaaccg ccaccaatga ctgtggctgt 7260  
 accacaacca cctgccttcc cgacaagggt tgtgtccacc gaagcaccat ctaccctgtg 7320  
 ggccagttct gggaggaggg ctgcgatgtg tgcacctgca ccgacatgga ggatgccgtg 7380  
 atgggcctcc gcgtggccca gtgctcccag aagccctgtg aggacagctg tcggctgggc 7440  
 ttcacttacg ttctgcatga aggcgagtgc tgtggaaggt gcctgccatc tgctgtgag 7500  
 gtggtgactg gctcaccgcg gggggactcc cagtcttctt ggaagagtgt cggtcccag 7560  
 tgggcctccc cggagaaccc ctgcctcatc aatgagtgtg tccgagtga ggaggaggtc 7620  
 ttatacaac aaaggaacgt ctctgcccc cagctggagg tccctgtctg cccctcgggc 7680  
 ttcagctga gctgtaagac ctacgcgtgc tgcccaagct gtcgctgtga gcgcatggag 7740  
 gcctgcatgc tcaatggcac tgtcattggg cccgggaaga ctgtgatgat cgatgtgtgc 7800  
 acgacctgcc gctgcatggt gcaggtgggg gtcactcttg gattcaagct ggagtgcagg 7860  
 aagaccacct gcaaccctg cccctgggt tacaaggaag aaaataacac aggtgaatgt 7920  
 tgtgggagat gttgcctac ggctgcacc attcagctaa gaggaggaca gatcatgaca 7980  
 ctgaagcgtg atgagacgct ccaggatggc tgtgatactc acttctgcaa ggtcaatgag 8040  
 agaggagagt acttctggga gaagaggggt acaggctgcc cacccttga tgaacacaag 8100  
 tgtctggctg agggaggtaa aattatgaaa attccaggca cctgctgtga cacatgtgag 8160  
 gagcctgagt gcaacgacat cactgccagg ctgcagtatg tcaagggtggg aagctgtaag 8220  
 tctgaagtag aggtggatat ccactactgc cagggcaa atgtgccagcaa agccatgtac 8280  
 tccattgaca tcaacgatgt gcaggaccag tgctctgtct gctctccgac acggacggag 8340  
 cccatgcagg tggccctgca ctgcaccaat ggctctgttg tgtacatga ggttctcaat 8400  
 gccatggagt gcaa atgctc cccaggaag tgcagcaagt ga 8442

<210> 4  
 <211> 2813  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

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

# ES 2 774 011 T3

165

170

175

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

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser  
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln  
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu  
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu  
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala  
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His  
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys  
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met  
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu  
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His  
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn  
355 360 365

# ES 2 774 011 T3

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 Ile 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

ES 2 774 011 T3

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

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val  
740 745 750

ES 2 774 011 T3

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 2 774 011 T3

|                                                                 |      |      |      |
|-----------------------------------------------------------------|------|------|------|
| 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 |      |      |      |
|                                                                 | 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 |



# ES 2 774 011 T3

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

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

# ES 2 774 011 T3

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

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

# ES 2 774 011 T3

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

# ES 2 774 011 T3

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

# ES 2 774 011 T3

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  
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

# ES 2 774 011 T3

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

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

# ES 2 774 011 T3

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

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

# ES 2 774 011 T3

|                                                             |      |      |
|-------------------------------------------------------------|------|------|
| 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 2 774 011 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> 5  
<211> 1444  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> Factor VIII de cadena sencilla  
<400> 5

Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser Trp Asp Tyr  
1 5 10 15

Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg Phe Pro Pro  
20 25 30

Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val Tyr Lys Lys  
35 40 45

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

Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln Ala Glu Val  
65 70 75 80

Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser His Pro Val  
85 90 95

Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser Glu Gly Ala  
100 105 110

Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp Asp Lys Val  
115 120 125

Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu Lys Glu Asn  
130 135 140

Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser Tyr Leu Ser  
145 150 155 160

His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile Gly Ala Leu  
165 170 175

Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr Gln Thr Leu  
180 185 190

His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly Lys Ser Trp  
195 200 205

His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp Ala Ala Ser  
210 215 220

Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr Val Asn Arg  
225 230 235 240

Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val Tyr Trp His  
245 250 255

Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile Phe Leu Glu  
260 265 270

Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser Leu Glu Ile  
275 280 285

Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met Asp Leu Gly  
290 295 300

Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His Asp Gly Met  
305 310 315 320

Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro Gln Leu Arg  
325 330 335

Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp Leu Thr Asp  
340 345 350

Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser Pro Ser Phe  
355 360 365

Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr Trp Val His  
370 375 380

Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro Leu Val Leu  
385 390 395 400

Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn Asn Gly Pro  
405 410 415

Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met Ala Tyr Thr  
420 425 430

Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu Ser Gly Ile  
435 440 445

Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu Leu Ile Ile  
450 455 460

Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro His Gly Ile  
465 470 475 480

Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys Gly Val Lys  
485 490 495

His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe Lys Tyr Lys  
500 505 510

ES 2 774 011 T3

Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp Pro Arg Cys  
515 520 525

Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg Asp Leu Ala  
530 535 540

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu Ser Val Asp  
545 550 555 560

Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val Ile Leu Phe  
565 570 575

Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu Asn Ile Gln  
580 585 590

Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp Pro Glu Phe  
595 600 605

Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val Phe Asp Ser  
610 615 620

Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp Tyr Ile Leu  
625 630 635 640

Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe Ser Gly Tyr  
645 650 655

Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr Leu Phe Pro  
660 665 670

Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro Gly Leu Trp  
675 680 685

Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly Met Thr Ala  
690 695 700

Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp Tyr Tyr Glu

# ES 2 774 011 T3

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

Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe  
915 920 925

Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys  
930 935 940

Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His  
945 950 955 960

Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn  
965 970 975

Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe  
980 985 990

Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu  
995 1000 1005

Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr  
1010 1015 1020

Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met  
1025 1030 1035

Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg  
1040 1045 1050

Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile  
1055 1060 1065

His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr  
1070 1075 1080

Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val  
1085 1090 1095

|         |                     |                     |             |
|---------|---------------------|---------------------|-------------|
| Glu Met | Leu Pro Ser Lys Ala | Gly Ile Trp Arg Val | Glu Cys Leu |
| 1100    | 1105                | 1110                |             |
| Ile Gly | Glu His Leu His Ala | Gly Met Ser Thr Leu | Phe Leu Val |
| 1115    | 1120                | 1125                |             |
| Tyr Ser | Asn Lys Cys Gln Thr | Pro Leu Gly Met Ala | Ser Gly His |
| 1130    | 1135                | 1140                |             |
| Ile Arg | Asp Phe Gln Ile Thr | Ala Ser Gly Gln Tyr | Gly Gln Trp |
| 1145    | 1150                | 1155                |             |
| Ala Pro | Lys Leu Ala Arg Leu | His Tyr Ser Gly Ser | Ile Asn Ala |
| 1160    | 1165                | 1170                |             |
| Trp Ser | Thr Lys Glu Pro Phe | Ser Trp Ile Lys Val | Asp Leu Leu |
| 1175    | 1180                | 1185                |             |
| Ala Pro | Met Ile Ile His Gly | Ile Lys Thr Gln Gly | Ala Arg Gln |
| 1190    | 1195                | 1200                |             |
| Lys Phe | Ser Ser Leu Tyr Ile | Ser Gln Phe Ile Ile | Met Tyr Ser |
| 1205    | 1210                | 1215                |             |
| Leu Asp | Gly Lys Lys Trp Gln | Thr Tyr Arg Gly Asn | Ser Thr Gly |
| 1220    | 1225                | 1230                |             |
| Thr Leu | Met Val Phe Phe Gly | Asn Val Asp Ser Ser | Gly Ile Lys |
| 1235    | 1240                | 1245                |             |
| His Asn | Ile Phe Asn Pro Pro | Ile Ile Ala Arg Tyr | Ile Arg Leu |
| 1250    | 1255                | 1260                |             |
| His Pro | Thr His Tyr Ser Ile | Arg Ser Thr Leu Arg | Met Glu Leu |
| 1265    | 1270                | 1275                |             |



Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu  
1280 1285 1290

Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe  
1295 1300 1305

Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His  
1310 1315 1320

Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro  
1325 1330 1335

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

Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr  
1355 1360 1365

Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp  
1370 1375 1380

Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn  
1385 1390 1395

Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu  
1400 1405 1410

Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln  
1415 1420 1425

Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu  
1430 1435 1440

Tyr

<210> 6  
<211> 585  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

# ES 2 774 011 T3

<400> 6

Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys Asp Leu Gly Glu  
1 5 10 15

Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala Gln Tyr Leu Gln  
20 25 30

Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn Glu Val Thr Glu  
35 40 45

Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu Asn Cys Asp Lys  
50 55 60

Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr Val Ala Thr Leu  
65 70 75 80

Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala Lys Gln Glu Pro  
85 90 95

Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp Asn Pro Asn Leu  
100 105 110

Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys Thr Ala Phe His  
115 120 125

Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr Glu Ile Ala Arg  
130 135 140

Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe Phe Ala Lys Arg  
145 150 155 160

Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala Ala Asp Lys Ala Ala  
165 170 175

Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp Glu Gly Lys Ala Ser  
180 185 190

Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu Gln Lys Phe Gly Glu  
195 200 205

Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu Ser Gln Arg Phe Pro  
210 215 220

Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val Thr Asp Leu Thr Lys  
225 230 235 240

Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu Glu Cys Ala Asp Asp  
245 250 255

Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn Gln Asp Ser Ile Ser  
260 265 270

Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu Leu Glu Lys Ser His  
275 280 285

Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro Ala Asp Leu Pro Ser  
290 295 300

Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val Cys Lys Asn Tyr Ala  
305 310 315 320

Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu Tyr Glu Tyr Ala Arg  
325 330 335

Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu Arg Leu Ala Lys Thr  
340 345 350

Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala Ala Asp Pro His Glu  
355 360 365

# ES 2 774 011 T3

Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu Val Glu Glu Pro  
370 375 380

Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu Gln Leu Gly Glu  
385 390 395 400

Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr Lys Lys Val Pro  
405 410 415

Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg Asn Leu Gly Lys  
420 425 430

Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys Arg Met Pro Cys  
435 440 445

Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu Cys Val Leu His  
450 455 460

Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys Cys Thr Glu Ser  
465 470 475 480

Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu Val Asp Glu Thr  
485 490 495

Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr Phe His Ala Asp  
500 505 510

Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys Lys Gln Thr Ala  
515 520 525

Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr Lys Glu Gln Leu  
530 535 540

Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu Lys Cys Cys Lys  
545 550 555 560

Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly Lys Lys Leu Val

565 570 575

Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu  
580 585

5 <210> 7  
<211> 519  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> D'D3 marcado con His

10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(479)  
<223> Secuencia de aminoácidos de D'D3-His8

15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(479)  
<223> Región D'D3 del VWF (aminoácidos 764-1242 del VWF)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (480)..(511)  
<223> enlazador de glicina/serina

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (512)..(519)  
<223> marcador de polihistidina

<400> 7

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

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

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

25

# ES 2 774 011 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 774 011 T3

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

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

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met  
275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val  
290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys  
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly  
340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu  
355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn  
370 375 380

Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu  
385 390 395 400

Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro  
405 410 415

Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp  
420 425 430

Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys

# ES 2 774 011 T3

435 440 445

Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys  
450 455 460

Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Ser  
465 470 475 480

Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
485 490 495

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser His  
500 505 510

His His His His His His His  
515

- 5 <210> 8  
<211> 584  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial
- 10 <220>  
<223> Proteína de fusión CTP marcada con His
- 10 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(479)  
<223> Región D'D3 del VWF (aminoácidos 764-1242 del VWF)
- 15 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (480)..(511)  
<223> enlazador de glicina/serina
- 20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (512)..(576)  
<223> Péptido C-terminal de la subunidad beta de gonadotropina coriónica humana
- <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (577)..(584)  
<223> Marcador de polihistidina
- <400> 8



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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 774 011 T3

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

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

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

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

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

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

Lys Val Pro Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met  
275 280 285

Lys Gln Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val  
290 295 300

Phe Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
305 310 315 320

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala Cys  
325 330 335

Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln His Gly  
340 345 350

Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln Ser Cys Glu  
355 360 365

Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu Trp Arg Tyr Asn

# ES 2 774 011 T3

370                      375                      380  
 Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln His Pro Glu Pro Leu  
 385                      390                      395                      400  
 Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys His Ala His Cys Pro Pro  
                     405                      410                      415  
 Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp  
                     420                      425                      430  
 Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys  
                     435                      440                      445  
 Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys  
                     450                      455                      460  
 Asp Val Val Asn Leu Thr Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Ser  
 465                      470                      475                      480  
 Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
                     485                      490                      495  
 Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ala  
                     500                      505                      510  
 Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
                     515                      520                      525  
 Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Ser Ser Ser  
                     530                      535                      540  
 Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly  
 545                      550                      555                      560  
 Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln Ala Gly Gly Ser Gly Gly Ser  
                     565                      570                      575  
 His His His His His His His His  
 580

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende un factor de von Willebrand (VWF) truncado para su uso en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y un Factor VIII (FVIII), en el que el polipéptido es capaz de unirse a dicho FVIII, y en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 50, en el que el polipéptido comprende un resto que prolonga la semivida.
2. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido se administra por vía intravenosa y además la relación molar entre el polipéptido administrado y el VWF endógeno es mayor que 0,5, y en el que dicha relación molar es la concentración plasmática molar del polipéptido del sujeto tratado inmediatamente después de la administración del polipéptido, dividido por la concentración plasmática molar de VWF endógeno del sujeto tratado, en el que la concentración del VWF endógeno se define como la concentración en plasma humano normal (PHN).
3. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que el sujeto es un ser humano.
4. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el polipéptido se administra por vía intravenosa.
5. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el VWF truncado comprende los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4.
6. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el VWF truncado carece de los aminoácidos 1243 a 2813 de la SEQ ID NO: 4.
7. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el VWF truncado consiste en (a) los aminoácidos 764 a 1242 de SEQ ID NO: 4, (b) una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos un 90 % con respecto a los aminoácidos 764 a 1242 de la SEQ ID NO: 4 o (c) un fragmento de (a) o (b).
8. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el resto que prolonga la semivida es una secuencia de aminoácidos heteróloga fusionada al VWF truncado.
9. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicha secuencia de aminoácidos heteróloga comprende o consiste en un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en regiones constantes de inmunoglobulina y porciones de las mismas, por ejemplo, el fragmento Fc, transferrina y fragmentos de la misma, el péptido C-terminal de la gonadotropina coriónica humana, cadenas aleatorias solvatadas con gran volumen hidrodinámico conocido como XTEN, repeticiones de homo-aminoácidos (HAP), repeticiones de prolina-alanina-serina (PAS), albúmina, afamina, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, polipéptidos capaces de unirse en condiciones fisiológicas a albúmina o regiones constantes de inmunoglobulina, y combinaciones de las mismas.
10. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que el resto que prolonga la semivida se conjuga con el polipéptido.
11. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho resto que prolonga la semivida se selecciona del grupo que consiste en hidroxietilalmidón (HES), polietilenglicol (PEG), ácidos polisíalicos (PSA), polipéptidos similares a elastina, polímeros de heparosano, ligandos de unión al ácido hialurónico y albúmina, por ejemplo, cadenas de ácidos grasos y sus combinaciones.
12. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido es una glucoproteína que comprende N-glucanos, y en el que al menos el 75 %, preferentemente al menos el 85 % de dichos N-glucanos comprende, en promedio, al menos un resto de ácido siálico.
13. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el polipéptido es un dímero.
14. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el tiempo de residencia medio (TMR) del FVIII se incrementa por la coadministración del polipéptido, en comparación con un tratamiento de referencia, en el que dicho tratamiento de referencia es idéntico a dicho tratamiento, excepto que el polipéptido y el FVIII se administran en cantidades equimolares en dicho tratamiento de referencia.
15. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la frecuencia de administración del FVIII se reduce en comparación con un tratamiento con el FVIII solo.
16. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la semivida en plasma del polipéptido es mayor que la del VWF endógeno.

17. El polipéptido para su uso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la semivida en plasma del polipéptido es al menos un 25 % mayor que la del VWF endógeno.

5 18. Una composición farmacéutica que comprende (i) un FVIII y (ii) un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que la relación molar entre el polipéptido y el FVIII en la composición es mayor que 50.

10 19. Un kit farmacéutico que comprende (i) un FVIII y (ii) un polipéptido como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para su uso simultáneo, separado o secuencial en el tratamiento de un trastorno de la coagulación de la sangre, comprendiendo dicho tratamiento administrar a un sujeto que tiene VWF endógeno el polipéptido y el FVIII, en el que la relación molar entre el polipéptido a administrar y el FVIII a administrar es mayor que 50 y el polipéptido comprende un resto que prolonga la semivida.

20. El polipéptido para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 para mejorar la semivida en plasma del FVIII.

Figura 1A

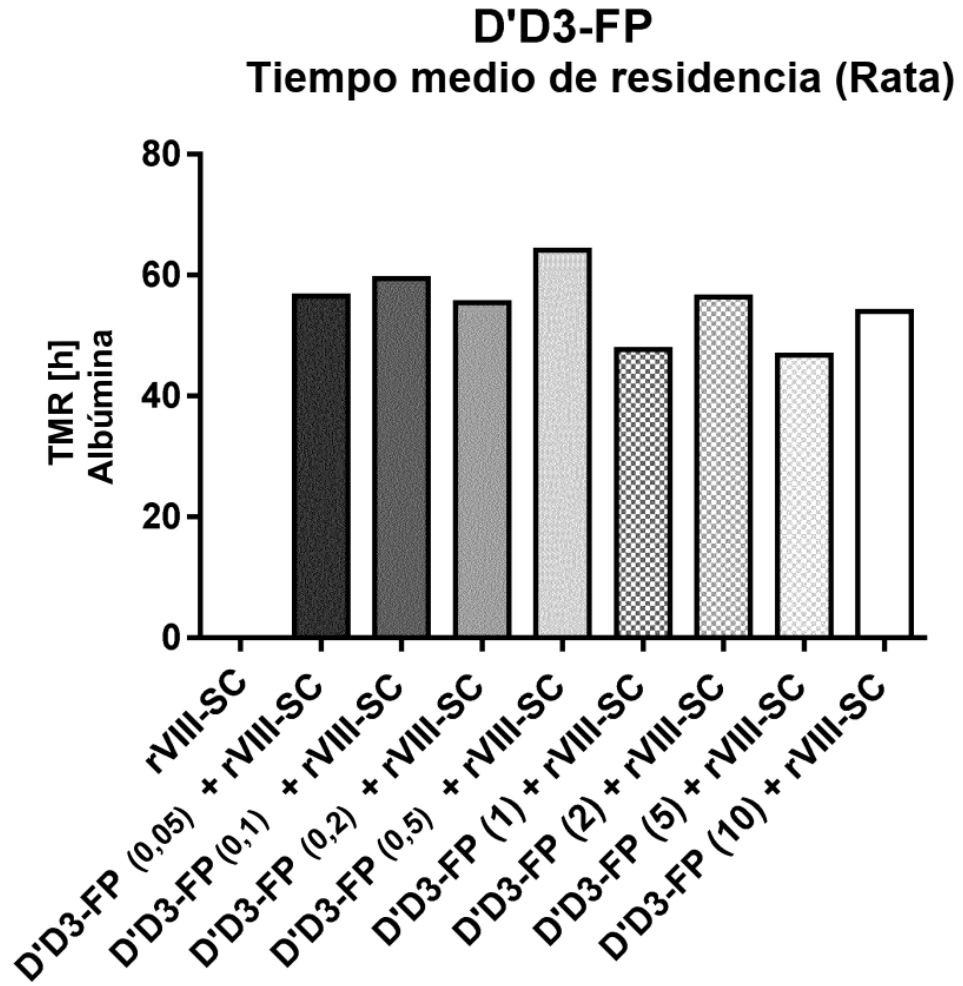


Figura 1B

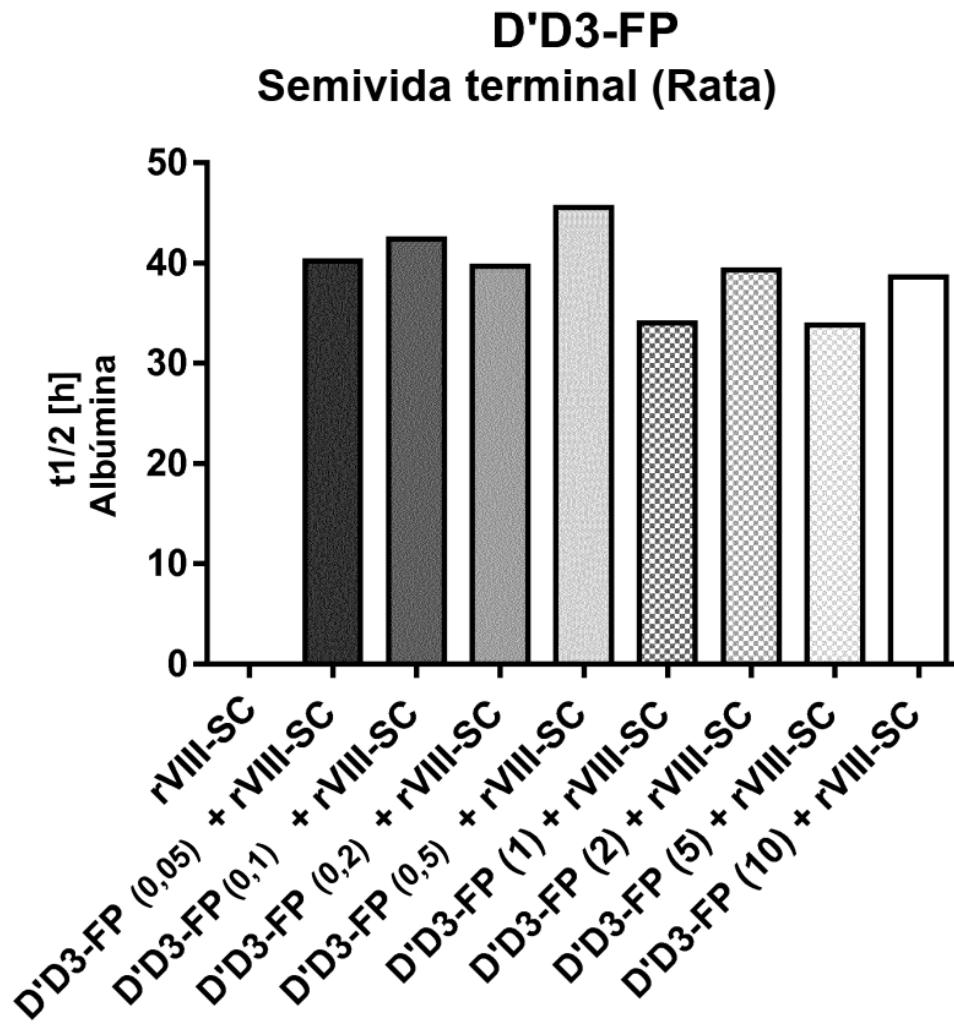


Figura 1C

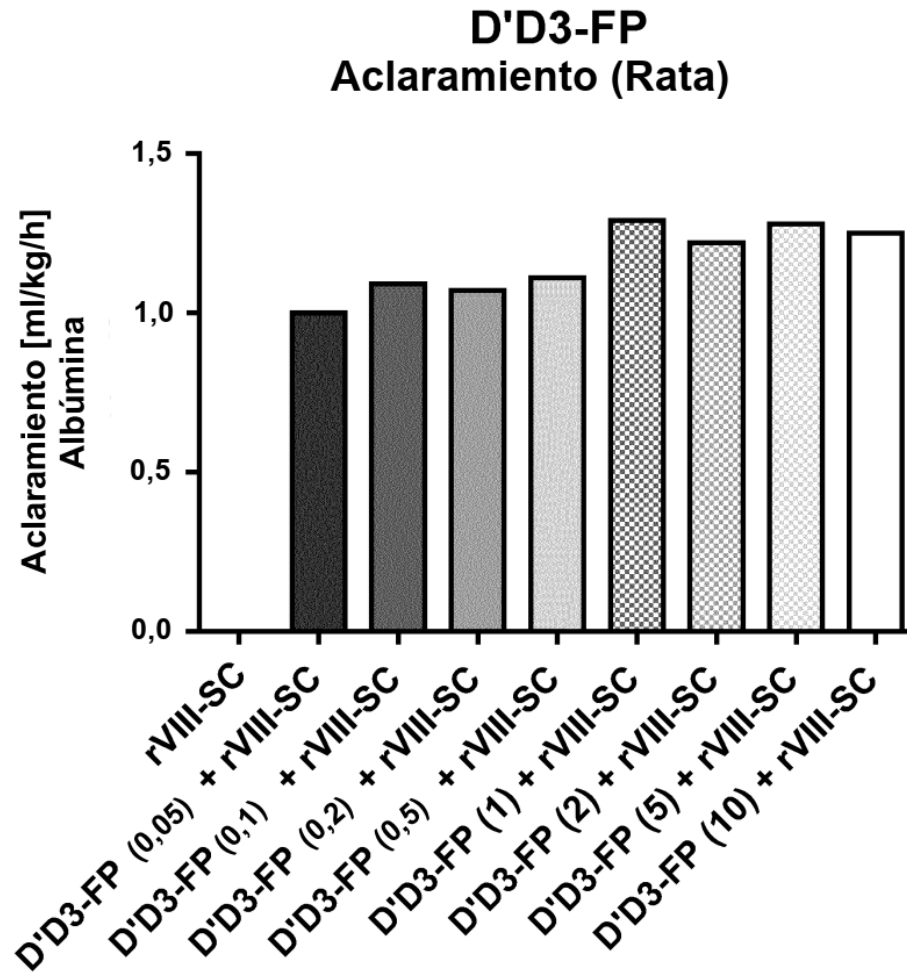




Figura 2A

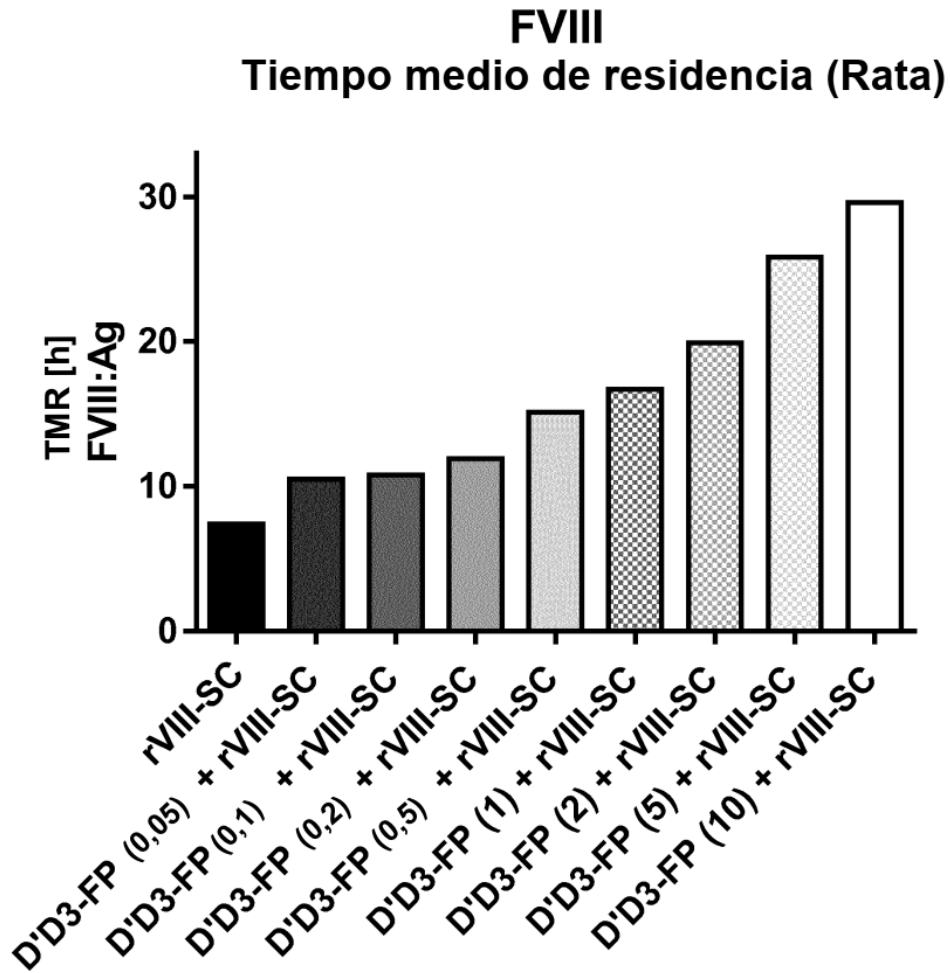


Figura 2B

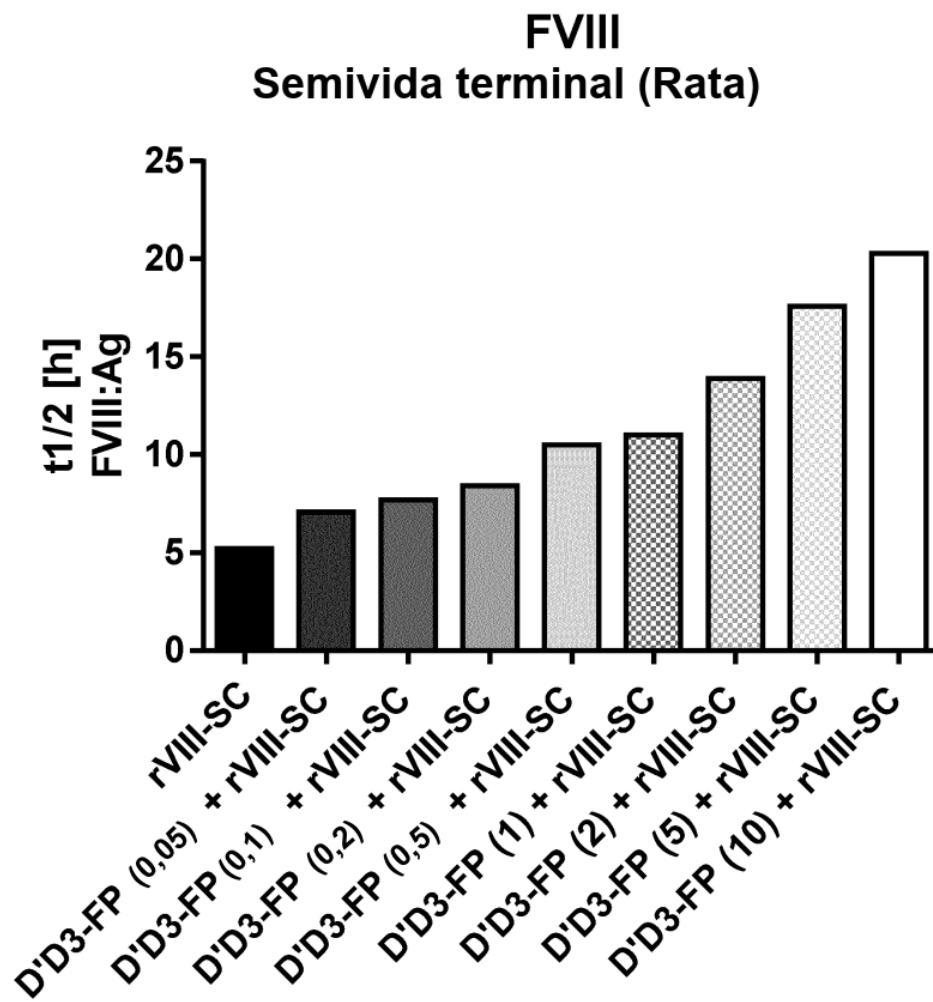


Figura 2C

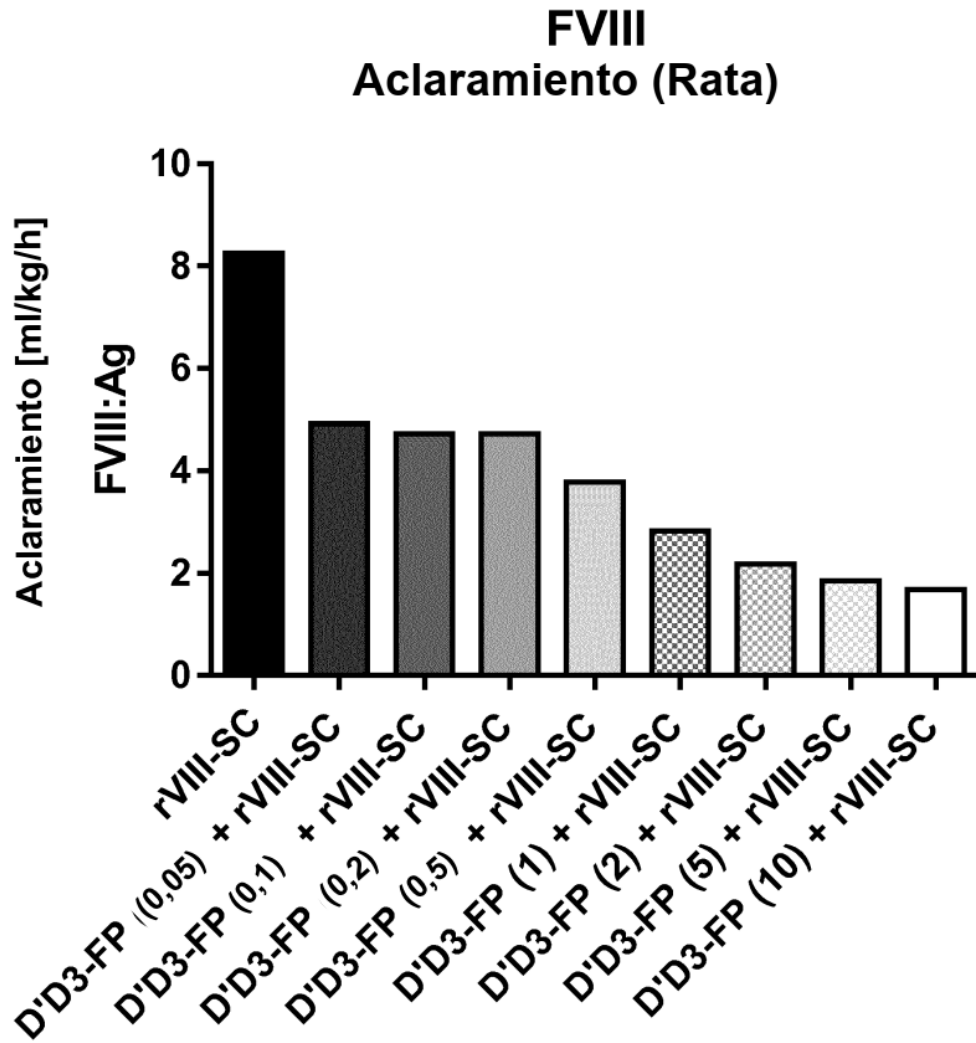


Figura 3A

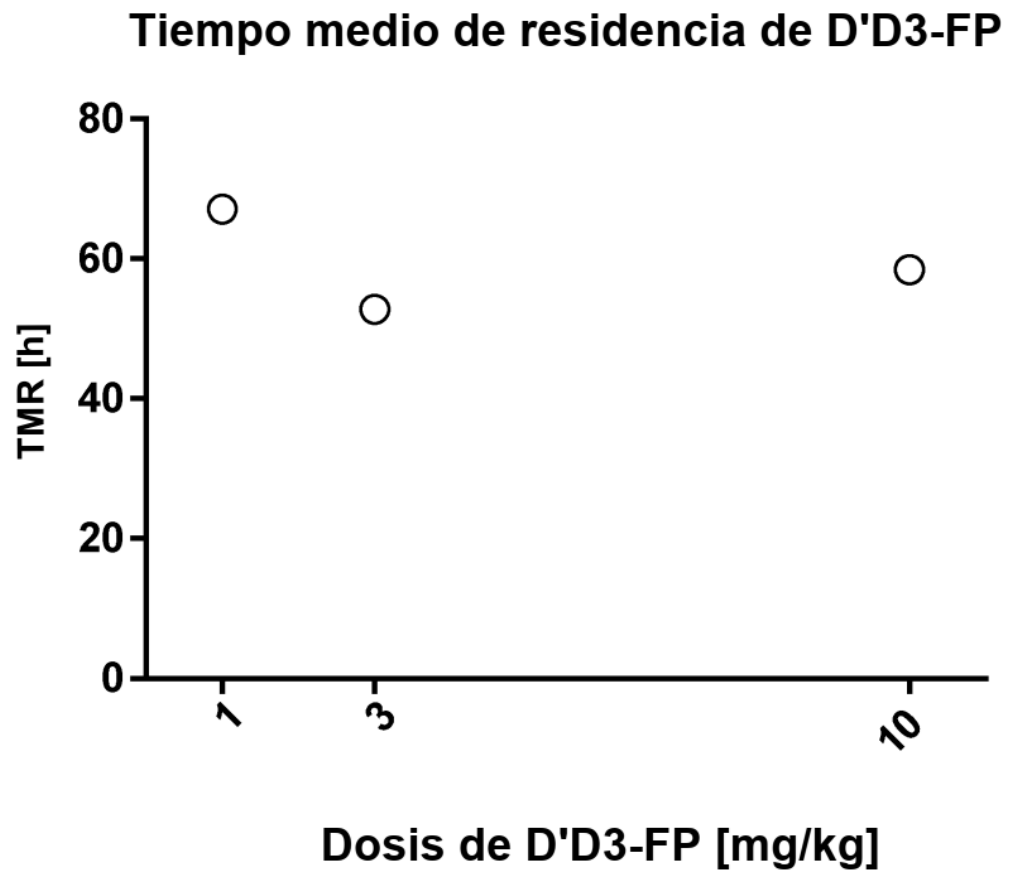


Figura 3B

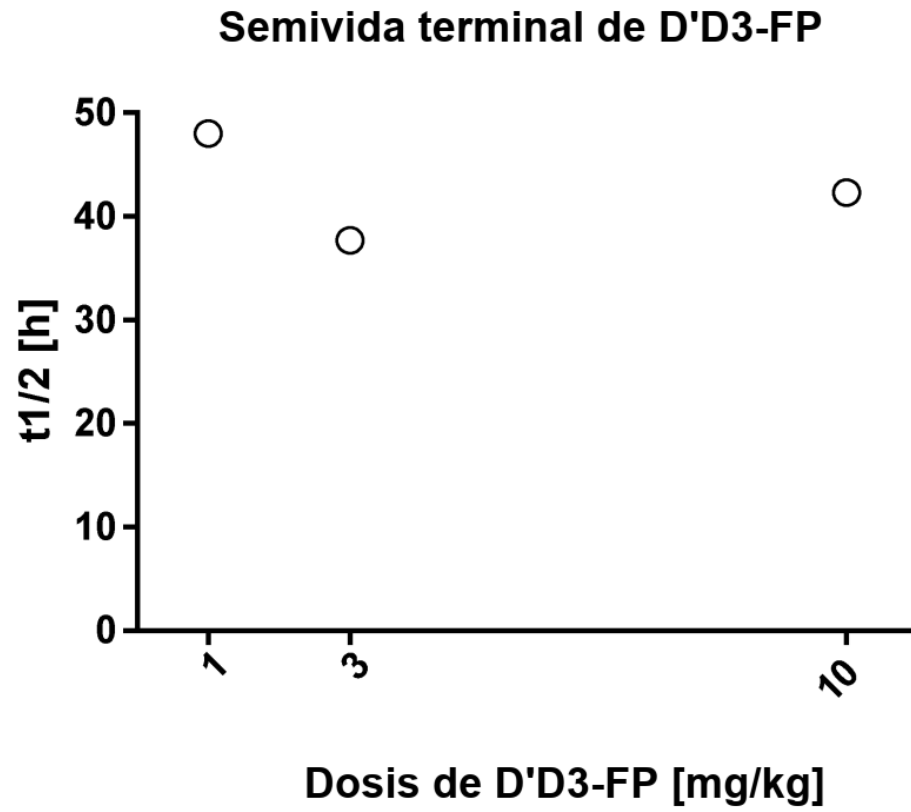


Figura 3C

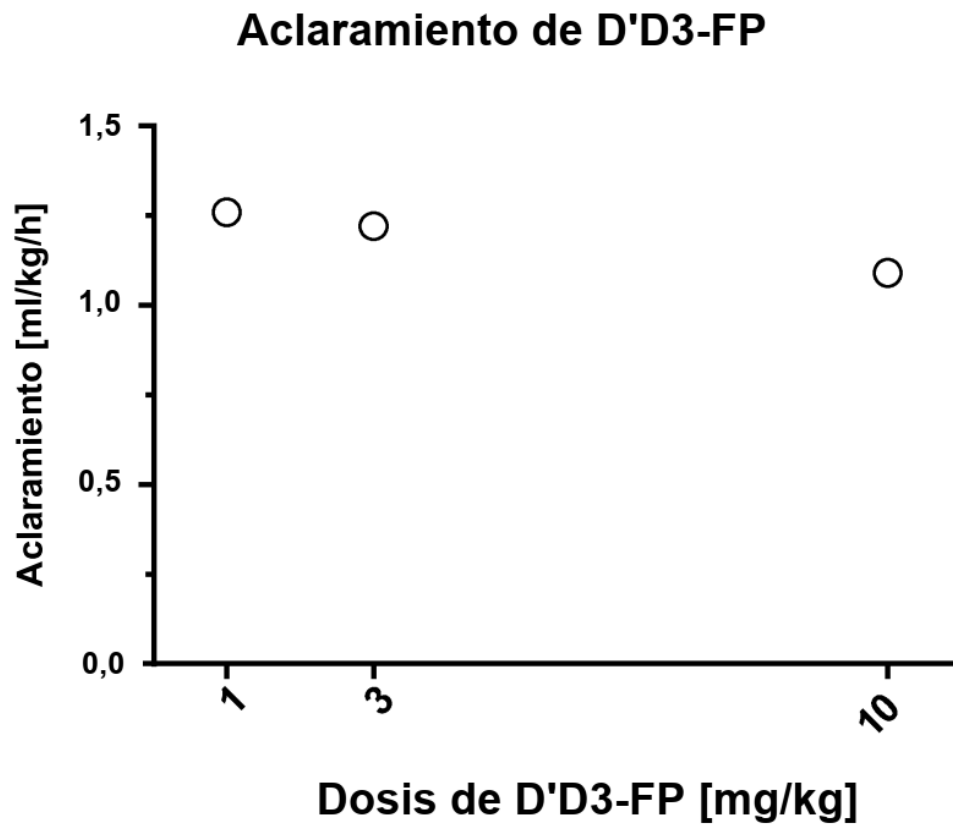


Figura 4A

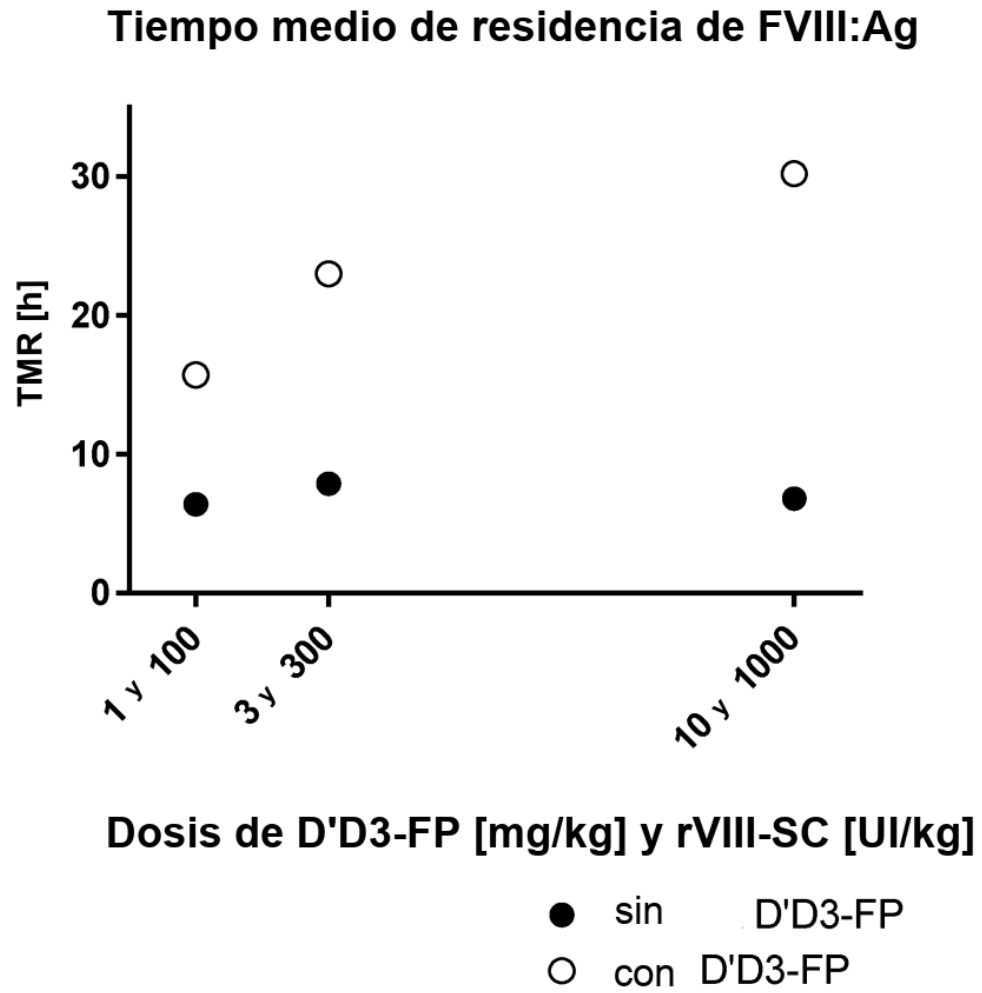


Figura 4B

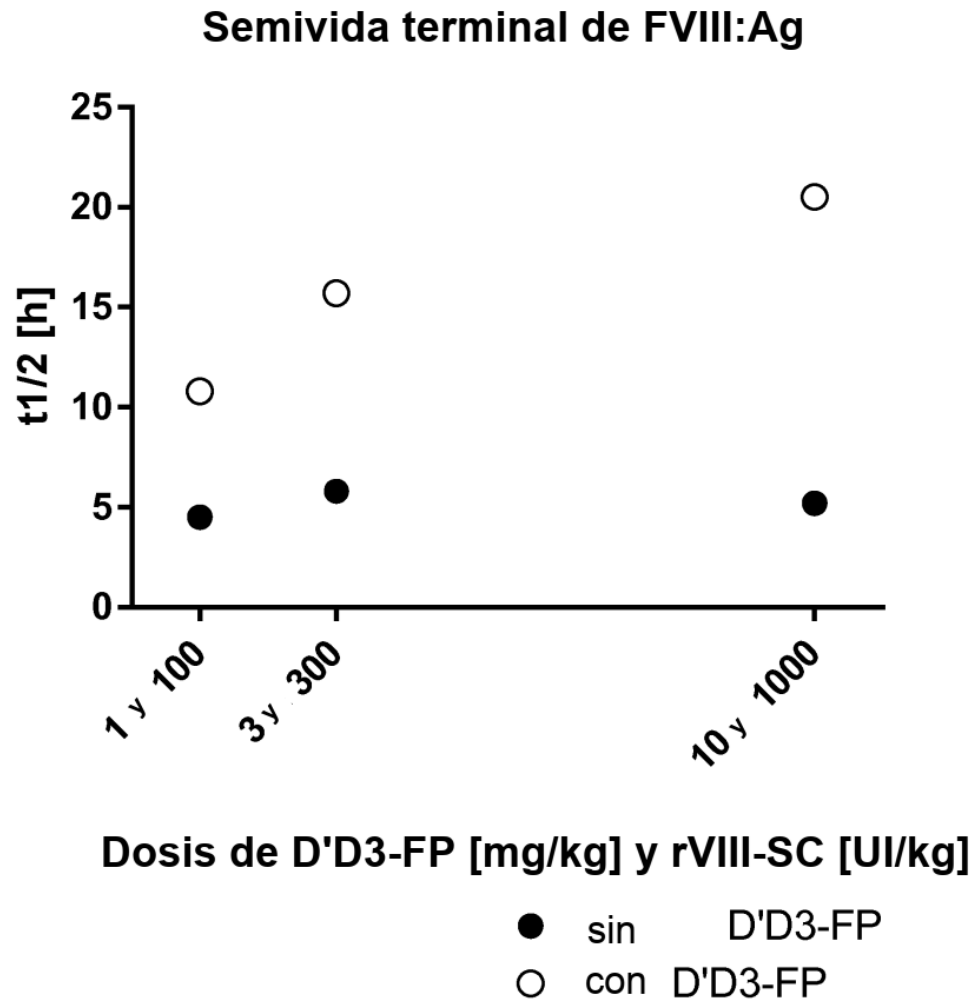




Figura 4C

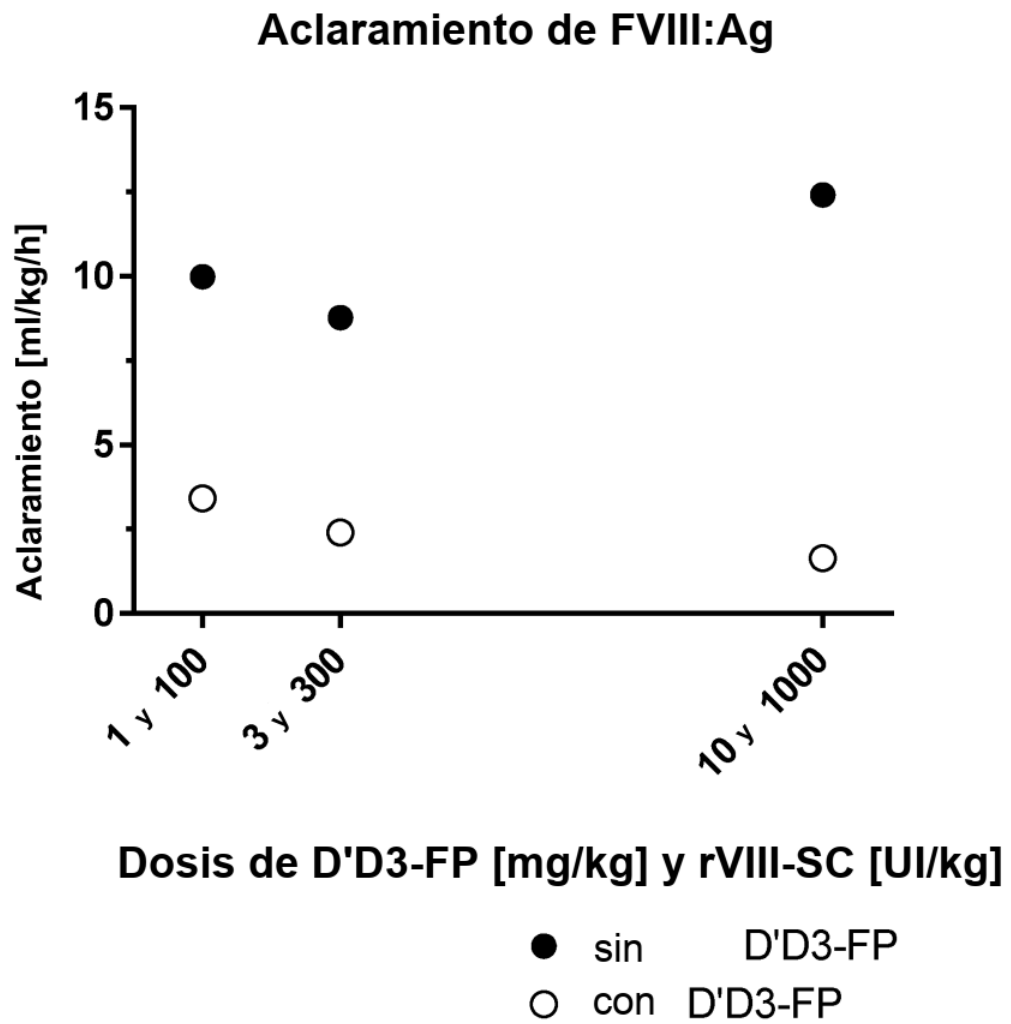


Figura 5A

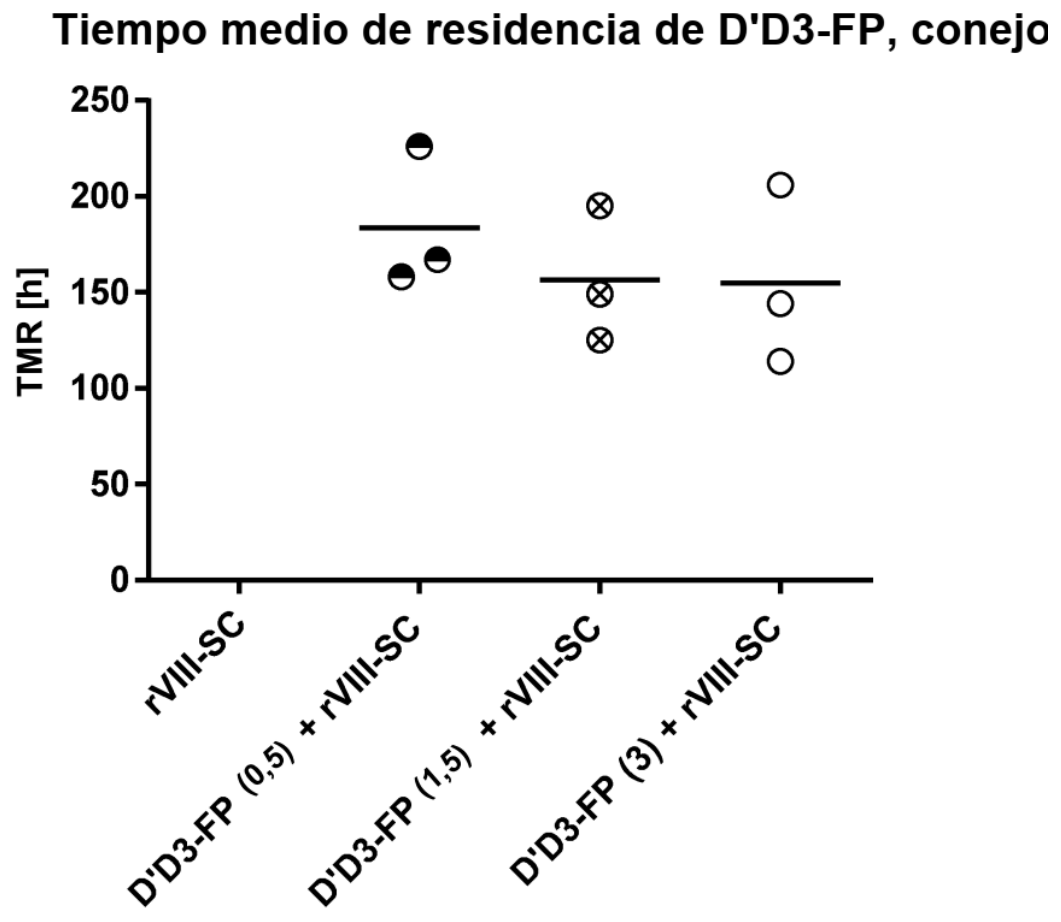


Figura 5B

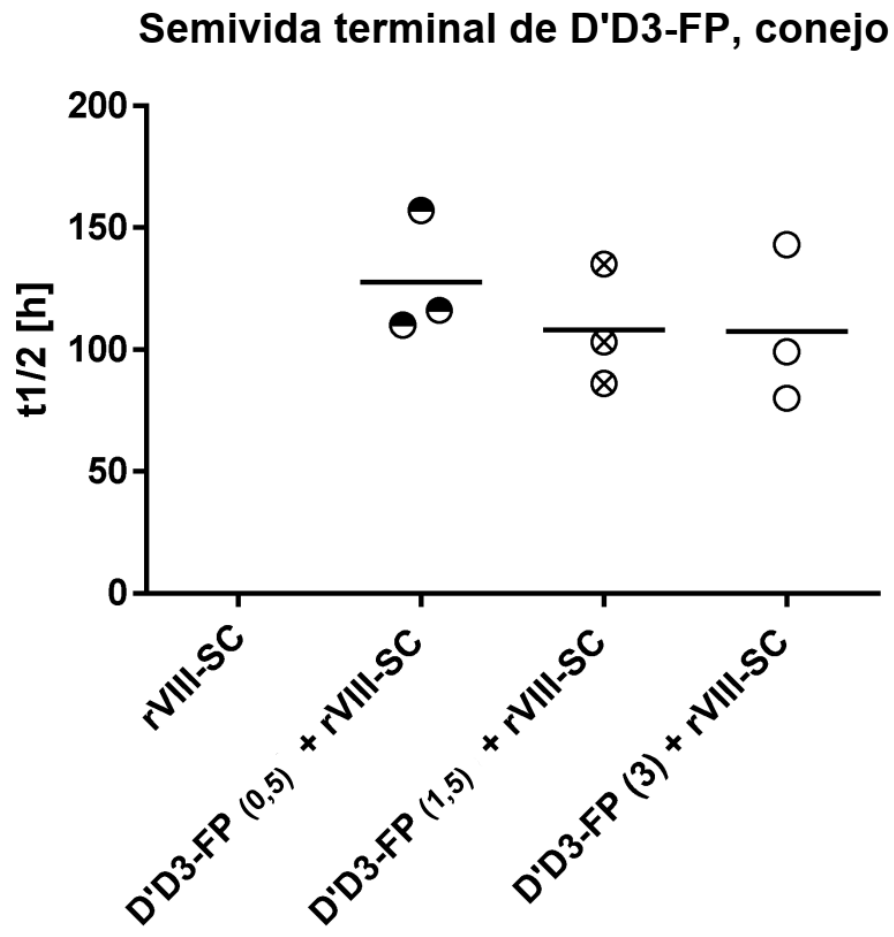


Figura 5C

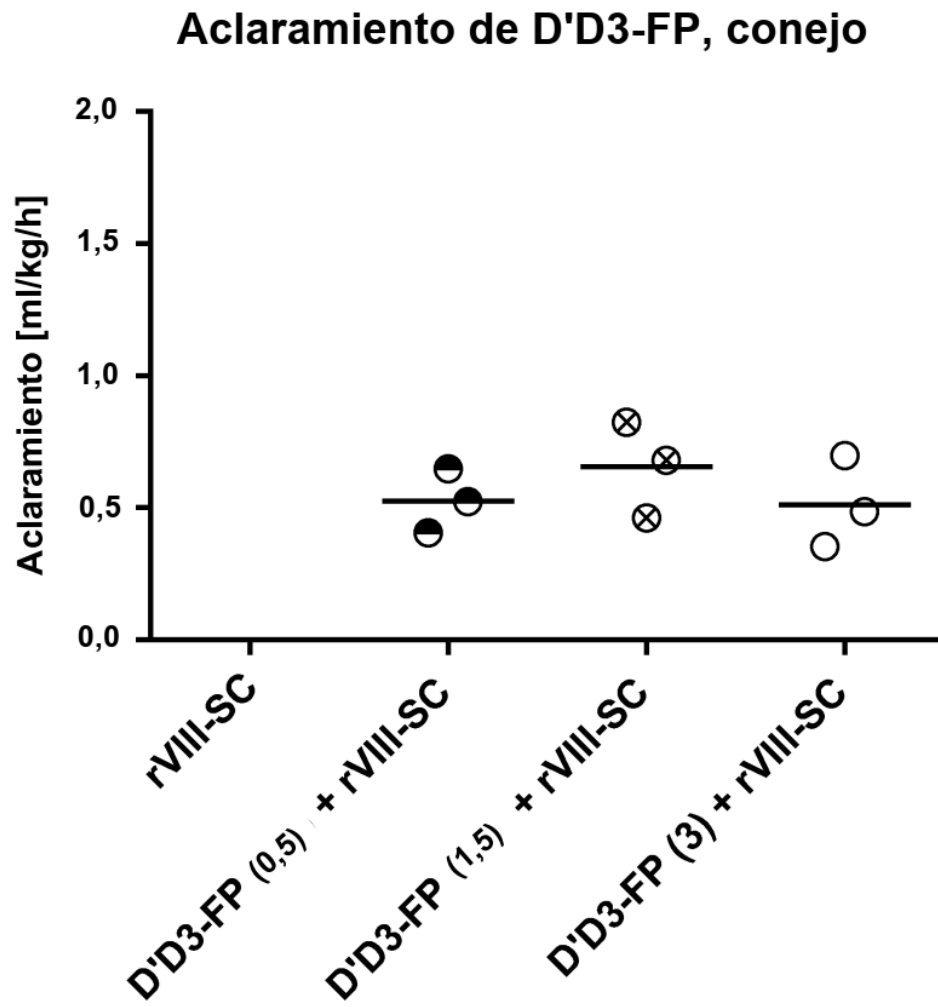


Figura 6A

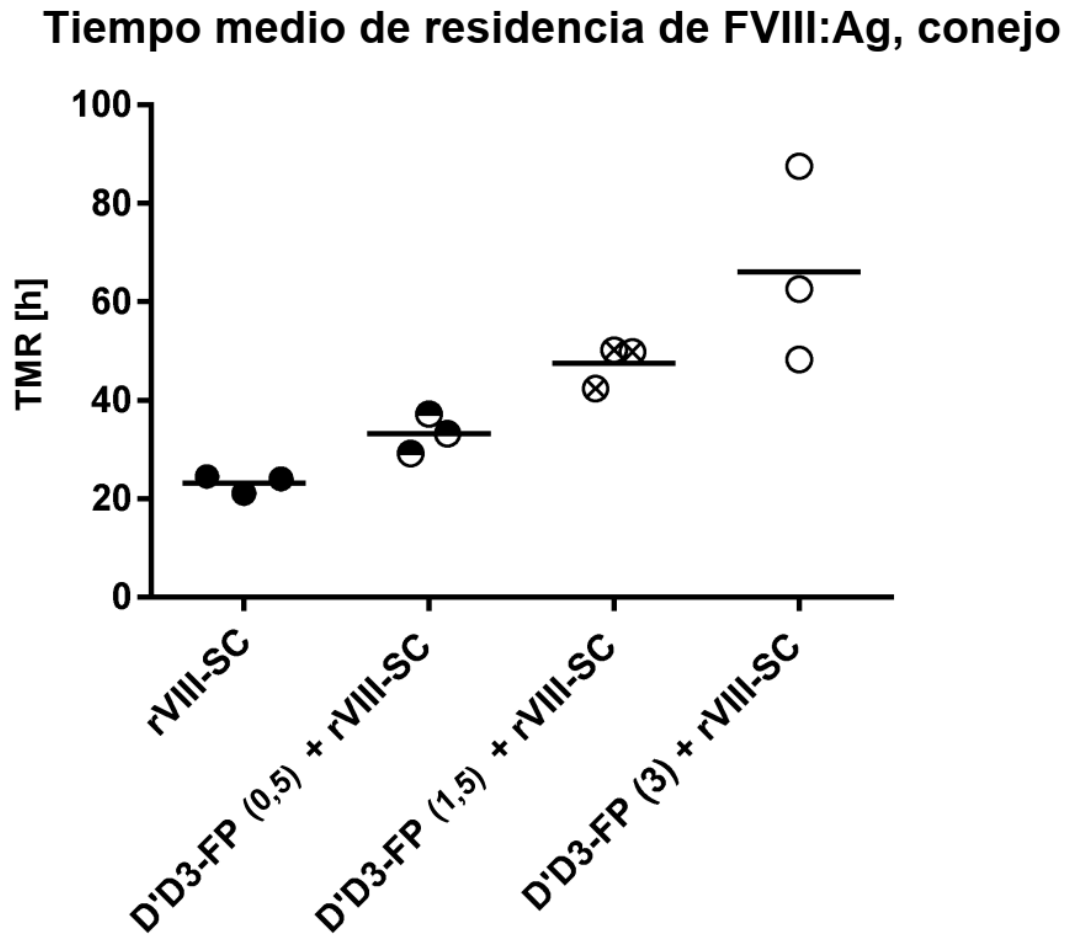


Figura 6B

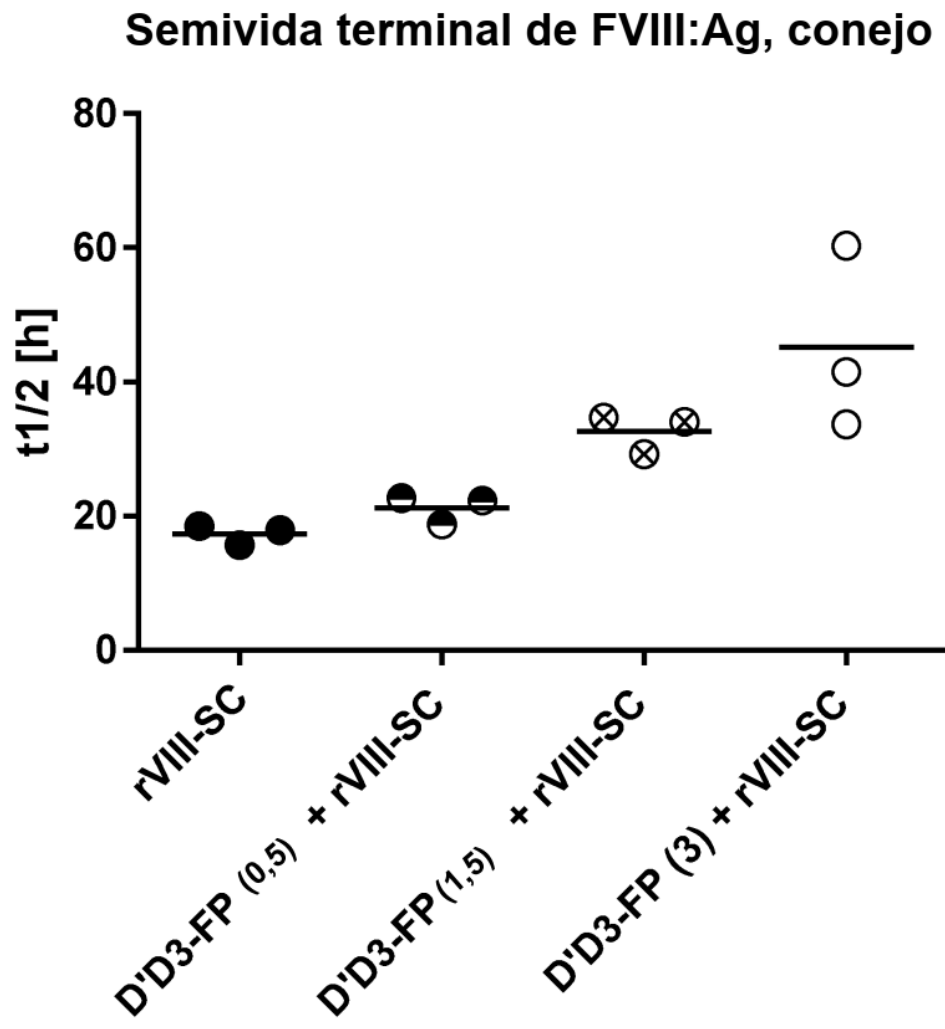


Figura 6C

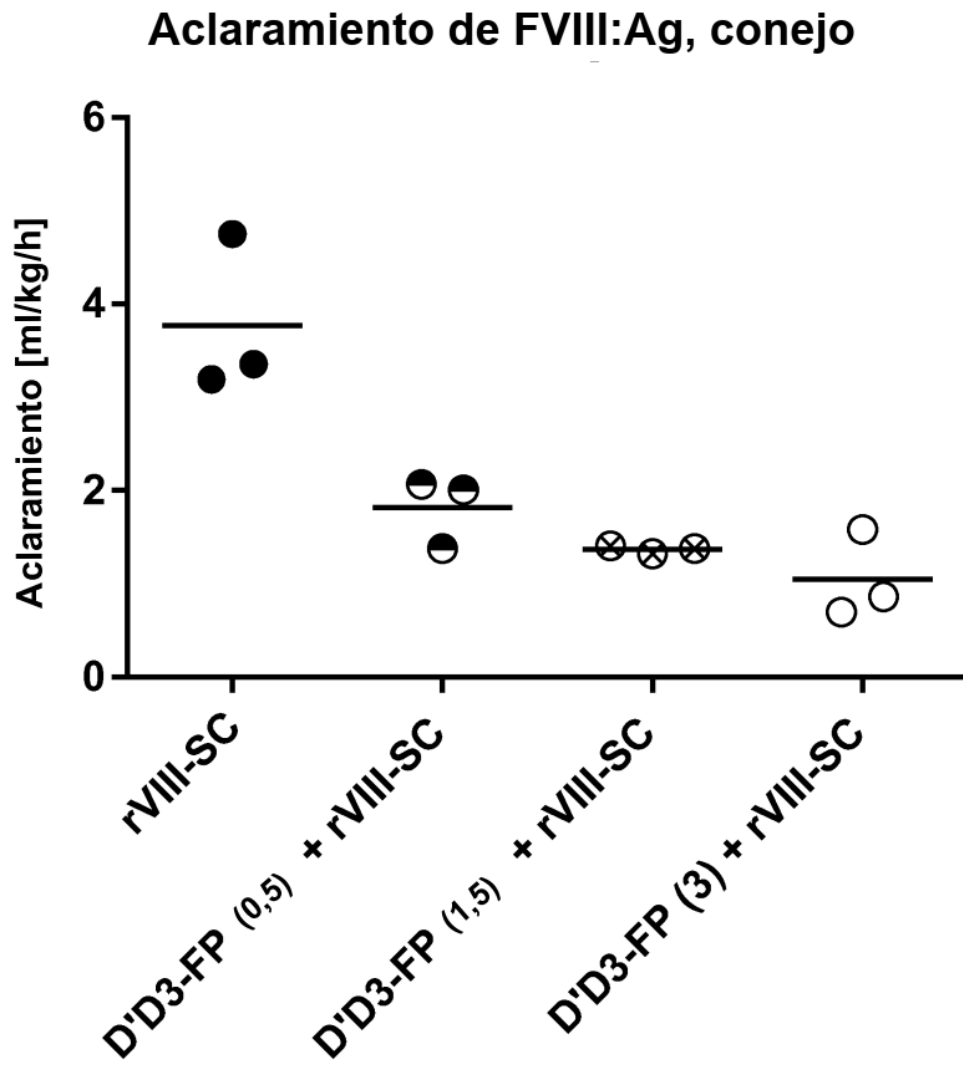


Figura 7A

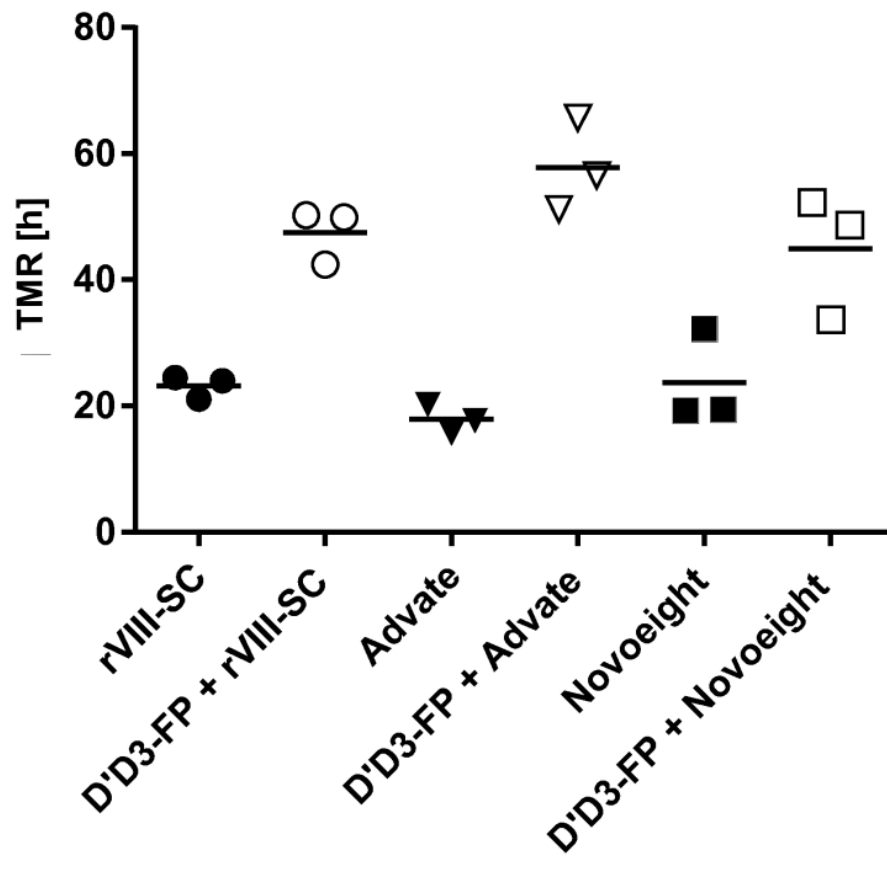
**Tiempo medio de residencia de FVIII:Ag, conejo**



Figura 7B

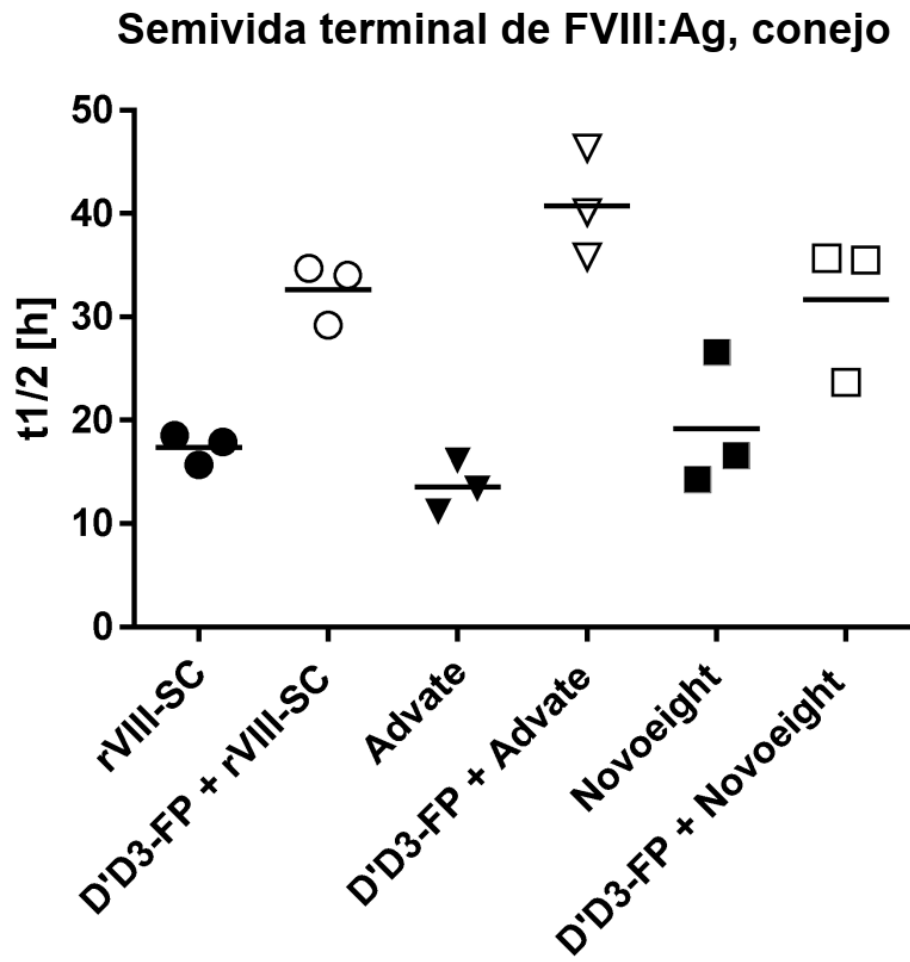


Figura 7C

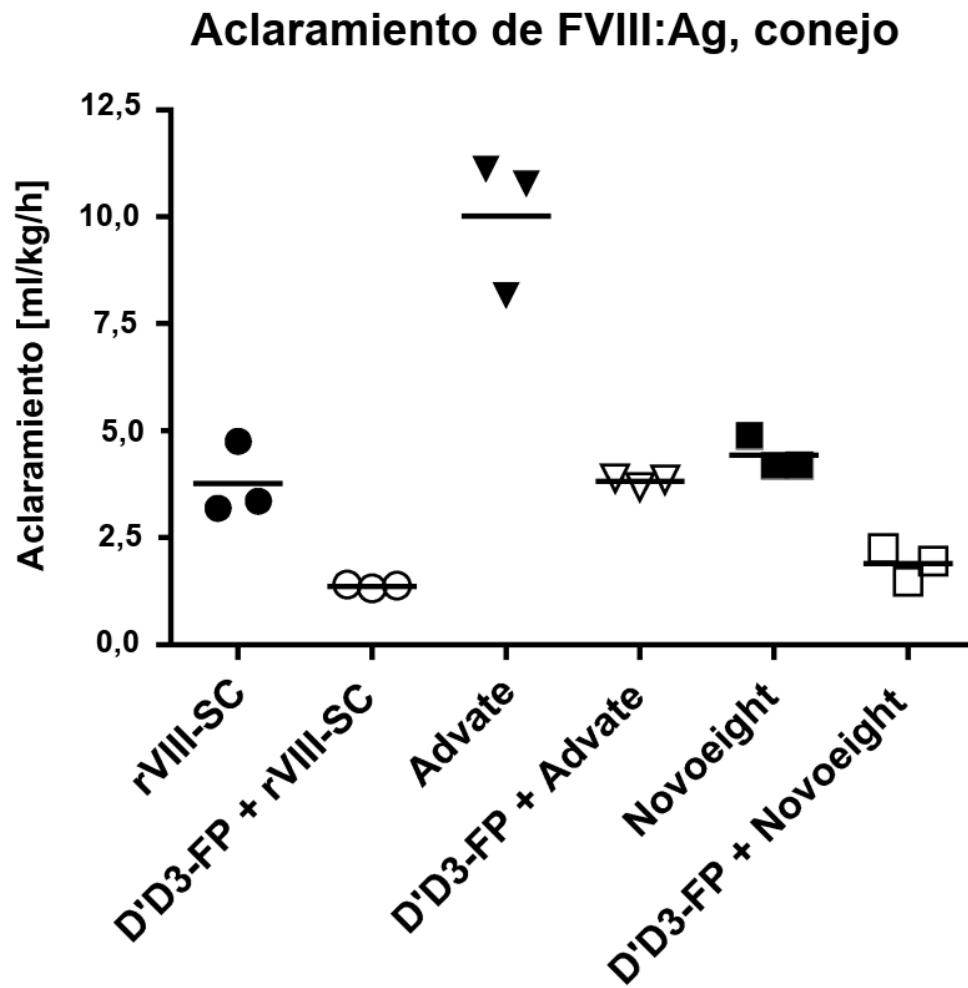


Figura 8A

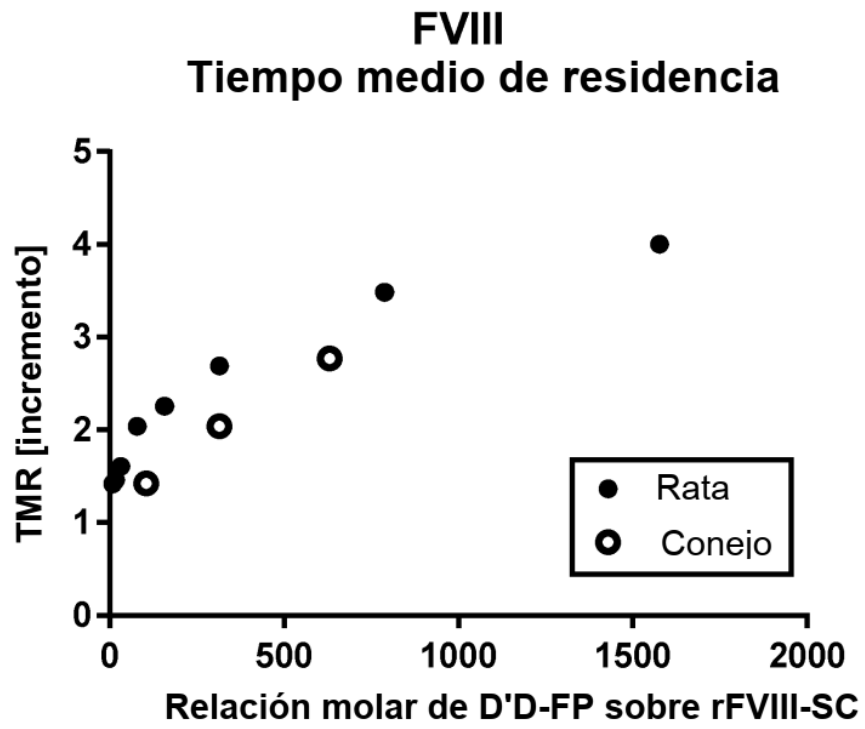


Figura 8B

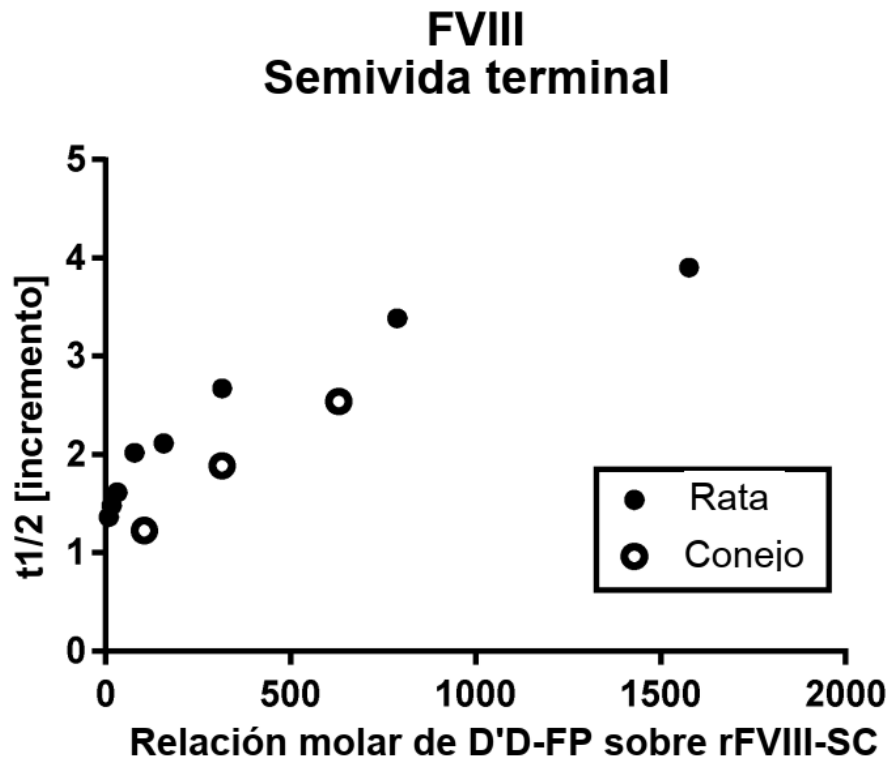


Figura 8C

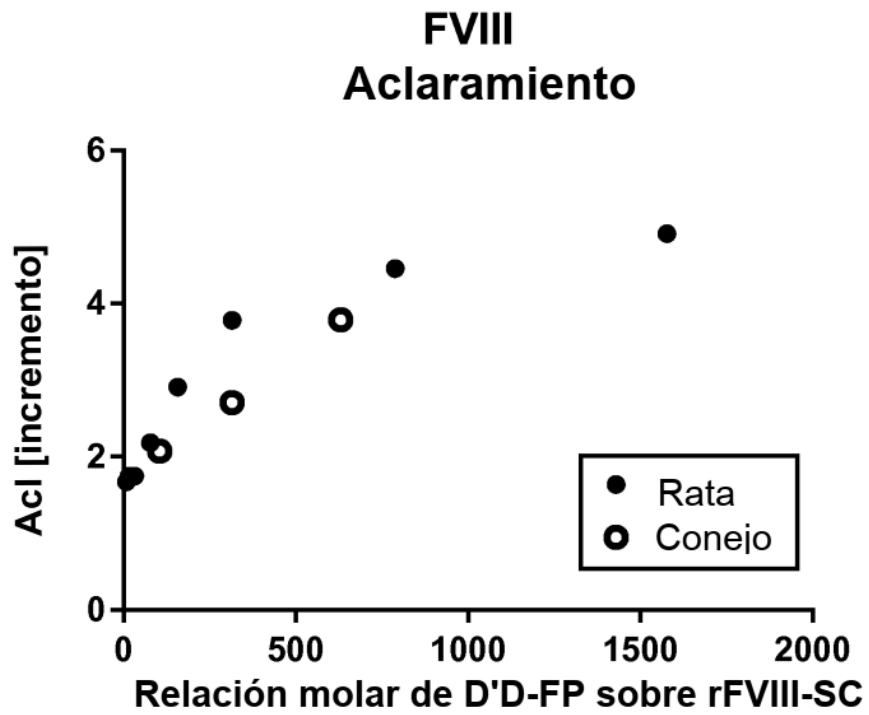


Figura 9A

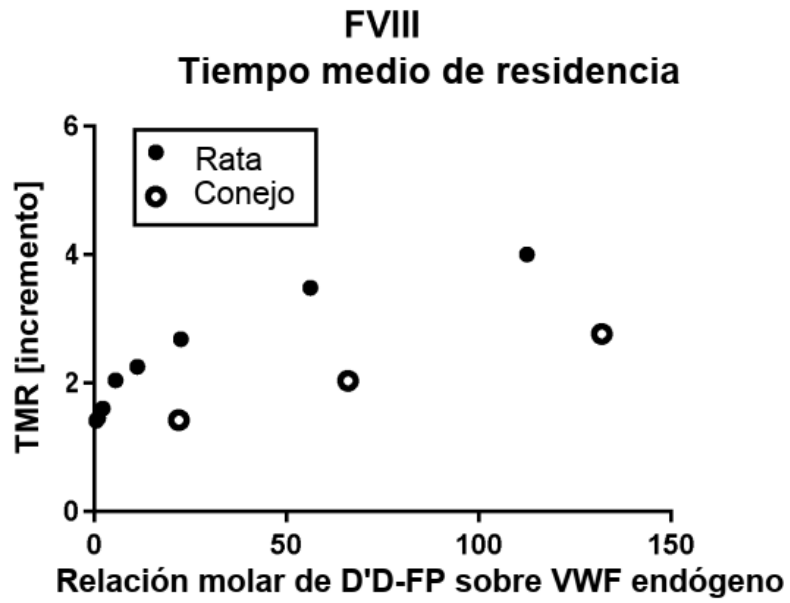


Figura 9B

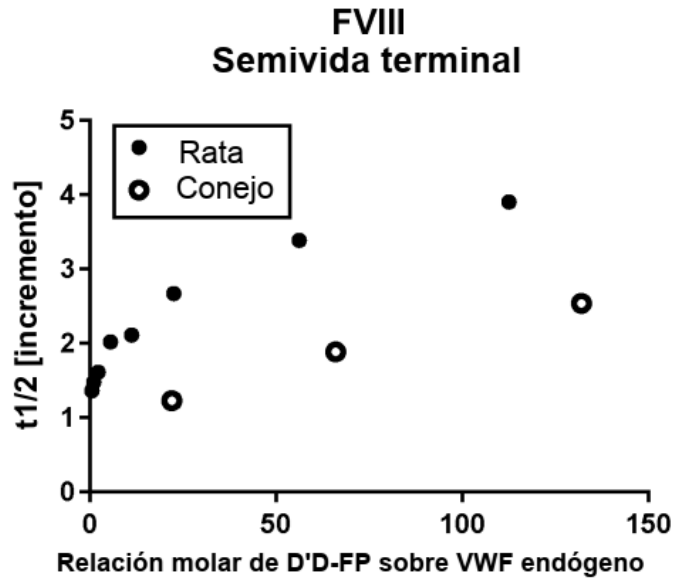


Figura 9C

