

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 895 798**

51 Int. Cl.:

C07K 14/755 (2006.01)

A61K 38/36 (2006.01)

A61K 38/37 (2006.01)

A61P 7/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2015 E 18159816 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.08.2021 EP 3360895**

54 Título: **Preparación que comprende péptidos del factor VIII y del factor Von Willebrand**

30 Prioridad:

06.06.2014 EP 14171579

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

22.02.2022

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

ROEB DÍAZ-ÁLVAREZ, María

ES 2 895 798 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Preparación que comprende péptidos del factor VIII y del factor de Von Willebrand

- 5 La presente invención se refiere a preparaciones farmacéuticas para el tratamiento de trastornos hemorrágicos.

Antecedentes de la invención

10 El Factor VIII ("FVIII") es una glucoproteína del plasma sanguíneo con una masa molecular de aproximadamente 280 kDa. Interviene en la cascada de reacciones de coagulación que conducen a la coagulación de la sangre. El trastorno hemorrágico más común se produce por una deficiencia del Factor VIII funcional, denominada hemofilia A. Dicho trastorno se trata sustituyendo el Factor VIII, ya sea derivado de plasma o recombinante. El Factor VIII se utiliza para el tratamiento urgente y profiláctico de hemorragias en pacientes con hemofilia A.

15 La secuencia de aminoácidos del Factor VIII está organizada en tres dominios estructurales: un dominio A triplicado de 330 aminoácidos, un solo dominio B de 980 aminoácidos y un dominio C duplicado de 150 aminoácidos. El dominio B no tiene homología con otras proteínas y proporciona 18 de los 25 posibles sitios de glucosilación ligados a asparagina (N) de esta proteína. Aparentemente, el dominio B no tiene ninguna función en la coagulación. Las moléculas del Factor VIII con supresión del dominio B, tienen actividad procoagulante invariable en comparación con el Factor VIII de longitud completa. Algunas preparaciones de Factor VIII recombinante (rFVIII) tienen el dominio B suprimido.

20 En el plasma, el Factor VIII se estabiliza a través de la asociación con la proteína del Factor de Von Willebrand ("vWF"), que parece inhibir el aclaramiento del Factor VIII, por ejemplo, aclaramiento por proteólisis o mediado por el receptor de LRP. En la circulación, el Factor de Von Willebrand está presente en un exceso molar de 50 veces en relación con el Factor VIII en condiciones fisiológicas normales.

30 El factor de Von Willebrand Factor es una glucoproteína adhesiva multimérica presente en el plasma de mamíferos, que tiene múltiples funciones fisiológicas. Durante la hemostasia primaria, el Factor de Von Willebrand actúa como mediador entre receptores específicos en la superficie plaquetaria y componentes de la matriz extracelular como el colágeno. Asimismo, el Factor de Von Willebrand actúa como una proteína transportadora y estabilizadora del Factor VIII procoagulante. El Factor de Von Willebrand se sintetiza en células endoteliales y megacariocitos como una molécula precursora de 2813 aminoácidos. El polipéptido precursor, pre-pro-Factor de Von Willebrand, consiste en un péptido señal de 22 residuos, en un pro-péptido de 741 residuos y en el polipéptido de 2050 residuos que se encuentra en el Factor de Von Willebrand de plasma maduro (Fischer *et al.*, FEBS Lett. 351: 345-348, 1994). Tras la secreción en plasma, el factor de Von Willebrand circula en forma de varias especies con diferentes tamaños moleculares. Estas moléculas de factor de Von Willebrand consisten en oligo y multímeros de la subunidad madura de 2050 residuos de aminoácidos. El Factor de Von Willebrand se puede encontrar generalmente en el plasma como multímeros de un tamaño que varía de aproximadamente 500 a 20000 kDa (Furlan, Ann Hematol. Junio de 1996; 72(6): 341-8).

40 La semivida promedio *in vivo* del Factor VIII humano en la circulación humana es de aproximadamente 12 horas. El Factor de Von Willebrand podría disminuir las posibles inmunorreacciones contra el Factor VIII cuando forma un complejo con el Factor VIII al protegerlo de posibles sitios inhibidores de anticuerpos conocidos en la cadena pesada (dominio A2) y en la cadena ligera (dominio A3/C2) (Ragni, J Thromb. Haemost. 10: 2324-2327, 2012) o en otros posibles sitios inhibidores de anticuerpos en la molécula del Factor VIII.

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

55 Hasta hoy, el tratamiento estándar de la hemofilia A y de la EvW implica frecuentes infusiones intravenosas de preparaciones de concentrados de Factor VIII y Factor VIII/Factor de Von Willebrand. Estas terapias sustitutivas son generalmente eficaces, sin embargo, por ejemplo, en pacientes con hemofilia A grave sometidos a tratamiento profiláctico, el Factor VIII debe administrarse por vía intravenosa (i.v.) aproximadamente 3 veces por semana debido a la corta semivida plasmática del Factor VIII de aproximadamente 12 horas. Ya alcanzando niveles de Factor VIII por encima del 1 % del plasma humano normal, lo que corresponde a un aumento de los niveles de Factor VIII en 0,01 U/ml, la hemofilia A grave se convierte en hemofilia A moderada. En la terapia profiláctica, el régimen de dosificación se diseña de manera que los niveles de actividad del Factor VIII no caigan por debajo de los niveles del 2-3 % de la actividad del Factor VIII de los no hemofílicos.

65 La administración de un Factor VIII por vía intravenosa (i.v.) es complicada, asociada a dolor y conlleva el riesgo de una infección, especialmente porque esta se realiza principalmente en tratamiento domiciliario por los propios pacientes o por los padres de los niños con diagnóstico de hemofilia A. Además, las inyecciones intravenosas

frecuentes producen inevitablemente la formación de cicatrices, interfiriendo con futuras infusiones. Aun así, podría ser necesario un tratamiento i.v. en una situación de urgencia o cirugía, es decir, cuando se necesita inmediatamente un nivel alto de Factor VIII.

5 Se ha propuesto la administración subcutánea (s.c.) del Factor VIII, por ejemplo, en los documentos WO 95/01804 A1 y WO 95/026750 A1. Sin embargo, para alcanzar una biodisponibilidad aceptable, se tuvieron que administrar dosis muy altas de Factor VIII.

10 Otra estrategia para mejorar la biodisponibilidad después de la administración no intravenosa, ha sido utilizar Factor VIII fusionado a albúmina (documento WO 2011/020866 A2).

En el documento WO 2013/057167 A1 se propone administrar Factor VIII en combinación con glucosaminoglucanos sulfatados mediante administración no intravenosa, opcionalmente junto con Factor de Von Willebrand.

15 En el documento WO 2008/151817 A1 se describe el uso general de multímeros del Factor de Von Willebrand no escindidos para la estabilización del Factor VIII, derivados de plasma o recombinantes (mutantes por supresión y de longitud completa) destinados al tratamiento extravascular.

20 En los documentos WO 2013/160005 A1 y WO 2013/083858 A1, se describe el uso general del Factor de Von Willebrand recombinante o de fragmentos del Factor de Von Willebrand recombinante, para mejorar la biodisponibilidad, después del tratamiento s.c., de moléculas muy específicas del Factor VIII, en donde dichas moléculas del Factor VIII comprenden un dominio B truncado con un tamaño de 100-400 aminoácidos. Según el documento WO 2013/160005 A1, las moléculas del Factor VIII con dominios B truncados entre 100 y 400 aminoácidos, tienen una mayor biodisponibilidad del Factor VIII en comparación con el Factor VIII que tiene el dominio B completo o con las moléculas de Factor VIII con dominio B truncado que no tienen o tienen pocos aminoácidos.

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

30 El objeto de la presente invención es proporcionar preparaciones de Factor VIII alternativas. Preferentemente, estas preparaciones deben mostrar estabilidad mejorada, biodisponibilidad mejorada y/o riesgo reducido de que se produzcan reacciones inmunológicas.

35 Este objeto se logra mediante una composición que comprende un complejo de Factor VIII y uno o más péptidos del Factor de Von Willebrand, en donde los péptidos del Factor de Von Willebrand son fragmentos del Factor de Von Willebrand y comprenden al menos los aminoácidos 764 a 1905 de la SEQ ID NO: 1 pero no los aminoácidos 2255 a 2645 de la SEQ ID NO: 1 y en donde los péptidos del Factor de Von Willebrand tienen una constante de afinidad de unión K_D por la heparina $\geq 2,43$ nM.

40 El Factor VIII, como se usa en el presente documento, incluye el Factor VIII de longitud completa, el Factor VIII con supresión del dominio B o un Factor VIII en donde el dominio B se ha sustituido por un enlazador artificial o por un fragmento del dominio B natural o por una combinación de ambos, es decir, el dominio B tiene un tamaño diferente en comparación con el Factor VIII de longitud completa. También incluye Factor VIII con un número limitado de modificaciones con, inserción, supresión o sustituciones, especialmente Factor VIII adaptado a haplotipos como se describe en K.R. Viel, *et al.* New England J Med 2009; 360:1618-1627. Preferentemente, la homología de secuencia con el Factor VIII (definida en los aminoácidos 20-2351 de P00451 de la base de datos SwissProt el 21 de julio de 1986) aunque ignorando la homología en el Dominio B del 99 % según FASTA, implementada en la versión 36 de FASTA, se basa en W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227-258. En otras palabras, cuando se calcula una homología de secuencia, el dominio B no se incluye en la comparación de ambas proteínas. También se incluye Factor VIII modificado, como el Factor VIII con HES (*Hydroxyethyl Starch*, hidroxietil almidón) o Factor VIII con PEG (polietilenglicol) o Factor VIII con proteínas de fusión Fc y Factor VIII con proteínas de fusión de albumina, como se describe en Oldenburg, Haemophilia (2014), 20 (Suppl. 4), 23-28.

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

60 Los péptidos del Factor de Von Willebrand son péptidos que comprenden al menos los aminoácidos 764 a 1905 de la SEQ ID NO: 1 en una sola cadena de aminoácidos. Estos aminoácidos pueden formar parte de una secuencia más larga que comprenda ambas secuencias juntas. En otras palabras, los péptidos de Von Willebrand de la invención comprenden tanto la SEQ ID NO: 5 como la SEQ ID NO: 6. Estos pueden comprender partes adicionales del Factor de Von Willebrand, excluyendo todos los aminoácidos de 2255 a 2645 (SEQ ID NO: 7). Los péptidos de Von Willebrand pueden comprender otras secuencias que forman parte de la SEQ ID NO: 1 o secuencias que no forman parte de la SEQ ID NO: 1, por ejemplo, enlazadores de aminoácidos o similares. Preferentemente, la cantidad total de aminoácidos que no forman parte de la SEQ ID NO: 1 no es superior a 50, a 20 o a 10 aminoácidos.

Un aspecto importante de la invención es que los aminoácidos 2255 a 2645 de la SEQ ID NO: 1 no forman parte de los péptidos del Factor de Von Willebrand. En otras palabras, los péptidos del Factor de Von Willebrand, descritos más adelante, no comprenden ninguna secuencia que tenga una homología de al menos 90 % con la SEQ ID NO: 7 según FASTA.

La SEQ ID NO: 1 es la secuencia P04275 de la base de datos Swiss Prot desde el 11 de enero de 2011.

Los péptidos del Factor de Von Willebrand en la composición de la presente invención pueden ser péptidos que tengan la misma secuencia o pueden ser una mezcla de péptidos que tengan secuencias como se definió anteriormente.

Normalmente, una proporción molecular de péptidos del Factor VIII y del Factor de Von Willebrand estará comprendida entre 1:1 y 1:20, preferentemente, entre 1:2 y 1:10. Si los péptidos del Factor de Von Willebrand están en forma de dímeros o multímeros, la proporción molecular se calcula en una sola cadena de aminoácidos, es decir, un complejo de una molécula de Factor VIII con un dímero de péptidos del Factor de Von Willebrand tendrá una proporción de 1:2.

Un complejo, como se usa en el presente documento, se refiere a una unión no covalente del Factor VIII a uno o más péptidos del Factor de Von Willebrand.

Los péptidos del Factor de Von Willebrand son fragmentos del Factor de Von Willebrand, es decir, formas truncadas del extremo N y/o C del Factor de Von Willebrand.

Los fragmentos comprenden los aminoácidos 764 a 1905 de la SEQ ID NO: 1.

Una realización adicional de la invención es una composición que comprende un complejo de Factor VIII y uno o más péptidos del Factor de Von Willebrand que son fragmentos del Factor de Von Willebrand y tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, comenzando desde el aminoácido 764 y finalizando entre los aminoácidos 1905 y 2153 con hasta 10 modificaciones seleccionadas de supresiones, inserciones o sustituciones de aminoácidos.

Los péptidos preferidos del Factor de Von Willebrand son:

- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1905 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1906 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1907 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1908 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1909 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1910 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1911 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1912 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1913 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1914 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1915 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1916 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1917 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1918 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1919 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1920 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1921 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1922 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1923 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1924 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1925 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1926 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1927 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1928 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1929 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1930 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1931 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1932 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1933 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1934 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1935 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1936 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1937 de SEQ ID NO: 1
- Péptidos que tienen la secuencia 764 a 1938 de SEQ ID NO: 1

Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2137 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2138 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2139 de SEQ ID NO: 1
 5 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2140 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2141 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2142 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2143 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2144 de SEQ ID NO: 1
 10 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2145 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2146 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2147 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2148 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2149 de SEQ ID NO: 1
 15 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2150 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2151 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2152 de SEQ ID NO: 1
 Péptidos que tienen la secuencia 764 a 2153 de SEQ ID NO: 1

20 Preferentemente, los péptidos del Factor de Von Willebrand tienen un peso molecular <500 kD, preferentemente < 400 kD. Como el Factor de Von Willebrand a menudo forma oligómeros o multímeros, también los péptidos de la presente invención pueden estar en forma de multímeros u oligómeros.

En una realización preferida, los péptidos de la presente invención tienen al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en

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

35 Los péptidos del Factor de Von Willebrand de la invención muestran, preferentemente, una unión reducida a la heparina, una afinidad más baja por el colágeno (como el colágeno III), una afinidad más baja por los fosfolípidos aunque sin embargo una unión alta con el Factor VIII.

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

40 En la parte experimental se describe la medición de las respectivas constantes de afinidad de unión.

En una realización, los péptidos del Factor de Von Willebrand derivan del Factor de Von Willebrand mediante escisión proteolítica o química. Si se usa la escisión proteolítica, se prefiere especialmente la proteasa V 8 de *S. aureus*.

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

- (i) los péptidos del Factor de Von Willebrand protegen al Factor VIII de la unión de anticuerpos minimizando la formación de inhibidores en un paciente
 50 (ii) el Factor VIII se estabiliza proporcionando una actividad residual del Factor VIII de al menos 90 % después de su almacenamiento durante 12 meses en forma líquida congelada a -70 °C
 (iii) el Factor VIII se estabiliza proporcionando una actividad residual del Factor VIII de al menos 90 % después de su almacenamiento durante 24 meses en forma liofilizada a 5 °C
 55 (iv) el Factor VIII se estabiliza proporcionando una actividad residual del Factor VIII de al menos 90 % después de su almacenamiento durante 12 meses en forma liofilizada a 25 °C
 (v) la semivida del Factor VIII se prolonga *in vivo* en al menos un 20 % y
 60 (vi) reduce a menos de un 20 % la formación de inhibidores en pacientes no tratados previamente, preferentemente a menos de un 10 % después del tratamiento con la composición durante 6 meses.

65 Sorprendentemente, los péptidos del Factor de Von Willebrand parecen aumentar la estabilidad del Factor durante el almacenamiento (vida útil) y/o reducir la formación de inhibidores en los pacientes. La formación de inhibidores es uno de los principales problemas en el tratamiento de los trastornos hemorrágicos crónicos.

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

- 5 Por lo tanto, una realización adicional de la invención es la composición para su uso en un método de tratamiento de un trastorno hemorrágico, comprendiendo dicho método administrar a un paciente que lo necesite una cantidad eficaz de la composición de la presente invención.

10 La cantidad depende de la enfermedad o afección a tratar y puede seleccionarla un experto en la materia. Para tratamientos prolongados, normalmente son adecuadas cantidades de 20 a 40 UI/kg de peso corporal por aplicación. En una situación de urgencia, la cantidad puede ser de aproximadamente 10 a 50 UI/kg de peso corporal.

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

20 Una ventaja del método de la presente invención es la posibilidad de utilizar nanofiltración para eliminar virus. Debido a su tamaño, el Factor de Von Willebrand no se puede nanofiltrar con un nanofiltro que tenga un tamaño de poro pequeño para eliminar virus. Dado que los péptidos del Factor de Von Willebrand tienen un tamaño mucho más pequeño que la molécula de longitud completa del Factor de Von Willebrand, es posible la nanofiltración con tamaños de poro pequeños. La nanofiltración se realiza con un tamaño de poro y unas condiciones que reducen la concentración de uno de los virus más pequeños conocidos, el parvovirus porcino, en al menos un factor de 100 (2 log), preferentemente en al menos un factor de 1000 (3 log) y lo más preferentemente a una concentración por debajo del límite de detección del ensayo de parvovirus, opcionalmente utilizando uno o más nanofiltros en serie. En esta prueba, se añade parvovirus porcino a una muestra y se analiza después de la filtración.

30 Por lo tanto, una realización adicional de la invención es un método para la reducción de virus que comprende la etapa de nanofiltrar los péptidos del Factor de Von Willebrand antes o después de una combinación con el Factor VIII, por lo que el parvovirus porcino se reduciría en al menos 2 log.

Un tampón preferido para la administración de la composición de la invención comprende melicitosa, preferentemente en una cantidad de hasta 1000 mM, particularmente de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, por ejemplo, de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM.

35 **Breve descripción de los dibujos**

40 La Figura 1 muestra la purificación del fragmento III (SPIII) de pdVWF (siglas del inglés *plasma-derived von Willebrand Factor*, Factor de Von Willebrand derivado de plasma) digerido por la proteasa V8 de *S. aureus*. A Cromatograma MonoQ del perfil de elución del fragmento III (indicado con una flecha). B Gel de SDS-PAGE (por las siglas del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico) del fragmento purificado; rojo.- en condiciones reductoras; n.r.- en condiciones no reductoras.

45 La Figura 2 muestra la purificación del fragmento I (III-T4) a partir del fragmento III digerido con tripsina. Cromatograma MonoQ del perfil de elución del fragmento I (indicado con una flecha). En la imagen insertada se muestra la SDS-PAGE en condiciones no reductoras del fragmento purificado.

50 La Figura 3 muestra la purificación del fragmento II a partir del fragmento III, después de una segunda digestión con la proteasa V8 de *S. aureus*. A Cromatograma MonoQ del perfil de elución del fragmento II (indicado con una flecha), también se indica el segundo producto de escisión así como la proteasa V8. B Cromatograma de la segunda cromatografía MonoQ necesaria para retirar completamente la proteasa. En la imagen insertada se muestra la SDS-PAGE en condiciones reductoras del fragmento purificado.

55 La Figura 4 muestra la unión al rFVIII del pdVWF y de los fragmentos II y III. A, B, C Sensogramas de unión (curvas de color gris) y alineación de curvas (curvas de color negro) representativos de la interacción entre el rFVIII y el pdVWF/fragmentos II y III purificados, inmovilizados. En el diagrama se muestran las concentraciones y el tipo de muestra. C Constantes de disociación (K_D) expresadas como media y EEM; n=8.

60 La Figura 5 muestra la unión de rFVIII a la monocapa de fosfolípidos en SPR y la inhibición por pdVWF. A Sensogramas de unión del rFVIII y del rFVIII en presencia de BSA (seroalbúmina bovina) 108 nM o de pdVWF 47,6 nM;

65 cada muestra por triplicado. B Media y DE de los niveles de unión medidos 120 segundos después del final de la inyección del analito, expresados como porcentaje de unión a rFVIII; n=3.

La Figura 6 muestra la inhibición de la interacción entre rFVIII-fosfolípido por fragmentos derivados del Factor de

Von Willebrand medida en SPR. La unión del rFVIII a la monocapa de fosfolípidos se realizó en presencia de tres concentraciones diferentes de los tres fragmentos derivados del Factor de Von Willebrand (en el gráfico se indican las concentraciones y el tipo de fragmento). El gráfico representa la media y la DE de los niveles de unión medidos 120 segundos después del final de la inyección del analito expresados como porcentaje de unión del rFVIII; n=3.

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

La Figura 8 muestra la unión del pdVWF y del fragmento III a colágeno de tipo III. A, B Sensogramas de unión (curvas de color gris) y alineación de curvas (curvas de color negro) representativos de la interacción entre el colágeno de tipo III y el pdVWF/fragmento III purificado, inmovilizados. En el diagrama se muestran las concentraciones y el tipo de muestra. C Constantes de disociación (K_D) expresadas como media y EEM; n=9.

La Figura 9 muestra la unión a heparina del pdVWF y del fragmento III. A, B Sensogramas de unión (curvas de color gris) y alineación de curvas (curvas de color negro) representativos de la interacción entre la heparina y el pdVWF/fragmento III purificado, inmovilizados. En el diagrama se muestran las concentraciones y el tipo de muestra. C Constantes de disociación (K_D) expresadas como media y EEM; n=6.

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

La Figura 11 muestra la actividad de FVIII medida con un ensayo de actividad de FVIII cromogénico en muestras de plasma de perros con hemofilia A obtenidas después de la aplicación del FVIII o FVIII en combinación con el fragmento III del VWF. A El FVIII o FVIII con un exceso molar de cinco veces del fragmento III del VWF se aplicó por vía subcutánea a 200 UI de FVIII/kg de PC; el área bajo la curva (ABC) de la muestra del FVIII sola fue de 2,867 y el del FVIII en combinación con el fragmento III del VWF fue de 4,917. B El FVIII o FVIII con un exceso molar de cinco veces del fragmento III del VWF se aplicó por vía intravenosa a 200 UI de FVIII/kg de PC. El ABC de la muestra del FVIII sola fue de 27,69 y el del FVIII en combinación con el fragmento III del VWF fue de 45,72.

La Figura 12 muestra la unión del monómero del fragmento III recombinante, del dímero del fragmento III recombinante y del VWF derivado de plasma (flVWF) al rFVIII. A, B, C Sensogramas de unión (curvas de color gris) y alineación de curvas (curvas de color negro) representativos de la interacción entre el FvW o los fragmentos del FvW recombinante y el FVIII, inmovilizados. En el diagrama se muestra el tipo de muestra. La concentración del FVIII aplicado fue de 0, 0,2, 0,6, 1,7, 5, 15, 45 y 135 nM. D Constantes de disociación (K_D) expresadas como media y DE; n=4.

La Figura 13 muestra la estabilización del FVIII por el fragmento III del VWF. La actividad de FVIII del FVIII solo o del FVIII formando complejo con el fragmento III del VWF incubado a 40 °C, se midió a diferentes momentos.

La Figura 14 muestra la unión a Heparina utilizando cromatografía de afinidad con heparina de dos fragmentos del VWF como se describe en el Ejemplo 9.

Ejemplos

La invención se explica con más detalle mediante los siguientes ejemplos no limitativos.

Ejemplo 1

Producción y purificación de fragmentos del Factor de Von Willebrand derivados de plasma.

Producción y purificación del fragmento III (SPIII, res. 764-2128)(Según Marti *et al.* Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. Biochemistry 1987; 26:8099-8109 con modificaciones) (SEQ ID NO: 2):

SLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVA
 LERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKY
 LFPGECQYVLVQDYCGSNPGETFRILVGNKGCSPVSVKCKRVTILVEGGEIELFDGEVNV
 KRPMKDETHFEVVESGRYIILLGKALSVVWDRHLSISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQ
 NNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRIL
 TSDVVFQDCNKLVDPPEYLDVCIYDTCSCESI GDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVTTWRTA
 TLC PQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVGCHAHCPPGKIL
 DELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL
 VVPPTDAPVSPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVDM
 MERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKY
 TLFQIFSKIDRPEASRITLLMASQEPQRM SRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVGIGPHANLK
 QIRLIEKQAPENKAFVLSSVDELEQQORDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLL
 GVSTLGPKRNSMVL DVAFVLEGS D KI GEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQYS
 YMVTVEYFPFSEAQSKGDILQVRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNL
 YMVTGNPASDEIKRLPGDIQVVPIGVGNANVQELERIGWPNAPILIQDFETLPREAPD
 LVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLLDGSSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANI

 GPRLTQVSVLQYGSITTTIDVPWNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRYLTS
 EMHGARPGASKAVVILVTDVSVDSVDAAADAARSNRVTVFPIGIGDRYDAAQLRILAGPA
 GDSNVVVLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRI CMDEDGNEKRP GDVWTL PDQCHT VT
 CQPDGQTLKSHRVNCDRGLRPS CPNSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDG
 QNFKLTGSCSYVLFQNKQDLEVI LHNGACSPGARQGCMKSEVKHSALSVELHSDMEVT
 VNGRLVSPVYVGGNMEVNVYGAIMHEVRFNHLGHI FTFTPQNNEFQLQLSPKTFASKTYG
 LCGICDENGANDFMLRDGTVT TDWKT LVQEWTVQRPGQTCQPILE

- 5 El fragmento III se prepara mediante digestión del Factor de Von Willebrand derivado de plasma (pdVWF) con la proteasa V 8 de *S. aureus*. La digestión se realiza durante 3 horas a 37 °C en un tampón de Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,8 a una proporción en peso de enzima con respecto a proteína de 1:40.
- 10 La purificación del fragmento se realiza utilizando una columna de intercambio aniónico fuerte (MonoQ). El tampón de ejecución es un tampón de Tris-HCl 20 mM pH 7,4, y el tampón de elución (tampón B) es Tris-HCl 20 mM, NaCl 500 mM pH 7,4. La proteasa V 8 de *S. aureus* eluye de la columna de intercambio aniónico a aprox. 22 mS/cm (aproximadamente 40 % de tampón B), por lo tanto, para eliminar la proteasa se requiere una etapa prolongada de lavado al 42 % antes de la elución del fragmento. Como alternativa, se puede realizar una etapa de SEC (cromatografía de exclusión por tamaño) en Superose 6 10/300 GL para retirar la proteasa. En la figura 1 se representa la purificación del fragmento III y el producto obtenido. La secuencia definida por Marti *et al.* 1987 se ha confirmado mediante análisis de EM (espectrometría de masas).
- 15

Producción y purificación del fragmento I comparativo (III-T4, res. 764-1035) (Según Marti *et al.* 1987 con modificaciones (SEQ ID NO: 3):

20

SLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVA
 LERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKY
 LFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSPSVKCKKRVTILVEGGEIELFDGEVNV
 KRPMKDETHFEVVESGRYI I LLLGKALSVVWDRHLS ISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQ
 NNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTR

5 El fragmento I se prepara a partir del fragmento III (SPIII) mediante digestión con tripsina (tratada con TPCK (N-tosil-L-fenilalanina clorometil cetona) de bovino). La digestión se realiza durante 1,5 horas en un tampón de NH₄HCO₃ 100 mM pH 8,0 a una proporción en peso de enzima con respecto a proteína de 1:100. La digestión finalizó añadiendo inhibidor de tripsina de soja.

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

15 En la figura 2 se representa la purificación del fragmento I y el producto obtenido. La secuencia definida por Marti *et al.* 1987 se ha confirmado mediante análisis de EM (espectrometría de masas).

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

SLSCRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQNYDLECMGCVSGCLCPPGMVRHENRCVA
 LERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCQDRKWNCTDHVCDATCSTIGMAHYLTFDGLKY
 LFPGECQYVLVQDYCGSNPGTFRILVGNKGCSPSVKCKKRVTILVEGGEIELFDGEVNV
 KRPMKDETHFEVVESGRYI I LLLGKALSVVWDRHLS ISVVLKQTYQEKVCGLCGNFDGIQ
 NNDLTSSNLQVEEDPVDFGNSWKVSSQCADTRKVPDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRIL
 TSDVFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESI GDCACFCDTIAAYAHVCAQHGVVVTWRTA
 TLC PQSCEERNLRENGYECEWRYN SCAPACQVTCQHPEPLACPVQCVEGCHAHCPPGKIL
 DELLQTCVDPEDCPVCEVAGRRFASGKKVTLNPSDPEHCQICHCDVVNLTCEACQEPGGL
 VVPPTDAPVSPPTTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDLVFLLDGSSRLSEAEFEVLKAFVVDMM
 MERLRISQKWVRVAVVEYHDGSHAYI GLKDRKRPSELRRIASQVKYAGSQVASTSEVLKY
 TLFQIFSKIDRPEASRITLLLMSAQEPQMSRNFVRYVQGLKKKKVIVIPVIGIPHANLK
 QIRLIEKQAPENKAFVLSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPPDMAQVTVGPGLL
 GVSTLGPKRNSMVLVDVAFVLEGS D KI GEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSIHVTVLQYS
 YMVTVEYFPFSEAQSKGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQAPNL
 VYMTGNPASDEIKRLPGDIQVVPVIGVGNANVQELERIGWPNAPILI QDFETLPPREAPD
 LVLQRCCSGE

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

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

En la figura 3 se representa la purificación del fragmento II y el producto obtenido. El segundo sitio de escisión de V8

entre Glu¹⁶⁷³-Gly¹⁶⁷⁴ fue determinado por Fretto *et al.* 1986 y confirmado por análisis de EM.

Ejemplo 2

5 *Determinación de la afinidad de unión del Factor VIII.*

El análisis se realizó utilizando el instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) según McCormick *et al.* 2004 con modificaciones. Resumiendo, el rFVIII se acopló de manera covalente al chip detector CM5 dando como resultado un nivel de recubrimiento de ~ 200 UR. Posteriormente, los fragmentos del Factor de Von Willebrand así como el Factor de Von Willebrand de longitud completa (fVWF, *full length Von Willebrand Factor*) se inyectaron sobre la superficie del chip detector. El tampón de ejecución consistía en HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween 20 al 0,02 %. Se determinaron las constantes de afinidad de disociación del fVWF así como de los fragmentos II y III, no hubo unión significativa del fragmento I al Factor VIII, por lo tanto no se determinó la K_D. En la figura 4 se representan los sensogramas de unión y los valores de K_D. El fVWF se unió al rFVIII con una K_D de 0,67 nM, el fragmento III se unió con una afinidad más baja (K_D de 6,18 nM), la afinidad disminuyó aún más para el fragmento II (K_D de 154,60 nM)

Ejemplo 3

20 *Determinación de la unión del Factor VIII a la monocapa de fosfolípidos e inhibición mediante el Factor de Von Willebrand y fragmentos derivados del Factor de Von Willebrand.*

El análisis se realizó utilizando el instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) según Saenko *et al.* 1999 con modificaciones. Resumiendo, se prepararon vesículas de fosfolípidos a partir de DOPC (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfocolina) y DOPS (1,2-dioleoil-sn-glicerol-3-fosfo-L-serina). Las vesículas unilaminares se prepararon según MacDonal *et al.* 1991 utilizando una extrusora y se recubrieron sobre un chip detector HPA. Posteriormente, se inyectaron los compuestos de interés sobre la superficie de PCPS y se evaluó el nivel de unión durante 120 s después de finalizar la inyección.

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

Para evaluar si los fragmentos obtenidos por digestión limitada podían inhibir la unión de PSPC de forma similar al fVWF, los fragmentos I, II y III se inyectaron sobre la superficie del chip detector. Solo el fragmento III pudo inhibir la interacción entre el rFVIII y la monocapa de fosfolípidos (figura 6). Este efecto fue dependiente de la dosis con una inhibición casi completa a un exceso de 2,5 x del fragmento III sobre el rFVIII (figura 7).

Ejemplo 4

40 *Determinación de la afinidad de unión por el colágeno III del fVWF y del fragmento III.*

El análisis se realizó utilizando el instrumento Biacore 2000 (GE Healthcare) según Romjin *et al.* 2003 con modificaciones. Resumiendo, colágeno de tipo III digerido con pepsina humana, se unió de manera covalente a la superficie de un chip detector CM5. Posteriormente, las muestras se inyectaron sobre la superficie del chip detector. El tampón de ejecución consistía en HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3,4 mM, Tween 20 al 0,005 %. El fVWF se unió al colágeno III con una afinidad muy alta (0,75 nM), la unión del fragmento III disminuyó significativamente a 17,02 nM (figura 8).

Ejemplo 5

50 *Determinación de la afinidad de unión por la heparina del fVWF y del fragmento III.*

El análisis se realizó utilizando el instrumento Biacore T200 (GE Healthcare) según Sarafanov *et al.* 2001. Resumiendo, utilizando un kit con reactivo NHS-biotina, heparina de la mucosa intestinal porcina se marcó con biotina y se unió a la superficie de un chip detector SA. La celda de flujo de referencia se recubrió con biotina. Posteriormente, las muestras se inyectaron sobre la superficie del chip detector. El tampón de ejecución consistía en HEPES 150 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween 20 al 0,05 %. El fVWF se unió a la heparina con una afinidad de 0,65 nM, la afinidad de unión del fragmento III disminuyó significativamente a 2,43 nM (figura 9).

Ejemplo 6

65 *Determinación de la recuperación del complejo del FVIII o del FVIII/Fragmento III del VWF y de la semivida en circulación en perros con hemofilia A.*

Dos perros con hemofilia A se sometieron a inyección s.c. y posterior i.v. de FVIII con supresión del dominio B

recombinante solo o en combinación con un exceso molar de cinco veces del Fragmento III del VWF. El perro 1 recibió 200 UI/kg PC de FVIII solo y el perro 2 recibió 200 UI/kg PC de FVIII formando complejo con el Fragmento III del VWF. Se recogieron muestras de sangre a las 0,5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 32, 48, 72 y 96 horas después de cada administración del fármaco por vía subcutánea o intravenosa. Las muestras se analizaron para determinar el tiempo de coagulación de sangre entera (TCSE) y la actividad en un ensayo de actividad cromogénica de FVIII. La administración subcutánea del Fragmento III del VWF formando complejo con el FVIII, dio lugar a un aumento de 1,4 veces en cuanto al tiempo necesario para superar el tiempo de coagulación de un perro normal en comparación con la administración s.c. del FVIII solo (figura 10). La administración del Fragmento III del VWF con el FVIII también dio lugar a un aumento de la actividad de FVIII en el plasma del perro a lo largo del tiempo y a valores casi duplicados del área bajo la curva (ABC) para la administración tanto s.c. como i.v. en comparación con la administración del FVIII solo (figura 11).

Ejemplo 7

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

El fragmento III recombinante se expresó de manera transitoria en la línea celular HEK293 con un *Strep-Tag* carboxiterminal y se purificó mediante cromatografía de afinidad con *Strep-Tactin*. Los monómeros y dímeros del fragmento III se separaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). El análisis se realizó utilizando el instrumento Biacore 2000. Los monómeros y dímeros del fragmento III se inmovilizaron en el CM5 y se inyectaron series de concentración de FVIII sobre la superficie del chip detector. Como control se utilizó el VWF de longitud completa derivado de plasma. El tampón de ejecución consistía en HEPES 150 mM, NaCl 150 mM, CaCl₂ 5 mM, Tween 20 al 0,05 %. El FVIII se unió al dímero del fragmento III con una constante de afinidad de 1,9 nM. La afinidad del FVIII por el Fragmento III monomérico fue significativamente más baja ($K_D = 14,3$ nM) (figura 12).

Ejemplo 8

Estabilización del rFVIII en solución mediante el Fragmento III del VWF.

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

Ejemplo 9

Comparación de la unión a heparina entre el fragmento III recombinante y el fragmento NovoSeq21.

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

Métodos analíticos

Descripción de métodos analíticos

FVIII: C, Método de exploración basado en Coatest

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

El método cumple con los requisitos de la Farmacopea Europea. La unidad de FVIII: C se expresa en unidades internacionales (UI) como se define en la norma internacional (IS) sobre concentrados actual establecida por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Para realizar diluciones previas se ha aprobado el hábito de utilizar tampón que contiene BSA al 1 % en lugar de plasma hemofílico fuerte. Véanse también las referencias bibliográficas (European Pharmacopoeia Supplement 2000, general Methods, 2.7.4. Assay of Blood Coagulation FVIII; Rosen S (1984) Assay of FVIII: C with a Chromogenic Substrate. J, Haematol, Suppl 40, vol 33, 139-145, 1984; Carlebork G,

Oswaldsson U, Rosen S (1987) A simple and accurate micro plate assay for the determination of FVIII activity. *Thrombosis Research* 47; 5-14, 1987; Mire-Sluis AR, Gerrard T, Gaines das R, Padilla A and Thorpe R. *Biological assays: Their Role in the development and quality Control of Recombinant Biological Medicinal Products*. *Biological*, 24, 351-362 (1996).

5 Determinación de proteína total según Bradford

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

15 Determinación de proteína total según análisis de aminoácidos (AAA)

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

30 Pureza o actividad específica (FVIII:C/Proteína total)

La pureza (o también llamada actividad específica) de una muestra, se calcula tomando el valor obtenido en el análisis de FVIII:C y dividiéndolo entre el valor obtenido en el análisis de proteína total.

35 SDS-PAGE (distribución de peso molecular)

40 La electroforesis en gel de poli(acrilamida) con SDS (SDS-PAGE) implica la separación de proteínas en función de su tamaño. Este método describe la SDS-PAGE de proteínas, que se desarrolla en condiciones reductoras. Al calentar la muestra en condiciones de desnaturalización y reductoras, las proteínas se despliegan y se recubren con un detergente aniónico, dodecilsulfato de sodio (SDS), adquiriendo una alta carga negativa neta que es proporcional a la longitud de la cadena polipeptídica. Cuando se carga en una matriz de gel de poli(acrilamida) y se coloca en un campo eléctrico, las moléculas de proteína cargadas negativamente migran hacia el electrodo cargado positivamente y se separan mediante un efecto de tamizado molecular, es decir, por su peso molecular. Los geles de poli(acrilamida) impiden que las moléculas más grandes migren tan rápido como las moléculas más pequeñas. Dado que la proporción carga con respecto a masa es casi la misma entre los polipéptidos desnaturalizados con SDS, la separación final de proteínas depende casi por completo de las diferencias en la masa molecular relativa de los polipéptidos. En un gel de densidad uniforme, la distancia de migración relativa de una proteína (R_f) es negativamente proporcional al logaritmo de su masa. Si las proteínas de masa conocida se desarrollan simultáneamente con las desconocidas, la relación entre R_f y masa se puede representar gráficamente y calcular las masas de proteínas desconocidas. Las bandas de proteínas separadas por electroforesis se visualizan mediante tinción con plata. La evaluación se realiza visualmente determinando el aspecto de los estándares, referencia (muestra de control) y muestras analizadas.

50 Contenido antigénico del Factor VIII (FVIII:Ag)

55 La cantidad de contenido antigénico del Factor VIII (FVIII:Ag) se mide con un kit ELISA (ASSERACHROM® VIII:Ag, enzyme immunoassay for Factor VIII, kit, Diagnostica Stago (Francia), como se describe con más detalle⁽¹⁸⁾ sustituyendo el tampón del kit proporcionado por tampón de Tris-NaCl + seroalbúmina bovina al 1 % para diluciones de muestra.

60 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

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

Transferencia Western frente al Factor VIII

5 El producto de degeneración del Factor VIII basado en el tamaño, se mide utilizando Transferencia Western FVIII. Las proteínas y los péptidos de distribución de la masa molecular del FVIII en las preparaciones del Factor VIII, se separan según su masa molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) con dodecilsulfato sódico (SDS) en condiciones reductoras. Después de eso, las proteínas se transfieren electroforéticamente desde la matriz de gel a una membrana de nitrocelulosa que posteriormente se incuba con un agente bloqueante. A continuación, se añaden anticuerpos policlonales de oveja disponibles en el comercio, dirigidos a la molécula entera de Factor VIII humano seguido de un anticuerpo secundario marcado con enzima utilizado como sonda. Como tercera etapa, se añade un sustrato quimioluminiscente que, al combinarse con la enzima, produce luz como subproducto. La salida de luz se captura como una imagen en tiempo real utilizando una cámara de dispositivo de carga acoplada enfriada. La intensidad de la señal se correlaciona con la abundancia del antígeno (FVIII) en la membrana de transferencia.

15 PAGE 2D

Para estudiar el patrón de bandas electroforéticas de la cadena proteica del Factor VIII, se realizó una electroforesis 2D con tinción de plata. El enfoque isoelectrico se realizó como primer desarrollo de dimensión utilizando un gradiente de pH lineal de 3 a 10. La SDS-PAGE de segunda dimensión se desarrolló utilizando geles de Tris-Acetato (3-8 %). Los geles se tiñeron con tinción de plata después de desarrollar la segunda dimensión.

20 Proteína total (Bradford)

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

30 LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Octapharma AG

35 <120> Preparación que comprende péptidos del factor VIII y del factor de Von Willebrand

<130> 151432WO

40 <160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

45 <211> 2813

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

50

ES 2 895 798 T3

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr
 20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly
 35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly
 50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys
 65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu
 85 90 95

Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro
 100 105 110

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys
 115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly
 130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly
 145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln
 165 170 175

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys
 370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp
 385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg
 405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys
 420 425 430

ES 2 895 798 T3

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

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Val Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly
610 615 620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe

ES 2 895 798 T3

Val Glu Gly Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys
 930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg
 945 950 955 960

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

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln
 1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys
 1160 1165 1170

ES 2 895 798 T3

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

ES 2 895 798 T3

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

ES 2 895 798 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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

ES 2 895 798 T3

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
 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

ES 2 895 798 T3

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

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

5

<400> 2

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr Ser Tyr Met Val Thr
770 775 780

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Ile Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp
915 920 925

Val Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe
930 935 940

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn Ile
945 950 955 960

Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser Ile Thr
965 970 975

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

ES 2 895 798 T3

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 3

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 4
<211> 910
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

5

<400> 4

ES 2 895 798 T3

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

ES 2 895 798 T3

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

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

5

<400> 6

ES 2 895 798 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

5

<400> 7

ES 2 895 798 T3

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

ES 2 895 798 T3

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

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

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

Cys Cys Gly Arg Cys Leu
385 390

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende un complejo del Factor VIII y uno o más péptidos del Factor de Von Willebrand, en donde los péptidos del Factor de Von Willebrand son fragmentos del Factor de Von Willebrand y comprenden al menos los aminoácidos 764 a 1905 de la SEQ ID NO: 1 pero no los aminoácidos 2255 a 2645 de la SEQ ID NO: 1 y en donde los péptidos del Factor de Von Willebrand tienen una constante de afinidad de unión K_D por la heparina $\geq 2,43$ nM.
2. La composición de la reivindicación 1, en donde los fragmentos del Factor de Von Willebrand tienen una secuencia de aminoácidos que corresponde a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 comenzando desde el aminoácido 764 y finalizando entre los aminoácidos 1905 y 2153 con hasta 10 supresiones, inserciones o sustituciones.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en donde el péptido del Factor de Von Willebrand tiene un peso molecular < 500 kD, preferentemente < 400 kD.
4. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los péptidos del Factor de Von Willebrand tienen al menos una propiedad seleccionada del grupo que consiste en
- (i) una constante de afinidad de unión K_D por el colágeno III > 5 nM, preferentemente $\geq 17,02$ nM;
 - (ii) una constante de afinidad de unión K_D por el Factor VIII < 100 nM o < 10 nM, preferentemente $\leq 6,19$ nM y
 - (iii) una inhibición de la unión de fosfolípidos al Factor VIII de al menos 70 %, preferentemente de al menos 80 %.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los péptidos del Factor de Von Willebrand derivan del Factor Willebrand mediante escisión proteolítica o química, preferentemente mediante escisión proteolítica con la proteasa V 8 de *S. aureus*.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el Factor VIII es un Factor VIII de longitud completa, un Factor VIII con supresión del dominio B o un Factor VIII donde el dominio B se ha sustituido por un enlazador artificial o por un fragmento del dominio B natural o por una combinación de los mismos.
7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el Factor VIII es Factor VIII derivado de plasma o Factor VIII recombinante, en donde un Factor VIII recombinante se expresa preferentemente en una línea celular humana.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la composición tiene al menos una de las propiedades seleccionadas del grupo que consiste en
- (i) los péptidos del Factor de Von Willebrand protegen al Factor VIII de la unión de anticuerpos minimizando la formación de inhibidores en un paciente;
 - (ii) estabiliza al Factor VIII proporcionando una actividad residual del Factor VIII de al menos 90 % después de su almacenamiento durante 12 meses en forma líquida congelada a -70 °C;
 - (iii) estabiliza al Factor VIII proporcionando una actividad residual del Factor VIII de al menos 90 % después de su almacenamiento durante 24 meses en forma liofilizada a 5 °C;
 - (iv) estabiliza al Factor VIII proporcionando una actividad residual del Factor VIII de al menos 90 % después de su almacenamiento durante 12 meses en forma liofilizada a 25 °C;
 - (v) prolonga la semivida del Factor VIII *in vivo* en al menos un 20 % y
 - (vi) reduce a menos de un 20 % la formación de inhibidores en pacientes no tratados previamente después del tratamiento con la composición durante 6 meses.
9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno hemorrágico.
10. El uso de la composición según la reivindicación 9, en donde el tratamiento comprende la administración no intravenosa de la composición, preferentemente en donde la administración no intravenosa es una inyección subcutánea.
11. Un método para la reducción de virus en una preparación de la composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende la etapa de nanofiltrar los péptidos del Factor de Von Willebrand antes o después de una combinación con el Factor VIII, por lo cual el parvovirus porcino, si está presente, se reduce en al menos un factor de 100.

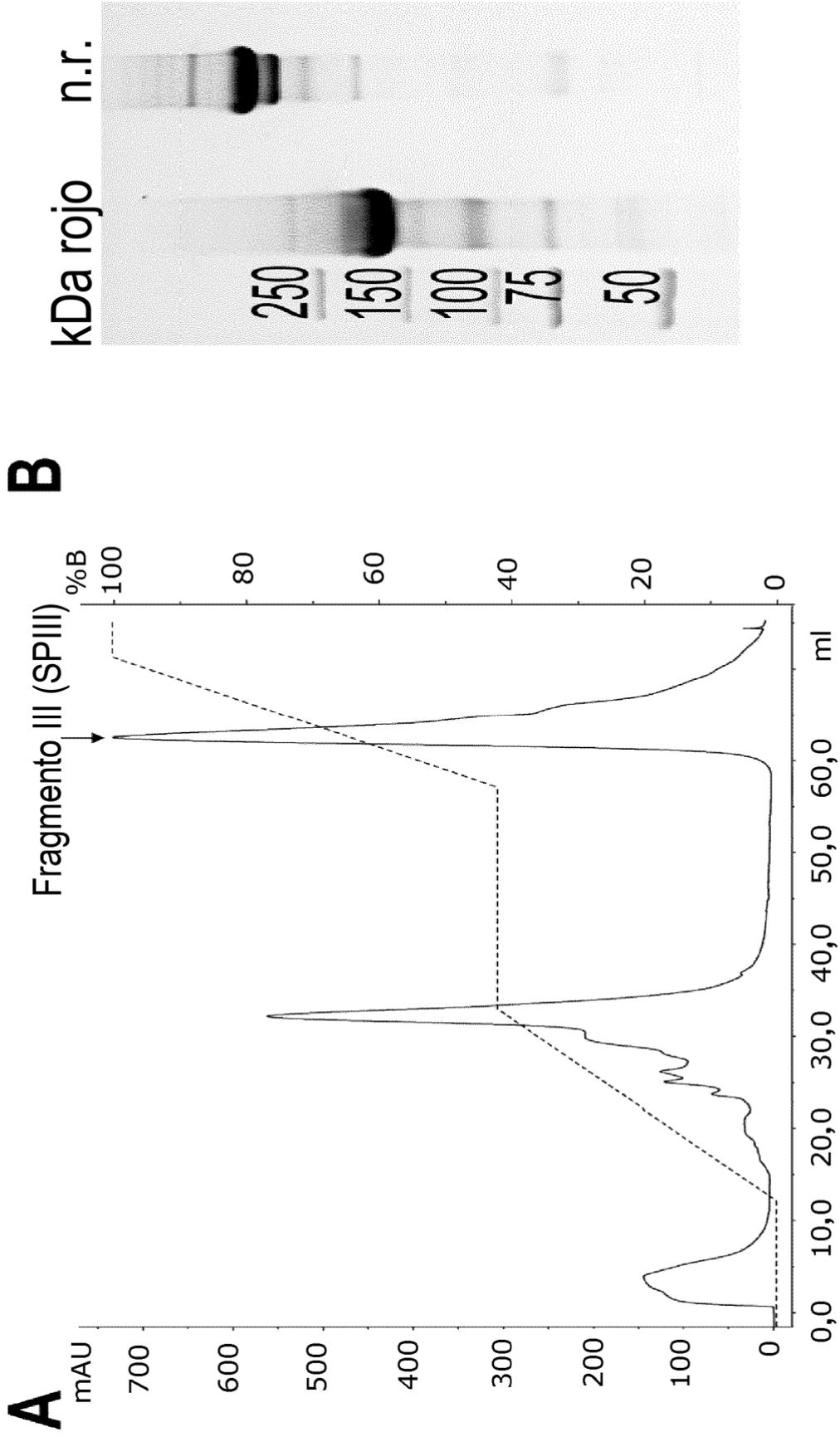


Fig. 1

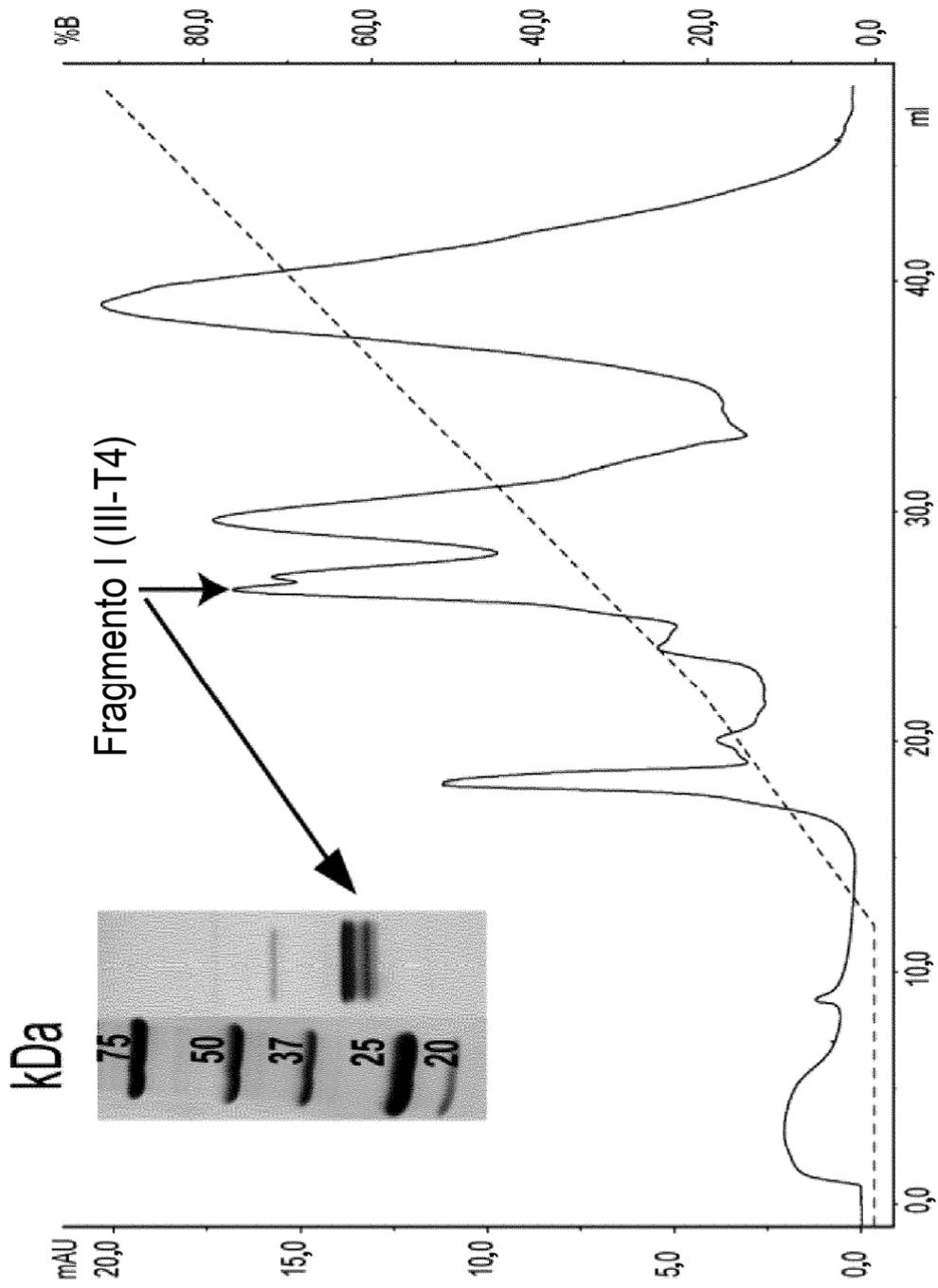


Fig. 2

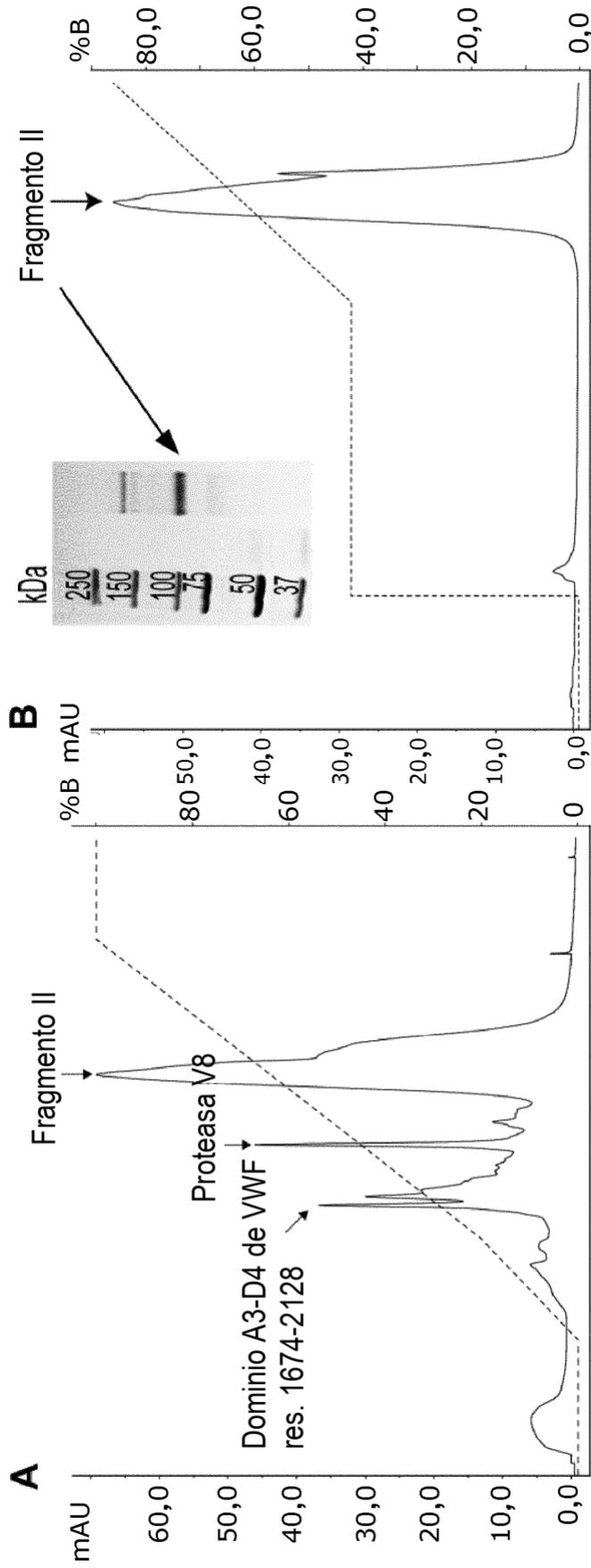


Fig. 3

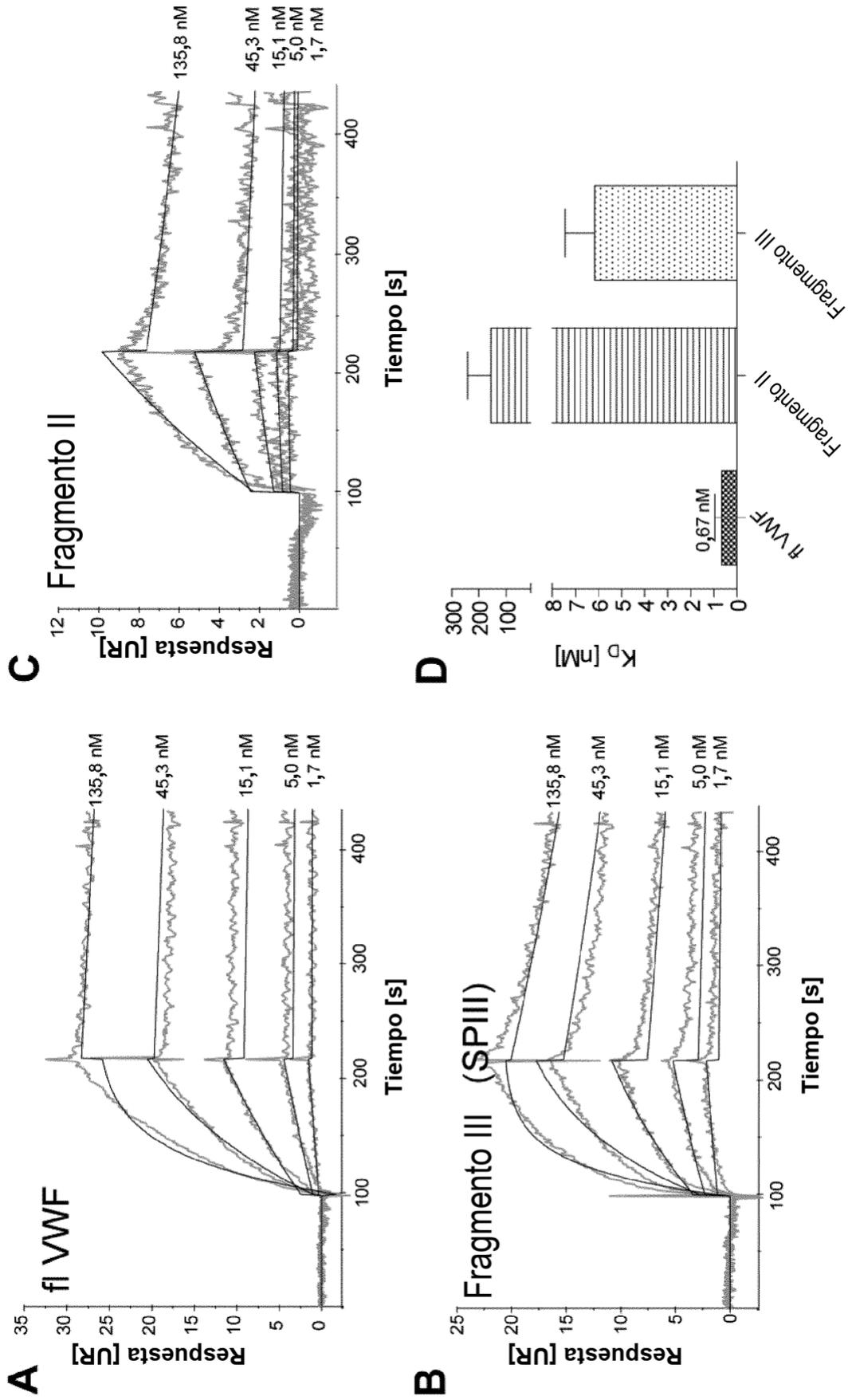


Fig. 4

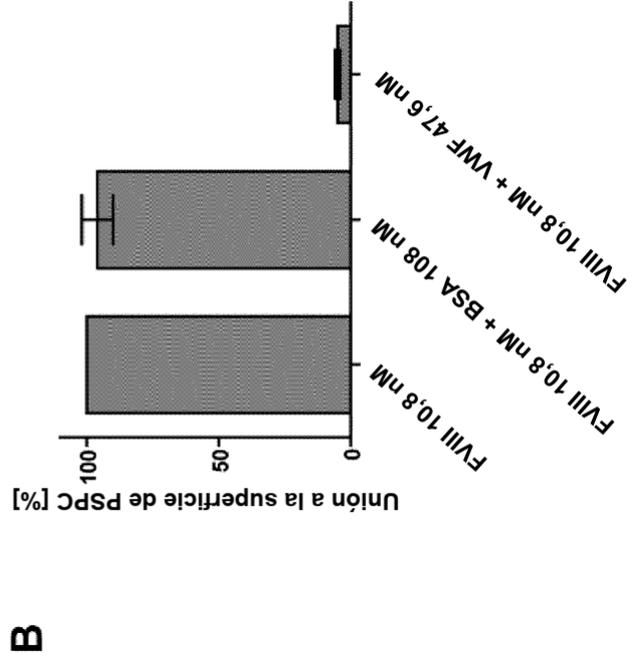
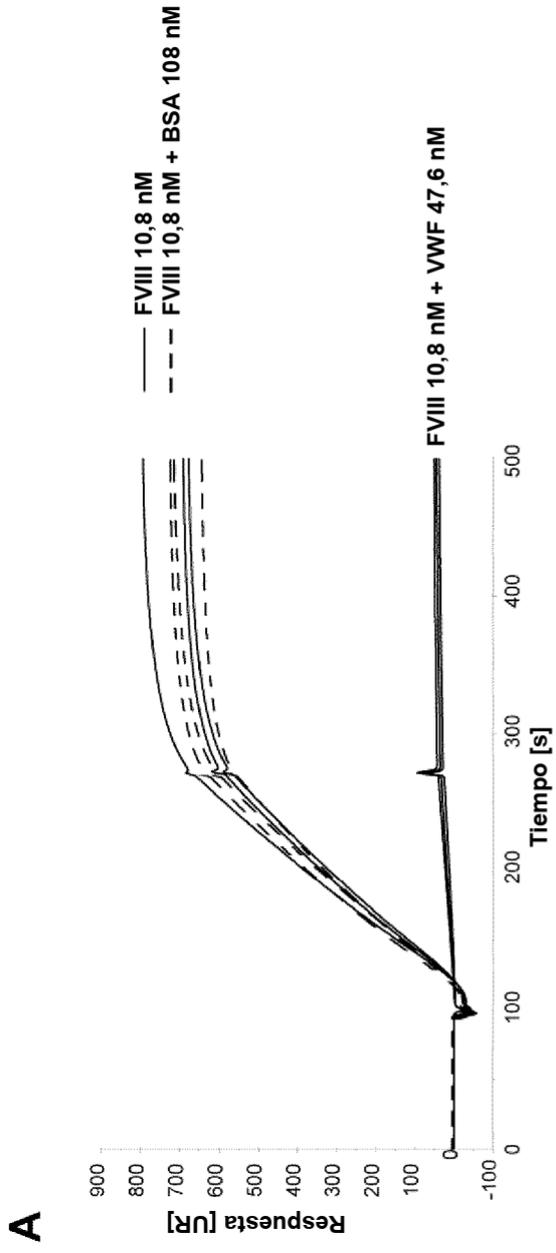


Fig. 5

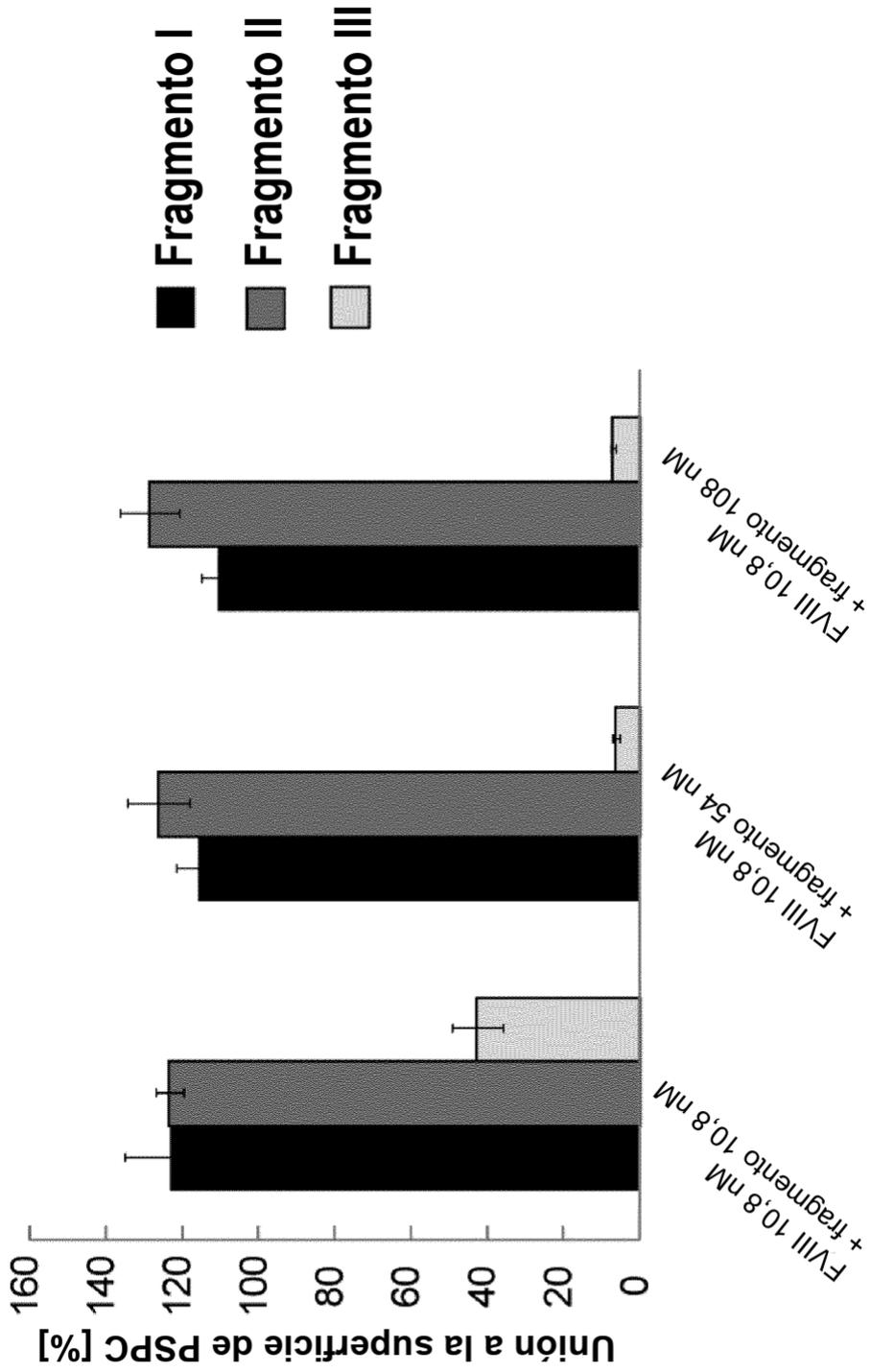


Fig. 6

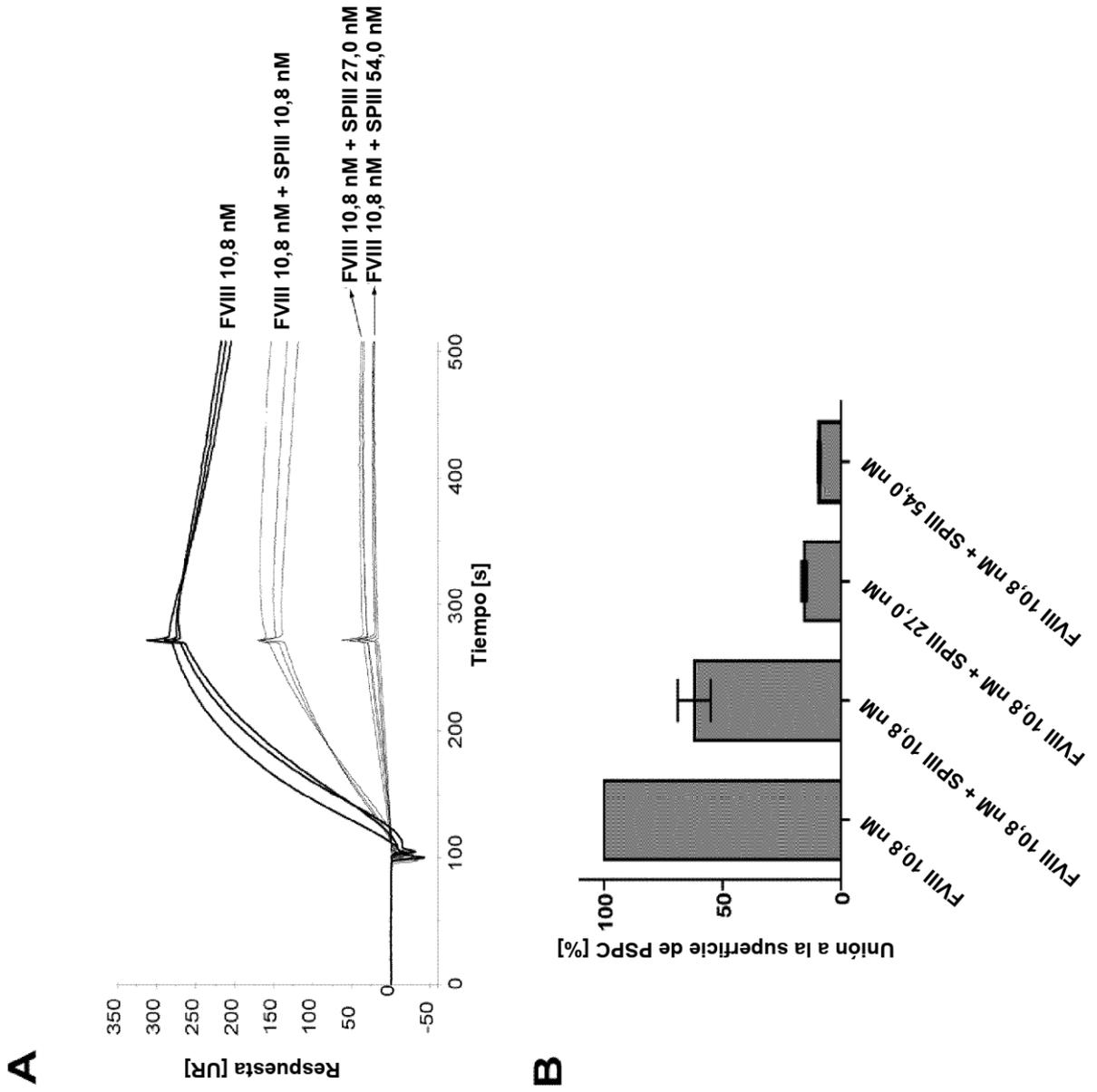


Fig. 7

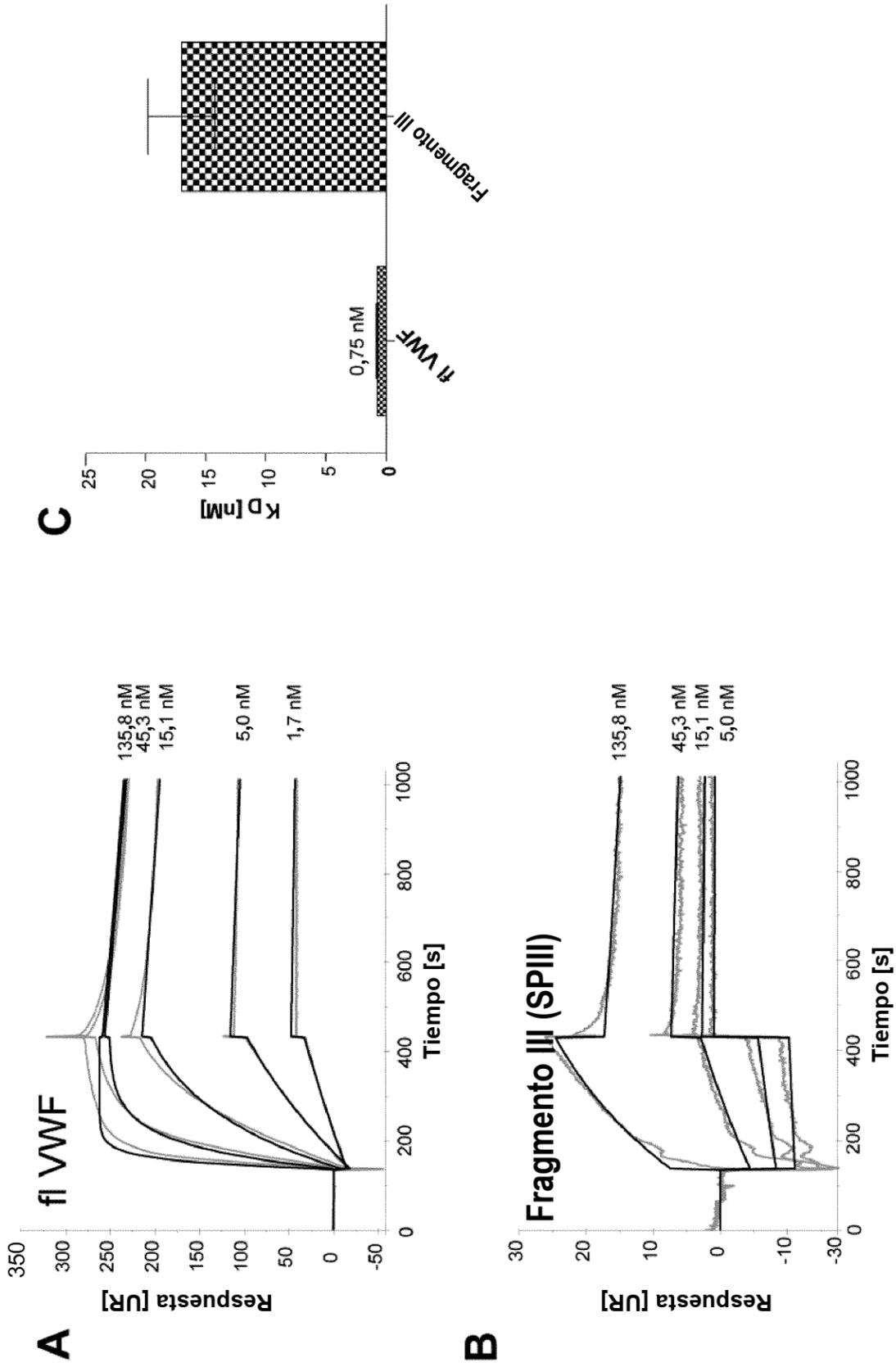


Fig. 8

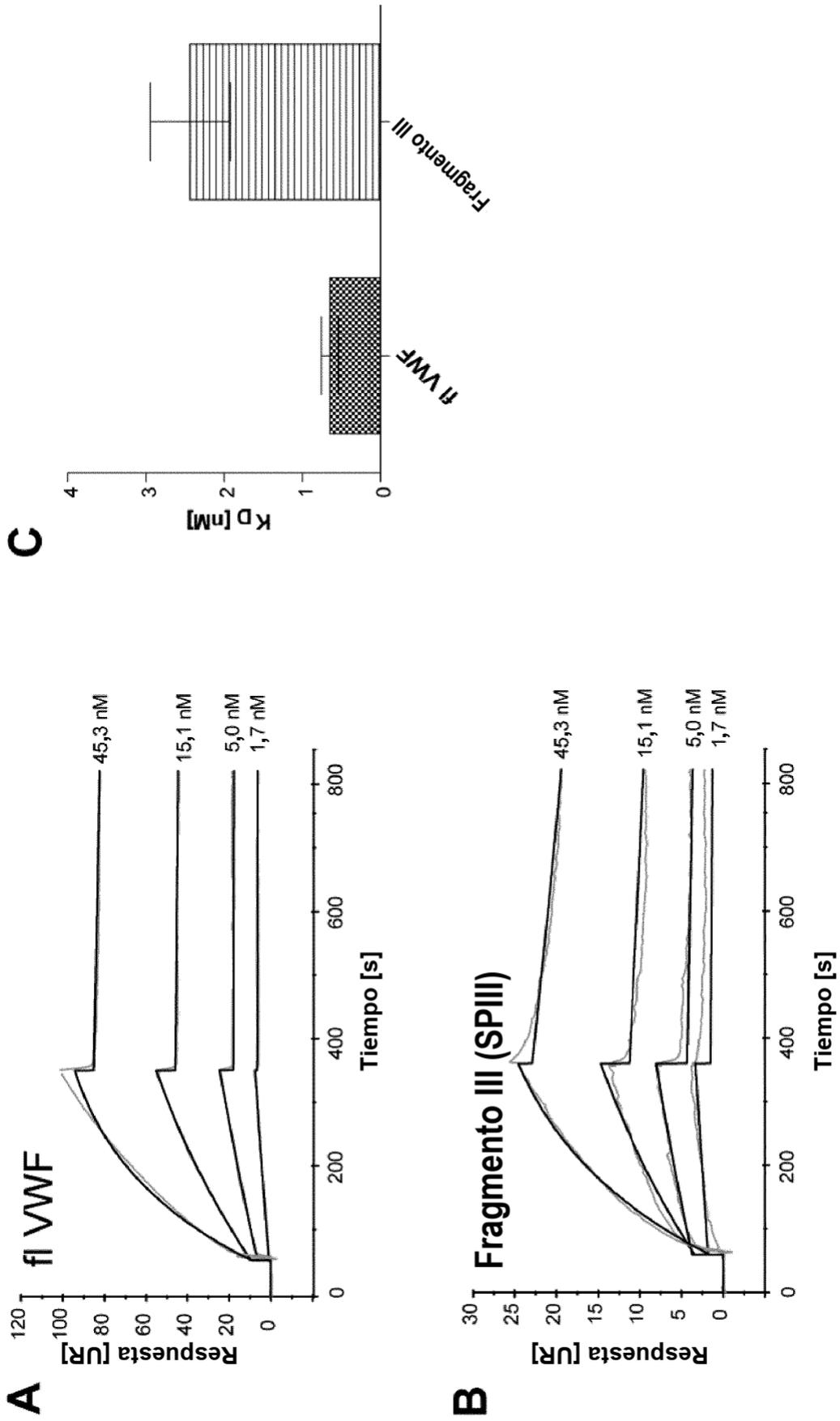


Fig. 9

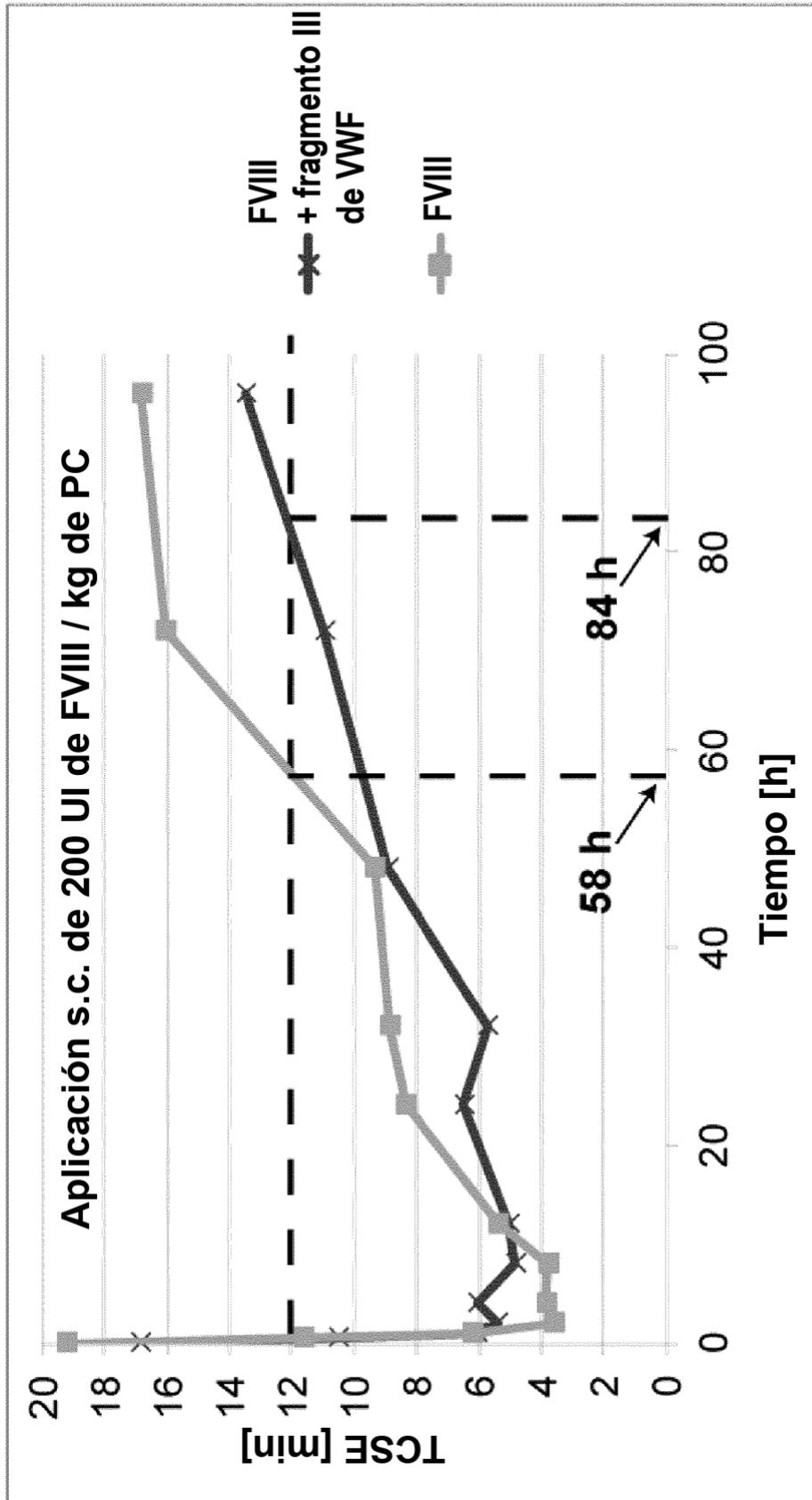


Fig. 10

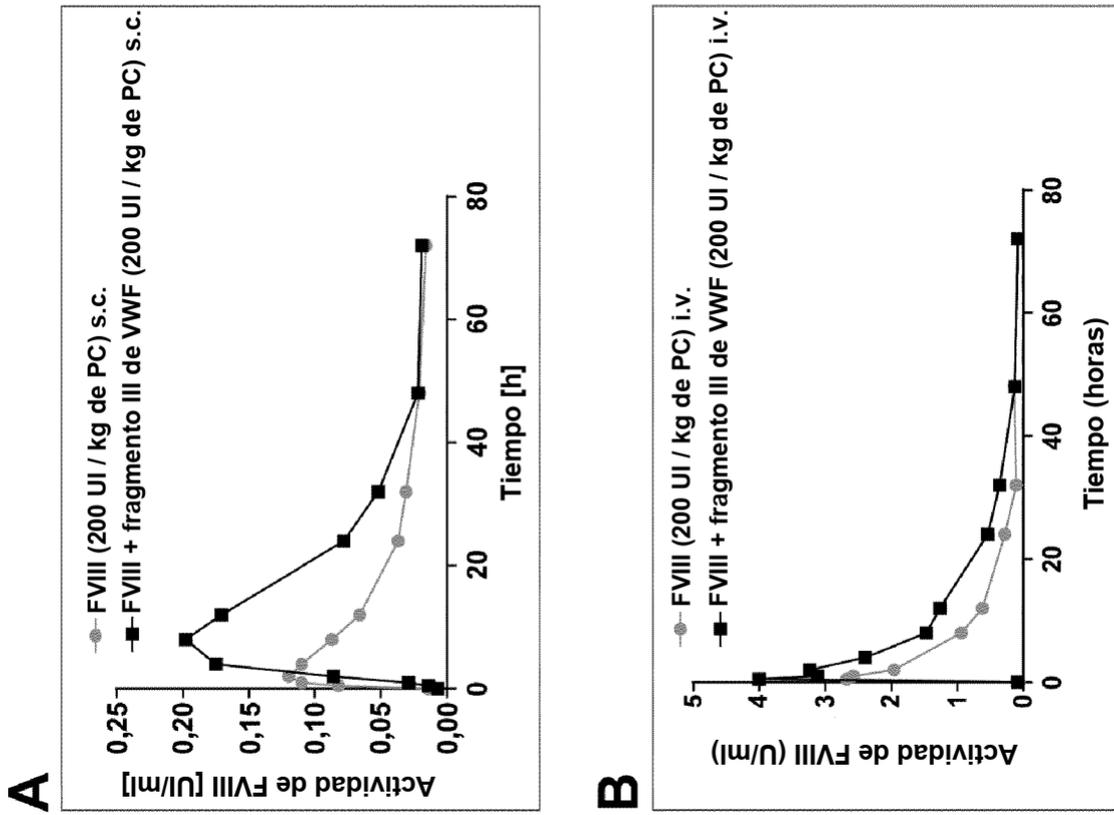


Fig. 11

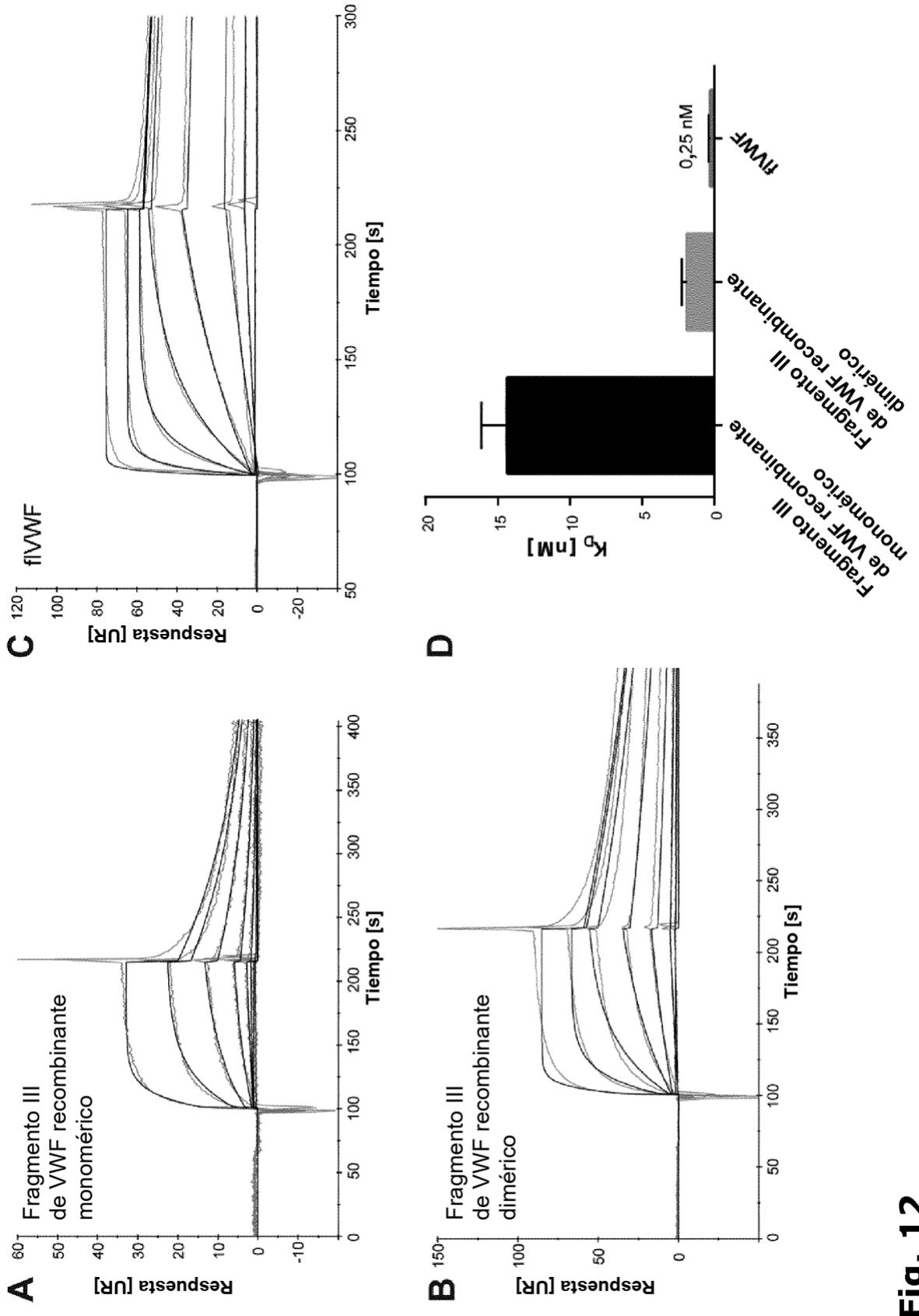


Fig. 12

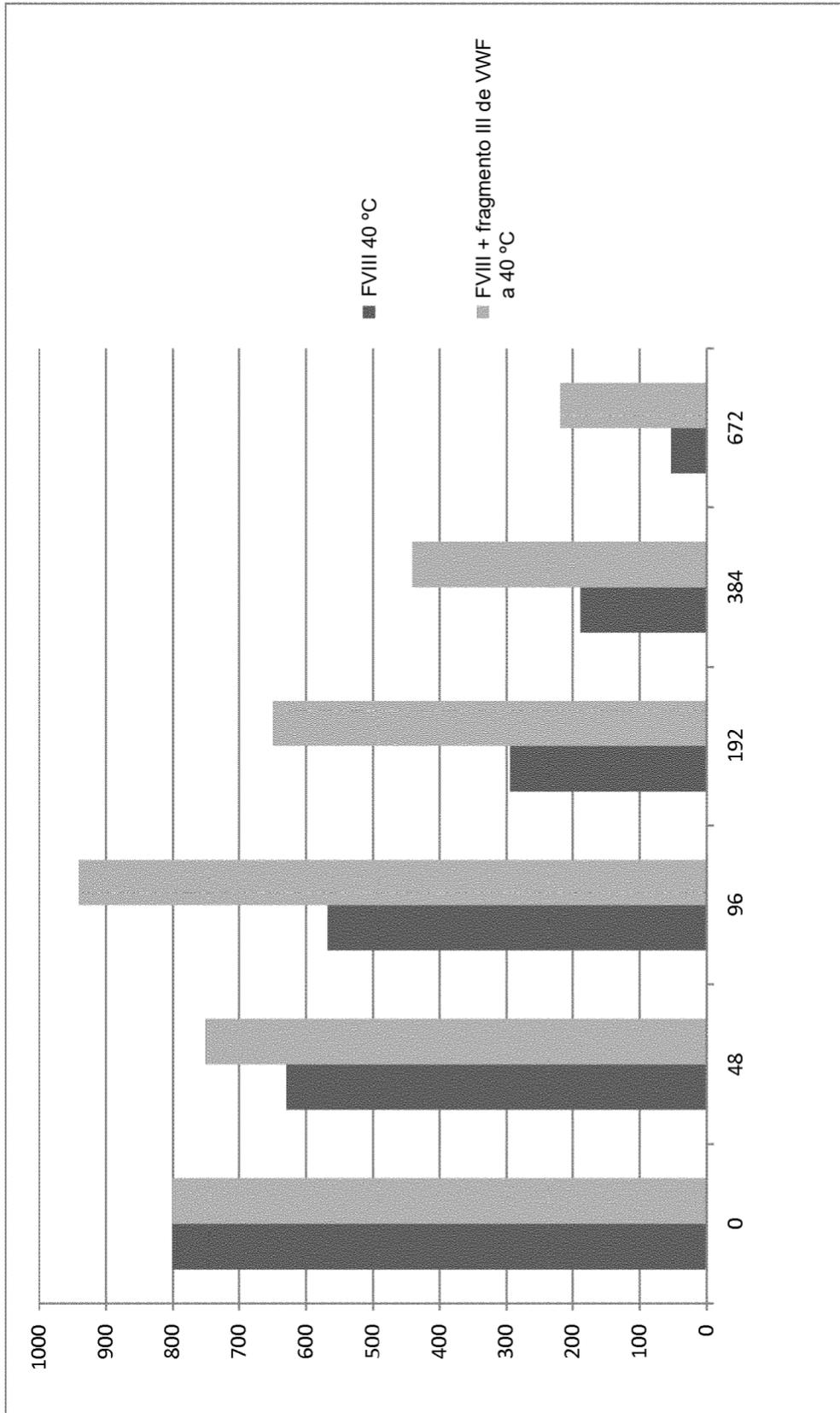


Fig. 13

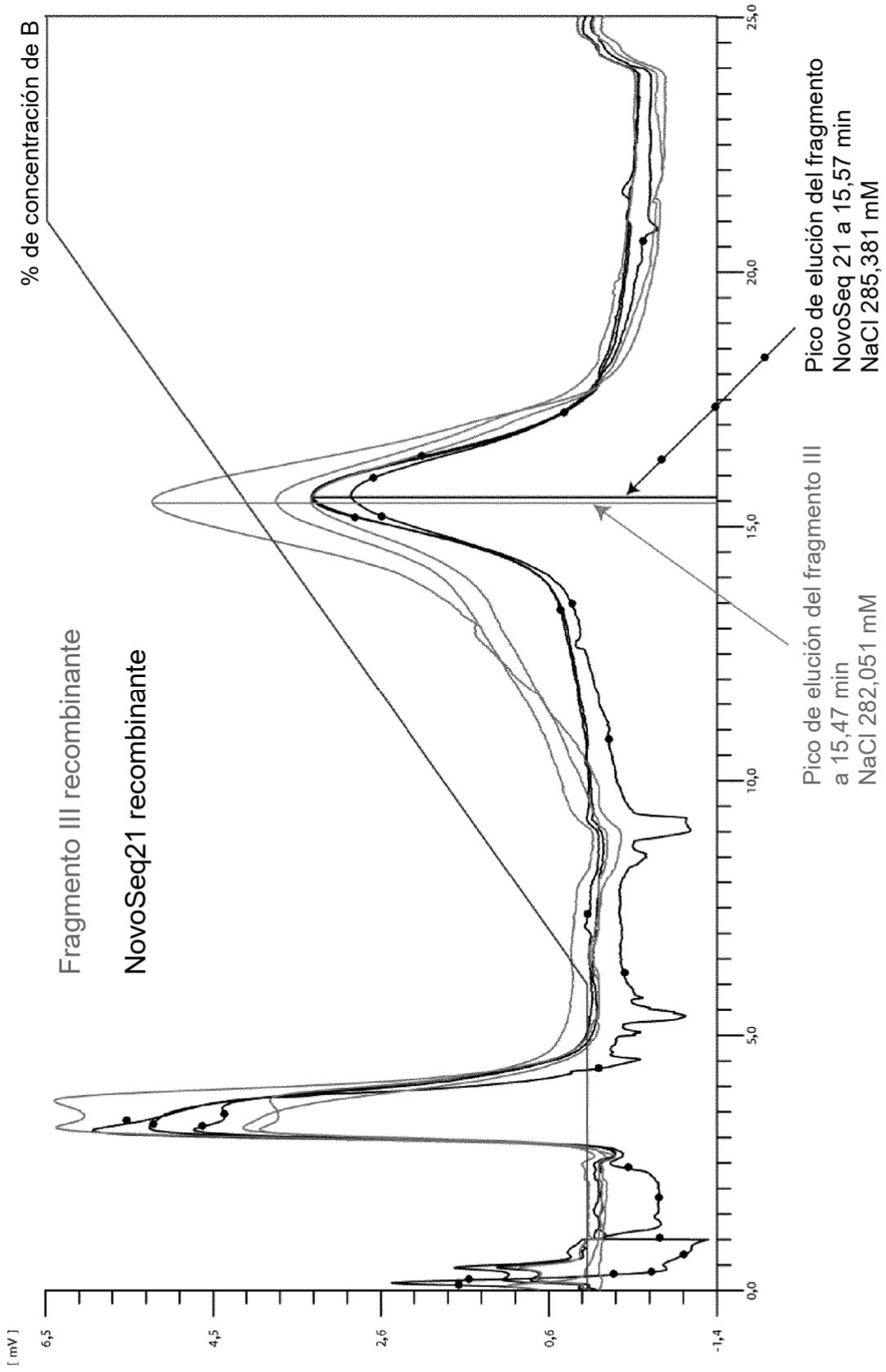


Fig. 14