

TRATAMIENTO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND GRAVE QUE SE SOMETEN A CIRUGÍA ELECTIVA MEDIANTE ADMINISTRACIÓN DE VWF RECOMBINANTE

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

- 5 [0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/546,999, presentada el 17 de agosto de 2017, y la solicitud de patente provisional estadounidense n.º 62/530,024, presentada el 7 de julio de 2017, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

- [0002] Las enfermedades de coagulación tales como la enfermedad de von Willebrand (VWD) generalmente con causadas por una deficiencia en la cascada de coagulación. La enfermedad de von Willebrand (VWD) se refiere al grupo de enfermedades causadas por una deficiencia del factor de von Willebrand. El factor de von Willebrand ayuda a que las plaquetas se agrupen y se adhieran a la pared
15 de los vasos sanguíneos, lo que es necesario para la coagulación sanguínea normal.

- [0003] La enfermedad de von Willebrand (VWD) es el trastorno hemorrágico hereditario más común, con una tasa de prevalencia estimada del 1 % (Veyradier A, et ál., Medicine (Baltimore). 2016, 95(11):e3038). Sin embargo, al excluir las formas más leves de la enfermedad, solo alrededor de 1/10 000 pacientes realmente requieren tratamiento. El tratamiento actual para estas coagulopatías
20 incluye una terapia de reemplazo que usa preparaciones farmacéuticas que comprenden el factor de coagulación normal.

- [0004] El VWF es una glicoproteína que circula en el plasma como una serie de multímeros con un tamaño que varía de alrededor de 500 a 20 000 kD. Se ha clonado la longitud completa del ADNc del VWF; el polipéptido corresponde a los residuos de aminoácidos 23 a 764 del prepro-VWF de longitud
25 completa (Eikenboom et ál (1995) Haemophilia 1, 77 90). Las formas multiméricas de VWF están compuestas por subunidades de polipéptidos de 250 kD enlazadas mediante enlaces disulfuro. El VWF media la adhesión inicial de las plaquetas al subendotelio de la pared de los vasos dañados, donde los multímeros más grandes presentan actividad hemostática mejorada. El VWF multimerizado se une a la glucoproteína Gp1b α de la superficie de las plaquetas, a través de una interacción en el
30 dominio A1 de VWF, lo que facilita la adhesión de las plaquetas. Otros sitios en el VWF median la unión a la pared de los vasos sanguíneos. Por lo tanto, el VWF forma un puente entre la plaqueta y la

pared del vaso que es esencial para la adhesión de las plaquetas y la hemostasia primaria en condiciones de tensión de corte elevada. Normalmente, las células endoteliales secretan grandes formas poliméricas del VWF, y las formas del VWF que tienen un peso molecular bajo surgen de la escisión proteolítica. Los multímeros con masas moleculares excepcionalmente grandes se almacenan en cuerpos de Weibel-Pallade de las células endoteliales y se liberan tras la estimulación mediante agonistas tales como trombina e histamina.

[0005] Para los pacientes con VWD, se recomienda que sean tratados con reemplazo del factor de von Willebrand (VWF) dada la necesidad de hemostasia prolongada, particularmente, en cirugías mayores (Mannucci PM y Franchini M., Haemophilia, 2017, 23(2):182-187; National Institutes of Health. National Heart, Lung, y Blood Institute. The Diagnosis, Evaluation, and Management of von Willebrand Disease NIH publicación n.º 08-5832; diciembre de 2007). Las terapias de VWF derivadas del plasma contienen el factor VIII (FVIII) y tienen potencial de acumulación de FVIII con la repetición de las dosis. VONVENDI® (factor de von Willebrand [recombinante], Shire, Westlake Village, CA) es el primer y único concentrado de VWF recombinante (rVWF) (Turecek PL, et ál. Hamostaseologie. 2009;29(suppl 1):S32-38; Mannucci PM, et ál. Blood, 2013;122(5):648-657; Gill JC, et ál. Blood, 2015;126(17):2038-2046).

BREVE COMPENDIO DE LA INVENCION

[0006] La presente invención proporciona métodos de pretratamiento para un paciente con enfermedad de von Willebrand grave antes de la cirugía mediante la administración de 20-60 IU/kg del factor de von Willebrand recombinante (rVWF) al paciente entre 12 horas y 24 horas, por ejemplo, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 12 horas y 24 horas, 14 horas y 24 horas, 16 y 24 horas, 18 horas y 24 horas, o 20 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y no administrar el factor VIII (FVIII) con el rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, el método de pretratamiento comprende, además, administrar al sujeto 5-90 IU/kg del rVWF 1 hora antes de la cirugía. En algunas modalidades, al sujeto se le administra 70-200 IU del rVWF después de la cirugía, con o sin el pretratamiento descrito anteriormente. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico se selecciona de un grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.

[0007] En algunas modalidades, al sujeto se le administra 35-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de un procedimiento quirúrgico mayor. En otras modalidades, al sujeto se le administra 15-90 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico mayor. En otra modalidad, al sujeto se le

administra 150-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico mayor. En algunos casos, al sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico mayor se le administra una dosificación total de 220-320 IU/kg. En algunos casos, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. El término «aproximadamente iguales», tal como se usa en la presente, se refiere a dosis que tienen concentraciones dentro de 1-15 %, 2-14 %, 3-13 %, 4-12 %, 5-11 %, 6-10 %, 7-9 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 % con respecto a la otra.

[0008] En algunas modalidades, al sujeto se le administra 50-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de un procedimiento quirúrgico menor. En otras modalidades, al sujeto se le administra 5-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes de la cirugía menor. En otra modalidad, al sujeto se le administra 70-150 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico menor. En algunos casos, al sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico menor se le administra una dosificación total de 100-220 IU/kg. En algunos casos, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis del rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis.

[0009] En algunas modalidades, al sujeto se le administra 20-40 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de un procedimiento quirúrgico oral. En otras modalidades, al sujeto se le administra 20-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico oral. En otra modalidad, al sujeto se le administra 10-50 IU/kg del rVWF durante el procedimiento quirúrgico oral. En otra modalidad, al sujeto se le administra 70-150 IU/kg del rVWF después de un procedimiento quirúrgico oral. En algunos casos, al sujeto que se somete a un procedimiento quirúrgico oral se le administra una dosificación total de 70-190 IU/kg. En algunos casos, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales del rVWF antes del procedimiento quirúrgico.

[00010] Otros objetivos, ventajas y modalidades de la invención serán evidentes a partir de la descripción detallada que se encuentra a continuación.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[00011] La FIGURA 1 muestra la eficiencia hemostática general (criterio de valoración primario) en los pacientes del estudio.

[00012] La FIGURA 2 muestra la eficiencia hemostática (criterio de valoración secundario) en

los pacientes del estudio.

[00013] La FIGURA 3 muestra los datos demográficos y las características clínicas iniciales.

[00014] La FIGURA 4 muestra los parámetros de PK para VWF:RCo (n=11).

[00015] La FIGURA 5A y la FIGURA 5B muestran los niveles promedio de VWF:RCo y FVIII
 5 endógeno:C en respuesta a rVWF, 50 ± 5 IU rVWF:RCo/kg, en todos los pacientes con VWD con los
 datos de PK analizados (n=11) (FIGURA 5A), y el subconjunto de pacientes con VWD tipo 3 (n=5)
 (FIGURA 5B).

[00016] La FIGURA 6 muestra las secuencias de ácido nucleico y aminoácidos del VWF.

10 DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Introducción

[00017] La presente invención proporciona métodos para pretratar a un paciente con
 enfermedad de von Willebrand grave antes de la cirugía mediante la administración del factor de von
 Willebrand recombinante (rVWF) al paciente, 45-60 IG/kg del rVWF, sin administrar el factor VIII con el
 15 rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico se selecciona
 de un grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.

[00018] La descripción de la publicación de la solicitud del PCT n.º WO2012/171031 se
 incorpora en su totalidad a la presente mediante referencia a todos los efectos.

Definiciones

20 [00019] Tal como se usa en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares
 «un», «una» y «el/la», incluyen los referentes plurales a menos que el contexto indique claramente lo
 contrario. Por lo tanto, por ejemplo, una referencia a «un anticuerpo» incluye múltiples de dichos
 anticuerpos y la referencia a una «célula hospedadora» incluye la referencia a una o más células
 hospedadoras y equivalentes de estas conocidas por los expertos en la técnica, y similares. Se
 25 observa además que las reivindicaciones pueden estar redactadas de forma que excluyan cualquier
 elemento opcional. De esta forma, se pretende que esta afirmación sea una base antecedente para el
 uso de terminología exclusiva tal como «meramente», «solamente» y similares con relación a la
 enumeración de elementos de las reivindicaciones o el uso de una limitación «negativa».

[00020] Antes de describir la invención en mayor detalle, debe entenderse que esta invención
 30 no se limita a las modalidades particulares descritas, ya que evidentemente estas pueden variar.

También se entenderá que la terminología utilizada en la presente tiene el fin de describir solamente modalidades particulares y no se pretende que sea taxativa, dado que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

[00021] El término «pre-propéptido VWF», «prepro-VWF» o «pro-VWF» se refiere a un
5 polipéptido no maduro de VWF que comprende un péptido señal de alrededor de 22 residuos de aminoácidos, un propéptido de VWF de alrededor de 741 residuos de aminoácidos, y una subunidad madura de VWF de alrededor de 2050 residuos de aminoácidos. Las subunidades Pro-VWF pueden dimerizarse a través de enlaces disulfuro cerca de su extremo carboxilo en el retículo endoplasmático para formar dímeros de cola a cola que luego se transportan al Golgi. En el Golgi, se forman enlaces
10 disulfuro cabeza a cabeza adicionales cerca del extremo amino de las subunidades, formando de ese modo multímeros. La escisión proteolítica del propéptido VWF se produce a través de la proteasa de procesamiento furina, produciendo de ese modo un complejo maduro de VWF/VWF-PP. Cuando se incluye «r» antes de la denominación de VWF, se refiere a la versión recombinante. En algunas modalidades, los métodos descritos en la presente se aplican al VWF recombinante (rVWF).

[00022] El término «complejo de VWF» o «complejo de mat-VWF/VWF-PP» se refiere a una
15 estructura heterodimérica enlazada de forma no covalente que comprende una subunidad madura de VWF y un propéptido de VWF. El complejo de VWF puede generarse como un producto de escisión de furina entre la parte de propéptido y la parte de VWF madura de pre-propéptido VWF. Cuando se incluye «r» antes de la denominación de VWF, se refiere a la versión recombinante. En algunas
20 modalidades, los métodos descritos en la presente se aplican al VWF recombinante (rVWF). Tal como se usa en la presente, «rVWF» refiere a VWF recombinante.

[00023] Tal como se usa en la presente, «rFVIII» refiere a FVIII recombinante.

[00024] El término «recombinante», cuando se usa, por ejemplo, con referencia a una célula,
ácido nucleico, proteína o vector, indica que la célula, ácido nucleico, proteína o vector ha sido
25 modificado mediante la introducción de una proteína o ácido nucleico heterólogo, o mediante la alteración de una proteína o ácido nucleico natural, o que la célula deriva de una célula modificada de este modo. Por lo tanto, por ejemplo, las células recombinantes expresan genes que no se encuentran dentro de la forma natural (no recombinante) de la célula o expresan genes naturales que de lo contrario se expresan de forma anómala, se subexpresan o no se expresan en absoluto.

[00025] Tal como se usa en la presente, «VWF recombinante» incluye el VWF obtenido
30 mediante tecnología de ADN recombinante. En determinadas modalidades, las proteínas de VWF de la invención pueden comprender una construcción, por ejemplo, preparada como en el documento WO 1986/06096 publicado el 23 de octubre de 1986 y la solicitud de patente estadounidense serie n.º

07/559,509, presentada el 23 de julio de 1990, a nombre de Ginsburg et ál., que se incorpora a la presente mediante referencia con respecto a los métodos para producir el VWF recombinante. El VWF en la presente invención puede incluir todas las formas posibles que incluyen las formas monoméricas y multiméricas. También debe entenderse que la presente invención abarca diferentes formas de VWF para su uso en combinación. Por ejemplo, el VWF de la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados, y derivados biológicamente activos y derivados no biológicamente activos.

[00026] En el contexto de la presente invención, el VWF recombinante comprende cualquier miembro de la familia de VWF, por ejemplo, de un mamífero tal como un primate, ser humano, mono, conejo, cerdo, roedor, ratón, rata, hámster, jerbo, canino, felino, y derivados biológicamente activos de estos. También están comprendidas las proteínas de VWF variantes y mutantes que tienen actividad, ya que son fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas de VWF. Asimismo, las proteínas de VWF de la invención pueden comprender además etiquetas que facilitan la purificación, la detección o ambas. EL VWF descrito en la presente se puede modificar además con un resto terapéutico o imaginología adecuada con un resto in vitro o in vivo.

[00027] Tal como se usa en la presente, «VWF derivado de plasma (pdVWF)» incluye todas las formas de la proteína que se encuentran en la sangre, incluido el VWF maduro obtenido de un mamífero que tiene la propiedad de estabilizar in vivo, por ejemplo, la unión, de al menos una molécula de FVIII.

[00028] El término «VWF altamente multimérico» o «VWF de alto peso molecular» se refiere a un VWF que comprende al menos 10 subunidades, o 12, 14, 16 subunidades, a alrededor de 20, 22, 24 o 26 subunidades o más. El término «subunidad» se refiere a un monómero de VWF. Tal como se conoce en la técnica, generalmente son los dímeros de VWF los que se polimerizan para formar los multímeros de mayor orden (véase, Turecek et ál., Semin. Thromb. Hemost. 2010, 36(5): 510-521, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones que se refieren al análisis multimérico de VWF).

[00029] Tal como se usa en la presente, el término «factor VIII» o «FVIII» se refiere a cualquier forma de la molécula del factor VIII con las características típicas del factor VIII de coagulación sanguínea, ya sea endógeno del paciente, derivado del plasma sanguíneo o producido a través del uso de técnicas de ADN recombinante, y que incluye todas las formas modificadas del factor VIII. El factor VIII (FVIII) existe de forma natural y en preparaciones terapéuticas como una distribución heterogénea de polipéptidos que surgen de un solo producto génico (véase, por ejemplo, Andersson et ál. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:2979-2983 (1986)). Los ejemplos comercialmente disponibles de

preparaciones terapéuticas que contienen el factor VIII incluyen las que se comercializan con los nombres HEMOFIL M, ADVATE, y RECOMBINATE (disponibles en Baxter Healthcare Corporation, Deerfield, Ill., E.E. U.U.).

[00030] Tal como se usa en la presente, «actividad de FVIII en el plasma» y «actividad de FVIII in vivo» se usan de forma indistinta. La actividad de FVIII in vivo medida mediante el uso de ensayos estándar puede ser actividad de FVIII endógeno, la actividad de FVIII administrado terapéuticamente (recombinante o derivado de plasma), o actividad de FVIII endógeno y administrado. De manera similar, «FVIII en el plasma» se refiere a FVIII endógeno o FVIII derivado del plasma o recombinante administrado.

[00031] Tal como se usa en la presente, «enfermedad de von Willebrand» se refiere al grupo de enfermedades causadas por una deficiencia del factor de von Willebrand. El factor de von Willebrand ayuda a que las plaquetas se agrupen y se adhieran a la pared de los vasos sanguíneos, lo que es necesario para la coagulación sanguínea normal. Tal como se describe en la presente, existen varios tipos de enfermedad de von Willebrand que incluyen los tipos 1, 2A, 2B, 2M y 3.

[00032] Los términos «aislado», «purificado» o «biológicamente puro» se refieren a un material que es sustancialmente o esencialmente no contiene los compuestos que normalmente lo acompañan cuando se encuentra en su estado original. La pureza y homogeneidad se determinan típicamente mediante el uso de técnicas de química analítica, tales como electroforesis en gel de poliacrilamida o cromatografía líquida de alto rendimiento. El VWF la especie predominante presente en una preparación sustancialmente purificada. El término «purificado», en algunas modalidades, indica que un ácido nucleico o proteína producen esencialmente una banda en un gel electroforético. En otras modalidades, significa que el ácido nucleico o la proteína es al menos 50 % puro, más preferentemente, al menos 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % puro o más. «Purificar» o «purificación», en otras modalidades, significa retirar al menos un contaminante de la composición a purificar. En este sentido, la purificación no requiere que el compuesto purificado sea homogéneo, por ejemplo, 100 % puro.

[00033] Tal como se usa en la presente «administrar» (y todos los equivalentes gramaticales) incluye la administración intravenosa, administración intramuscular, administración subcutánea, administración oral, administración como supositorio, contacto tópico, administración intraperitoneal, intralesional o intranasal, o el implante de un dispositivo de liberación lenta, por ejemplo, una minibomba osmótica, a un sujeto. La administración se realiza por cualquier vía, lo que incluye parenteral e intramucosa (por ejemplo, oral, nasal, vaginal, rectal o transdérmica). La administración parenteral incluye, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intraarteriolas, intradérmica, subcutánea,

intraperitoneal, intraventricular e intracraneal. Otros modos de administración incluyen, de modo no taxativo, el uso de formulaciones liposomales, infusión intravenosa, parches transdérmicos, etc.

[00034] Los términos «cantidad o dosis terapéuticamente eficaz», «cantidad o dosis terapéuticamente suficiente» o «cantidad o dosis eficaz o suficiente» se refieren a una dosis que produce los efectos terapéuticos para los que se administra. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de un fármaco útil para el tratamiento de la hemofilia puede ser la cantidad que sea capaz de prevenir o aliviar uno o más síntomas asociados con la hemofilia. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y será verificable por un experto en la técnica mediante el uso de técnicas conocidas (véase, por ejemplo, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1-3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20.^a edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[00035] Tal como se usan en la presente, los términos «paciente» y «sujeto» se usan de forma indiferente y se refieren a un mamífero (preferentemente, humano) que tiene una enfermedad o tiene el potencial de contraer una enfermedad.

[00036] Tal como se usa en la presente, el término «alrededor de» denota un intervalo aproximado de más o menos 10 % del valor indicado. Por ejemplo, la expresión «alrededor de 20 %» comprende un intervalo de 18-22 %.

[00037] Tal como se usa en la presente, el término «semivida» se refiere al período de tiempo que tarda la cantidad de una sustancia en descomposición (o eliminación de una muestra o de un paciente) en disminuir a la mitad.

I. Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

[00038] La presente invención utiliza composiciones que comprenden el factor de von Willebrand (rVWF) para el pretratamiento de sujetos con VWD grave que se someten a un procedimiento quirúrgico tal como, de modo no taxativo, cirugía mayor, cirugía menor o cirugía oral.

[00039] En determinadas modalidades, las proteínas de VWF de la invención pueden comprender una construcción, por ejemplo, preparada como en el documento WO 1986/06096 publicado el 23 de octubre de 1986 y la solicitud de patente estadounidense serie n.º 07/559,509, presentada el 23 de julio de 1990, a nombre de Ginsburg et ál., que se incorpora a la presente mediante referencia con respecto a los métodos para producir el VWF recombinante. El VWF útil para la presente invención incluye todas las formas posibles que incluyen las formas monoméricas y

multiméricas. Una forma particularmente útil de VWF son los homomultímeros de al menos dos VWF. Las proteínas de VWF pueden ser un derivado biológicamente activo, o cuando se usan únicamente como estabilizadores para FVIII, el VWF puede ser de una forma no biológicamente activa. También debe entenderse que la presente invención abarca diferentes formas de VWF para su uso en combinación. Por ejemplo, una composición útil para la presente invención puede incluir diferentes multímeros, diferentes derivados, y derivados biológicamente activos y derivados no biológicamente activos.

[00040] En la hemostasia primaria, el VWF sirve como un puente entre las plaquetas y los componentes específicos de la matriz extracelular, tal como el colágeno. La actividad biológica de VWF en este proceso puede medirse mediante diferentes ensayos in vitro (Turecek et ál., Semin. Thromb. Hemost. 28: 149-160, 2002). El ensayo del cofactor de ristocetina se basa en la aglutinación de plaquetas frescas o fijadas con formalina inducida por el antibiótico ristocetina en presencia del VWF.

[00041] El grado de aglutinación de las plaquetas depende de la concentración del VWF y puede medirse por el método turbidimétrico, por ejemplo, mediante el uso de un agregómetro (Weiss et ál., J. Clin. Invest. 52: 2708-2716, 1973; Macfarlane et ál., Thromb. Diath. Haemorrh. 34: 306-308, 1975). El segundo método es el ensayo de unión de colágeno, que se basa en la tecnología ELISA (Brown et Bosak, Thromb. Res. 43: 303-311, 1986; Favalaro, Thromb. Haemost. 83: 127-135, 2000). Una placa de microtitulación se recubre con colágeno tipo I o III. Luego, el VWF se une a la superficie del colágeno y posteriormente se detecta con un anticuerpo policlonal marcado con enzimas. La última etapa es la reacción de sustrato, que puede controlarse fotométricamente con un lector de ELISA. Tal como se proporciona en la presente, la actividad específica del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo) de la presente invención se describe generalmente en términos de mU/μg de VWF, según se mide mediante el uso de ensayos in vitro.

[00042] Una ventaja de las composiciones de rVWF de la presente invención con respecto a pdVWF es que el rVWF presenta una mayor actividad específica que pdVWF. En algunas modalidades, el rVWF de la invención tiene una actividad específica de al menos alrededor de 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 mU/μg o más.

[00043] El rVWF de la presente invención es altamente multimérico y comprende de alrededor de 10 a alrededor de 40 subunidades. En modalidades adicionales, el rVWF multimérico producido mediante el uso de los métodos de la presente invención comprende alrededor de 10-30, 12-28, 14-26,

16-24, 18-22, 20-21 subunidades. En modalidades adicionales, el rVWF se encuentra presente en multímeros de tamaño variable, desde dímeros hasta multímeros de más de 40 subunidades (>10 millones de Daltons). Los multímeros más grandes proporcionan múltiples sitios de unión que pueden interactuar con los receptores de plaquetas y los sitios de lesión de la matriz subendotelial, y son la forma de VWF más activa hemostáticamente. La aplicación de ADAMTS13 escindirá los multímeros de rVWF muy grandes con el transcurso del tiempo, pero durante la producción (generalmente, a través de la expresión en el cultivo celular), las composiciones de rVWF de la presente invención generalmente no se exponen a ADAMTS13 y retienen su estructura altamente multimérica.

[00044] En una modalidad, una composición de rVWF usada en los métodos descritos en la presente tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada porque 95 % de los oligómeros tienen entre 6 subunidades y 20 subunidades. En otras modalidades, una composición de rVWF tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada por que 95 % de los oligómeros tienen un intervalo de subunidades que se selecciona de las variaciones de 458 a 641 que se encuentran en la Tabla 2 del documento WO 2012/171031, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

[00045] En una modalidad, una composición de rVWF puede caracterizarse de acuerdo con el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o un multímero más grande. Por ejemplo, en una modalidad, al menos 20 % de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF usada en los métodos descritos en la presente están presentes en un complejo oligomérico de al menos 10 subunidades. En otra modalidad, al menos 20 % de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF usada en los métodos descritos en la presente están presentes en un complejo oligomérico de al menos 12 subunidades. En aun otras modalidades, una composición de rVWF usada en los métodos proporcionados en la presente tiene un porcentaje mínimo (por ejemplo, tiene al menos X %) de las moléculas de rVWF presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande (por ejemplo, un multímero de al menos Y subunidades) de acuerdo con cualquiera de las variaciones de 134 a 457 que se encuentran en la Tabla 3 a la Tabla 5, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

[00046] De acuerdo con lo anterior, la composición de rVWF administrada al sujeto (con o sin FVIII) generalmente comprende un porcentaje significativo de multímeros de rVWF de alto peso molecular (HMW). En modalidades adicionales, la composición de multímeros de rVWF HMW comprende al menos 10 %-80 % de decámeros de rVWF o multímeros de orden superior. En modalidades adicionales, la composición comprende alrededor de 10-95 %, 20-90 %, 30-85 %, 40-

80 %, 50-75 %, 60-70 % de decámeros o multímeros de orden superior. En modalidades adicionales, la composición de multímeros de rVWF HMW comprende al menos alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de decámeros o multímeros de orden superior.

[00047] La evaluación de la cantidad y el porcentaje de multímeros de rVWF puede realizarse

5 mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, de modo no taxativo, métodos que usan electroforesis y métodos de cromatografía de exclusión por tamaño para separar los multímeros de VWF por tamaño, por ejemplo, tal como se describe en Cumming et ál, (J Clin Pathol. mayo de 1993; 46(5): 470-473, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con la evaluación de los multímeros

10 de VWF). Dichas técnicas pueden incluir, además, técnicas de inmunotransferencia (tales como transferencia Western), en las cuales el gel se inmunotransfiere con un anticuerpo radiomarcado contra VWF seguido por de detección quimioluminiscente (véase, por ejemplo, Wen et ál., (1993), J. Clin. Lab. Anal., 7: 317-323, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con la evaluación de los

15 multímeros de VWF). Los análisis adicionales para VWF incluyen ensayos de VWF:antígeno (VWF:Ag), VWF:cofactor de ristocetina (VWF:RCofy y VWF:actividad de unión de colágeno (VWF:CBA), que se usan a menudo para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de Von Willebrand. (véase, por ejemplo, Favaloro et ál., Pathology, 1997, 29(4): 341-456, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las

20 indicaciones relacionadas con los ensayos para VWF).

[00048] En modalidades adicionales, los multímeros de rVWF de orden superior de la invención son estables durante alrededor de 1 a alrededor de 90 horas después de la administración. En incluso otras modalidades, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante alrededor de 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 horas después de la administración. En aun otras modalidades, los

25 multímeros de rVWF de orden superior son estables durante al menos 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 horas después de la administración. En determinadas modalidades, la estabilidad de los multímeros de rVWF se evalúa in vitro.

[00049] En una modalidad, los multímeros de rVWF de orden superior usados en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente tienen una semivida de al menos 12

30 horas después de la administración. En otra modalidad los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida de al menos 24 horas después de la administración. En aun otras modalidades, los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida seleccionada de las variaciones de 642 a 1045 que se encuentran en la Tabla 6 del documento WO 2012/171031, que se incorpora a la

presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

[00050] En aspectos específicos, el rVWF (recombinante o derivado de plasma) utilizado de acuerdo con la presente invención no se modifica con ninguna conjugación, postraducción o modificación covalente. En modalidades particulares, el rVWF de la presente invención no se modifica con un polímero soluble en agua, que incluye de modo no taxativo, un polietilenglicol (PEG), un propilenglicol, un polioxialquileno, un ácido polisiálico, almidón de hidrixiletilo, un resto de poli-carbohidrato, y similares.

[00051] En otros aspectos, el rVWF (recombinante o derivado de plasma) utilizado de acuerdo con la presente invención se modifica a través de conjugación, modificación postraduccional o modificación covalente, que incluyen modificaciones en los residuos del extremo N o C, así como modificaciones de las cadenas laterales seleccionadas, por ejemplo, en grupos sulfhidrilo libres, aminas primarias y grupos hidroxilo. En una modalidad, un polímero soluble en agua se enlaza a la proteína (directamente o mediante un enlazador) mediante un grupo lisina u otra amina primaria. En una modalidad, las proteínas de rVWF de la presente invención pueden modificarse mediante conjugación de un polímero soluble en agua que incluye, de modo no taxativo, un polietilenglicol (PEG), un propilenglicol, un polioxialquileno, un ácido polisiálico, almidón de hidrixiletilo, un resto de poli-carbohidrato, y similares.

[00052] Los polímeros solubles en agua que pueden usarse para modificar el rVWF y/o el FVIII incluyen estructuras lineales y ramificadas. Los polímeros conjugados pueden unirse directamente a las proteínas de coagulación de la invención o, alternativamente, pueden unirse a través de un resto enlazador. Los ejemplos no taxativos de conjugación de proteínas con polímeros solubles en agua pueden encontrarse en las patentes estadounidenses n.º 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, y 4,179,337, así como en Abuchowski y Davis «Enzymes as Drugs», Holcenberg y Roberts, Eds., págs. 367 383, John Wiley e hijos, Nueva York (1981), y Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2.ª Ed., Academic Press, Inc. 2008.

[00053] La conjugación de proteínas puede realizarse mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, véase Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2.ª Ed., Academic Press, Inc. 2008. Los ejemplos incluyen el enlace a través de enlace peptídico entre un grupo carboxilo en uno de la proteína de coagulación o el resto polimérico soluble en agua y un grupo amina del otro, o un enlace de éster entre un grupo carboxilo de uno y un grupo hidroxilo del otro. Otro enlace mediante el cual una proteína de coagulación de la invención puede conjugarse con un compuesto polimérico soluble en agua es a través de una base de Schiff, entre un grupo amino libre en el resto polimérico que reacciona con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polímero mediante

oxidación de peryodato (Jennings y Lugowski, J. Immunol. 1981; 127:1011-8; Femandes y Gregonradis, Biochim Biophys Acta. 1997; 1341; 26-34). La base de Schiff puede estabilizarse mediante la reducción específica con NaCNBH_3 para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino libres terminales en el polímero mediante la aminación reductiva con NH_4Cl después de la oxidación previa. Se pueden utilizar reactivos bifuncionales para unir dos grupos amino o dos grupos hidroxilo. Por ejemplo, un polímero que contiene un grupo amino puede acoplarse a un grupo amino de la proteína de coagulación con reactivos como BS3 (Bis(sulfosuccinimidil)suberato/Pierce, Rockford, Ill). Además, pueden usarse reactivos de reticulación heterobifuncionales como Sulfo-EMCS éster de (N-épsilon-maleimidocaproiloxi) sulfosuccinimida/Pierce), por ejemplo, para unir grupos amina y tiol. En otras modalidades, puede usarse el grupo reactivo con aldehído, tal como alcóxido de PEG más dietil acetal de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, y cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres activos de succinimidilo, PEG y ditiocarbonato activado, 2,4,5-triclorofenilcloroformiato y PEG activado con P-nitrofenilcloroformiato en la conjugación de una proteína de coagulación.

[00054] En algunos aspectos, el rVWF usado en los métodos de la presente invención se ha madurado in vitro con furina. En modalidades adicionales, la furina es furina recombinante.

[00055] En aspectos adicionales, el rVWF usado en los métodos de la presente invención se produce mediante la expresión en un cultivo de células de mamífero mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En modalidades particulares, el cultivo de mamíferos comprende células CHO. En una modalidad ilustrativa, el rVWF de la invención comprende la proteína de rVWF aislada de un sistema de expresión de células CHO. En una modalidad adicional, la remoción del propéptido es mediada in vitro a través de la exposición del pro-VWF a furina; en incluso otra modalidad, la furina usada para la remoción del propéptido es furina recombinante. En aun otra modalidad, los glicanos del grupo sanguíneo ABO/completamente glicosilados se encuentran ausentes.

[00056] En aun otras modalidades, el rVWF usado en los métodos y las composiciones de la presente invención se expresa en un sistema hospedador eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, de modo no taxativo, células de mamíferos tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, y HepG2; células de insectos, por ejemplo, células SF9, células SF21, células S2 y células High Five, y células de levadura, por ejemplo, células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una modalidad, el VWF puede expresarse en células de levadura, células de insectos, células de aves, células de mamíferos y similares. Por ejemplo, en una línea de células humanas, una línea de células de hámster o una línea de células de murino. En otra modalidad

particular, la línea de células es una línea de células CHO BHK o HEK. Típicamente, pueden usarse células de mamíferos, por ejemplo, células CHO de una línea de células continua, para expresar el VWF de la presente invención.

[00057] En determinadas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que comprende una
5 secuencia que codifica el VWF puede ser un vector. El vector puede ser administrado por un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína puede ser un gen específico o una parte biológicamente funcional de este. En una modalidad, la proteína es al menos una parte biológicamente activa del VWF. Puede usarse una amplia variedad de vectores para la expresión del VWF y pueden seleccionarse de los vectores de expresión de eucariotas. Algunos
10 ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para la expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, mediante el uso de promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para la expresión en células de insectos, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., mediante el uso de promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3,
15 pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como el virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes, retrovirus, etc., mediante el uso de promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

[00058] En algunas modalidades de la presente invención, la secuencia de ácido nucleico comprende, además, otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tal
20 como secuencias promotoras, potenciadores, cajas TATA, sitios de inicio de transcripción, polienlazadores, sitios de restricción, secuencias poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de selección, y similares, que generalmente son conocidos por un experto en la técnica.

[00059] En determinadas modalidades, los métodos de cultivo celular de la invención pueden comprender el uso de un microportador. En algunas modalidades, los cultivos celulares de las
25 modalidades pueden realizarse en biorreactores grandes en condiciones adecuadas para proporcionar áreas de superficie de cultivo específicas de alto volumen para lograr altas densidades celulares y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar dichas condiciones de cultivo es usar microportadores para el cultivo celular en biorreactores de tanque con agitación. El concepto de cultivo celular en microportadores fue descrito por primera por van Wezel (van Wezel, A. L., Nature 216:64-5
30 (1967)) y permite la unión celular en la superficie de pequeñas partículas sólidas suspendidas en el medio de cultivo. Estos métodos proporcionan relaciones de superficie a volumen altas y, por lo tanto, permiten una utilización eficiente de los nutrientes. Además, para la expresión de proteínas secretadas en líneas de células eucariotas, el aumento de la relación de superficie a volumen permite niveles

mayores de secreción y, por lo tanto, una mayor producción de proteínas en el sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten una ampliación fácil de los cultivos de expresión eucariotas.

[00060] Las células que expresan VWF pueden unirse a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores a base de dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros, tal como se describe en Butler (1988 En: Spier & Griffiths, *Animal Cell Biotechnology* 3:283-303). También es posible cultivar las células hasta obtener una biomasa en microportadores esféricos y subcultivar las células cuando hayan alcanzado la biomasa de fermentación final y antes de la producción de la proteína expresada en un microportador poroso o viceversa. Los microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, y Cytode™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

[00061] En determinadas modalidades, el rVWF se expresa en células cultivadas en medios de cultivo celular que producen rVWF de alto peso molecular. Los términos «solución de cultivo celular», «medio o medios de cultivo celular» y «sobrenadante del cultivo celular» se refieren a aspectos de los procesos de cultivo celular que generalmente se conocen en la técnica. En el contexto de la presente invención, una solución de cultivo celular puede incluir medios de cultivo celular y sobrenadante del cultivo celular. Los medios de cultivo celular se agregan de forma externa a la solución de cultivo celular, opcionalmente, junto con suplementos para proporcionar nutrientes y otros componentes para el cultivo de células que expresan VWF. El sobrenadante del cultivo celular se refiere a una solución de cultivo celular que comprende los nutrientes y otros componentes del medio de cultivo celular, así como los productos liberados, metabolizados y/o excretados de las células durante el cultivo. En modalidades adicionales, es posible que los medios no contengan proteínas animales y sean químicamente definidos. Los métodos para preparar medios de cultivo sin proteínas animales y químicamente definidos se conocen en la técnica, por ejemplo, en US 2008/0009040 y US 2007/0212770, que se incorporan a la presente a todos los efectos y, en particular, para las indicaciones relacionadas con los medios de cultivo celular. «Sin proteínas» y los términos relacionados se refieren a proteínas que provienen de una fuente exógena o diferente a las células en el cultivo, que naturalmente eliminan las proteínas durante el crecimiento. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene polipéptidos. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene suero. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene proteína. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene componentes animales. En otra modalidad, el medio de cultivo contiene proteína, por ejemplo, proteína

animal del suero tal como suero fetal de ternero. En otra modalidad, el cultivo tiene proteínas recombinantes agregadas exógenamente. En otra modalidad, las proteínas son de un animal certificado sin patógenos. El término «químicamente definido», tal como se usa en la presente, significará que el medio no comprende ningún suplemento indefinido tal como, por ejemplo, extractos
5 de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levadura. Por consiguiente, cada componente de un medio químicamente definido está definido de forma precisa. En una modalidad preferida, los medios no contienen componentes animales ni proteínas.

[00062] En modalidades adicionales, después de la purificación de un cultivo de células de mamífero, el rFVIII se reconstituye antes de la administración. En incluso otras modalidades, el rVWF
10 se trata con furina antes o después de la reconstitución. En modalidades adicionales, la furina es furina recombinante. En incluso otras modalidades, el rVWF de la invención no se expone a ADAMTS13, con el resultado de que ultra grandes (es decir, que comprenden 10 o más subunidades) están presentes en las composiciones de rVWF de la invención.

[00063] En aspectos específicos, el rVWF usado en los métodos de la presente invención se
15 encuentra contenido en una formulación que contiene un amortiguador, un azúcar y/o alcohol de azúcar (que incluye, de modo no taxativo, trehalosa y manitol), un estabilizador (tal como glicina), y un tensioactivo (tal como polisorbato 80). En modalidades adicionales, para las formulaciones que contienen rFVIII, la formulación puede incluir, además, sodio, histidina, calcio y glutatión.

[00064] En un aspecto, las formulaciones que comprenden rVWF son liofilizadas antes de la
20 administración. La liofilización se lleva a cabo mediante el uso de técnicas comunes en la técnica y debe optimizarse para la composición que se desarrolla [Tang et ál., Pharm Res. 21:191-200. (2004) y Chang et ál., Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

[00065] Los métodos para preparar formulaciones farmacéuticas pueden incluir una o más de
25 las siguientes etapas: agregar un agente estabilizador tal como se describe en la presente a dicha mezcla antes de la liofilización, agregar al menos un agente seleccionado de un agente espesante, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo, cada uno de los cuales es como se describe en el presente, a dicha mezcla antes de la liofilización. Una formulación liofilizada, en un aspecto, está compuesta por uno o más de un amortiguador, un agente espesante y un estabilizador. En un aspecto, se evalúa y selecciona la utilidad de un tensioactivo en casos en los que la agregación durante la
30 etapa de liofilización o durante la reconstitución se convierte en un problema. Se incluye un agente amortiguador adecuado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización.

[00066] La práctica de reconstitución estándar para el material liofilizado es volver a agregar un

volumen de agua pura o agua esterilizada para inyección (WFI) (típicamente equivalente al volumen retirado durante la liofilización), pese a que a veces se usan soluciones diluidas de los agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para la administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de VWF recombinante reconstituidas que comprenden la etapa de agregar un diluyente a una composición de VWF recombinante liofilizada de la invención.

[00067] El material liofilizado puede reconstituirse como una solución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua esterilizada para inyección, agua con conservantes para uso en dosis múltiples, o agua con cantidades adecuadas de tensioactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En varios aspectos, dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, de modo no taxativo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, agentes dispersantes o humectantes que son una fosfatida de origen natural, por ejemplo, de modo no taxativo, lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, de modo no taxativo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, de modo no taxativo, heptadecaetileneoxiceanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, de modo no taxativo, monooleato de polietileno sorbitán. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más conservantes, por ejemplo, de modo no taxativo, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

[00068] En determinadas modalidades, las composiciones de la presente invención son formulaciones líquidas para administración con el uso de una jeringa u otro recipiente de almacenamiento. En modalidades adicionales, estas formulaciones líquidas se producen a partir del material liofilizado descrito en la presente, reconstituido como una solución acuosa.

[00069] En un aspecto adicional, las composiciones de la invención comprenden, además, uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los términos «farmacéuticamente» o «farmacológicamente» aceptable se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tales como productos de escisión y agregación y, además, no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran mediante el uso de vías conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación. Algunos

«portadores farmacéuticamente aceptables» incluyen cualesquiera y todos los solventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción y similares, incluso los agentes descritos anteriormente.

5 II. Producción de VWF recombinante

[00070] El factor de von Willebrand recombinante maduro libre (rVWF) de la presente invención puede producirse de forma recombinante. Un experto en la técnica reconoce los métodos útiles para expresar una proteína recombinante en una célula hospedadora. En algunos casos, el método incluye expresar una secuencia de ácido nucleico que codifica rVWF en una célula hospedadora tal como una
10 célula CHO y cultivar la célula hospedadora resultante en determinadas condiciones para producir el rVWF, prepro-VWF, pro-VWF, y similares.

[00071] En determinadas modalidades, la secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica el VWF puede ser un vector de expresión. El vector puede ser administrado por un virus o puede ser un plásmido. La secuencia de ácido nucleico que codifica la proteína puede ser
15 un gen específico o una parte biológicamente funcional de este. En una modalidad, la proteína es al menos una parte biológicamente activa del VWF. La secuencia de ácido nucleico puede comprender, además, otras secuencias adecuadas para una expresión controlada de una proteína tal como secuencias promotoras, potenciadores, cajas TATA, sitios de inicio de transcripción, polienlazadores, sitios de restricción, secuencias poli-A, secuencias de procesamiento de proteínas, marcadores de
20 selección, y similares, que generalmente son conocidos por un experto en la técnica.

[00072] Puede usarse una amplia variedad de vectores para la expresión del VWF y pueden seleccionarse de los vectores de expresión de eucariotas. Algunos ejemplos de vectores para la expresión eucariota incluyen: (i) para la expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, mediante el uso de promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para la
25 expresión en células de insectos, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., mediante el uso de promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para la expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas virales tales como el virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes, retrovirus, etc., mediante el uso de promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y
30 β -actina.

[00073] En algunos aspectos, el rVWF usado en los métodos de la presente invención se produce mediante la expresión en un cultivo de células de mamífero mediante el uso de métodos

conocidos en la técnica. En modalidades particulares, el cultivo de mamíferos comprende células CHO. En modalidades adicionales, el rVWF se coexpresa con el factor VIII recombinante (rFVIII) en el mismo cultivo. En dichas modalidades, el rVWF y el rFVIII se purifican juntos (se copurifican) o por separado mediante el uso de métodos conocidos en la técnica. En otras modalidades, el rVWF se expresa en un cultivo que no contiene el rFVIII.

[00074] En algunas modalidades, el rVWF se expresa y se aísla de un sistema hospedador eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, de modo no taxativo, células de mamíferos tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, y HepG2; células de insectos, por ejemplo, células SF9, células SF21, células S2 y células High Five, y células de levadura, por ejemplo, células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una modalidad, el VWF puede expresarse en células de levadura, células de insectos, células de aves, células de mamíferos y similares. Por ejemplo, en una línea de células humanas, una línea de células de hámster o una línea de células de murino. En otra modalidad particular, la línea de células es una línea de células CHO BHK o HEK. Típicamente, pueden usarse células de mamíferos, por ejemplo, células CHO de una línea de células continua, para expresar el VWF de la presente invención. En determinados casos, la proteína de VWF se expresa y se aísla de un sistema de expresión de células CHO.

[00075] El VWF puede producirse en un sistema de cultivo celular de acuerdo con cualquier método de cultivo celular reconocido por los expertos en la técnica. En algunas modalidades, los cultivos celulares pueden realizarse en biorreactores grandes en condiciones adecuadas para proporcionar áreas de superficie de cultivo específicas de alto volumen para lograr altas densidades celulares y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar dichas condiciones de cultivo es usar microportadores para el cultivo celular en biorreactores de tanque con agitación. El concepto de cultivo celular en microportadores fue descrito por primera vez por van Wezel (van Wezel, A. L., *Nature*, 1967, 216:64-5) y permite la unión celular en la superficie de pequeñas partículas sólidas suspendidas en el medio de cultivo. Estos métodos proporcionan relaciones de superficie a volumen altas y, por lo tanto, permiten una utilización eficiente de los nutrientes. Además, para la expresión de proteínas secretadas en líneas de células eucariotas, el aumento de la relación de superficie a volumen permite niveles mayores de secreción y, por lo tanto, una mayor producción de proteínas en el sobrenadante del cultivo. Finalmente, estos métodos permiten una ampliación fácil de los cultivos de expresión eucariotas.

[00076] Las células que expresan VWF pueden unirse a un microportador esférico o poroso durante el crecimiento del cultivo celular. El microportador puede ser un microportador seleccionado del grupo de microportadores a base de dextrano, colágeno, plástico, gelatina y celulosa y otros, tal

como se describe en Butler (1988 En: Spier & Griffiths, Animal Cell Biotechnology 3:283-303). También es posible cultivar las células hasta obtener una biomasa en microportadores esféricos y subcultivar las células cuando hayan alcanzado la biomasa de fermentación final y antes de la producción de la proteína expresada en un microportador poroso o viceversa. Los microportadores esféricos adecuados pueden incluir microportadores de superficie lisa, tales como Cytodex™ 1, Cytodex™ 2, y Cytodex™ 3 (GE Healthcare) y microportadores macroporosos tales como Cytopore™ 1, Cytopore™ 2, Cytoline™ 1, y Cytoline™ 2 (GE Healthcare).

[00077] En una modalidad adicional, el propéptido de VWF se escinde del VWF no maduro no maduro in vitro a través de la exposición del pro-VWF a furina. En algunas modalidades, la furina utilizada para la escisión del propéptido es furina recombinante.

[00078] En determinadas modalidades, el rVWF se expresa en células cultivadas en medios de cultivo celular que producen rVWF de alto peso molecular. Los términos «solución de cultivo celular», «medio o medios de cultivo celular» y «sobrenadante del cultivo celular» se refieren a aspectos de los procesos de cultivo celular que generalmente se conocen en la técnica. En el contexto de la presente invención, una solución de cultivo celular puede incluir medios de cultivo celular y sobrenadante del cultivo celular. Los medios de cultivo celular se agregan de forma externa a la solución de cultivo celular, opcionalmente, junto con suplementos para proporcionar nutrientes y otros componentes para el cultivo de células que expresan VWF. El sobrenadante del cultivo celular se refiere a una solución de cultivo celular que comprende los nutrientes y otros componentes del medio de cultivo celular, así como los productos liberados, metabolizados y/o excretados de las células durante el cultivo. En modalidades adicionales, es posible que los medios no contengan proteínas animales y sean químicamente definidos. Los métodos para preparar medios de cultivo sin proteínas animales y químicamente definidos se conocen en la técnica, por ejemplo, en US 2006/0094104, US 2007/0212770 US 2008/0009040, que se incorporan a la presente a todos los efectos y, en particular, para las indicaciones relacionadas con los medios de cultivo celular. «Sin proteínas» y los términos relacionados se refieren a proteínas que provienen de una fuente exógena o diferente a las células en el cultivo, que naturalmente eliminan las proteínas durante el crecimiento. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene polipéptidos. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene suero. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene proteína. En otra modalidad, el medio de cultivo no contiene componentes animales. En otra modalidad, el medio de cultivo contiene proteína, por ejemplo, proteína animal del suero tal como suero fetal de ternero. En otra modalidad, el cultivo tiene proteínas recombinantes agregadas exógenamente. En otra modalidad, las proteínas son de un animal certificado sin patógenos. El término «químicamente definido», tal como se usa en la presente,

significará que el medio no comprende ningún suplemento indefinido tal como, por ejemplo, extractos de componentes animales, órganos, glándulas, plantas o levadura. Por consiguiente, cada componente de un medio químicamente definido está definido de forma precisa. En una modalidad preferida, los medios no contienen componentes animales ni proteínas.

5 [00079] En determinadas modalidades, el cultivo de células que expresan el VWF puede mantenerse durante al menos alrededor de 7 días, o al menos alrededor de 14 días, 21 días, 28 días, o al menos alrededor de 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas, o al menos alrededor de 2 meses, o 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 meses o más. La densidad celular a la que se mantiene un cultivo celular para la producción de una proteína de VWF recombinante dependerá de las
10 condiciones de cultivo y del medio usado para la expresión de la proteína. Un experto en la técnica podrá determinar fácilmente la densidad celular óptima para un cultivo celular que produce un VWF. En una modalidad, el cultivo se mantiene a una densidad celular de entre alrededor de $0,5 \times 10^6$ y 4×10^7 células/ml durante un período de tiempo prolongado. En otras modalidades, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre alrededor de $1,0 \times 10^6$ y alrededor de $1,0 \times 10^7$ células/ml durante
15 un período de tiempo prolongado. En otras modalidades, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre alrededor de $1,0 \times 10^6$ y alrededor de $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un período de tiempo prolongado. En otras modalidades, la densidad celular se mantiene a una concentración de entre alrededor de $1,0 \times 10^6$ y alrededor de $4,0 \times 10^6$ células/ml durante un período de tiempo prolongado. En aun otras modalidades, la densidad celular puede mantenerse a una concentración entre alrededor
20 de $2,0 \times 10^6$ y alrededor de $4,0 \times 10^6$, o entre alrededor de $1,0 \times 10^6$ y alrededor de $2,5 \times 10^6$, o entre alrededor de $1,5 \times 10^6$ y alrededor de $3,5 \times 10^6$, o cualquier otro intervalo similar, durante un período de tiempo prolongado. Después de un tiempo adecuado en el cultivo celular, el rVWF puede aislarse del sistema de expresión mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

[00080] En una modalidad específica, la densidad celular del cultivo celular continuo para la
25 producción de rVWF se mantiene a una concentración de no más de $2,5 \times 10^6$ células/mL durante un período de tiempo prolongado. En otras modalidades específicas, la densidad celular se mantiene a no más de $2,0 \times 10^6$ células/mL, $1,5 \times 10^6$ células/mL, $1,0 \times 10^6$ células/mL, $0,5 \times 10^6$ células/mL, o menos. En una modalidad, la densidad celular se mantiene entre $1,5 \times 10^6$ células/mL y $2,5 \times 10^6$ células/mL.

[00081] En una modalidad de los cultivos celulares descritos anteriormente, la solución de
30 cultivo celular comprende un suplemento del medio que comprende cobre. Dichas soluciones de cultivo celular se describen, por ejemplo, en la patente estadounidense n.º 8,852,888 y la patente estadounidense n.º 9,409,971, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con los métodos y las

composiciones para producir VWF recombinante.

[00082] Las secuencias de polinucleótidos y aminoácidos de prepro-VWF se muestran en la SEQ ID NO:1 y la SEQ ID NO:2, respectivamente, y están disponibles en los n.º de acceso de GenBank NM_000552 (ARNm del factor de von Willebrand de Homo sapiens (VWF)) y NP_000543, respectivamente. La secuencia de aminoácidos correspondiente a la proteína de VWF madura se muestra en la SEQ ID NO: 3 (correspondiente a los aminoácidos 764-2813 de la secuencia de aminoácidos de prepro-VWF de longitud completa). En algunas modalidades, el VWF presenta al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3. En algunas modalidades, el rVWF de la invención presenta al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de la SEQ ID NO: 3. Véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 8,597,910, la publicación de patente estadounidense n.º 2016/0129090, así como la FIGURA 6.

[00083] Una forma de rVWF útil tiene al menos la propiedad de estabilizar in vivo, por ejemplo, la unión de al menos una molécula del factor VIII (FVIII) y, opcionalmente, tiene un patrón de glicosilación que es farmacológicamente aceptable. Los ejemplos específicos de este incluyen VWF sin el dominio A2, por lo tanto, resistente a la proteólisis (Lankhof et ál., *Thromb. Haemost.* 77: 1008-1013, 1997), y un fragmento de VWF de Val 449 a Asn 730 que incluye el dominio de unión a la glicoproteína Ib y los sitios de unión para colágeno y heparina (Pietu et ál., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 164: 1339-1347, 1989). La determinación de la capacidad de un VWF para estabilizar al menos una molécula de FVIII se realiza, en un aspecto, en mamíferos con deficiencia de VWF de acuerdo con métodos conocidos en el estado de la técnica.

[00084] El rVWF de la presente invención puede producirse mediante cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se describe en WO86/06096 publicado el 23 de octubre de 1986 y la solicitud de patente estadounidense n.º 07/559,509 presentada el 23 de julio de 1990, que se incorpora a la presente mediante referencia con respecto a los métodos para producir VWF recombinante. Por lo tanto, los métodos se conocen en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante modificación genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células eucariotas o procariotas mediante transfección, es decir, mediante electroporación o microinyección, (iii) cultivar las células transformadas, por ejemplo, de manera continua o por lotes, (iv) expresar el VWF, por ejemplo, de manera constitutiva o tras la inducción, y (v) aislar el VWF, por ejemplo, a partir del cultivo celular o mediante el cultivo de las células transformadas, con el fin de (vi) obtener el rVWF purificado, por ejemplo, mediante

cromatografía de intercambio de aniones o cromatografía de afinidad. En un aspecto, un VWF recombinante se elabora en células hospedadoras transformadas mediante el uso de técnicas de ADN recombinante conocidas en la técnica. Por ejemplo, se podrían escindir del ADN las secuencias que codifican el polipéptido mediante el uso de enzimas de restricción adecuadas. De manera alternativa, en otro aspecto, la molécula de ADN se sintetiza mediante el uso de técnicas de síntesis química tales como el método de fosforamidata. En incluso otro aspecto, también se usa una combinación de estas técnicas.

[00085] La invención también proporciona vectores que codifican polipéptidos de la invención en un hospedador adecuado. El vector comprende el polinucleótido que codifica el polipéptido enlazado operativamente a las secuencias de control de expresión adecuadas. Se conocen métodos para llevar a cabo este enlace operativo, ya sea antes o después de la inserción del polinucleótido en el vector. Las secuencias de control de expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosomal, señales de inicio, señales de terminación, señales de casquete, señales de poliadenilación y otras señales involucradas con el control de la transcripción o la traducción. El vector resultante con el polinucleótido en él se usa para transformar un hospedador adecuado. Esta transformación puede realizarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica.

[00086] Se usan cualquiera de una gran cantidad de células hospedadoras disponibles y conocidas en la práctica de esta invención. La selección de un hospedador particular depende de una cantidad de factores reconocidos en la técnica que incluyen, por ejemplo, compatibilidad con el vector de expresión elegido, toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, velocidad de transformación, facilidad de recuperación de los péptidos, características de expresión, bioseguridad y costos. Se debe conseguir el equilibrio de estos factores con la comprensión de que puede que no todas las células hospedadoras sean igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas pautas generales, las células hospedadoras microbianas útiles incluyen, de modo no taxativo, células de bacterias, levadura y otros hongos, insectos, plantas, mamíferos (incluidos los seres humanos) en cultivo u otros hospedadores conocidos en la técnica.

[00087] Las células hospedadoras transformadas se cultivan en condiciones de fermentación convencionales de modo que se expresen los compuestos deseados. Dichas condiciones de fermentación son conocidas en la técnica. Finalmente, los polipéptidos se purifican a partir de medios de cultivo o las propias células hospedadoras mediante métodos conocidos en la técnica.

[00088] Dependiendo de la célula hospedadora utilizada para expresar un compuesto de la invención, opcionalmente, se unen grupos carbohidrato (oligosacárido) a los sitios que se conocen como sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, los oligosacáridos enlazados a O se unen a

serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que los oligosacáridos enlazados a N se unen a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferentemente uno de los 19 aminoácidos de origen natural sin contar la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos enlazados a N y enlazados a O y los residuos de azúcar que se encuentran en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos oligosacáridos enlazados a N y enlazados a O es el ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es usualmente el residuo del extremo de ambos oligosacáridos enlazados a N y enlazados a O y, en virtud de su carga negativa, en un aspecto, confiere propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Dichos sitios pueden incorporarse en el enlazador de los compuestos de esta invención y preferentemente se glicosilan mediante una célula durante la producción recombinante de compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamíferos tales como CHO, BHK, COS). En otros aspectos, dichos sitios se glicosilan mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

[00089] En algunas modalidades, puede realizarse sialización (también denominada sialilación) en la columna como parte de los procedimientos de purificación descritos en la presente (que incluyen métodos de intercambio aniónico, intercambio catiónico, exclusión por tamaño y/o inmunoafinidad). En algunas modalidades, la sialilación da como resultado una mayor estabilidad del rVWF en comparación con el rVWF que no se ha sometido a sialilación. En algunas modalidades, la sialilación da como resultado una mayor estabilidad del rVWF en la circulación sanguínea (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) en comparación con el rVWF que no se ha sometido a sialilación. En algunas modalidades, la mayor estabilidad del rVWF sialilado da como resultado un aumento de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más en comparación con el rVWF que no se ha sometido a sialilación. En algunas modalidades, la sialilación da como resultado una mayor semivida para el rVWF en comparación con el rVWF que no se ha sometidos sialilación. En algunas modalidades, la sialilación da como resultado una mayor semivida para el rVWF en la circulación sanguínea (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) en comparación con el rVWF que no se ha sometidos sialilación. En algunas modalidades, la mayor semivida para el rVWF sialilado da como resultado un aumento de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o más en comparación con el rVWF que no se ha sometido a sialilación. En algunas modalidades, la mayor semivida para el rVWF sialilado da como resultado un rVWF que es estable durante 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas, 24 horas o más en la circulación sanguínea (por ejemplo, después de la administración a un sujeto) en comparación con el rVWF que no se ha sometido a sialilación. En algunas modalidades, la sialilación aumenta el número de 2,3 sialilación y/o 2,6 sialilación. En algunas

modalidades, la sialilación aumenta mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y/o 2,6 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de amortiguación adicional. En algunas modalidades, la sialilación aumenta mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de amortiguación adicional. En algunas modalidades, la 2,3 sialilación aumenta mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de amortiguación adicional.

[00090] En algunas modalidades, la 2,6 sialilación aumenta mediante la adición de 2,6 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de amortiguación adicional. En algunas modalidades, la 2,3 sialilación y/o 2,6 sialilación aumentan mediante la adición de 2,3 sialiltransferasa y/o 2,6 sialiltransferasa y CMP-NANA (sal sódica de ácido citidina-5'-monofosfo-N-acetilneuramínico) como una etapa de amortiguación adicional. En algunas modalidades, la CMP-NANA se modifica química o enzimáticamente para transferir ácido siálico modificado a una posición potencial libre. En algunas modalidades, la sialilación se realiza al cargar el rVWF en la resina, lavar con uno o más amortiguadores, tal como se describe en la presente, para agotar las impurezas no deseadas, aplicar uno o más amortiguadores que contienen sialiltransferasa y CMP-NANA en condiciones que permiten la sialilación adicional, y lavar con uno o más amortiguadores para agotar el exceso de reactivos de sialilación, y eluir con uno o más amortiguadores el rVWF potenciado (por ejemplo, el rVWF con mayor sialilación). En algunas modalidades, el proceso de sialilación se realiza como parte de un método de intercambio catiónico, un método de intercambio aniónico, un método de exclusión por tamaño, o un método de purificación por inmunoafinidad, tal como se describe en la presente.

[00091] De manera alternativa, los compuestos se preparan mediante métodos sintéticos, por ejemplo, mediante el uso de técnicas de síntesis de fase sólida. Las técnicas adecuadas se conocen en la técnica e incluyen las que se describen en Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, págs. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis et ál. (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart y Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; patente estadounidense n.º 3,941,763; Finn et ál. (1976), *The Proteins* (3.^a ed.) 2: 105-253; y Erickson et ál. (1976), *The Proteins* (3.^a ed.) 2: 257-527'. La síntesis de fase sólida es la técnica preferida para preparar péptidos individuales dado que es el método económicamente más eficaz para preparar péptidos pequeños.

[00092] Los fragmentos, las variantes y los análogos de VWF pueden producirse de acuerdo con métodos conocidos en la técnica. Los fragmentos de un polipéptido pueden prepararse mediante

el uso, de modo no taxativo, de escisión enzimática (por ejemplo, tripsina, quimotripsina) y también mediante el uso de medios recombinantes para generar fragmentos de un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos específica. Pueden generarse fragmentos de polipéptidos que comprenden una región de la proteína que tiene una actividad particular, tal como un dominio de multimerización o cualquier dominio de VWF identificable conocido en la técnica.

[00093] También se conocen los métodos para preparar análogos de polipéptidos. Los análogos de secuencia de aminoácidos de un polipéptido pueden ser análogos de sustitución, inserción, adición o eliminación. Los análogos de eliminación, que incluyen fragmentos de un polipéptido, carecen de uno o más residuos de la proteína natural que no son esenciales para la función o actividad inmunogénica.

Los análogos de inserción implican la adición, por ejemplo, de uno o más aminoácidos en un punto no de extremo en el polipéptido. Este análogo puede incluir, por ejemplo, de modo no taxativo, la inserción de un epítipo inmunorreactivo o simplemente un único residuo. Los análogos de adición, que incluyen los fragmentos de un polipéptido, incluyen la adición de uno o más aminoácidos en uno o ambos extremos de una proteína e incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión. También se contemplan combinaciones de los análogos mencionados anteriormente.

[00094] Los análogos de sustitución, típicamente, intercambian un aminoácido de tipo salvaje por otro en uno o más sitios dentro de la proteína, y pueden diseñarse para modular una o más propiedades del polipéptido sin la pérdida completa de otras funciones o propiedades. En un aspecto, las sustituciones son sustituciones conservadoras. La «sustitución de aminoácidos conservadora» es la sustitución de un aminoácido con un aminoácido que tiene una cadena lateral o carácter químico similar. Los aminoácidos similares para realizar sustituciones conservadoras incluyen aquellos que tienen una cadena lateral ácida (ácido glutámico, ácido aspártico); una cadena lateral básica (arginina, lisina, histidina); una cadena lateral de amida polar (glutamina, asparagina); una cadena lateral alifática hidrofóbica (leucina, isoleucina, valina, alanina, glicina); una cadena lateral aromática (fenilalanina, triptófano, tirosina); una cadena lateral pequeña (glicina, alanina, serina, treonina, metionina); o una cadena lateral alifática (serina, treonina).

[00095] En un aspecto, los análogos son sustancialmente homólogos o sustancialmente idénticos al VWF recombinante del que derivan. Los análogos incluyen aquellos que retienen al menos algo de la actividad biológica del polipéptido de tipo salvaje, por ejemplo, actividad de coagulación sanguínea.

[00096] Las variantes de polipéptidos contempladas incluyen, de modo no taxativo, polipéptidos modificados químicamente mediante técnicas tales como ubiquitinación, glicosilación, que incluye polisialación (o polisialilación), conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcado, unión

polimérica covalente tal como pegilación (derivación con polietilenglicol), introducción de enlaces no hidrolizables, e inserción o sustitución mediante síntesis química de aminoácidos tales como ornitina, que no se producen normalmente en las proteínas humanas. Las variantes retienen las mismas o esencialmente las mismas propiedades de unión de las moléculas no modificadas de la invención.

- 5 Dicha modificación química puede incluir la unión directa o indirecta (por ejemplo, a través de un enlazador) de un agente al polipéptido VWF. En el caso de la unión indirecta, se contempla que el enlazador pueda ser hidrolizable o no hidrolizable.

[00097] La preparación de análogos de polipéptidos pegilados comprenderá, en un aspecto, las etapas de (a) hacer reaccionar el polipéptido con polietilenglicol (tal como un éster reactivo) o derivado
 10 de aldehído de PEG) en condiciones mediante las cuales el polipéptido de la construcción de unión se une a uno o más grupos PEG, y (b) obtener uno o más productos de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones de acilación se determinan en función de parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la relación entre PEG:proteína, mayor es el porcentaje de producto poli-pegilado. En algunas modalidades, la
 15 construcción de unión tiene un único resto PEG en el extremo N. El polietilenglicol (PEG) puede unirse al factor de coagulación sanguínea, por ejemplo, para proporcionar una semivida in vivo más larga. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular conveniente y es lineal o ramificado. El peso molecular promedio del PEG varía de alrededor de 2 kiloDalton («kD») a alrededor de 100 kDa, de alrededor de 5 kDa a alrededor de 50 kDa, o de alrededor de 5 kDa a alrededor de 10 kDa. En
 20 determinados aspectos, los grupos PEG se unen al factor de coagulación sanguínea mediante acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo natural o modificado genéticamente en el resto PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, toil, o éster) con un grupo reactivo en el factor de coagulación sanguínea (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, o éster) o mediante cualquier otra técnica conocida en la técnica.

25 [00098] Los métodos para preparar el polipéptido polisialilado se describen en la publicación de patente estadounidense 20060160948, Fernandes et Gregoriadis; Biochim. Biophys. Acta 1341: 26-34, 1997, y Saenko et ál., Haemophilia 12:42-51, 2006. En resumen, una solución de ácido colomínico (CA) que contiene NaIO_4 0,1 M se agita en la oscuridad a temperatura ambiente para oxidar el CA. La solución de CA activada se dializa, por ejemplo, contra amortiguador de fosfato de sodio 0,05 M, pH
 30 7,2, en la oscuridad y esta solución se agrega a la solución de rVWF y se incuba durante 18 h a temperatura ambiente en la oscuridad con agitación suave. Los reactivos libres pueden separarse opcionalmente del conjugado de rVWF-ácido polisialílico, por ejemplo, mediante ultrafiltración/diafiltración. La conjugación de rVWF con ácido polisialílico se logra mediante el uso de

glutaraldehído como reactivo de reticulación (Migneault et ál., Biotechniques 37: 790-796, 2004).

[00099] También se contempla, en otro aspecto, que los polipéptidos prepro-VWF y pro-VWF proporcionarán un beneficio terapéutico en las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 7,005,502, describe una preparación farmacéutica que comprende cantidades sustanciales de pro-VWF que inducen la generación de trombina in vitro. Además de fragmentos, variantes u otros análogos biológicamente activos recombinantes del VWF maduro de origen natural, la presente invención contempla el uso de fragmentos, variantes u otros análogos biológicamente activos recombinantes de los polipéptidos prepro-VWF (se muestran en la SEQ ID NO:2) o pro-VWF (residuos de aminoácidos 23 a 764 de la SEQ ID NO: 2) en las formulaciones que se describen en la presente.

[000100] Un experto en la técnica puede generar fácilmente fragmentos, variantes y análogos que codifican polinucleótidos para codificar fragmentos, variantes u análogos biológicamente activos de la molécula de origen natural que posean actividad biológica igual o similar a la de la molécula de origen natural. En varios aspectos, estos polinucleótidos se preparan mediante el uso de técnicas de PCR, digestión/ligadura de la molécula que codifica el ADN, y similares. Por lo tanto, un experto en la técnica será capaz de generar cambios de base simple en la cadena de ADN para producir un codón alterado y una mutación con cambio de sentido mediante el uso de cualquier método conocido en la técnica, incluida, de modo no taxativo, la mutagénesis específica del sitio. Tal como se usa en la presente, la expresión «condiciones de hibridación moderadamente rigurosas» significa, por ejemplo, la hibridación a 42 °C en formamida al 50 % y lavado a 60 °C en 0,1 x SSC, SDS al 0,1 %. Un experto en la técnica entiende que la variación en estas condiciones se produce en función de la longitud y el contenido de bases de nucleótidos GC de las secuencias que se hibridan. Las fórmulas estándar en la técnica son adecuadas para determinar las condiciones de hibridación exactas. Véase Sambrook et ál., 9,47-9,51 en Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (1989).

A. MULTÍMEROS DE VWF

[000101] La evaluación de la cantidad y el porcentaje de multímeros de rVWF puede realizarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, de modo no taxativo, métodos que usan electroforesis y métodos de cromatografía de exclusión por tamaño para separar los multímeros de VWF por tamaño, por ejemplo, tal como se describe en Cumming et ál, (J Clin Pathol., mayo de 1993; 46(5): 470-473, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los

efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con la evaluación de los multímeros de VWF). Dichas técnicas pueden incluir, además, técnicas de inmunotransferencia (tales como transferencia Western), en las cuales el gel se inmunotransfiere con un anticuerpo radiomarcado contra VWF seguido por de detección quimioluminiscente (véase, por ejemplo, Wen et ál., J. Clin. Lab. Anal., 1993, 7: 317-323, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con la evaluación de los multímeros de VWF). Los análisis adicionales para VWF incluyen ensayos de VWF:antígeno (VWF:Ag), VWF:cofactor de ristocetina (VWF:RCofy y VWF:actividad de unión de colágeno (VWF:CBA), que se usan a menudo para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de Von Willebrand (véase, por ejemplo, Favaloro et ál., Pathology, 1997, 29(4): 341-456; Sadler, JE, Annu Rev Biochem, 1998, 67:395-424; y Turecek et ál., Semin Thromb Hemost, 2010, 36:510-521, que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con los ensayos para VWF). En algunas modalidades, el rVWF obtenido mediante el uso de los métodos de la presente incluye cualquier patrón multimérico presente en la muestra de carga del rVWF. En algunas modalidades, el rVWF obtenido mediante el uso de los métodos de la presente incluye los patrones multiméricos que se producen fisiológicamente, así como patrones multiméricos de VWF muy grandes.

b. Ensayos de VWF

[000102] En la hemostasia primaria, el VWF sirve como un puente entre las plaquetas y los componentes específicos de la matriz extracelular, tal como el colágeno. La actividad biológica de VWF en este proceso puede medirse mediante diferentes ensayos in vitro (Turecek et ál., Semin Thromb Hemost, 2010, 36: 510-521).

[000103] El ensayo de VWF:cofactor de ristocetina (VWF:RCof) se basa en la aglutinación de plaquetas frescas o fijadas con formalina inducida por el antibiótico ristocetina en presencia del VWF. El grado de aglutinación de las plaquetas depende de la concentración del VWF y puede medirse por el método turbidimétrico, por ejemplo, mediante el uso de un agregómetro (Weiss et ál., J. Clin. Invest., 1973, 52: 2708-2716; Macfarlane et ál., Thromb. Diath. Haemorrh., 1975, 34: 306-308). Tal como se proporciona en la presente, la actividad específica del cofactor de ristocetina del VWF (VWF:RCo) de la presente invención se describe generalmente en términos de mU/μg de VWF, según se mide mediante el uso de ensayos in vitro.

[000104] En algunas modalidades, el rVWF purificado de acuerdo con los métodos de la presente

invención tiene una actividad específica de al menos alrededor de 20, 22,5, 25, 27,5, 30, 32,5, 35, 37,5, 40, 42,5, 45, 47,5, 50, 52,5, 55, 57,5, 60, 62,5, 65, 67,5, 70, 72,5, 75, 77,5, 80, 82,5, 85, 87,5, 90, 92,5, 95, 97,5, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150 mU/μg o más. En algunas modalidades, el rVWF utilizado en los métodos descritos en la presente tiene una actividad específica de 20 mU/μg a 150 mU/μg. En algunas modalidades, el rVWF tiene una actividad específica de 30 mU/μg a 120 mU/μg. En algunas modalidades, el rVWF tiene una actividad específica de 40 mU/μg a 90 mU/μg. En algunas modalidades, el rVWF tiene una actividad específica seleccionada de las variaciones 1 a 133 que se encuentran en la Tabla 3 a continuación.

Tabla 3. Modalidades ilustrativas para la actividad específica de rVWF que se encuentra en las composiciones y se utiliza en los métodos que se proporcionan en la presente.

(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)		(mU/μg)	
20	Var. 1	110	Var. 35	40-150	Var. 68	70-120	Var. 101
22,5	Var. 2	115	Var. 36	40-140	Var. 69	70-110	Var. 102
25	Var. 3	120	Var. 37	40-130	Var. 70	70-100	Var. 103
27,5	Var. 4	125	Var. 38	40-120	Var. 71	70-90	Var. 104
30	Var. 5	130	Var. 39	40-110	Var. 72	70-80	Var. 105
32,5	Var. 6	135	Var. 40	40-100	Var. 73	80-150	Var. 106
35	Var. 7	140	Var. 41	40-90	Var. 74	80-140	Var. 107
37,5	Var. 8	145	Var. 42	40-80	Var. 75	80-130	Var. 108
40	Var. 9	150	Var. 43	40-70	Var. 76	80-120	Var. 109
42,5	Var. 10	20-150	Var. 44	40-60	Var. 77	80-110	Var. 110
45	Var. 11	20-140	Var. 45	40-50	Var. 78	80-100	Var. 111
47,5	Var. 12	20-130	Var. 46	50-150	Var. 79	80-90	Var. 112
50	Var. 13	20-120	Var. 47	50-140	Var. 80	90-150	Var. 113
52,5	Var. 14	20-110	Var. 48	50-130	Var. 81	90-140	Var. 114
55	Var. 15	20-100	Var. 49	50-120	Var. 82	90-130	Var. 115
57,5	Var. 16	20-90	Var. 50	50-110	Var. 83	90-120	Var. 116
60	Var. 17	20-80	Var. 51	50-100	Var. 84	90-110	Var. 117
62,5	Var. 18	20-70	Var. 52	50-90	Var. 85	90-100	Var. 118
65	Var. 19	20-60	Var. 53	50-80	Var. 86	100-150	Var. 119
67,5	Var. 20	20-50	Var. 54	50-70	Var. 87	100-140	Var. 120
70	Var. 21	20-40	Var. 55	50-60	Var. 88	100-130	Var. 121
72,5	Var. 22	30-150	Var. 56	60-150	Var. 89	100-120	Var. 122
75	Var. 23	30-140	Var. 57	60-140	Var. 90	100-110	Var. 123
77,5	Var. 24	30-130	Var. 58	60-130	Var. 91	110-150	Var. 124
80	Var. 25	30-120	Var. 59	60-120	Var. 92	110-140	Var. 125

82,5	Var. 26	30-110	Var. 60	60-110	Var. 93	110-130	Var. 126
85	Var. 27	30-100	Var. 61	60-100	Var. 94	110-120	Var. 127
87,5	Var. 28	30-90	Var. 62	60-90	Var. 95	120-150	Var. 128
90	Var. 29	30-80	Var. 63	60-80	Var. 96	120-140	Var. 129
92,5	Var. 30	30-70	Var. 64	60-70	Var. 97	120-130	Var. 130
95	Var. 31	30-60	Var. 65	70-150	Var. 98	130-150	Var. 131
97,5	Var. 32	30-50	Var. 66	70-140	Var. 99	130-140	Var. 132
100	Var. 33	30-40	Var. 67	70-130	Var. 100	140-150	Var. 133
105	Var. 34						

Var. = Variación

[000105] El rVWF de la presente invención es altamente multimérico y comprende de alrededor de 10 a alrededor de 40 subunidades. En modalidades adicionales, el rVWF multimérico producido mediante el uso de los métodos de la presente invención comprende alrededor de 10-30, 12-28, 14-26, 16-24, 18-22, 20-21 subunidades. En algunas modalidades, el rVWF se encuentra presente en multímeros de tamaño variable, desde dímeros hasta multímeros de más de 40 subunidades (>10 millones de Daltons). Los multímeros más grandes proporcionan múltiples sitios de unión que pueden interactuar con los receptores de plaquetas y los sitios de lesión de la matriz subendotelial, y son la forma de VWF más activa hemostáticamente. En algunas modalidades, el rVWF de la presente invención comprende multímeros muy grandes (ULM). Generalmente, los multímeros grandes y muy grandes se consideran hemostáticamente más eficaces (véase, por ejemplo, Turecek, P., *Hämostaseologie*, (Vol. 37): Suplemento 1, páginas S15-S25 (2017)). En algunas modalidades, el rVWF es de entre 500 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, puede obtenerse cualquier patrón de multímero deseado mediante el uso de los métodos descritos. En algunas modalidades, cuando se emplean métodos de intercambio aniónico y/o intercambio catiónico, puede manipularse el pH, la conductividad y/o la concentración de contraiones de los amortiguadores en una o más etapas de lavado o los amortiguadores de gradiente para obtener el patrón multimérico deseado. En algunas modalidades, cuando se emplean métodos de cromatografía de exclusión por tamaño, pueden emplearse criterios de recolección para obtener el patrón multimérico deseado. En algunas modalidades, el patrón multimérico deseado comprende multímeros muy grandes. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de al menos 10 000 kDa, al menos 11 000 kDa, al menos 12 000 kDa, al menos 13 000 kDa, al menos 14 000 kDa, al menos 15 000 kDa, al menos 16 000 kDa, al menos 17 000 kDa, al menos 18 000 kDa, al menos 19 000 kDa, al menos 20 000 kD. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 10 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de

11 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 12 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 13 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 14 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 15 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 16 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 17 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 18 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, los multímeros muy grandes son de entre alrededor de 19 000 kDa y 20 000 kDa. En algunas modalidades, el rVWF obtenido mediante el uso de los métodos de la presente incluye cualquier patrón multimérico presente en la muestra de carga del rVWF. En algunas modalidades, el rVWF obtenido mediante el uso de los métodos de la presente incluye los patrones multiméricos que se producen fisiológicamente, así como patrones multiméricos de VWF muy grandes.

[000106] En algunas modalidades, la composición de rVWF preparada mediante el método de purificación descrito en la presente tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada porque 95 % de los oligómeros tienen entre 6 subunidades y 20 subunidades. En algunas modalidades, la composición de rVWF tiene una distribución de oligómeros de rVWF caracterizada por que 95 % de los oligómeros tienen un intervalo de subunidades que se selecciona de las variaciones de 458 a 641 que se encuentran en 4.

20 Tabla 4. Modalidades ilustrativas para la distribución de oligómeros de rVWF que se encuentran en las composiciones y se utilizan en los métodos que se proporcionan en la presente.

Subunidades		Subunidades		Subunidades		Subunidades	
2-40	Var. 458	6-16	Var. 504	12-20	Var. 550	20-28	Var. 596
2-38	Var. 459	6-14	Var. 505	12-18	Var. 551	20-26	Var. 597
2-36	Var. 460	6-12	Var. 506	12-16	Var. 552	20-24	Var. 598
2-34	Var. 461	6-10	Var. 507	12-14	Var. 553	20-22	Var. 599
2-32	Var. 462	6-8	Var. 508	14-40	Var. 554	22-40	Var. 600
2-30	Var. 463	8-40	Var. 509	14-38	Var. 555	22-38	Var. 601
2-28	Var. 464	8-38	Var. 510	14-36	Var. 556	22-36	Var. 602
2-26	Var. 465	8-36	Var. 511	14-34	Var. 557	22-34	Var. 603
2-24	Var. 466	8-34	Var. 512	14-32	Var. 558	22-32	Var. 604

2-22	Var. 467	8-32	Var. 513	14-30	Var. 559	22-30	Var. 605
2-20	Var. 468	8-30	Var. 514	14-28	Var. 560	22-28	Var. 606
2-18	Var. 469	8-28	Var. 515	14-26	Var. 561	22-26	Var. 607
2-16	Var. 470	8-26	Var. 516	14-24	Var. 562	22-24	Var. 608
2-14	Var. 471	8-24	Var. 517	14-22	Var. 563	24-40	Var. 609
2-12	Var. 472	8-22	Var. 518	14-20	Var. 564	24-38	Var. 610
2-10	Var. 473	8-20	Var. 519	14-18	Var. 565	24-36	Var. 611
2-8	Var. 474	8-18	Var. 520	14-16	Var. 566	24-34	Var. 612
4-40	Var. 475	8-16	Var. 521	16-40	Var. 567	24-32	Var. 613
4-38	Var. 476	8-14	Var. 522	16-38	Var. 568	24-30	Var. 614
4-36	Var. 477	8-12	Var. 523	16-36	Var. 569	24-28	Var. 615
4-34	Var. 478	8-10	Var. 524	16-34	Var. 570	24-26	Var. 616
4-32	Var. 479	10-40	Var. 525	16-32	Var. 571	26-40	Var. 617
4-30	Var. 480	10-38	Var. 526	16-30	Var. 572	26-38	Var. 618
4-28	Var. 481	10-36	Var. 527	16-28	Var. 573	26-36	Var. 619
4-26	Var. 482	10-34	Var. 528	16-26	Var. 574	26-34	Var. 620
4-24	Var. 483	10-32	Var. 529	16-24	Var. 575	26-32	Var. 621
4-22	Var. 484	10-30	Var. 530	16-22	Var. 576	26-30	Var. 622
4-20	Var. 485	10-28	Var. 531	16-20	Var. 577	26-28	Var. 623
4-18	Var. 486	10-26	Var. 532	16-18	Var. 578	28-40	Var. 624
4-16	Var. 487	10-24	Var. 533	18-40	Var. 579	28-38	Var. 625
4-14	Var. 488	10-22	Var. 534	18-38	Var. 580	28-36	Var. 626
4-12	Var. 489	10-20	Var. 535	18-36	Var. 581	28-34	Var. 627
4-10	Var. 490	10-18	Var. 536	18-34	Var. 582	28-32	Var. 628
4-8	Var. 491	10-16	Var. 537	18-32	Var. 583	28-30	Var. 629
6-40	Var. 492	10-14	Var. 538	18-30	Var. 584	30-40	Var. 630
6-38	Var. 493	10-12	Var. 539	18-28	Var. 585	30-38	Var. 631
6-36	Var. 494	12-40	Var. 540	18-26	Var. 586	30-36	Var. 632
6-34	Var. 495	12-38	Var. 541	18-24	Var. 587	30-34	Var. 633
6-32	Var. 496	12-36	Var. 542	18-22	Var. 588	30-32	Var. 634

6-30	Var. 497	12-34	Var. 543	18-20	Var. 589	32-40	Var. 635
6-28	Var. 498	12-32	Var. 544	20-40	Var. 590	32-38	Var. 636
6-26	Var. 499	12-30	Var. 545	20-38	Var. 591	32-36	Var. 637
6-24	Var. 500	12-28	Var. 546	20-36	Var. 592	32-34	Var. 638
6-22	Var. 501	12-26	Var. 547	20-34	Var. 593	34-40	Var. 639
6-20	Var. 502	12-24	Var. 548	20-32	Var. 594	36-38	Var. 640
6-18	Var. 503	12-22	Var. 549	20-30	Var. 595	38-40	Var. 641

Var. = Variación

[000107] En algunas modalidades, la composición de rVWF preparada mediante los métodos proporcionados en la presente puede caracterizarse de acuerdo con el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o un multímero más grande. Por ejemplo, en una modalidad, al menos 20 % de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF usada en los métodos descritos en la presente están presentes en un complejo oligomérico de al menos 10 subunidades. En otra modalidad, al menos 20 % de las moléculas de rVWF en una composición de rVWF usada en los métodos descritos en la presente están presentes en un complejo oligomérico de al menos 12 subunidades. En aun otras modalidades, una composición de rVWF usada en los métodos proporcionados en la presente tiene un porcentaje mínimo (por ejemplo, tiene al menos X %) de las moléculas de rVWF presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande (por ejemplo, un multímero de al menos Y subunidades) de acuerdo con cualquiera de las variaciones de 134 a 457 que se encuentran en la Tabla 5 a la Tabla 7.

Tabla 5. Modalidades ilustrativas para el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande que se encuentran en las composiciones y se utilizan en los métodos proporcionados en la presente.

		Cantidad mínima de subunidades en el multímero de rVWF					
		6	8	10	12	14	16
Porcentaje mínimo de moléculas de rVWF	10%	Var. 134	Var. 152	Var. 170	Var. 188	Var. 206	Var. 224
	15%	Var. 135	Var. 153	Var. 171	Var. 189	Var. 207	Var. 225
	20%	Var. 136	Var. 154	Var. 172	Var. 190	Var. 208	Var. 226
	25%	Var. 137	Var. 155	Var. 173	Var. 191	Var. 209	Var. 227
	30%	Var. 138	Var. 156	Var. 174	Var. 192	Var. 210	Var. 228

	35%	Var. 139	Var. 157	Var. 175	Var. 193	Var. 211	Var. 229
	40 %	Var. 140	Var. 158	Var. 176	Var. 194	Var. 212	Var. 230
	45%	Var. 141	Var. 159	Var. 177	Var. 195	Var. 213	Var. 231
	50%	Var. 142	Var. 160	Var. 178	Var. 196	Var. 214	Var. 232
	55%	Var. 143	Var. 161	Var. 179	Var. 197	Var. 215	Var. 233
	60%	Var. 144	Var. 162	Var. 180	Var. 198	Var. 216	Var. 234
	65%	Var. 145	Var. 163	Var. 181	Var. 199	Var. 217	Var. 235
	70%	Var. 146	Var. 164	Var. 182	Var. 200	Var. 218	Var. 236
	75%	Var. 147	Var. 165	Var. 183	Var. 201	Var. 219	Var. 237
	80%	Var. 148	Var. 166	Var. 184	Var. 202	Var. 220	Var. 238
	85%	Var. 149	Var. 167	Var. 185	Var. 203	Var. 221	Var. 239
	90%	Var. 150	Var. 168	Var. 186	Var. 204	Var. 222	Var. 240
	95%	Var. 151	Var. 169	Var. 187	Var. 205	Var. 223	Var. 241

Var. = Variación

Tabla 6. Modalidades ilustrativas para el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande que se encuentran en las composiciones y se utilizan en los métodos proporcionados en la presente.

		Cantidad mínima de subunidades en el multímero de rVWF					
		18	20	22	24	26	28
Porcentaje mínimo de moléculas de rVWF	10%	Var. 242	Var. 260	Var. 278	Var. 296	Var. 314	Var. 332
	15%	Var. 243	Var. 261	Var. 279	Var. 297	Var. 315	Var. 333
	20%	Var. 244	Var. 262	Var. 280	Var. 298	Var. 316	Var. 334
	25%	Var. 245	Var. 263	Var. 281	Var. 299	Var. 317	Var. 335
	30%	Var. 246	Var. 264	Var. 282	Var. 300	Var. 318	Var. 336
	35%	Var. 247	Var. 265	Var. 283	Var. 301	Var. 319	Var. 337
	40 %	Var. 248	Var. 266	Var. 284	Var. 302	Var. 320	Var. 338
	45%	Var. 249	Var. 267	Var. 285	Var. 303	Var. 321	Var. 339
	50%	Var. 250	Var. 268	Var. 286	Var. 304	Var. 322	Var. 340
	55%	Var. 251	Var. 269	Var. 287	Var. 305	Var. 323	Var. 341
	60%	Var. 252	Var. 270	Var. 288	Var. 306	Var. 324	Var. 342
	65%	Var. 253	Var. 271	Var. 289	Var. 307	Var. 325	Var. 343

	70%	Var. 254	Var. 272	Var. 290	Var. 308	Var. 326	Var. 344
	75%	Var. 255	Var. 273	Var. 291	Var. 309	Var. 327	Var. 345
	80%	Var. 256	Var. 274	Var. 292	Var. 310	Var. 328	Var. 346
	85%	Var. 257	Var. 275	Var. 293	Var. 311	Var. 329	Var. 347
	90%	Var. 258	Var. 276	Var. 294	Var. 312	Var. 330	Var. 348
	95%	Var. 259	Var. 277	Var. 295	Var. 313	Var. 331	Var. 349

Var. = Variación

Tabla 7. Modalidades ilustrativas para el porcentaje de moléculas de rVWF que están presentes en un multímero de rVWF de orden superior particular o multímero más grande que se encuentran en las composiciones y se utilizan en los métodos proporcionados en la presente.

		Cantidad mínima de subunidades en el multímero de rVWF					
		30	32	34	36	38	40
Porcentaje mínimo de moléculas de rVWF	10%	Var. 350	Var. 368	Var. 386	Var. 404	Var. 422	Var. 440
	15%	Var. 351	Var. 369	Var. 387	Var. 405	Var. 423	Var. 441
	20%	Var. 352	Var. 370	Var. 388	Var. 406	Var. 424	Var. 442
	25%	Var. 353	Var. 371	Var. 389	Var. 407	Var. 425	Var. 443
	30%	Var. 354	Var. 372	Var. 390	Var. 408	Var. 426	Var. 444
	35%	Var. 355	Var. 373	Var. 391	Var. 409	Var. 427	Var. 445
	40 %	Var. 356	Var. 374	Var. 392	Var. 410	Var. 428	Var. 446
	45%	Var. 357	Var. 375	Var. 393	Var. 411	Var. 429	Var. 447
	50%	Var. 358	Var. 376	Var. 394	Var. 412	Var. 430	Var. 448
	55%	Var. 359	Var. 377	Var. 395	Var. 413	Var. 431	Var. 449
	60%	Var. 360	Var. 378	Var. 396	Var. 414	Var. 432	Var. 450
	65%	Var. 361	Var. 379	Var. 397	Var. 415	Var. 433	Var. 451
	70%	Var. 362	Var. 380	Var. 398	Var. 416	Var. 434	Var. 452
	75%	Var. 363	Var. 381	Var. 399	Var. 417	Var. 435	Var. 453
	80%	Var. 364	Var. 382	Var. 400	Var. 418	Var. 436	Var. 454
	85%	Var. 365	Var. 383	Var. 401	Var. 419	Var. 437	Var. 455
	90%	Var. 366	Var. 384	Var. 402	Var. 420	Var. 438	Var. 456
	95%	Var. 367	Var. 385	Var. 403	Var. 421	Var. 439	Var. 457

5 Var. = Variación

[000108] De acuerdo con lo anterior, el rVWF comprende un porcentaje significativo de multímeros de rVWF de alto peso molecular (HMW). En modalidades adicionales, la composición de multímeros de rVWF HMW comprende al menos 10 %-80 % de decámeros de rVWF o multímeros de orden superior. En modalidades adicionales, la composición comprende alrededor de 10-95 %, 20-

90 %, 30-85 %, 40-80 %, 50-75 %, 60-70 % de decámeros o multímeros de orden superior. En modalidades adicionales, la composición de multímeros de rVWF HMW comprende al menos alrededor de 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % de decámeros o multímeros de orden superior.

- 5 [000109] La evaluación de la cantidad y el porcentaje de multímeros de rVWF puede realizarse mediante el uso de métodos conocidos en la técnica, que incluyen, de modo no taxativo, métodos que usan electroforesis y métodos de cromatografía de exclusión por tamaño para separar los multímeros de rVWF por tamaño, por ejemplo, tal como se describe en Cumming et ál, (J Clin Pathol. mayo de 1993; 46(5): 470-473, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con la evaluación de los multímeros de rVWF). Dichas técnicas pueden incluir, además, técnicas de inmunotransferencia (tales como transferencia Western), en las cuales el gel se inmunotransfiere con un anticuerpo radiomarcado contra VWF seguido por de detección quimioluminiscente (véase, por ejemplo, Wen et ál., (1993), J. Clin. Lab. Anal., 7: 317-323, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con la evaluación de los multímeros de rVWF). Los análisis adicionales para VWF incluyen ensayos de VWF:antígeno (VWF:Ag), VWF:cofactor de ristocetina (VWF:RCofy y VWF:actividad de unión de colágeno (VWF:CBA), que se usan a menudo para el diagnóstico y la clasificación de la enfermedad de Von Willebrand. (véase, por ejemplo, Favaloro et ál., Pathology, 1997, 29(4): 341-456, que se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con los ensayos para VWF).

- [000110] En algunas modalidades, la relación de la actividad procoagulante del rFVIII (IU rFVIII:C) con respecto a la actividad del cofactor de ristocetina de rVWF (IU rVWF:RCo) para el rVWF preparado de acuerdo con los métodos de la presente invención es de entre 3:1 y 1:5. En modalidades adicionales, la relación es de entre 2:1 y 1:4. En incluso otras modalidades, la relación es de entre 5:2 y 1:4. En modalidades adicionales, la relación es de entre 3:2 y 1:3. En incluso otras modalidades, la relación es de alrededor de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 2:1, 2:3, 2:4, 2:5, 3:1, 3:2, 3:4, o 3:5. En modalidades adicionales, la relación es de entre 1:1 y 1:2. En aun otras modalidades, la relación es de 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, o 2:1. En determinadas modalidades, la relación de la actividad procoagulante del rFVIII (IU rFVIII:C) con respecto a la actividad del cofactor de ristocetina de rVWF (IU rVWF:RCo) en una composición útil para un método descrito en la presente se selecciona de las variaciones 1988 a 2140 que se encuentran en la Tabla 8.

Tabla 8. Las modalidades de ejemplo para la relación de la actividad procoagulante de rFVIII (IU rFVIII:C) respecto a la actividad del cofactor de ristocetina de rVWF (IU rVWF:RCo) en las composiciones y se utilizan en los métodos proporcionados en la presente.

(IU rFVIII:C) a (IU rVWF:RCo)		(IU rFVIII:C) a (IU rVWF:RCo)		(IU rFVIII:C) a (IU rVWF:RCo)		(IU rFVIII:C) a (IU rVWF:RCo)	
4:1	Var. 1988	3:1-3:5	Var. 2027	4:3-1:4	Var. 2065	4:5-2:3	Var. 2103
3:1	Var. 1989	3:1-2:3	Var. 2028	4:3-1:3	Var. 2066	4:5-3:4	Var. 2104
2:1	Var. 1990	3:1-3:4	Var. 2029	4:3-2:5	Var. 2067	3:4-1:6	Var. 2105
3:2	Var. 1991	3:1-4:5	Var. 2030	4:3-1:2	Var. 2068	3:4-1:5	Var. 2106
4:3	Var. 1992	3:1-5:6	Var. 2031	4:3-3:5	Var. 2069	3:4-1:4	Var. 2107
1:1	Var. 1993	3:1-1:1	Var. 2032	4:3-2:3	Var. 2070	3:4-1:3	Var. 2108
5:6	Var. 1994	3:1-4:3	Var. 2033	4:3-3:4	Var. 2071	3:4-2:5	Var. 2109
4:5	Var. 1995	3:1-3:2	Var. 2034	4:3-4:5	Var. 2072	3:4-1:2	Var. 2110
3:4	Var. 1996	3:1-2:1	Var. 2035	4:3-5:6	Var. 2073	3:4-3:5	Var. 2111
2:3	Var. 1997	2:1-1:6	Var. 2036	4:3-1:1	Var. 2074	3:4-2:3	Var. 2112
3:5	Var. 1998	2:1-1:5	Var. 2037	1:1-1:6	Var. 2075	2:3-1:6	Var. 2113
1:2	Var. 1999	2:1-1:4	Var. 2038	1:1-1:5	Var. 2076	2:3-1:5	Var. 2114
2:5	Var. 2000	2:1-1:3	Var. 2039	1:1-1:4	Var. 2077	2:3-1:4	Var. 2115
1:3	Var. 2001	2:1-2:5	Var. 2040	1:1-1:3	Var. 2078	2:3-1:3	Var. 2116
1:4	Var. 2002	2:1-1:2	Var. 2041	1:1-2:5	Var. 2079	2:3-2:5	Var. 2117

1:5	Var. 2003	2:1-3:5	Var. 2042	1:1-1:2	Var. 2080	2:3-1:2	Var. 2118
1:6	Var. 2004	2:1-2:3	Var. 2043	1:1-3:5	Var. 2081	2:3-3:5	Var. 2119
4:1-1:6	Var. 2005	2:1-3:4	Var. 2044	1:1-2:3	Var. 2082	3:5-1:6	Var. 2120
4:1-1:5	Var. 2006	2:1-4:5	Var. 2045	1:1-3:4	Var. 2083	3:5-1:5	Var. 2121
4:1-1:4	Var. 2007	2:1-5:6	Var. 2046	1:1-4:5	Var. 2084	3:5-1:4	Var. 2122
4:1-1:3	Var. 2008	2:1-1:1	Var. 2047	1:1-5:6	Var. 2085	3:5-1:3	Var. 2123
4:1-2:5	Var. 2009	2:1-4:3	Var. 2048	5:6-1:6	Var. 2086	3:5-2:5	Var. 2124
4:1-1:2	Var. 2010	2:1-3:2	Var. 2049	5:6-1:5	Var. 2087	3:5-1:2	Var. 2125
4:1-3:5	Var. 2011	3:2-1:6	Var. 2050	5:6-1:4	Var. 2088	1:2-1:6	Var. 2126
4:1-2:3	Var. 2012	3:2-1:5	Var. 2051	5:6-1:3	Var. 2089	1:2-1:5	Var. 2127
4:1-3:4	Var. 2013	3:2-1:4	Var. 2052	5:6-2:5	Var. 2090	1:2-1:4	Var. 2128
4:1-4:5	Var. 2014	3:2-1:3	Var. 2053	5:6-1:2	Var. 2091	1:2-1:3	Var. 2129
4:1-5:6	Var. 2015	3:2-2:5	Var. 2054	5:6-3:5	Var. 2092	1:2-2:5	Var. 2130
4:1-1:1	Var. 2016	3:2-1:2	Var. 2055	5:6-2:3	Var. 2093	2:5-1:6	Var. 2131
4:1-4:3	Var. 2017	3:2-3:5	Var. 2056	5:6-3:4	Var. 2094	2:5-1:5	Var. 2132
4:1-3:2	Var. 2018	3:2-2:3	Var. 2057	5:6-4:5	Var. 2095	2:5-1:4	Var. 2133
4:1-2:1	Var. 2019	3:2-3:4	Var. 2058	4:5-1:6	Var. 2096	2:5-1:3	Var. 2134
4:1-3:1	Var. 2020	3:2-4:5	Var. 2059	4:5-1:5	Var. 2097	1:3-1:6	Var. 2135
3:1-1:6	Var. 2021	3:2-5:6	Var. 2060	4:5-1:4	Var. 2098	1:3-1:5	Var. 2136

3:1-1:5	Var. 2022	3:2-1:1	Var. 2061	4:5-1:3	Var. 2099	1:3-1:4	Var. 2137
3:1-1:4	Var. 2023	3:2-4:3	Var. 2062	4:5-2:5	Var. 2100	1:4-1:6	Var. 2138
3:1-1:3	Var. 2024	4:3-1:6	Var. 2063	4:5-1:2	Var. 2101	1:4-1:5	Var. 2139
3:1-2:5	Var. 2025	4:3-1:5	Var. 2064	4:5-3:5	Var. 2102	1:5-1:6	Var. 2140
3:1-1:2	Var. 2026						

Var. = Variación

[000111] En modalidades adicionales, los multímeros de rVWF de orden superior de la invención son estables durante alrededor de 1 a alrededor de 90 horas después de la administración. En incluso otras modalidades, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante alrededor de 5-80, 10-70, 15-60, 20-50, 25-40, 30-35 horas después de la administración. En aun otras modalidades, los multímeros de rVWF de orden superior son estables durante al menos 3, 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 horas después de la administración. En determinadas modalidades, la estabilidad de los multímeros de rVWF se evalúa *in vitro*.

[000112] En una modalidad, los multímeros de rVWF de orden superior usados en las composiciones y los métodos que se proporcionan en la presente tienen una semivida de al menos 12 horas después de la administración. En otra modalidad los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida de al menos 24 horas después de la administración. En aun otras modalidades, los multímeros de rVWF de orden superior tienen una semivida seleccionada de las variaciones de 642 a 1045 que se encuentran en la Tabla 9.

Tabla 9. Modalidades ilustrativas para la semivida de multímeros de rVWF de orden superior que se encuentran en las composiciones preparadas mediante los métodos que se proporcionan en la presente.

Horas		Horas		Horas		Horas	
al menos 1	Var. 642	4-22	Var. 743	14-78	Var. 844	24-30	Var. 945
al menos 2	Var. 643	4-20	Var. 744	14-72	Var. 845	24-27	Var. 946
al menos 3	Var. 644	4-18	Var. 745	14-66	Var. 846	27-90	Var. 947
al menos 4	Var. 645	4-16	Var. 746	14-60	Var. 847	27-84	Var. 948
al menos 5	Var. 646	4-14	Var. 747	14-54	Var. 848	27-78	Var. 949
al menos 6	Var. 647	4-12	Var. 748	14-48	Var. 849	27-72	Var. 950

al menos 7	Var. 648	4-10	Var. 749	14-45	Var. 850	27-66	Var. 951
al menos 8	Var. 649	4-8	Var. 750	14-42	Var. 851	27-60	Var. 952
al menos 9	Var. 650	4-6	Var. 751	14-39	Var. 852	27-54	Var. 953
al menos 10	Var. 651	6-90	Var. 752	14-36	Var. 853	27-48	Var. 954
al menos 11	Var. 652	6-84	Var. 753	14-33	Var. 854	30-90	Var. 955
al menos 12	Var. 653	6-78	Var. 754	14-30	Var. 855	30-84	Var. 956
al menos 14	Var. 654	6-72	Var. 755	14-27	Var. 856	30-78	Var. 957
al menos 16	Var. 655	6-66	Var. 756	14-24	Var. 857	30-72	Var. 958
al menos 18	Var. 656	6-60	Var. 757	14-22	Var. 858	30-66	Var. 959
al menos 20	Var. 657	6-54	Var. 758	14-20	Var. 859	30-60	Var. 960
al menos 22	Var. 658	6-48	Var. 759	14-18	Var. 860	30-54	Var. 961
al menos 24	Var. 659	6-45	Var. 760	14-16	Var. 861	30-48	Var. 962
al menos 27	Var. 660	6-42	Var. 761	16-90	Var. 862	30-45	Var. 963
al menos 30	Var. 661	6-39	Var. 762	16-84	Var. 863	30-42	Var. 964
al menos 33	Var. 662	6-36	Var. 763	16-78	Var. 864	30-39	Var. 965
al menos 36	Var. 663	6-33	Var. 764	16-72	Var. 865	30-36	Var. 966
al menos 39	Var. 664	6-30	Var. 765	16-66	Var. 866	30-33	Var. 967
al menos 42	Var. 665	6-27	Var. 766	16-60	Var. 867	33-90	Var. 968
al menos 45	Var. 666	6-24	Var. 767	16-54	Var. 868	33-84	Var. 969
al menos 48	Var. 667	6-22	Var. 768	16-48	Var. 869	33-78	Var. 970
al menos 54	Var. 668	6-20	Var. 769	16-45	Var. 870	33-72	Var. 971
al menos 60	Var. 669	6-18	Var. 770	16-42	Var. 871	33-66	Var. 972
al menos 66	Var. 670	6-16	Var. 771	16-39	Var. 872	33-60	Var. 973
al menos 72	Var. 671	6-14	Var. 772	16-36	Var. 873	33-54	Var. 974
al menos 78	Var. 672	6-12	Var. 773	16-33	Var. 874	33-48	Var. 975
al menos 84	Var. 673	6-10	Var. 774	16-30	Var. 875	33-45	Var. 976
al menos 90	Var. 674	6-8	Var. 775	16-27	Var. 876	33-42	Var. 977
2-90	Var. 675	8-90	Var. 776	16-24	Var. 877	33-29	Var. 978
2-84	Var. 676	8-84	Var. 777	16-22	Var. 878	33-36	Var. 979
2-78	Var. 677	8-78	Var. 778	16-20	Var. 879	36-90	Var. 980
2-72	Var. 678	8-72	Var. 779	16-18	Var. 880	36-84	Var. 981
2-66	Var. 679	8-66	Var. 780	18-90	Var. 881	36-78	Var. 982
2-60	Var. 680	8-60	Var. 781	18-84	Var. 882	36-72	Var. 983
2-54	Var. 681	8-54	Var. 782	18-78	Var. 883	36-66	Var. 984
2-48	Var. 682	8-48	Var. 783	18-72	Var. 884	36-60	Var. 985
2-45	Var. 683	8-45	Var. 784	18-66	Var. 885	36-54	Var. 986
2-42	Var. 684	8-42	Var. 785	18-60	Var. 886	36-48	Var. 987
2-39	Var. 685	8-39	Var. 786	18-54	Var. 887	36-45	Var. 988
2-36	Var. 686	8-36	Var. 787	18-48	Var. 888	36-42	Var. 989

2-33	Var. 687	8-33	Var. 788	18-45	Var. 889	36-39	Var. 990
2-30	Var. 688	8-30	Var. 789	18-42	Var. 890	39-90	Var. 991
2-27	Var. 689	8-27	Var. 790	18-39	Var. 891	39-84	Var. 992
2-24	Var. 690	8-24	Var. 791	18-36	Var. 892	39-78	Var. 993
2-22	Var. 691	8-22	Var. 792	18-33	Var. 893	39-72	Var. 994
2-20	Var. 692	8-20	Var. 793	18-30	Var. 894	39-66	Var. 995
2-18	Var. 693	8-18	Var. 794	18-27	Var. 895	39-60	Var. 996
2-16	Var. 694	8-16	Var. 795	18-24	Var. 896	39-54	Var. 997
2-14	Var. 695	8-14	Var. 796	18-22	Var. 897	39-48	Var. 998
2-12	Var. 696	8-12	Var. 797	18-20	Var. 898	39-45	Var. 999
2-10	Var. 697	8-10	Var. 798	20-90	Var. 899	39-42	Var. 1000
2-8	Var. 698	10-90	Var. 799	20-84	Var. 900	42-90	Var. 1001
2-6	Var. 699	10-84	Var. 800	20-78	Var. 901	42-84	Var. 1002
2-4	Var. 700	10-78	Var. 801	20-72	Var. 902	42-78	Var. 1003
3-90	Var. 701	10-72	Var. 802	20-66	Var. 903	42-72	Var. 1004
3-84	Var. 702	10-66	Var. 803	20-60	Var. 904	42-66	Var. 1005
3-78	Var. 703	10-60	Var. 804	20-54	Var. 905	42-60	Var. 1006
3-72	Var. 704	10-54	Var. 805	20-48	Var. 906	42-54	Var. 1007
3-66	Var. 705	10-48	Var. 806	20-45	Var. 907	42-48	Var. 1008
3-60	Var. 706	10-45	Var. 807	20-42	Var. 908	42-45	Var. 1009
3-54	Var. 707	10-42	Var. 808	20-39	Var. 909	45-90	Var. 1010
3-48	Var. 708	10-39	Var. 809	20-36	Var. 910	45-84	Var. 1011
3-45	Var. 709	10-36	Var. 810	20-33	Var. 911	45-78	Var. 1012
3-42	Var. 710	10-33	Var. 811	20-30	Var. 912	45-72	Var. 1013
3-39	Var. 711	10-30	Var. 812	20-27	Var. 913	45-66	Var. 1014
3-36	Var. 712	10-27	Var. 813	20-24	Var. 914	45-60	Var. 1015
3-33	Var. 713	10-24	Var. 814	20-22	Var. 915	45-54	Var. 1016
3-30	Var. 714	10-22	Var. 815	22-90	Var. 916	45-48	Var. 1017
3-27	Var. 715	10-20	Var. 816	22-84	Var. 917	48-90	Var. 1018
3-24	Var. 716	10-18	Var. 817	22-78	Var. 918	48-84	Var. 1019
3-22	Var. 717	10-16	Var. 818	22-72	Var. 919	48-78	Var. 1020
3-20	Var. 718	10-14	Var. 819	22-66	Var. 920	48-72	Var. 1021
3-18	Var. 719	10-12	Var. 820	22-60	Var. 921	48-66	Var. 1022
3-16	Var. 720	12-90	Var. 821	22-54	Var. 922	48-60	Var. 1023
3-14	Var. 721	12-84	Var. 822	22-48	Var. 923	48-54	Var. 1024
3-12	Var. 722	12-78	Var. 823	22-45	Var. 924	54-90	Var. 1025
3-10	Var. 723	12-72	Var. 824	22-42	Var. 925	54-84	Var. 1026
3-8	Var. 724	12-66	Var. 825	22-39	Var. 926	54-78	Var. 1027
3-6	Var. 725	12-60	Var. 826	22-36	Var. 927	54-72	Var. 1028

3-4	Var. 726	12-54	Var. 827	22-33	Var. 928	54-66	Var. 1029
4-90	Var. 727	12-48	Var. 828	22-30	Var. 929	54-60	Var. 1030
4-84	Var. 728	12-45	Var. 829	22-27	Var. 930	60-90	Var. 1031
4-78	Var. 729	12-42	Var. 830	22-24	Var. 931	60-84	Var. 1032
4-72	Var. 730	12-39	Var. 831	24-90	Var. 932	60-78	Var. 1033
4-66	Var. 731	12-36	Var. 832	24-84	Var. 933	60-72	Var. 1034
4-60	Var. 732	12-33	Var. 833	24-78	Var. 934	60-66	Var. 1035
4-54	Var. 733	12-30	Var. 834	24-72	Var. 935	66-90	Var. 1036
4-48	Var. 734	12-27	Var. 835	24-66	Var. 936	66-84	Var. 1037
4-45	Var. 735	12-24	Var. 836	24-60	Var. 937	66-78	Var. 1038
4-42	Var. 736	12-22	Var. 837	24-54	Var. 938	66-72	Var. 1039
4-39	Var. 737	12-20	Var. 838	24-48	Var. 939	72-90	Var. 1040
4-36	Var. 738	12-18	Var. 839	24-45	Var. 940	72-84	Var. 1041
4-33	Var. 739	12-16	Var. 840	24-42	Var. 941	72-78	Var. 1042
4-30	Var. 740	12-14	Var. 841	24-39	Var. 942	78-90	Var. 1043
4-27	Var. 741	14-90	Var. 842	24-36	Var. 943	78-84	Var. 1044
4-24	Var. 742	14-84	Var. 843	24-33	Var. 944	84-90	Var. 1045

Var. = Variación

[000113] En algunas modalidades, el pro-VWF y/o rVWF purificado de acuerdo con la presente invención no se modifica con ninguna conjugación, postraduccion o modificación covalente. En modalidades particulares, el pro-VWF y/o rVWF purificado de la presente invención no se modifica con un polímero soluble en agua, que incluye de modo no taxativo, un polietilenglicol (PEG), un propilenglicol, un polioxialquileño, un ácido polisiálico, almidón de hidrixiletilo, un resto de polícarbohidrato, y similares.

[000114] En algunas modalidades, el pro-VWF y/o rVWF purificado de acuerdo con la presente invención se modifica a través de conjugación, modificación postraduccion o modificación covalente, que incluyen modificaciones en los residuos del extremo N o C, así como modificaciones de las cadenas laterales seleccionadas, por ejemplo, en grupos sulfhidrilo libres, aminas primarias y grupos hidroxilo. En una modalidad, un polímero soluble en agua se enlaza a la proteína (directamente o mediante un enlazador) mediante un grupo lisina u otra amina primaria. En algunas modalidades, el pro-VWF y/o rVWF purificado de la presente invención pueden modificarse mediante conjugación de un polímero soluble en agua que incluye, de modo no taxativo, un polietilenglicol (PEG), un propilenglicol, un polioxialquileño, un ácido polisiálico, almidón de hidrixiletilo, un resto de polícarbohidrato, y similares.

[000115] Los polímeros solubles en agua que pueden usarse para modificar el pro-VWF y/o

rVWF purificado incluyen estructuras lineales y ramificadas. Los polímeros conjugados pueden unirse directamente a las proteínas de coagulación de la invención o, alternativamente, pueden unirse a través de un resto enlazador. Los ejemplos no taxativos de conjugación de proteínas con polímeros solubles en agua pueden encontrarse en las patentes estadounidenses n.º 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192, y 4,179,337, así como en Abuchowski y Davis «Enzymes as Drugs», Holcenberg y Roberts, Eds., págs. 367 383, John Wiley e hijos, Nueva York (1981), y Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2.^a Ed., Academic Press, Inc. 2008.

[000116] La conjugación de proteínas puede realizarse mediante una serie de técnicas conocidas en la técnica, por ejemplo, véase Hermanson G., Bioconjugate Techniques 2.^a Ed., Academic Press, Inc. 2008. Los ejemplos incluyen el enlace a través de enlace peptídico entre un grupo carboxilo en uno de la proteína de coagulación o el resto polimérico soluble en agua y un grupo amina del otro, o un enlace de éster entre un grupo carboxilo de uno y un grupo hidroxilo del otro. Otro enlace mediante el cual una proteína de coagulación de la invención puede conjugarse con un compuesto polimérico soluble en agua es a través de una base de Schiff, entre un grupo amino libre en el resto polimérico que reacciona con un grupo aldehído formado en el extremo no reductor del polímero mediante oxidación de peryodato (Jennings y Lugowski, J. Immunol. 1981; 127:1011-8; Femandes y Gregonradis, Biochim Biophys Acta. 1997; 1341; 26-34). La base de Schiff puede estabilizarse mediante la reducción específica con NaCNBH_3 para formar una amina secundaria. Un enfoque alternativo es la generación de grupos amino libres terminales en el polímero mediante la aminación reductiva con NH_4Cl después de la oxidación previa. Se pueden utilizar reactivos bifuncionales para unir dos grupos amino o dos grupos hidroxilo. Por ejemplo, un polímero que contiene un grupo amino puede acoplarse a un grupo amino de la proteína de coagulación con reactivos como BS3 (Bis(sulfosuccinimidil)suberato/Pierce, Rockford, Ill). Además, pueden usarse reactivos de reticulación heterobifuncionales como Sulfo-EMCS éster de (N- $\square$ -maleimidocaproiloxi) sulfosuccinimida/Pierce), por ejemplo, para unir grupos amina y tiol. En otras modalidades, puede usarse el grupo reactivo con aldehído, tal como alcóxido de PEG más dietil acetal de bromoacetaldehído; PEG más DMSO y anhídrido acético, y cloruro de PEG más el fenóxido de 4-hidroxibenzaldehído, ésteres activos de succinimidilo, PEG y ditiocarbonato activado, 2,4,5-triclorofenilcloroformiato y PEG activado con P-nitrofenilcloroformiato en la conjugación de una proteína de coagulación.

[000117] Otro método para medir la actividad biológica de VWF es el ensayo de unión de colágeno, que se basa en la tecnología ELISA (Brown y Bosak, Thromb. Res., 1986, 43:303-311; Favaloro, Thromb. Haemost., 2000, 83 127-135). Una placa de microtitulación se recubre con colágeno tipo I o III. Luego, el VWF se une a la superficie del colágeno y posteriormente se detecta con un

anticuerpo policlonal marcado con enzimas. La última etapa es una reacción de sustrato, que puede controlarse fotométricamente con un lector de ELISA.

[000118] Los ensayos inmunológicos de los factores de von Willebrand (VWF:Ag) son inmunoensayos que miden la concentración de la proteína de VWF en el plasma. No dan ningún indicio sobre la función del VWF. Existen varios métodos para medir VWF:Ag y estos incluyen el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o inmunoensayos de látex automatizados (LIA). Actualmente, muchos laboratorios usan un inmunoensayo de látex completamente automatizado. Históricamente, los laboratorios utilizaron una variedad de técnicas incluido el electroinmunoensayo Laurell «Laurell Rockets», pero hoy en día tienen un uso poco frecuente en la mayoría de los laboratorios.

III. Kits

[000119] Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una o más composiciones envasadas de forma que facilite su uso para la administración a sujetos. En una modalidad, dicho kit incluye una formulación farmacéutica descrita en la presente (por ejemplo, una composición que comprende un péptido o proteína terapéutica), envasada en un recipiente tal como una botella o frasco sellados, con una etiqueta, pegada al recipiente o incluida en el envase, que describe el uso del compuesto o composición para poner en práctica el método. En una modalidad, la formulación farmacéutica se envasa en el recipiente de forma que la cantidad de espacio vacío en el recipiente (por ejemplo, la cantidad de aire entre la formulación líquida y la parte superior del recipiente) sea muy pequeña. Preferentemente, la cantidad de espacio vacío es insignificante (por ejemplo, casi nula). En una modalidad, el kit contiene un primer recipiente que tiene una composición de péptido o proteína terapéutica y un segundo recipiente que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición. En un aspecto, la formulación farmacéutica se envasa en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir, además, un dispositivo adecuado para la administración de la formulación farmacéutica de acuerdo con una vía específica de administración. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de las formulaciones farmacéuticas.

IV. rVWF para métodos de pretratamiento de sujetos con VWD que se someten a cirugía

[000120] Una de las ventajas de administrar rVWF a sujetos con VWD grave para el tratamiento previo a la cirugía es que la mayor actividad específica de rVWF en comparación con pdVWF permite flexibilidad en la cantidad de rVWF administrada y la cantidad de veces que el sujeto vuelve a recibir la

dosis. Tal como se apreciará y como se discute en más detalle en la presenta, el FVIII coadministrado puede ser recombinante o derivado de plasma.

[000121] Se realizan administraciones únicas o múltiples de rVWF con el patrón y los niveles de dosis seleccionados por el médico tratante. Para la prevención o el tratamiento de la enfermedad, la dosificación adecuada depende del tipo de enfermedad a tratar (por ejemplo, enfermedad de von Willebrand), la gravedad y curso de la enfermedad, si se administra el fármaco para fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, la historia clínica del paciente y la respuesta al fármaco, y el criterio del médico tratante.

[000122] En algunos aspectos, el rVWF se administra antes de un procedimiento quirúrgico a un sujeto en un intervalo de 20-60 IU/kg, por ejemplo, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 20-60, 35-70, 20-40, 35-60, 45-60, 45-55, 45-50, 50-60, 55-60, o 50-55 IU/kg. En algunas modalidades, el rVWF se administra entre 12 horas y 24 horas, por ejemplo, 12 horas, 13 horas, 14 horas, 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas, 19 horas, 20 horas, 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 12 horas y 24 horas, 14 horas y 24 horas, 16 y 24 horas, 18 horas y 24 horas, o 20 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunos aspectos, no se administra el Factor VIII (FVIII) con el rVWF antes del procedimiento quirúrgico.

[000123] En algunas modalidades, el rVWF se administra al sujeto en un intervalo de 5-90 IU/kg, por ejemplo, 5-90, 5-50, 10-90, 15-90, 20-90, 30-90, 40-90, 50-90, 60-90, 70-90, 80-90, 5-80, 10-70, 20-60, 30-50, 35-60, 5-50, 5-40, 5-30, 5-20, 10-90, 10-50, o 20-40 IU/kg 1 hora antes de la cirugía. En otras modalidades, el rVWF se administra en una dosis de 70-200 IU/kg, por ejemplo, 70-200, 80-200-, 90-200, 100-200, 110-200, 120-200, 130-200, 130-200, 140-200, 150-200, 160-200, 170-200, 180-200, 190-200, 70-170, 80-180, 60-160, 50-150, 40-140, 30, 130, 20-120, 10-110, 70-100, o 70-90 IU/kg después de la cirugía. En algunos casos, el procedimiento quirúrgico se selecciona de un grupo que consiste en cirugía mayor, cirugía menor y cirugía oral.

[000124] En algunas modalidades, al sujeto se le administra 35-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de una cirugía mayor. En otras modalidades, al sujeto se le administra 15-90 IU/kg del rVWF 1 hora antes de la cirugía mayor. En otra modalidad, al sujeto se le administra 150-220 IU/kg del rVWF después de la cirugía mayor. En algunos casos, al sujeto que se somete a una cirugía mayor se le administra una dosificación total de 220-320 IU/kg.

[000125] En algunas modalidades, al sujeto se le administra 50-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de una cirugía menor. En otras modalidades, al sujeto se le administra 5-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes de la cirugía menor. En otra modalidad, al sujeto se le administra 70-150 IU/kg del

rVWF después de la cirugía menor. En algunos casos, al sujeto que se somete a una cirugía menor se le administra una dosificación total de 100-220 IU/kg.

[000126] En algunas modalidades, al sujeto se le administra 20-40 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de una cirugía oral. En otras modalidades, al sujeto se le administra 20-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes de la cirugía oral. En otra modalidad, al sujeto se le administra 10-50 IU/kg del rVWF durante la cirugía oral. En otra modalidad, al sujeto se le administra 20-50 IU/kg del rVWF después de la cirugía oral. En algunos casos, al sujeto que se somete a una cirugía oral se le administra una dosificación total de 70-190 IU/kg.

[000127] Las composiciones de rVWF pueden estar contenidas en formulaciones farmacéuticas, tal como se describe en la presente. Dichas formulaciones pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante aspersión para inhalación, por vía vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en la presente incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implante quirúrgico en un sitio particular. Generalmente, las composiciones esencialmente no contienen pirógenos, así como otras impurezas que pueden ser dañinas para el receptor.

[000128] En un aspecto, las formulaciones de la invención se administran mediante un bolo inicial seguido por una infusión continua para mantener los niveles terapéuticos en circulación del producto farmacéutico. Como otro ejemplo, el compuesto de la invención se administra como una dosis única. Los expertos en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones y los regímenes de administración eficaces determinados por la buena práctica médica y la condición clínica del paciente individual. La vía de administración puede ser, de modo no taxativo, administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea o intramuscular. La frecuencia de la dosificación depende de los parámetros de farmacocinética de los agentes y la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima es determinada por un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y dosis deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18.^a Ed., 1990, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 páginas 1435-1712, cuya descripción se incorpora a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos y, en particular, para todas las indicaciones relacionadas con las formulaciones, vías de administración y dosificaciones para los productos farmacéuticos. Esas formulaciones influyen en el estado físico, la estabilidad, la velocidad de liberación in vivo y la velocidad de eliminación in vivo de los agentes que se administran. En virtud de la vía de administración, se calcula una dosis adecuada de acuerdo con el peso corporal, el área de la

superficie del cuerpo o el tamaño del órgano. Las dosificaciones adecuadas pueden determinarse a través del uso de ensayos establecidos para determinar los niveles de las dosificaciones en sangre junto con datos de respuesta a la dosis adecuada. El régimen de dosificación final es determinado por el médico tratante, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, hora de administración y otros factores clínicos. A modo de ejemplo, una dosis típica de un VWF recombinante de la presente invención es aproximadamente 50 IU/kg, igual a 500 µg/kg. A medida que se llevan a cabo los estudios, surgirá información adicional con respecto a los niveles de dosificación adecuados y la duración del tratamiento para varias enfermedades y afecciones.

[000129] La puesta en práctica de la presente invención puede emplear, a menos que se indique de otra modo, técnicas y descripciones convencionales de química orgánica, tecnología de polímeros, biología molecular (que incluye técnicas recombinantes), biología celular, bioquímica e inmunología, las cuales se encuentran comprendidas dentro del conocimiento de la técnica. Dichas técnicas convencionales incluyen síntesis de matriz polimérica, hibridación, enlace y detección de hibridación mediante el uso de un marcador. Se pueden obtener ilustraciones específicas de técnicas adecuadas mediante referencia al ejemplo que figura más adelante en la presente. Sin embargo, por supuesto, también se pueden emplear otros procedimientos convencionales equivalentes. Dichas descripciones y técnicas convencionales se pueden encontrar en manuales de laboratorio estándar, tales como Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Tomos I-IV), Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cells: A Laboratory Manual, PCR Primer: A Laboratory Manual y Molecular Cloning: A Laboratory Manual (todos de Cold Spring Harbor Laboratory Press), Stryer, L. (1995) Biochemistry (4.^a ed.) Freeman, Highly stabilized York, Gait, «Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach» 1984, IRL Press, Londres, Nelson y Cox (2000), Lehninger, Principles of Biochemistry 3rd Ed., W. H. Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y. y Berg et ál. (2002) Biochemistry, 5.^a Ed., W. H. Freeman Pub., Highly stabilized York, N.Y., que se incorporan a la presente en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.

[000130] Cabe observar que, tal como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto exprese claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a «una polimerasa» hace referencia a un agente o mezclas de dichos agentes y la referencia a «el método» incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

[000131] Cabe observar que, tal como se usan en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto exprese claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a «una polimerasa» hace referencia a un agente o mezclas de dichos agentes y la referencia a «el método» incluye la
5 referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

[000132] A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado comúnmente entendido por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Todas las publicaciones mencionadas en la presente
10 se incorporan a esta mediante referencia a los efectos de describir y divulgar dispositivos, composiciones, formulaciones y metodologías que se describen en la publicación, las cuales se pueden utilizar con relación a la invención que se describe en la presente.

[000133] Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta una décima parte de la unidad del límite inferior, a menos que el contexto claramente indique lo
15 contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor intermedio o establecido en ese intervalo indicado, se encuentra comprendido por la invención. Los límites superiores e inferiores de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos de forma independiente en los intervalos más pequeños comprendidos dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno
20 o ambos límites, también se incluyen en la invención los intervalos que excluyen alguno de ambos de los límites incluidos.

[000134] En la descripción anterior se presentan diversos detalles específicos a los efectos de proporcionar una comprensión más exhaustiva de la presente invención. Sin embargo, resultará evidente para el experto en la técnica que la presente invención puede ponerse en práctica sin uno o
25 más de estos detalles específicos. En otros casos, no se han descrito las características conocidas y los procedimientos conocidos por los expertos en la técnica a los efectos de evitar confusiones con respecto a la invención.

[000135] Aunque la presente invención se describe principalmente con referencia a modalidades específicas, también se prevé que otras modalidades resultarán evidentes para los expertos en la
30 técnica tras la lectura de la presente descripción, y se pretende que dichas modalidades estén contenidas dentro del método de la presente invención.

a. Formulaciones de VWF liofilizadas

[000136] El método de la presente también proporciona formulaciones de rVWF para su uso en los métodos de tratamiento que se proporcionan en la presente. En algunas modalidades, la composición de rVWF se usa para la producción de una composición farmacéutica. En algunas modalidades, el rVWF puede formularse en una formulación liofilizada.

[000137] En algunas modalidades, las formulaciones que comprenden un polipéptido VWF de la invención se liofilizan después de la purificación y antes de la administración a un sujeto. La liofilización se lleva a cabo mediante el uso de técnicas comunes en la técnica y debe optimizarse para la composición que se desarrolla (Tang et ál., Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang et ál., Pharm Res. 13:243-9 (1996)).

[000138] Un ciclo de liofilización está compuesto, en un aspecto, por tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario (A. P. Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977)). En la etapa de congelación, la solución se enfría hasta iniciar la formación de hielo. Además, esta etapa induce la cristalización del agente espesante. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, que se lleva adelante mediante la reducción de la presión de cámara por debajo de la presión del vapor del hielo, mediante el uso de vacío y la introducción de calor para promover la sublimación. Finalmente, el agua adsorbida o unida se retira en la etapa de secado secundario a una presión de cámara reducida y a una temperatura de almacenamiento elevada. El proceso produce un material conocido como torta liofilizada. Después de eso, la torta puede ser reconstituida con agua estéril o diluyente adecuado para la inyección.

[000139] El ciclo de liofilización no solo determina el estado físico final de los excipientes, sino que también afecta otros parámetros tales como el tiempo de reconstitución, la apariencia, la estabilidad y el contenido final de humedad. La estructura de la composición en estado congelado experimenta diversas transiciones (por ejemplo, transiciones vítreas, humectaciones y cristalizaciones) que se producen a temperaturas específicas y la estructura puede usarse para comprender y optimizar el proceso de liofilización. La temperatura de transición vítrea (T_g y/o T_g') puede proporcionar información sobre el estado físico de un soluto y puede determinarse mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). La T_g y la T_g' son un parámetro importante que debe tenerse en cuenta cuando se diseña el ciclo de liofilización. Por ejemplo, la T_g' es importante para el secado primario. Además, en estado seco, la transición vítrea proporciona información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

b. Formulaciones farmacéuticas y excipientes en general

[000140] Los excipientes son aditivos que imparten o potencian la estabilidad y la administración de un producto farmacéutico (por ejemplo, proteína). Independientemente del motivo de su inclusión, los excipientes son un componente integral de una formulación y, por lo tanto, es necesario que sean seguros y bien tolerados por los pacientes. Para los fármacos proteicos, la elección de los excipientes es particularmente importante porque pueden afectar tanto la eficacia como la inmunogenicidad del fármaco. Por lo tanto, las formulaciones de proteínas deben desarrollarse con una selección adecuada de los excipientes que ofrezcan estabilidad, seguridad y comerciabilidad adecuadas.

[000141] Una formulación liofilizada, en un aspecto, está compuesta por uno o más de un amortiguador, un agente espesante y un estabilizador. En un aspecto, se evalúa y selecciona la utilidad de un tensioactivo en casos en los que la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución se convierte en un problema. Se incluye un agente amortiguador adecuado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización. En la Tabla 10 se proporciona una comparación de los componentes excipientes contemplados para formulaciones de proteínas líquidas y liofilizadas.

15 Tabla 1: Componentes excipientes de formulaciones de proteínas liofilizadas

Componente excipiente	Función en la formulación liofilizada
Amortiguador	○ Mantener el pH de la formulación durante la liofilización y después de la reconstitución
Agente de tonicidad/estabilizante	○ Los estabilizantes incluyen crioprotectores y lioprotectores ○ Los ejemplos incluyen polioles, azúcares y polímeros ○ Los crioprotectores protegen las proteínas de las tensiones de congelación ○ Los lioprotectores estabilizan las proteínas en estado liofilizado
Agente espesante	○ Se usa para mejorar la elegancia del producto e impedir reventones ○ Proporciona resistencia estructural a la torta liofilizada ○ Los ejemplos incluyen manitol y glicina
Tensioactivo	○ Empleado si la agregación durante el proceso de liofilización es un problema ○ Puede servir para reducir los tiempos de reconstitución ○ Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80
Antioxidante	○ Usualmente no se emplea, se retrasan enormemente las reacciones moleculares en la torta liofilizada
Iones metálicos/agente quelante	○ Pueden incluirse si se incluye un ion metálico específico solo como un

	cofactor o cuando el metal es necesario para la actividad de proteasa o Los agentes quelantes generalmente no son necesarios en las formulaciones liofilizadas
Conservante	o Para formulaciones de múltiples dosis o Proporciona protección contra el crecimiento microbiano en la formulación o Usualmente se incluye en el diluyente de reconstitución (por ejemplo, bWFI)

[000142] El principal desafío en el desarrollo de formulaciones de proteínas es estabilizar el producto frente a las tensiones de fabricación, transporte y almacenamiento. La función de los excipientes de formulación es proporcionar estabilidad frente a estas tensiones. Los excipientes también pueden emplearse para reducir la viscosidad de las formulaciones de proteínas de alta concentración para permitir su administración y mejorar la conveniencia en el paciente. En general, los excipientes pueden clasificarse en función de los mecanismos mediante los cuales estabilizan las proteínas frente a diversas tensiones químicas y físicas. Algunos excipientes se usan para aliviar los efectos de una tensión específica o para regular una susceptibilidad particular de una proteína específica. Otros excipientes tienen efectos más generales sobre las estabilidades covalentes y físicas de las proteínas. Los excipientes descritos en la presente se organizan por su tipo químico o su rol funcional en las formulaciones. Se proporcionan breves descripciones de los modos de estabilización al analizar cada tipo de excipiente.

[000143] En virtud de las indicaciones y las pautas proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica sabrán que cantidad o intervalo de excipiente puede incluirse en cualquier formulación particular para lograr una formulación biofarmacéutica de la invención que promueva la retención en la estabilidad del producto biofarmacéutico (por ejemplo, una proteína). Por ejemplo, la cantidad y el tipo de una sal a incluir en una formulación biofarmacéutica de la invención se selecciona en función de la osmolaridad deseada (por ejemplo, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la solución final, así como las cantidades y la osmolaridad de otros componentes a incluir en la formulación.

[000144] A modo de ejemplo, la inclusión de alrededor de sorbitol al 5 % para lograr la isotonicidad, mientras que se necesita alrededor de 9 % de un excipiente de sacarosa para lograr la isotonicidad. La selección de la cantidad o intervalo de concentraciones de uno o más excipientes que pueden incluirse dentro de una formulación biofarmacéutica de la invención se ha ejemplificado anteriormente con referencia a sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que las consideraciones descritas en la presente y ejemplificadas adicionalmente con referencia a excipientes específicos son igualmente aplicables a todos los tipos y combinaciones de

excipientes que incluyen, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizadores, agentes espesantes, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

[000145] Además, cuando se informa un excipiente particular en concentración molar, los expertos en la técnica reconocerán que también se contempla el porcentaje equivalente (%) p/v (por ejemplo, (gramos de sustancia en una muestra de solución/mL de solución) X 100 %) de solución.

[000146] Obviamente, un experto en la técnica podría reconocer que las concentraciones de los excipientes que se describen en la presente comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A modo de ejemplo, la concentración de un agente espesante puede reducirse, por ejemplo, cuando hay una alta concentración de proteínas o, por ejemplo, cuando hay una alta concentración de agente estabilizante. Además, un experto en la técnica podría reconocer que, para mantener la isotonicidad de una formulación particular en la que no hay agente espesante, debería ajustarse la concentración de un agente estabilizante en consecuencia (por ejemplo, podría usarse una cantidad «tonificante» de estabilizante). Los excipientes comunes se conocen en la técnica y pueden encontrarse en Powell et ál., *Compendium of Excipients for Parenteral Formulations* (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311.

c. Amortiguadores farmacéuticos y agentes de amortiguación

[000147] Usualmente, se observa que la estabilidad de una formulación de proteína farmacológicamente activa es máxima en un intervalo de pH pequeño. Es necesario identificar este intervalo de pH de estabilidad óptima de forma temprana durante los estudios previos a la formulación. Diversos enfoques, tales como los estudios de estabilidad acelerada y los estudios de calorimetría de barrido, son útiles en este esfuerzo (Remmele R.L. Jr., et ál., *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez que se finaliza una formulación, la proteína debe fabricarse y mantenerse a lo largo de su vida útil. Por lo tanto, casi siempre se emplean agentes amortiguadores para controlar el pH en la formulación.

[000148] La capacidad de amortiguación de las especies de amortiguación es máxima a un pH igual a la pKa y disminuye a medida que el pH aumenta o disminuye desde este valor. El noventa por ciento de la capacidad de amortiguación existe dentro de una unidad de pH de su pKa. La capacidad de amortiguación también aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de amortiguador.

[000149] Es necesario considerar diversos factores cuando se elige un amortiguador. En primer

lugar, las especies de amortiguador y su concentración deben definirse en función de su pKa y el pH deseado de la formulación. Igualmente importante es garantizar que el amortiguador sea compatible con la proteína y otros excipientes de la formulación, y que no catalice ninguna reacción de degradación. Un tercer aspecto importante a considerar es la sensación de picazón e irritación que puede inducir el amortiguador después de la administración. Por ejemplo, se sabe que el citrato causa picazón tras la inyección (Laursen T, et ál., Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98(2): 218-21 (2006)). El potencial de picazón e irritación es mayor para los fármacos que se administran a través de las vías subcutánea (SC) o intramuscular (IM), donde la solución del fármaco permanece en el sitio durante un período de tiempo relativamente más largo que cuando se administra mediante la vía IV, donde la formulación se diluye rápidamente en la sangre después de la administración. Para las formulaciones que se administran mediante infusión IV directa, es necesario monitorear la cantidad total de amortiguador (y cualquier otro componente de la formulación). Hay que tener especial cuidado con los iones de potasio administrados en forma de amortiguador de fosfato de potasio, que puede inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodriguez JC, et ál., Am. Fam. Physician., 73(2): 283-90 (2006)).

[000150] Los amortiguadores para formulaciones liofilizadas necesitan consideración adicional. Algunos amortiguadores tales como el fosfato de sodio pueden cristalizarse en la fase amorfa de la proteína durante la congelación lo que produce cambios en el pH. Otros amortiguadores comunes tales como el acetato e imidazol pueden sublimarse o evaporarse durante el proceso de liofilización, cambiando de ese modo el pH de la formulación durante la liofilización o después de la reconstitución.

[000151] El sistema de amortiguador presente en las composiciones se selecciona para que sea fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado de la formulación farmacéutica. En una modalidad, el pH de la solución es de entre pH 2,0 a pH 12,0. Por ejemplo, el pH de la solución puede ser de 2,0, 2,3, 2,5, 2,7, 3,0, 3,3, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7, 9,0, 9,3, 9,5, 9,7, 10,0, 10,3, 10,5, 10,7, 11,0, 11,3, 11,5, 11,7, o 12,0.

[000152] El compuesto amortiguador del pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación a un nivel predeterminado. En una modalidad, la concentración del amortiguador del pH es de entre 0,1 mM y 500 mM (1 M). Por ejemplo, se contempla que el agente amortiguador del pH se encuentre en al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, o 500 mM.

[000153] Los agentes amortiguadores del pH utilizados para amortiguar la formulación tal como se establece en la presente incluyen, de modo no taxativo, ácidos orgánicos, glicina, histidina,

glutamato, succinato, fosfato, acetato, citrato, Tris, HEPES y aminoácidos o mezclas de aminoácidos, que incluyen, de modo no taxativo, aspartato, histidina y glicina. En una modalidad de la presente invención, el agente amortiguador es citrato.

5 d. Agentes amortiguadores y estabilizantes farmacéuticos

[000154] En un aspecto de las formulaciones farmacéuticas de la presente, se agrega un estabilizante (o una combinación de estabilizantes) para impedir o reducir la degradación química y la agregación inducida por el almacenamiento. Una solución turbia luego de la reconstitución indica que la proteína ha precipitado o al menos se ha agregado. El término «estabilizante» significa un excipiente capaz de impedir la agregación o la degradación física, incluida la degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.) en un estado acuoso. Los estabilizantes contemplados incluyen, de modo no taxativo, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, HCL de arginina, compuestos de polihidroxilo, que incluyen polisacáridos tales como dextrano, almidón, almidón de hidroxietilo, ciclodextrinas, N-metil pirrolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio (Carpenter et ál., Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)). En las formulaciones de la presente, el estabilizante se incorpora en una concentración de alrededor de 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900, o 1000 mM. En una modalidad de la presente invención se usan manitol y trehalosa como agentes estabilizantes.

[000155] Si se desea, las formulaciones también incluyen cantidades adecuadas de agentes reguladores de la osmolaridad y espesantes. Los agentes espesantes incluyen, por ejemplo, de modo no taxativo, manitol, glicina, sacarosa, polímeros tales como dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En una modalidad, el agente espesante es manitol. El agente espesante se incorpora en una concentración de alrededor de 0,1, 0,5, 0,7, 0,8 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700, 900, o 1000 mM.

e. Tensioactivos farmacéuticos

30 [000156] Las proteínas son muy propensas a interactuar con superficies que las vuelven susceptibles a la adsorción y desnaturalización en las interfaces aire-líquido, vial-líquido y líquido-

líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta vía de degradación es inversamente dependiente de la concentración de proteínas, y da como resultado la formación de agregados de proteínas solubles e insolubles o la pérdida de proteínas de la solución a través de adsorción hacia las superficies. Además de la adsorción de la superficie del recipiente, la degradación inducida por la superficie se exagera con la agitación física, tal como podría experimentarse durante el transporte y la manipulación del producto.

[000157] Comúnmente se usan tensioactivos en las formulaciones de proteínas para impedir la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas anfipáticas con la capacidad de competir con las proteínas por posiciones interfaciales. Las partes hidrofóbicas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones interfaciales (por ejemplo, aire/líquido), mientras que las partes hidrofílicas de las moléculas permanecen orientadas hacia el solvente del volumen. En concentraciones suficientes (típicamente alrededor de la concentración micelar crítica del detergente), una capa superficial de moléculas de tensioactivo sirve para impedir que las moléculas de proteína se adsorban en la interfaz. De este modo, se minimiza la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos contemplados en la presente incluyen, de modo no taxativo, ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán, por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80. Ambos difieren solo en la longitud de la cadena alifática que imparte el carácter hidrofóbico a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. Por consiguiente, el polisorbato-80 es más activo en la superficie y tiene una concentración micelar crítica más baja que el polisorbato-20.

[000158] Los detergentes también pueden afectar la estabilidad conformacional de las proteínas. Nuevamente, los efectos de un determinado excipiente de detergente serán específicos de las proteínas. Por ejemplo, se ha demostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de las proteínas por parte de los detergentes puede explicarse en términos de las colas hidrofóbicas de las moléculas de detergente que pueden acoplarse mediante unión específica a estados proteicos completamente desplegados. Estos tipos de interacciones podrían provocar un cambio en el equilibrio conformacional hacia los estados proteicos más expandidos (por ejemplo, al aumentar la exposición de las partes hidrofóbicas de la molécula de proteína en complemento al polisorbato de unión). De manera alternativa, si el estado natural de la proteína presenta algunas superficies hidrofóbicas, el detergente que se une al estado natural puede estabilizar esa conformación.

[000159] Otro aspecto de los polisorbatos es que son inherentemente susceptibles a la degradación oxidativa. A menudo, como materias primas, contienen cantidades de peróxidos suficientes para provocar la oxidación de las cadenas laterales de los residuos de proteína,

especialmente, metionina. El potencial de daño oxidativo derivado de la adición de un estabilizante enfatiza el punto de que deben usarse concentraciones eficaces más bajas de excipientes en las formulaciones. Para los tensioactivos, la concentración eficaz para una proteína dada dependerá del mecanismo de estabilización.

- 5 [000160] Los tensioactivos también se agregan en cantidades adecuadas para impedir el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante la congelación y el secado (Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)). Por lo tanto, los tensioactivos ilustrativos incluyen, de modo no taxativo, tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y anfotéricos, que incluyen tensioactivos derivados de aminoácidos de origen natural. Los tensioactivos aniónicos incluyen, de modo no
- 10 taxativo, laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, sal sódica de ácido 1-octanosulfónico, hidratod e colato de sodio, desoxicolato de sodio y sal sódica de ácido glicodesoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, de modo no taxativo, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, monohidrato de cloruro de cetilpiridinio y bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
- 15 Los tensioactivos zwitteriónicos incluyen, de modo no taxativo, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, y SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, de modo no taxativo, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20, y TWEEN-80. Los tensioactivos también incluyen, de modo no taxativo, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja y otros fosfolípidos tales como
- 20 dioleil fosfatidil colina (DOPC) dimiristoilfosfatidilglicerol (DMPG), dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC), y DOPG (dioleilfosfatidilglicerol); éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Por lo tanto, se proporcionan composiciones que comprenden estos tensioactivos, ya sea de forma individual o como una mezcla en diferentes relaciones. En una modalidad de la presente invención, el tensioactivo es TWEEN-80. En las formulaciones de la presente, el tensioactivo se incorpora en una
- 25 concentración de alrededor de 0,01 a alrededor de 0,5 g/L. En las formulaciones proporcionadas, la concentración de tensioactivo es de 0,005, 0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 o 1,0 g/L.

f. Sales farmacéuticas

- 30 [000161] A menudo se agregan sales para aumentar la resistencia iónica de la formulación, que puede ser importante para la solubilidad, la estabilidad física y la isotonicidad de las proteínas. Las sales pueden afectar la estabilidad física de las proteínas de varias formas. Los iones pueden

estabilizar el estado natural de las proteínas al unirse a residuos con carga en la superficie de las proteínas. De manera alternativa, las sales pueden estabilizar el estado desnaturalizado al unirse a grupos peptídicos a lo largo de la estructura principal de la proteína (-CONH-). Las sales también pueden estabilizar la conformación natural de las proteínas al proteger las interacciones electrostáticas repulsivas entre los residuos dentro de una molécula de proteína. Las sales en las formulaciones de proteínas también pueden proteger interacciones electrostáticas atractivas entre las moléculas de proteínas que pueden producir agregación de proteínas e insolubilidad. En las formulaciones proporcionadas, la concentración de sal es de entre 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 y 500 mM.

g. Otros componentes excipientes comunes: Aminoácidos farmacéuticos

[000162] Los aminoácidos tienen un uso versátil en las formulaciones de proteínas como amortiguadores, agentes espesantes, estabilizantes y antioxidantes. Por lo tanto, en un aspecto, se emplean histidina y el ácido glutámico para amortiguar las formulaciones de proteínas en el intervalo de pH de 5,5 - 6,5 y 4,0 - 5,5, respectivamente. El grupo imidazol de histidina tiene una pKa = 6,0 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico tiene una pKa de 4,3, lo que hace que estos aminoácidos sean adecuados para amortiguar sus respectivos intervalos de pH. El ácido glutámico es particularmente útil en dichos casos. La histidina se encuentra comúnmente en las formulaciones de proteínas comercializadas, y este aminoácido proporciona una alternativa al citrato, un amortiguador conocido por producir picazón después de la inyección. De manera interesante también se ha informado que la histidina tiene un efecto estabilizante con respecto a la agregación cuando se usa en altas concentraciones en presentaciones líquidas y liofilizadas (Chen B, et ál., Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). Otros también observaron que la histidina reduce la viscosidad de una formulación con alta concentración de proteínas. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron una mayor agregación y decoloración en las formulaciones que contienen histidina durante los estudios de congelación y descongelación del anticuerpo en recipientes de acero inoxidable. Otra nota de cautela con la histidina es que experimenta fotooxidación en presencia de iones metálicos (Tomita M, et ál., Biochemistry, 8(12): 5149-60 (1969)). El uso de metionina como antioxidante en las formulaciones parece prometedor; se ha observado que es eficaz contra una serie de tensiones oxidativas (Lam XM, et ál., J Pharm Sci, 86(11): 1250-5 (1997)).

[000163] En diversos aspectos, se proporcionan formulaciones que incluyen uno o más de los aminoácidos glicina, prolina, serina, arginina y alanina y se ha demostrado que estabilizan las

proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial. La glicina también es un agente espesante comúnmente usado en formulaciones liofilizadas. Se ha demostrado que la arginina es un agente eficaz para inhibir la agregación y se ha utilizado en formulaciones líquidas y liofilizadas.

[000164] En las formulaciones proporcionadas, la concentración de aminoácido es de entre 0,1, 1, 10, 20, 30, 40, 50, 80, 100, 120, 150, 200, 300 y 500 mM. En una modalidad de la presente invención, el aminoácido es glicina.

h. Otros componentes excipientes comunes: Antioxidantes farmacéuticos

[000165] La oxidación de los residuos de proteínas surge de diversas fuentes diferentes. Además de la adición de antioxidantes específicos, la prevención del daño oxidativo de las proteínas implica el control cuidadoso de una serie de factores a lo largo del proceso de fabricación y el almacenamiento del producto tales como el oxígeno atmosférico, la temperatura, la exposición a la luz y la contaminación química. Por lo tanto, la invención contempla el uso de antioxidantes farmacéuticos que incluyen, de modo no taxativo, agentes reductores, depuradores de radicales libres/oxígeno o agentes quelantes. En un aspecto, los antioxidantes en las formulaciones de proteínas son solubles en agua y permanecen activos durante la vida útil del producto. Los agentes reductores y los depuradores de radicales libres/oxígeno funcionan mediante la ablación de especies de oxígeno activo en solución. Los agentes quelantes tales como EDTA son eficaces al unirse a los contaminantes de trazas de metales que promueven la formación de radicales libres. Por ejemplo, el EDTA se usó en la formulación líquida del factor de crecimiento de fibroblastos ácidos para inhibir la oxidación catalizada por iones metálicos de los residuos de cisteína.

[000166] Además de la eficacia de diversos excipientes para prevenir la oxidación de las proteínas, el potencial de los antioxidantes para inducir otros cambios covalentes o físicos en la proteína es motivo de preocupación. Por ejemplo, los agentes reductores pueden causar la interrupción de los enlaces disulfuro intramoleculares, lo que puede provocar la transposición de disulfuro. En presencia de iones metálicos de transición, se ha demostrado que el ácido ascórbico y el EDTA promueven la oxidación de metionina en diversas proteínas y péptidos (Akers MJ, y Defelippis MR. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. En: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editores. Pharmaceutical Science. Taylor y Francis, Reino Unido (1999)); Fransson J.R., / J. Pharm. Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, et ál., Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha informado que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de metionina inducida por la luz y la temperatura en rhuMab HER2; sin embargo, también se

informó la formación de un aducto de tiosulfato-proteína en este estudio (Lam XM, Yang JY, et ál., J Pharm Sci. 86(11): 1250-5 (1997)). La selección de un antioxidante adecuado se realiza de acuerdo con las tensiones y sensibilidades específicas de la proteína. Los antioxidantes contemplados en determinados aspectos incluyen, de modo no taxativo, agentes reductores y depuradores de radicales libres/oxígeno, EDTA y tiosulfato de sodio.

i. Otros componentes excipientes comunes: Iones metálicos farmacéuticos

[000167] En general, los iones metálicos de transición no son deseados en las formulaciones de proteínas porque pueden catalizar reacciones de degradación física y química en las proteínas. Sin embargo, se incluyen iones metálicos específicos en las formulaciones cuando estos son cofactores de las proteínas y en formulaciones de suspensión de proteínas donde forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión de zinc de insulina). Recientemente, se ha propuesto el uso de iones de magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización de ácido aspártico en ácido isoaspártico (WO 2004039337).

[000168] Dos ejemplos en los que los iones metálicos confieren estabilidad o mayor actividad en las proteínas son la desoxirribonucleasa humana (rhDNasa, Pulmozyme®), y el Factor VIII. En el caso de la rhDNasa, los iones de Ca^{+2} (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima a través de un sitio de unión específico (Chen B, et ál., / Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999)). De hecho, la remoción de los iones de calcio de la solución con EGTA provocó un aumento en la desamidación y agregación. Sin embargo, este efecto se observó solo con iones de Ca^{+2} , se observó que otros cationes divalentes de Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} desestabilizan la rhDNasa. Se observaron efectos similares con el Factor VIII. Los iones de Ca^{+2} y Sr^{+2} estabilizaron la proteína, mientras que otros tales como Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} desestabilizaron la enzima (Fatouros, A., et ál., Int. J. Pharm., 155, 121-131 (1997)). En un estudio independiente con el Factor VIII, se observó un aumento significativo en la velocidad de agregación en presencia de iones de Al^{+3} (Derrick TS, et ál., / Pharm. Sci., 93(10): 2549-57 (2004)). Los autores señalan que otros excipientes como sales amortiguadoras a menudo están contaminados con iones de Al^{+3} e ilustran la necesidad de usar excipientes de calidad adecuada en los productos formulados.

j. Otros componentes excipientes comunes: Conservantes farmacéuticos

[000169] Los conservantes son necesarios al momento de desarrollar formulaciones parenterales de usos múltiples que impliquen más de una extracción del mismo recipiente. Su función principal es

inhibir el crecimiento de microbios y asegurar la esterilidad del producto durante la vida útil o el período de uso del producto farmacéutico. Los conservantes usados comúnmente incluyen, de modo no taxativo, alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen extensos antecedentes de uso, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyen conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha vuelto un factor importante en la limitación de su uso en formulaciones de proteínas de dosis múltiples (Roy S, et ál., J Pharm ScL, 94(2): 382-96 (2005)).

[000170] Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos de proteínas se han formulado solamente para uso único. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones de dosis múltiples, tienen la ventaja agregada de permitir la conveniencia para el paciente y una mayor comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona de crecimiento humano (hGH) donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones de inyecciones de dosis múltiples en forma de lápiz más convenientes. Al menos cuatro de dichos dispositivos en forma de lápiz que contienen formulaciones conservadas de hGH están actualmente disponibles en el mercado. Norditropin® (líquida, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquida, Genentech) y Genotropin (liofilizada-cartucho de cámara doble, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que la Somatropin® (Eli Lilly) está formulada con m-cresol.

[000171] Deben considerarse varios aspectos durante el desarrollo de la formulación de formas de dosificación conservadas. Debe optimizarse la concentración eficaz de conservante en el producto farmacéutico. Esto requiere probar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieran eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, tres conservantes se analizaron con éxito en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina-1 (Tipo I), mediante el uso de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los conservantes se ordenaron en función de su impacto en la estabilidad en concentraciones usadas comúnmente en los productos comercializados (Remmele RL Jr., et ál., Pharm Res., 15(2): 200-8 (1998)).

[000172] El desarrollo de formulaciones líquidas que contengan conservantes presenta mayores desafíos que el de formulaciones liofilizadas. Los productos secados por congelación pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un conservante que contenga diluyente al momento de usarlos. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando considerablemente los riesgos de estabilidad asociados. Con las formulaciones líquidas, la estabilidad y la eficacia del conservante deben mantenerse durante toda la vida útil del producto (-18-24 meses). Un aspecto importante a considerar es que la eficacia del conservante debe

demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes del excipiente.

[000173] Algunos conservantes pueden causar reacciones en el sitio de inyección, que es otro factor a considerar al elegir un conservante. En ensayos clínicos que se centraron en la evaluación de conservantes y amortiguadores en Norditropin, se observó que la percepción del dolor era menor en las formulaciones que contenían fenol y alcohol bencílico en comparación con una formulación que contenía m-cresol (Kappelgaard, A.M., Horm Res. 62 Supl 3:98-103 (2004)). De forma interesante, entre los conservantes de uso común, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC, y Sun DA., AnesthAnalg., 100(3): 683-6 (2005)). En diversos aspectos, el uso de conservantes proporciona un beneficio que supera cualquier efecto secundario.

k. Métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas

[000174] La presente invención contempla, además, métodos para la preparación de formulaciones farmacéuticas.

[000175] Los métodos de la presente comprenden, además, una o más de las siguientes etapas: agregar un agente estabilizador tal como se describe en la presente a dicha mezcla antes de la liofilización, agregar al menos un agente seleccionado de un agente espesante, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo, cada uno de los cuales es como se describe en el presente, a dicha mezcla antes de la liofilización.

[000176] La práctica de reconstitución estándar para el material liofilizado es volver a agregar un volumen de agua pura o agua esterilizada para inyección (WFI) (típicamente equivalente al volumen retirado durante la liofilización), pese a que a veces se usan soluciones diluidas de los agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para la administración parenteral (Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)). Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de composiciones de rVWF reconstituidas que comprenden la etapa de agregar un diluyente a una composición de rVWF liofilizada de la invención.

[000177] El material liofilizado puede reconstituirse como una solución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua esterilizada para inyección, agua con conservantes para uso en dosis múltiples, o agua con cantidades adecuadas de tensioactivos (por ejemplo, una suspensión acuosa que contiene el compuesto activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas). En varios aspectos, dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo, de modo no taxativo, carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa,

alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia, agentes dispersantes o humectantes que son una fosfatida de origen natural, por ejemplo, de modo no taxativo, lecitina o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo, de modo no taxativo, estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo, de modo no taxativo, heptadecaetil-eneoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo, de modo no taxativo, monooleato de polietileno sorbitán. En diversos aspectos, las suspensiones acuosas también contienen uno o más conservantes, por ejemplo, de modo no taxativo, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

I. Formulación ilustrativa de rVWF para administración

[000178] En algunas modalidades, los métodos de la presente proporcionan una formulación mejorada que permite un producto final con alta potencia (alta concentración de rVWF y estabilidad mejorada a largo plazo) para reducir el volumen para el tratamiento (100 IU/ml to 10000 IU/ml). En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 100 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 500 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 1000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 2000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 3000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 4000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 5000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 6000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 7000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 8000 IU/ml a 10 000 IU/ml. En algunas modalidades, la concentración de rVWF en la formulación para administración es de alrededor de 9000 IU/ml a 10 000 IU/ml.

[000179] En algunas modalidades, la formulación para administración comprende uno o más compuestos zwitteriónicos, que incluyen, por ejemplo, aminoácidos como histidina, glicina, arginina. En algunas modalidades, la formulación para administración comprende un componente con características anfipáticas que tiene un mínimo de un grupo hidrofóbico y un grupo y un grupo

5 hidrofílico, que incluye, por ejemplo, polisorbato 80, octilpiranosid, dipéptidos y/o péptidos anfipáticos. En algunas modalidades, la formulación para administración comprende un azúcar no reductor o alcohol de azúcar o disacáridos, que incluyen, por ejemplo, sorbitol, manitol, sacarosa o trehalosa. En algunas modalidades, la formulación para administración comprende una sal soluble en agua no tóxica que incluye, por ejemplo, cloruro de sodio, que produce una osmolaridad fisiológica. En algunas

10 modalidades, la formulación para administración comprende un pH en un intervalo de 6,0 a 8,0. En algunas modalidades, la formulación para administración comprende un pH de alrededor de 6,0 a alrededor de 6,5, alrededor de 7, alrededor de 7,5 o de alrededor de 8,0. En algunas modalidades, la formulación para administración comprende uno o más cationes bivalentes que estabilizan el rVWF que incluyen, por ejemplo, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} y/o combinaciones de estos. En algunas

15 modalidades, la formulación para administración comprende glicina de alrededor de 1 mM a alrededor de 50 mM, histidina de alrededor de 1 mM a alrededor de 50 mM, cloruro de sodio de alrededor de cero a alrededor de 300 mM (por ejemplo, sodio en menos de 300 mM), polisorbato 20 (o polisorbato 80) de alrededor de 0,01 % a alrededor de 0,05 %, y sacarosa de alrededor de 0,5 % a alrededor de 20 % (p/p) con un pH de alrededor de 7,0 y con una osmolaridad fisiológica al momento de la

20 administración.

[000180] En algunas modalidades, la formulación para administración puede liofilizarse. En algunas modalidades, la formulación para administración es estable y puede almacenarse en estado líquido de alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C, así como de alrededor de 18 °C a alrededor de 25 °C. En algunas modalidades, la formulación para administración es estable y puede almacenarse

25 en estado líquido de alrededor de 2 °C a alrededor de 8 °C. En algunas modalidades, la formulación para administración es estable y puede almacenarse en estado líquido de alrededor de 18 °C a alrededor de 25 °C.

m. Administración/dosificación

30 [000181] Para administrar composiciones a seres humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Los términos «farmacéuticamente» o «farmacológicamente» aceptable se refieren a entidades moleculares y

composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tales como productos de escisión y agregación y, además, no producen reacciones alérgicas u otras reacciones adversas cuando se administran mediante el uso de vías conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación.

Algunos «portadores farmacéuticamente aceptables» incluyen cualesquiera y todos los solventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción y similares, incluso los agentes descritos anteriormente.

[000182] Las formulaciones farmacéuticas se administran por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante aspersión para inhalación, por vía vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en la presente incluye inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares, inyección intracisternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar y/o intrapulmonar en un sitio particular. Generalmente, las composiciones esencialmente no contienen pirógenos, así como otras impurezas que pueden ser dañinas para el receptor.

[000183] De acuerdo con la presente invención, el rVWF se administra en ausencia del factor VIII (FVIII). En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000184] En algunas modalidades el rVWF se administra antes del procedimiento quirúrgico, tal como se describe en la presente. En algunas modalidades, el rVWF se administra al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas, o al menos 24 horas, antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000185] En algunas modalidades, se administra 35-60 IU/kg del rVWF al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas, o al menos 24 horas, antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, se administra 50-60 IU/kg del rVWF al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17 horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas, o al menos 24 horas, antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, se administra 20-40 IU/kg del rVWF al menos 12 horas, al menos 13 horas, al menos 14 horas, al menos 15 horas, al menos 16 horas, al menos 17

horas, al menos 18 horas, al menos 19 horas, al menos 20 horas, al menos 21 horas, al menos 22 horas, al menos 23 horas, o al menos 24 horas, antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000186] En algunas modalidades, se administra alrededor de 50-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, se administra 50-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 55-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 50-55 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 50 IU/kg, alrededor de 52 IU/kg, alrededor de 54 IU/kg, alrededor de 56 IU/kg, alrededor de 58 IU/kg, o alrededor de 60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000187] En algunas modalidades, se administra alrededor de 35-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, se administra alrededor de 35-55 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 40-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 45-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 50-60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 35 IU/kg, alrededor de 40 IU/kg, alrededor de 45 IU/kg, alrededor de 50 IU/kg, alrededor de 55 IU/kg, o alrededor de 60 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes del procedimiento quirúrgico, y el procedimiento quirúrgico es un procedimiento

quirúrgico mayor. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

- [000188] En algunas modalidades, alrededor de 20-40 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico, y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, alrededor de 20 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico, y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, alrededor de 25 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico, y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, alrededor de 30 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico, y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, alrededor de 35 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico, y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, alrededor de 40 IU/kg del rVWF entre 12 horas y 24 horas antes de dicho procedimiento quirúrgico, y dicho procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.
- 15 [000189] En algunas modalidades, el método comprende una segunda etapa de pretratamiento para administrar el rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, se administra alrededor de 5-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 5 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 10 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 15 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 20 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 35 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 40 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el

procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 45 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[illegible]

procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 80 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 85 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 90 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000191] En algunas modalidades, se administra alrededor de 20-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25-40 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 40-50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 20 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 35 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 40 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 45 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 50 IU/kg del rVWF 1 hora antes del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000192] En algunas modalidades, el método comprende la administración del rVWF durante el

[illegible]

[000194] En algunas modalidades, se administra alrededor de 70-150 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 80-150 IU/kg del rVWF después del

administra alrededor de 150 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis del rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000195] En algunas modalidades, se administra alrededor de 150-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico

mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 160-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 170-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 180-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 180-210 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 190-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 190-210 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 200-220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor.

En algunas modalidades, se administra alrededor de 150 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas

modalidades, se administra alrededor de 160 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se

administra alrededor de 170 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se

administra alrededor de 180 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se

administra alrededor de 190 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se

administra alrededor de 200 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 210 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, se administra alrededor de 220 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

- 10 [000196] En algunas modalidades, se administra alrededor de 20-50 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25-50 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30-50 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25-40 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30-40 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 40-50 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 45-50 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 20 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 25 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 30 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 35 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 40 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 45 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un

procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra alrededor de 50 IU/kg del rVWF después del procedimiento quirúrgico, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral, y el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000197] En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 100-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 110-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 120-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 130-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 140-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 150-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 160-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 170-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 180-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 190-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 180-210 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 190-210 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 200-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 210-220 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 100 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 110 IU/kg del

[illegible]

[000199] En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 70-190 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas

[illegible]

modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 150 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 160 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de
 5 alrededor de 170 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 180 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, se administra una dosificación total de alrededor de 190 IU/kg del rVWF cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

10 [000200] En algunas modalidades, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, la dosificación es una dosificación enumerada anteriormente. En algunas modalidades, no se administra el FVIII. En algunas modalidades, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el
 15 pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, cuando el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor, el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis del rVWF antes del procedimiento quirúrgico, en donde la primera dosis es mayor que la segunda dosis. En algunas modalidades, la dosificación es una dosificación enumerada anteriormente. En algunas modalidades,
 20 no se administra el FVIII. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral, y el pretratamiento comprende administrar al menos dos dosis aproximadamente iguales del rVWF antes del procedimiento quirúrgico. En algunas modalidades, la dosificación es una dosificación enumerada anteriormente. En algunas modalidades, no se administra el FVIII.

[000201] Generalmente, la VWD tipo 1 se indica mediante <30 IU/dL de VWF:RCo, <30 IU/dL de
 25 VWF:Ag, FVIII bajo o normal, y $>0,5-0,7$ IU/dL de la relación de VWF:RCo/VWF:Ag. La VWD tipo 2A se indica mediante <30 IU/dL de VWF:RCo, $<30-200$ IU/dL de VWF:Ag, FVIII bajo o normal, y $<0,5-0,7$ IU/dL de la relación de VWF:RCo/VWF:Ag. La VWD tipo 2B se indica mediante $<30-200$ IU/dL de VWF:RCo, <30 IU/dL de VWF:Ag, FVIII bajo o normal, y usualmente $<0,5-0,7$ IU/dL de la relación de VWF:RCo/VWF:Ag. La VWD tipo 2M se indica mediante <30 IU/dL de VWF:RCo, $<30-200$ IU/dL de
 30 VWF:Ag, FVIII bajo o normal, y $<0,5-0,7$ IU/dL de la relación de VWF:RCo/VWF:Ag. La VWD tipo 2N se indica mediante $30-2000$ IU/dL de VWF:RCo, $30-200$ IU/dL de VWF:Ag, FVIII muy bajo, y $>0,5-0,7$ IU/dL de la relación de VWF:RCo/VWF:Ag. La VWD tipo 3 se indica mediante <3 IU/dL de VWF:RCo, <3 IU/dL de VWF:Ag, FVIII extremadamente bajo (<10 IU/dL), y no la relación de VWF:RCo/VWF:Ag

no es aplicable. Los niveles normales se indican mediante 50-200 IU/dL de VWF:RCo, 50-200 IU/dL de VWF:Ag, FVIII normal, y $>0,5-0,7$ IU/dL de relación de VWF:RCo/VWF:Ag. En algunas modalidades, el sujeto tiene VWD tipo 3. En algunas modalidades, el sujeto tiene VWD tipo 1. En algunas modalidades, el sujeto tiene VWD tipo 2.

5

V. Procedimientos quirúrgicos

[000202] El procedimiento quirúrgico de acuerdo con los métodos de la presente invención puede ser un procedimiento quirúrgico mayor o un procedimiento quirúrgico menor.

[000203] Generalmente, una cirugía mayor incluye cualquier procedimiento quirúrgico invasivo en el que se realiza en el cual se realiza una resección más extensa, por ejemplo, se ingresa a una cavidad corporal, se extraen órganos o se altera la anatomía normal. Generalmente, si se abre una barrera mesenquimal (por ejemplo, cavidad pleural, peritoneo, meninges), se considera una cirugía mayor. En algunas modalidades, una cirugía mayor es aquella en la que hay una pérdida de sangre esperada de más de 500 mL, cambios de fluido significativos y, típicamente, al menos una noche en el hospital. Los procedimientos quirúrgicos mayores ilustrativos incluyen, de modo no taxativo, cirugías bariátricas/bypass gástrico, miotomía septal, pancreatometomía, reparación de disección aórtica torácica, esofagectomía, cistectomía de vejiga, revascularización coronaria, cirugía de osteomielitis espinal, restauración quirúrgica ventricular, craneotomía, cirugía laparoscópica (excepto colecistectomía y ligadura de trompas), resección abierta de órganos, reemplazos de articulaciones grandes, mastectomía con reconstrucción y/o cirugía de columna, torácica, vascular y/o intracraneal. Los ejemplos adicionales de cirugías mayores incluyen, de modo no taxativo, osteotomía maxilar o mandibular, laringectomía, resección de masa benigna o maligna grande y/o disección de ganglios linfáticos que requieran pasar la noche en el hospital (con o sin cirugía reconstructiva), mastectomía con reconstrucción tisular inmediata (con o sin biopsia de los ganglios linfáticos o disección axilar), laparoscopia, reparación abierta o resección (por ejemplo, del estómago, intestino delgado, colon, hígado, páncreas, bazo, glándulas suprarrenales o hígado), colecistectomía abierta, reparaciones de hernia grande incisional, epigástrica o ventral, resección o ablación histeroscópica, histerectomía y/o cirugía anexial, laparoscopia para endometriosis extensa, cirugía abdominal o transvaginal del piso pélvico, laminectomía y/o fusión espinal, reemplazo de rodilla, reemplazo de cadera reemplazo de hombro, reemplazo de articulación del codo remoción o revisión de hardware por infección o falla, amputación, laminectomía y/o fusión espinal, reconstrucción de colgajos (cirugía plástica), panniculectomía, mediastinoscopía, resección pulmonar, resección esofágica, resección de masa

mediastínica (toroscópica o abierta), reparación de hernia hiatal (toroscópica o abierta) resección de tumor de vejiga (transuretral o abierta), tumor de próstata (transuretral o abierta), resección de riñón (laparoscópica o abierta), resección ureteral (laparoscópica o abierta), resección de testículo (transescrotal o abdominal), amputación, cirugía de bypass arterial periférica, reparación de aneurisma aórtico (endovascular o abierta) y/O endarterectomía de la carótida).

[000204] La cirugía menor es cualquier procedimiento quirúrgico en el que solo se resecan la piel o las membranas mucosas y el tejido conectivo, por ejemplo, corte vascular para la colocación de catéter, implante de bombas en tejido subcutáneo. Un procedimiento quirúrgico menor típicamente incluye cualquier procedimiento que pueda realizarse de forma segura en un entorno ambulatorio, sin el uso de anestesia general o la necesidad de asistencia respiratoria. En algunas modalidades, una cirugía menor es aquella en la que hay una pérdida de sangre esperada de menos de 500 mL, cambios de fluido mínimos y, típicamente, se realiza de forma ambulatoria (día de la cirugía/el mismo día el alta). Dichos procedimientos quirúrgicos ambulatorios pueden incluir, de modo no taxativo, cirugía de cataratas, cirugía mamaria sin reconstrucción, colecistectomía laparoscópica y ligadura de trompas, y la mayoría de los procedimientos cutáneos, superficiales, endoscópicos y artroscópicos. Los ejemplos adicionales de cirugías menores incluyen, de modo no taxativo, extracción dental, amigdalectomía, adenoidectomía, septoplastia, turbinectomía, rinoplastia, biopsia faríngea, biopsia laríngea, escisión menor por láser u otros medios, cirugía del oído medio, mastoidectomía, implante coclear, cirugía endoscópica sinusal, resecciones pequeñas de masas benignas y malignas (realizadas de forma ambulatoria; es decir, rodetes mandibulares, quiste braquial, cáncer pequeño de lengua), tiroidectomía, tumorectomía mamaria (con o sin biopsia de ganglios linfáticos o disección axilar), mastectomía (con o sin biopsia de ganglios linfáticos o disección axilar), reparación de hernia inguinal (método laparoscópico o abierto), reparación de hernia umbilical (método laparoscópico o abierto), colecistectomía laparoscópica, hemorroidectomía, dilatación, legrado, histeroscopia diagnóstica, laparoscopia, ablación endometrial con balón térmico, ligadura de trompas, laparoscopia – endometriosis limitada, inserción de cinta transvaginal, discectomía, extracción de cataratas, la mayoría de los procedimientos oftalmológicos, cirugía artroscópica (incluida la reparación de ACL), extracción de hardware de rutina (no por infección), cirugía de tendones, bunionectomía, discectomía, liberación del túnel carpiano, liberación de contractura de Dupuytren, cirugía de tendones mayores, cirugía de tendones menores, colgajos rotativos e injertos de piel pequeños, resección de carcinoma de células basales, escisión de lipoma, mamoplastia de reducción y otras cirugías para enfermedades mamarias benignas, cirugía de mamas cosmética, broncoscopia, cistoscopia, ureteroscopia, renoscopia para cálculos, renoscopia para estenosis, renoscopia para biopsia, escisión de hidrocele,

escisión de varicocele, vasectomía, circuncisión, y/o escisión de venas varicosas.

[000205] Los procedimientos quirúrgicos orales incluyen, de modo no taxativo, diversos procedimientos dentales y cirugías orales, que incluyen, por ejemplo, extracciones dentales.

- [000206] En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico mayor. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico menor. En algunas modalidades, el procedimiento quirúrgico es un procedimiento quirúrgico oral.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: EFICACIA HEMOSTÁTICA Y SEGURIDAD DEL RVWF

- 10 [000207] Este estudio evaluó la eficacia hemostática y la seguridad del rVWF con o sin ADVATE (factor antihemofílico [recombinante]), Baxalta US Inc., Westlake Village, CA (rFVIII) en pacientes con VWD grave sometidos a cirugía electiva.

MÉTODOS

- 15 [000208] Estudio de fase 3 abierto no aleatorio en 14 sitios en 10 países (NCT02283268) en pacientes ≥ 18 años de edad con VWD grave y se iban a someter a una cirugía electiva programada. Los pacientes fueron monitoreados durante 14 d después de la cirugía.

TRATAMIENTO

- 20 [000209] 12–24 h antes de la cirugía, se proporcionó el rVWF, 40–60 IU/kg de rVWF:RCo por vía intravenosa para permitir que los niveles de FVIII:C endógeno aumentaran hasta ≥ 30 IU/dL (cirugía menor/oral) o ≥ 60 IU/dL (cirugía mayor). Los niveles de FVIII:C se evaluaron dentro de las 3 h del inicio de la cirugía. Si se alcanzaron los niveles de FVIII:C objetivo, se administró rVWF solo 1 h antes de la cirugía para alcanzar los niveles máximos descritos en la Tabla 2. Si se alcanzaron los niveles de FVIII:C objetivo, se administró rVWF solo 1 h antes de la cirugía para alcanzar los niveles máximos descritos en la Tabla 2. Se individualizó la dosificación intraoperatoria y postoperatoria para mantener los niveles mínimos objetivo de acuerdo con los resultados farmacocinéticos (PK) y farmacodinámicos (PD), así como la intensidad y la duración del estímulo hemostático.

- 30 Tabla 2. Niveles objetivo de VWF:RCo y FVIII:C: Recomendaciones para la prevención del sangrado

excesivo durante y después de la cirugía

Tipo de cirugía	Nivel en plasma		Cálculo de la dosis de rVWF (IU VWF:RCo requerido)†
	máximo objetivo de VWF:RCo (IU/dL)	Nivel en plasma máximo objetivo de FVIII:C* (IU/dL)	
Menor/Oral	50-60	40-50	$\Delta\text{VWF:RCo} \times \text{BW (kg)}/\text{IR}‡$
Mayor	100	80-100	$\Delta\text{VWF:RCo} \times \text{BW (kg)}/\text{IR}‡$

BW=peso corporal; FVIII:C=actividad del factor VIII; IR=recuperación gradual; rVWF=factor de von Willebrand recombinante; VWF:RCo=actividad del cofactor del factor de von Willebrand y ristocetina.

*Puede que se requiera rFVIII adicional para alcanzar los niveles en plasma máximos objetivo de FVIII:C recomendados.

†Administrado dentro de 1 h antes de la cirugía.

‡Si la IR no está disponible, se supone una IR de 2,0 IU/dL por IU/kg.

$\Delta\text{VWF:RCo} = \text{VWF:RCo en plasma máximo objetivo} - \text{VWF:RCo en plasma al inicio}$.

10 EVALUACIÓN

[000210] El investigador evaluó la eficacia hemostática general (resultado primario) 24 h después de la última infusión perioperatoria o al finalizar el estudio, lo que ocurriera antes (Tabla 3). El cirujano evaluó la eficacia hemostática intraoperatoria (tabla 3), junto con la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista. Las evaluaciones de seguridad incluyeron eventos adversos (AE) y anticuerpos contra rVWF, rFVIII, proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) murina y rFurina.

Tabla 3. Escala de calificación de eficacia hemostática general* e intraoperatoria†

Calificación	Evaluación
Excelente	La hemostasia lograda con rVWF con o sin rFVIII fue tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal
Buena	La hemostasia lograda con rVWF con o sin rFVIII fue probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal
Moderada	La hemostasia lograda con rVWF con o sin rFVIII fue claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado, pero se mantuvo sin la necesidad de cambiar el concentrado de rVWF

Ninguna El paciente experimentó un sangrado descontrolado como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio del concentrado de rVWF

rFVIII=factor VIII recombinante; rVWF=factor de von Willebrand recombinante.

*Según lo evaluado por el investigador.

†Según lo evaluado por el cirujano.

5 DATOS ESTADÍSTICOS

[000211] Los análisis descriptivos incluyeron estimaciones puntuales e IC al 90 % para la cantidad de pacientes con eficacia hemostática calificada como «excelente/buena» mediante el uso de una prueba de Clopper Pearson. La PK/PD y la seguridad se resumieron mediante el uso de estadística descriptiva.

10

RESULTADOS

PACIENTES

Tabla 4. Características clínicas y datos demográficos iniciales

Parámetro	N=15
Sexo, n (%)	
Masculino	7 (46,7)
Femenino	8 (53,3)
Mediana de edad (intervalo), y	40 (20–70)
Mediana de peso (intervalo), kg	73,5 (52,0–127,2)
Mediana de IMC (intervalo, kg/m²)	25,6 (17,1–38,0)
Tipo de VWD, n (%)	
1	3 (20,0)
2A	2 (13,3)
2B	1 (6,7)
2M	1 (6,7)
3	8 (53,3)
Clasificación de cirugía, n (%)	
Mayor	10 (66,7)
Menor	4 (26,7)
Oral	1 (6,7)
Promedio (SD) de FVIII:C, IU/dL	

Parámetro	N=15
Todos los tipos de VWD (n=11)	20,6 (23,7)
VWD tipo 3 (n=5)	1,8 (1,1)
Promedio (SD) de VWF:RCo, IU/dL	
Todos los tipos de VWD (n=11)	9,7 (11,0)
VWD tipo 3 (n=5)	<8 (0,0)

IMC=índice de masa corporal; FVIII:C=actividad del factor VIII; VWD=enfermedad de von Willebrand; VWF:RCo=actividad del cofactor del factor de von Willebrand y ristocetina.

La eficacia hemostática general se calificó como «excelente» o «buena» para los 15 pacientes (IC al 90 %: 81,9–100,0) (Figura 1).

EFICACIA

[000212] La eficacia hemostática general se calificó como «excelente» o «buena» para los 15 pacientes (IC al 90 %: 81,9–100,0) (Figura 1).

10 [000213] La eficacia hemostática intraoperatoria se calificó como «excelente» o «buena» para los 15 pacientes (IC al 90 %: 81,9–100,0) (Figura 2). Entre los 8 pacientes con VWD tipo 3, la eficacia hemostática general e intraoperatoria se calificó como «excelente» para 7 pacientes y como «buena» para 1 paciente. El promedio $\pm$ SD de la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la pérdida de sangre prevista fue de 70 % $\pm$ 45 % y se calificó como «excelente» para 13 pacientes y
15 «buena» para 2 pacientes.

EXPOSICIÓN

[000214] Los pacientes recibieron un total de 104 infusiones de rVWF para prevenir el sangrado quirúrgico; la mediana de la dosis quirúrgica general de rVWF fue de 220,4 IU/kg (intervalo, 63,8–648,4 IU/kg) (Tabla 4). 93 (89,4 %) infusiones de rVWF solo: 15 (12–24 h antes de la cirugía), 12 (1 h antes de la cirugía), y 66 (después de la cirugía). 11 (10,6 %) infusiones de rVWF con rFVIII: 3 (1 h antes de la cirugía), 1 (intraoperatoria), y 7 (después de la cirugía). 5 pacientes recibieron las 11 infusiones de rVWF con rFVIII, y 6 de las 7 infusiones postoperatorias de rVWF con rFVIII fueron en 1 paciente.

25 [000215] De los 10 pacientes sometidos a cirugía mayor, 7 (70 %) no requirieron la coadministración de rFVIII.

Tabla 5. Mediana de exposición a rVWF en general y según clasificación de cirugía

	Clasificación de cirugía			
	Menor (n=4)	Mayor (n=10)	Oral (n=1)	General (N=15)
Mediana de la cantidad total de infusiones* (intervalo)	3 (2–4)	7,5 (4–15)	5	6 (2–15)
Mediana de exposición (intervalo), d	3 (2–4)	6,5 (4–15)	4	6 (2–15)
Mediana de la dosis 12-24 h antes de la cirugía (intervalo), IU/kg	57,2 (55,0–59,9)	49,3 (37,4–57,6)	36,1 55,0	(36,1–59,9)
Mediana de la dosis 1 h antes de la cirugía (intervalo), IU/kg	39,3 (8,0–46,4)	37,6 (15,7–82,7)	18,1	35,8 (8,0–82,7)
Mediana de la dosis intraoperatoria (intervalo), IU/kg	0	0	18,1	18,1
Mediana de la dosis posoperatoria (intervalo), IU/kg	79,3 (42,8–115,9)	214,8 (47,7–533,3)	36,1	189,8 (36,1–533,3)
Mediana de la dosis quirúrgica total (intervalo), IU/kg	119,9 (63,8–217,3)	307,6 (125,2–648,4)	108,4	220,4 (63,8–648,4)

rVWF=factor de von Willebrand recombinante.

*Cantidad total de infusiones de cebado preoperatorias, dosis de carga inicial preoperatorias, dosis de carga suplementarias preoperatorias, dosis intraoperatorias y dosis postoperatorias.

5

SEGURIDAD

[000216] 6 pacientes informaron 12 eventos adversos que surgieron del tratamiento; ninguno se consideró relacionado con el tratamiento. Los pacientes tuvieron AE graves (diverticulitis y trombosis venosa profunda [DVT]; cada uno se produjo en 1 paciente); ninguno se consideró relacionado con el tratamiento de reemplazo de factor.

10

[000217] La DVT grave se produjo el día 8 después de la cirugía (inicialmente se informó como una DVT no grave el día 4 después de la cirugía). El evento fue asintomático y se observó después de la exploración dúplex de rutina. El evento se evaluó como relacionado de forma poco probable con el

rVWF y no relacionado con el rFVIII o los procedimientos de estudio; asociado causalmente con la cirugía mayor del paciente (reemplazo total de cadera) y los antecedentes de obesidad permanente. Los niveles de FVIII:C después de la cirugía nunca superaron 150 IU/dL. El evento provocó la colocación de un filtro en la cava y posteriormente se resolvió sin secuelas. No se observó reacciones alérgicas graves; anticuerpos neutralizantes contra rFVIII, proteínas CHO, IgG murina o rFurina.

[000218] Un paciente con VWD tipo 3 que tuvo una transfusión intraoperatoria de glóbulos rojos empaquetados durante una cirugía mayor de reemplazo total de rodilla dio positivo para anticuerpos de unión al VWF el día 7 después de la cirugía.

[000219] Los parámetros de PK para VWF:RCo para los pacientes que se sometieron a análisis de PK (n=11) se muestran en la FIGURA 4. Las concentraciones promedio de VWF:RCo, VWF:Ag, y VWF actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB) alcanzaron niveles máximos en 30 min y disminuyeron gradualmente durante un período de 72 h después de la infusión (FIGURA 4).

[000220] La administración de rVWF solo dio como resultado una estabilización rápida y sustancial de los niveles de FVIII:C endógeno 6-12 h después de la infusión, con niveles máximos de FVIII:C alcanzados en 24 h entre todos los pacientes evaluados n=11; FIGURA 5A), así como en el subconjunto de pacientes con VWD tipo 3 (n=5, FIGURA 5B). En general los pacientes alcanzaron un nivel promedio de FVIII:C >60 IU/dL a las 6 h después de la infusión (FIGURA 5A), y los pacientes con un nivel inicial de FVIII:C mayor (por ejemplo, con VWD tipo 1 o tipo 2) alcanzaron los niveles objetivo más rápidamente. A pesar de tener niveles promedio de FVIII:C <2 IU/dL al inicio, la administración de rVWF solo permitió que los pacientes con VWD tipo 3 alcanzaran niveles objetivo de VWF:RCo y FVIII:C rápidamente, con FVIII:C >60 IU/dL alcanzado a las 12 h después de la infusión (FIGURA 5B).

CONCLUSIONES

[000221] En este estudio de cirugía, las eficacias hemostáticas generales e intraoperatorias se calificaron como «excelentes» o «buenas» para los 15 pacientes. Para las cirugías mayores, la eficacia hemostática general fue «excelente» en 7 pacientes y «buena» en 3 pacientes, y la eficacia intraoperatoria fue «excelente» en 8 pacientes y «buena» en 2 pacientes. Casi 90 % de las infusiones para lograr la hemostasia intraoperatoria y postoperatoria fueron con rVWF solo; 70 % de las cirugías mayores se controlaron con rVWF solo. EL rVWF se dirige a la disfunción primaria de VWD y permite que los médicos se concentren en lograr una eficacia óptima sin preocuparse por la acumulación de FVIII. Estos datos respaldan el uso seguro y eficaz de rVWF en cirugías mayores y menores.

EJEMPLO 2: FACTOR DE VON WILLEBRAND RECOMBINANTE EN SUJETOS CON ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND GRAVE QUE SE SOMETEN A CIRUGÍA

[000222] Este ejemplo proporciona los resultados de un estudio que examina el tratamiento de sujetos con enfermedad de von Willebrand (VWD) grave que se someten a cirugía.

5

MEDICIONES DE RESULTADOS:

Mediciones de resultados primarios:

10 [000223] Eficacia hemostática general según lo evaluado por el investigador (médico de hemofilia) [Período de tiempo: 24 horas después de la última infusión perioperatoria o al finalizar la visita del día 14 ($\pm$ 2 días), lo que ocurra antes]. La eficacia hemostática se calificó en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna.

- Excelente: La hemostasia intraoperatoria y postoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
- 15 • Buena: La hemostasia intraoperatoria y postoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
- Moderada: La hemostasia intraoperatoria y postoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado, pero se mantuvo sin
- 20 la necesidad de cambiar el concentrado de rVWF.
- Ninguna: El participante experimentó un sangrado descontrolado como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio del concentrado de rVWF.

Mediciones de resultados secundarios:

25 [000224] #1: Pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]. La pérdida de sangre prevista fue estimada antes de la cirugía por el cirujano de la operación en función de un individuo hemostáticamente normal del mismo sexo, edad, estatura y comorbilidades que el participante. La evaluación de la pérdida de sangre real consistió en la pérdida de sangre estimada, lo que incluyó

30 hisopos, toallas y succión durante el procedimiento, según el registro del anestesiólogo.

[000225] #2: Pérdida de sangre real intraoperatoria con respecto a la pérdida de sangre prevista

[Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]. La pérdida de sangre real con respecto a la pérdida de sangre prevista se calculó como [pérdida de sangre real (mL)] dividido [pérdida de sangre prevista (mL) multiplicado por 100.

[000226] #3: Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

- La eficacia hemostática se calificó en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna.
- Excelente: La pérdida de sangre intraoperatoria fue menor o igual a la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($\leq 100\%$).
- Buena: La pérdida de sangre intraoperatoria fue hasta 50 % mayor que la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal (101-150%). Moderada: La pérdida de sangre intraoperatoria fue más de 50 % con respecto a la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($> 150\%$).
- Ninguna: Hemorragia descontrolada como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio de del régimen de reemplazo del factor de coagulación.

[000227] #4: Puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria según lo evaluado por el cirujano de la operación [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

- La eficacia hemostática se calificó en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna.
- Excelente: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
- Buena: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal.
- Moderada: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado, pero se mantuvo sin la necesidad de cambiar el concentrado de rVWF.
- Ninguna: El participante experimentó un sangrado descontrolado como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio del concentrado de rVWF.

[000228] #5: Dosis diaria intraoperatoria y postoperatoria de rVWF ajustada según el peso con o

sin ADVATE [Período de tiempo: Diariamente, desde el día de la cirugía hasta el día 14 después de la cirugía (± 2 días)]

[000229] #6: Aparición de eventos adversos [Período de tiempo: Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Se evaluaron los eventos adversos que surgieron del tratamiento (TEAE) y los eventos adversos graves que surgieron del tratamiento (TESAE).

[000230] #7: Aparición de eventos trombóticos [Período de tiempo: Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Se evaluaron los eventos adversos que surgieron del tratamiento (TEAE) y los eventos adversos graves que surgieron del tratamiento (TESAE) para eventos trombóticos.

[000231] #8: Aparición de reacciones alérgicas graves (por ejemplo, anafilaxia) [Período de tiempo: Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Se evaluaron los eventos adversos que surgieron del tratamiento (TEAE) y los eventos adversos graves que surgieron del tratamiento (TESAE) para reacciones alérgicas graves.

[000232] #9: Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total al factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores del Factor VIII (FVIII) [Período de tiempo: Las pruebas se realizaron durante todo el estudio en la detección, antes de la infusión de PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 después de la cirugía y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Los participantes fueron tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.

[000233] #10: Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina) [Período de tiempo: Las pruebas se realizaron durante todo el estudio en la detección, antes de la infusión de PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 después de la cirugía y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 (± 2) días después de la cirugía)]. Los participantes fueron tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.

[000234] #11: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión (AUC 0-72 h/dosis) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2)

horas]. Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El área bajo la curva de concentración en plasma/tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión se calculó mediante el uso de la regla trapezoidal lineal. Para el cálculo de la AUC(0-72h), los niveles a las 72 horas se interpolaron/extrapolaron de forma lineal desde los 2 puntos temporales de muestreo más cercanos. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación de FVIII (FVIII:C)

5 [000235] #12: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo desde el momento 0 a infinito (AUC $0-\infty$ /dosis) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. rea bajo la curva de concentración en plasma/tiempo de desde el momento 0 a infinito y el área bajo la curva del primer momento desde el momento 0 a infinito se calculó como la suma de AUC o AUMC desde el momento 0 hasta el momento de la última concentración cuantificable más una corrección del área de cola calculada como C_t/λ_z y $C_t/\lambda_z(t+1/\lambda_z)$, respectivamente, donde C_t es la última concentración cuantificable, t es el momento de la última concentración cuantificable y λ_z es la constante de velocidad de disposición o terminal. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación de FVIII (FVIII:C)

25 [000236] #13: Farmacocinética: Tiempo de residencia promedio (MRT) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas]. Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El tiempo de residencia promedio se calculó como el área bajo la curva del primer momento desde el momento 0 a infinito dividido el área bajo la curva desde el momento 0 a infinito menos $T/2$, donde T es la duración de la infusión. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF

(VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

[000237] #14: Farmacocinética: Eliminación (CL) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas]. Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. La eliminación se calculó como la dosis (IU/kg) dividido por el área bajo la curva desde el momento 0 a infinito. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

[000238] #15: Farmacocinética: Recuperación gradual (IR) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas]. Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. La recuperación gradual se calculó como ($C_{\text{máx}}$ menos $C_{\text{preinfusión}}$) dividido por la dosis (IU/kg), donde kg se refiere al peso corporal al momento de la dosificación y $C_{\text{máx}}$ fue la concentración máxima observada antes de la corrección para los valores previos a la infusión. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

[000239] #16: Farmacocinética: Semivida de la fase de eliminación ($Y_{1/2}$) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas]. Esta evaluación solo es necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. La semivida terminal o de disposición ($T_{1/2}$) se calculó como $\ln 2 / \lambda_z$, donde λ_z es la constante de velocidad de eliminación terminal como se calcula en WinNonlin NCA mediante el uso de al menos tres concentraciones cuantificables. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo

INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

[000240] #17: Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas]. Esta evaluación solo es necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El Vss se calculó como la eliminación multiplicado con el tiempo residencia promedio. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)

Criterios de elegibilidad:

[000241] Edades elegibles para el estudio: 18 años y mayores; sexos elegibles para el estudio: Todos

Criterios de inclusión:

[000242] Diagnóstico de enfermedad de von Willebrand (VWD) grave, tal como se enumera a continuación, y procedimiento quirúrgico electivo planificado:

- 1. Tipo 1 (actividad cofactor del factor de von Willebrand:ristocetina (FvW: RCo) < 20 IU / dL), o
- 2. Tipo 2A (según lo verificado mediante patrón multimérico), Tipo 2B (según lo diagnosticado mediante genotipo), Tipo 2N (FVIII:C < 10 % y antecedentes genéticos documentados), Tipo 2M, o
- 3. Tipo 3 (antígeno del factor von Willebrand (VWF:Ag) ≤ 3 IU/dL)

[000243] VWD con antecedentes de necesitar terapia de sustitución con concentrado del factor de von Willebrand (VWF) para controlar el sangrado.

[000244] Con VWD tipo 3 (antígeno de VWF/VWF:Ag ≤ 3 IU/dL), el participante tiene antecedentes médicos de exposición de al menos 20 días a concentrados de VWF/factor de coagulación de FVIII (incluido el crioprecipitado o plasma fresco congelado).

[000245] Con VWD tipo 1 o tipo 2, el participante tiene antecedentes médicos de exposición de 5 días o una cirugía mayor previa que requirió concentrados de VWF/factor de coagulación de FVIII (incluido el crioprecipitado o plasma fresco congelado).

[000246] Participante con al menos 18 años de edad.

[000247] Si es una mujer es en edad fértil, la participante presenta una prueba de embarazo negativa.

[000248] Si corresponde, el participante acepta emplear medidas anticonceptivas adecuadas durante el período del estudio.

[000249] El participante tiene voluntad y es capaz de cumplir con los requisitos del protocolo.

5 Criterios de exclusión seleccionados:

[000250] Diagnóstico de pseudo-VWD u otro trastorno de coagulación hereditario o adquirido (por ejemplo, trastornos plaquetarios cualitativos y cuantitativos o tiempo elevado de protrombina [PT] / relación internacional normalizada [INR] > 1,4).

[000251] Antecedentes o presencia de un inhibidor de VWF durante la detección.

10 [000252] Antecedentes o presencia de un inhibidor del factor VIII (FVIII) con una titulación $\geq 0,4$ BU (ensayo de Bethesda modificado por Nijmegen) o $\geq 0,6$ BU (mediante ensayo de Bethesda).

[000253] Hipersensibilidad conocida a cualquiera de los componentes de los fármacos del estudio, tales como proteínas de ratón o hámster.

[000254] Antecedentes médicos de trastornos inmunológicos, excluida la rinitis alérgica estacional/conjuntivitis; asma leve; alergias alimentarias o alergias a los animales.

15

[000255] Antecedentes médicos de un evento tromboembólico.

[000256] VIH positivo con un recuento absoluto de CD4 < 200/mm³.

[000257] Recuento de plaquetas < 100 000/mL.

[000258] Diagnóstico de enfermedad hepática significativa, como lo demuestra, por ejemplo, de modo no taxativo, cualquiera de los siguientes: alanina aminotransferasa en suero (ALT) 5 veces mayor al límite superior de la normalidad; hipoalbuminemia; hipertensión de la vena porta (por ejemplo, presencia de esplenomegalia inexplicable de otro modo, antecedentes de varices esofágicas) o cirrosis hepática clasificada como Child B o C.

20

[000259] Diagnóstico de enfermedad renal, con un nivel de creatinina en suero $\geq 2,5$ mg/dL.

25

[000260] El participante ha sido tratado con un fármaco inmunomodulador, excluido el tratamiento tópico (por ejemplo, ungüentos, aerosoles nasales), dentro de los 30 días previos a la firma del consentimiento informado.

[000261] La participante estaba embarazada o lactando en el momento en que se obtiene el contenido informado.

30

[000262] El participante ha participado en otro estudio clínico que implica un producto de investigación (IP), distinto a rVWF con o sin ADVATE, o dispositivo en investigación dentro de los 30 días previos a la inscripción o iba a participar en otro estudio clínico que implica un IP o dispositivo en investigación durante el transcurso de este estudio. Sin embargo, pueden inscribirse los pacientes

elegibles que participan en el estudio de profilaxis de rVWF (071301).

[000263] Enfermedad progresiva mortal y/o expectativa de vida inferior a 3 meses.

RESULTADOS:

- 5 [000264] La inscripción se realizó en 14 sitios de estudio en 10 países (Estados Unidos, Australia, Taiwán, Alemania, Rusia, España, Ucrania, Reino Unido, Italia, Turquía).

Tabla 6: Grupos de información

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

10 **Tabla 6: Participante: Estudio general**

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
INICIADO	15
COMPLETADO	14
NO COMPLETADO	1
Retiro por parte del sujeto	1

Tabla 7: Mediciones al inicio

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Total de participantes analizados	15
[Unidades: Participantes]	
Edad	40,0
[Unidades: Años]	(20,0 a 70,0)
Promedio (intervalo completo)	
Sexo: Femenino, Masculino	
[Unidades: Participantes]	
Recuento de participantes	
Femenino	8 53,3%
Masculino	7 46,7%

Resultados primarios: Resultado #1**Tabla 8: Mediciones de resultados**

- [000265] 1. Primario: Eficacia hemostática general según lo evaluado por el investigador (médico de hemofilia) [Período de tiempo: 24 horas después de la última infusión perioperatoria o al finalizar la visita del día 14 ($\pm$ 2 días), lo que ocurriera antes].

Tabla 9: Resultado primario #1

Tipo de medición	Primaria
Título de la medición	Eficacia hemostática general según lo evaluado por el investigador (médico de hemofilia)
Descripción de la medición	La eficacia hemostática se calificó en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna. Excelente: La hemostasia intraoperatoria y postoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Buena: La hemostasia intraoperatoria y postoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Moderada: La hemostasia intraoperatoria y postoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado, pero se mantuvo sin la necesidad de cambiar el concentrado de rVWF. Ninguna: El participante experimentó un sangrado descontrolado como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio del concentrado de rVWF.
Período de tiempo	24 horas después de la última infusión perioperatoria o al finalizar la visita del día 14 ($\pm$ 2 días), lo que ocurra antes

Descripción de la población Resultado #1

- 10 [000266] La cantidad de participantes con cirugía mayor, menor u oral y la cantidad de participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1, 2A, 2B, 2M y 3 se suman a la cantidad total de participantes analizados. Para el análisis se utilizó el conjunto de datos de análisis completo, que incluye a todos los participantes que recibieron un producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 10: Grupos de información Resultado #1

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía mayor.
Cirugía oral	Todos los participantes que se sometieron a cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 11: Valores medidos Resultado #1

[illegible]

Excelente	11 73,3%	4 100,0 %	7 70,0 %	0 0,0%	2 66,7%	1 50,0%	1 100,0%	0 0,0%	7 87,5%
Buena	4 26,7%	0 0,0%	3 30,0 %	1 100,0 %	1 33,3%	1 50,0%	0 0,0%	1 100,0%	1 12,5%
Moderada	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
Ninguna	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%

Resultado secundario: Resultado #2

[000267] 2. Secundario: Pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

5

Tabla 12: Resultado primario #2

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación
Descripción de la medición	La pérdida de sangre prevista fue estimada antes de la cirugía por el cirujano de la operación en función de un individuo hemostáticamente normal del mismo sexo, edad, estatura y comorbilidades que el participante. La evaluación de la pérdida de sangre real consistió en la pérdida de sangre estimada, lo que incluyó hisopos, toallas y succión durante el procedimiento, según el registro del anestesiólogo.
Período de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

Descripción de la población Resultado #2

[000268] Para la pérdida de sangre prevista la cantidad de participantes analizados fue de 14, ya que para un participante (incluido en el grupo de información de cirugía mayor) no se registró la pérdida de sangre prevista. Para el análisis se utilizó el conjunto de datos de análisis completo, que incluye a todos los participantes que recibieron un producto en investigación y tenían al menos 1 evaluación hemostática.

10

Tabla 13: Grupos de información Resultado #2

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía mayor.
Cirugía oral	Todos los participantes que se sometieron a cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 26: Valores medidos Resultado #2

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía mayor	Cirugía oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3
Participantes	15	4	10	1	3	2	1	1	8

analizados									
Pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación									
[Unidades: mL]									
Promedio (desvío estándar)									
Pérdida de sangre real									
Participantes analizados	15	4	10	1	3	2	1	1	8
Pérdida de sangre real	94,3 (177,88)	0,0 (0,00)	127,0 (209,27)	145,0 [1]	115,0 (103,32)	42,5 (53,03)	50,0 [1]	50,0 [1]	110,6 (240,87)
Pérdida de sangre prevista									
Participantes analizados	14	4	9	1	3	1	1	1	8
Pérdida de sangre prevista	106,1 (161,82)	2,5 (5,00)	152,8 (186,33)	100,0 [1]	100,0 (100,00)	10,0 [1]	50,0 [1]	50,0 [1]	134,4 (206,46)

[1] No es posible el desvío estándar ya que solo se analizó un participante.

5 No se proporcionan análisis estadísticos para la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación

Resultado secundario: Resultado #3

[000269] 3. Secundario: Pérdida de sangre real intraoperatoria con respecto a la pérdida de sangre prevista [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

Tabla 14: Resultado #3

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Pérdida de sangre real intraoperatoria con respecto a la pérdida de sangre prevista
Descripción de la medición	La pérdida de sangre real con respecto a la pérdida de sangre prevista se calculó como [pérdida de sangre real (mL)] dividido [pérdida de sangre prevista (mL) multiplicado por 100.
Período de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

Descripción de la población Resultado #3

- 5 [000270] La cantidad de participantes analizados fue de 11, ya que para 3 participantes la pérdida de sangre real y prevista fue cero y para 1 participante no se registró la pérdida de sangre prevista. Por lo tanto, no se pudo calcular la «pérdida de sangre real con respecto a la pérdida de sangre prevista». Se utilizó el conjunto de datos de análisis completo para el análisis de esta medición de resultados.

10

Tabla 15: Grupos de información Resultado #3

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía mayor.
Cirugía oral	Todos los participantes que se sometieron a cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.

Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.
-------------------------------------	--

Tabla 16: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía mayor	Cirugía oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3
Participantes analizados	11	1	9	1	2	1	1	1	6
Pérdida de sangre real intraoperatoria con respecto a la pérdida de sangre prevista	69,6 (44,77)	0,0 ^[1]	68,9 (34,48) ¹	145,0 ^[1]	122,5 (31,82)	50,0 ^[1]	100,0 ^[1]	100,0 ^[1]	45,0 (38,92)
[Unidades: Porcentaje]									
e]									
Promedio (desvío estándar)									

[1] No es posible el desvío estándar ya que solo se analizó un participante.

- 5 **No se proporcionan análisis estadísticos para la pérdida de sangre real intraoperatoria con respecto a la pérdida de sangre prevista**

Resultado secundario: Resultado #4

- 10 [000271] 4. Secundario: Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

Tabla 17: Resultado #4

Tipo de medición	Secundaria
Título de la	Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por

medición	el cirujano de la operación
Descripción de la medición	La eficacia hemostática se calificó en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna. Excelente: La pérdida de sangre intraoperatoria fue menor o igual a la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($\leq 100\%$). Buena: La pérdida de sangre intraoperatoria fue hasta 50 % mayor que la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal (101-150%). Moderada: La pérdida de sangre intraoperatoria fue más de 50 % con respecto a la pérdida de sangre máxima esperada para el tipo de procedimiento realizado en un sujeto hemostáticamente normal ($> 150\%$). Ninguna: Hemorragia descontrolada como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio de del régimen de reemplazo del factor de coagulación.
Período de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

Tabla 18: Descripción de la población Resultado #4

La cantidad de participantes con cirugía mayor, menor u oral y la cantidad de participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1, 2A, 2B, 2M y 3 se suman a la cantidad total de participantes analizados. Para el análisis se utilizó el conjunto de datos de análisis completo, que incluye a todos los participantes que recibieron un producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 19: Grupos de información Resultado #4

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía mayor.
Cirugía oral	Todos los participantes que se sometieron a cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.

Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 20: Valores medidos Resultado #4

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía a mayor	Cirugía oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3
Participantes analizados	15	4	10	1	3	2	1	1	8
Puntuación de la pérdida de sangre intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación [Unidades: Participantes] Recuento de participantes									
Excelente	13 86,7%	4 100,0%	8 80,0%	1 100,0%	3 100,0%	1 50,0%	1 100,0%	1 100,0%	7 87,5%
Buena	2 13,3%	0 0,0%	2 20,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 50,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 12,5%
Moderada	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
Ninguna	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%

5 No se proporcionan análisis estadísticos para la puntuación de la pérdida de sangre

intraoperatoria real con respecto a la prevista según lo evaluado por el cirujano de la operación

Resultado secundario: Resultado #5

- 5 [000272] 5. Secundario: Puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria según lo evaluado por el cirujano de la operación [Período de tiempo: Día 0 (al finalizar la cirugía)]

Tabla 21: Resultado #5

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria según lo evaluado por el cirujano de la operación
Descripción de la medición	La eficacia hemostática se calificó en una escala de excelente - buena - moderada - ninguna. Excelente: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue tan buena o mejor que la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Buena: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue probablemente tan buena como la esperada para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado en un sujeto hemostáticamente normal. Moderada: La hemostasia intraoperatoria lograda con rVWF con o sin ADVATE fue claramente menos que óptima para el tipo de procedimiento quirúrgico realizado, pero se mantuvo sin la necesidad de cambiar el concentrado de rVWF. Ninguna: El participante experimentó un sangrado descontrolado como resultado de una respuesta terapéutica inadecuada a pesar de la dosificación adecuada, lo que requirió un cambio del concentrado de rVWF.
Período de tiempo	Día 0 (al finalizar la cirugía)

Tabla 22: Descripción de la población Resultado #5

La cantidad de participantes con cirugía mayor, menor u oral y la cantidad de participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1, 2A, 2B, 2M y 3 se suman a la cantidad total de participantes analizados. Para el análisis se utilizó el conjunto de datos de análisis completo, que incluye a todos los participantes que recibieron un producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 23: Grupos de información Resultado #5

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Cirugía menor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía menor.
Cirugía mayor	Todos los participantes que se sometieron a cirugía mayor.
Cirugía oral	Todos los participantes que se sometieron a cirugía oral.
Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 1.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2A.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2B.
Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 2M.
Enfermedad de von Willebrand tipo 3	Todos los participantes con enfermedad de von Willebrand tipo 3.

Tabla 24: Valores medidos Resultado #5

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Cirugía menor	Cirugía mayor	Cirugía oral	Enfermedad de von Willebrand tipo 1	Enfermedad de von Willebrand tipo 2A	Enfermedad de von Willebrand tipo 2B	Enfermedad de von Willebrand tipo 2M	Enfermedad de von Willebrand tipo 3
Participantes analizados	15	4	10	1	3	2	1	1	8
Puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria según lo evaluado por el cirujano de la operación [Unidades: Participantes]									
Recuento de participantes									
Excelente	13 86,7%	4 100,0	8 80,0	1 100,0	3 100,0%	1 50,0%	1 100,0%	1 100,0%	7 87,5%

		%	%	%														
Buena	2	13,3%	0	0,0%	2	20,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	50,0%	0	0,0%	0	0,0%	1	12,5%
Moderada	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%
Ninguna	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%	0	0,0%

No se proporcionan análisis estadísticos para la puntuación de la eficacia hemostática intraoperatoria según lo evaluado por el cirujano de la operación

5 **Resultado secundario: Resultado #6**

[000273] 6. Secundario: Dosis diaria intraoperatoria y postoperatoria de rVWF ajustada según el peso con o sin ADVATE [Período de tiempo: Diariamente, desde el día de la cirugía hasta el día 14 después de la cirugía ($\pm$ 2 días)]

10 **Tabla 25: Resultado #6**

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Dosis diaria intraoperatoria y postoperatoria de rVWF ajustada según el peso con o sin ADVATE
Descripción de la medición	No se ingresó ningún texto.
Período de tiempo	Diariamente, desde el día de la cirugía hasta el día 14 después de la cirugía ($\pm$ 2 días)

Tabla 25: Descripción de la población Resultado #6

La cantidad de participantes analizados fue diferente para los puntos temporales de acuerdo con el tratamiento individual. Para el análisis se utilizó el conjunto de datos de análisis completo, que incluye a todos los participantes que recibieron un producto en investigación y tienen al menos 1 evaluación hemostática.

Tabla 40: Grupos de información Resultado #6

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 26: Valores medidos Resultado #6

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Dosis diaria intraoperatoria y postoperatoria de rVWF ajustada según el peso con o sin ADVATE	
[Unidades: IU/kg]	
Promedio (Rango intercuartílico)	
intraoperatoria	
Participantes analizados	1
intraoperatoria	18,1 (18,1 a 18,1)
día 1 después de la cirugía	
Participantes analizados	3
día 1 después de la cirugía	23,5 (16,9 a 47,2)
día 2 después de la cirugía	
Participantes analizados	11
día 2 después de la cirugía	42,3 (23,2 a 50,6)
día 3 después de la cirugía	
Participantes analizados	12
día 3 después de la cirugía	28,6 (20,6 a 48,9)
día 4 después de la cirugía	
Participantes analizados	9
día 4 después de la cirugía	33,9 (23,2 a 44,3)
día 5 después de la cirugía	
Participantes analizados	7

día 5 después de la cirugía	31,5 (18,8 a 47,2)
día 6 después de la cirugía	
Participantes analizados	5
día 6 después de la cirugía	23,2 (18,8 a 23,6)
día 7 después de la cirugía	
Participantes analizados	5
día 7 después de la cirugía	23,8 (23,6 a 50,8)
día 8 después de la cirugía	
Participantes analizados	7
día 8 después de la cirugía	33,9 (23,6 a 53,6)
día 9 después de la cirugía	
Participantes analizados	3
día 9 después de la cirugía	23,6 (16,3 a 53,6)
día 10 después de la cirugía	
Participantes analizados	3
día 10 después de la cirugía	23,6 (16,3 a 34,8)
día 11 después de la cirugía	
Participantes analizados	3
día 11 después de la cirugía	23,6 (16,3 a 53,6)
día 12 después de la cirugía	
Participantes analizados	4
día 12 después de la cirugía	29,3 (20,1 a 44,2)
día 13 después de la cirugía	
Participantes analizados	1
día 13 después de la cirugía	16,3 (16,3 a 16,3)
día 14 después de la cirugía	

Participantes analizados	2
día 14 después de la cirugía	25,5 (16,3 a 34,8)
día 15 después de la cirugía	
Participantes analizados	1
día 15 después de la cirugía	16,3 (16,3 a 16,3)

No se proporcionan análisis estadísticos para la dosis diaria intraoperatoria y postoperatoria de rVWF ajustada según el peso con o sin ADVATE

5 Resultado secundario: Resultado #7

[000274] 7. Secundario: Aparición de eventos adversos [Período de tiempo: Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

10 Tabla 27: Resultado #7

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Aparición de eventos adversos
Descripción de la medición	Se evaluaron los eventos adversos que surgieron del tratamiento (TEAE) y los eventos adversos graves que surgieron del tratamiento (TESAE).
Período de tiempo	Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)

Tabla 28: Descripción de la población Resultado #7

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, incluidos todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 29: Grupos de información Resultado #7

	Descripción
--	-------------

Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
---	---

Tabla 30: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Aparición de eventos adversos	
[Unidades: Eventos adversos]	
Eventos adversos que surgen del tratamiento (TEAE)	12
TEAE graves	1
TEAE relacionados con rVWF	0
TEAE relacionados con ADVATE	0
TEAE relacionados con rVWF y ADVATE	0
Eventos adversos graves que surgen del tratamiento (TESAE)	2
TESAE relacionados con rVWF	0
TESAE relacionados con ADVATE	0
TESAE relacionados con rVWF y ADVATE	0
TEAE que provocan la interrupción de rVWF	0
TEAE que provocan la interrupción de ADVATE	0
TEAE que provocan la interrupción del estudio	0
TEAE que provoan el fallecimiento	0
TEAE relacionados con el procedimiento del estudio	0
TESAE relacionados con el procedimiento del estudio	0

No se proporcionan análisis estadísticos para la aparición de eventos adversos

5

Resultado secundario: Resultado #8

[000275] 8. Secundario: Aparición de eventos trombóticos [Período de tiempo: Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)]

10

Tabla 31: Resultado #8

Tipo de medición	Secundaria
-------------------------	------------

Título de la medición	Aparición de eventos trombóticos
Descripción de la medición	Se evaluaron los eventos adversos que surgieron del tratamiento (TEAE) y los eventos adversos graves que surgieron del tratamiento (TESAE) para eventos trombóticos.
Período de tiempo	Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)

Tabla 32: Descripción de la población Resultado #8

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, incluidos todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 33: Grupos de información

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

5

Tabla 34: Valores medidos Resultado #8

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Aparición de eventos trombóticos [Unidades: Eventos adversos]	
TEAE trombóticos	2
TESAE trombóticos	1

No se proporcionan análisis estadísticos para la aparición de eventos trombóticos

10

Resultado secundario: Resultado #9

[000276] 9. Secundario: Aparición de reacciones alérgicas graves (por ejemplo, anafilaxia)
[Período de tiempo: Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)]

Tabla 35: Resultado #9

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Aparición de reacciones alérgicas graves (por ejemplo, anafilaxia)
Descripción de la medición	Se evaluaron los eventos adversos que surgieron del tratamiento (TEAE) y los eventos adversos graves que surgieron del tratamiento (TESAE) para reacciones alérgicas graves.
Período de tiempo	Desde la primera infusión del producto en investigación hasta la finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)

Tabla 36: Descripción de la población Resultado #9

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, incluidos todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 37: Grupos de información Resultado #9

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

5

Tabla 38: Valores medidos Resultado #9

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Aparición de reacciones alérgicas graves (por ejemplo, anafilaxia) [Unidades: Eventos adversos]	
TEAE de reacción alérgica grave	0
TESAE de reacción alérgica grave	0

No se proporcionan análisis estadísticos para la aparición de reacciones alérgicas graves (por ejemplo, anafilaxia)

10

Resultado secundario: Resultado #10

[000277] 10. Secundario: Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total al factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores del Factor VIII (FVIII)

[Período de tiempo: Las pruebas se realizaron durante todo el estudio en la detección, antes de la infusión de PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 después de la cirugía y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

5

Tabla 39: Descripción de la población Resultado #10

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total al factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores del Factor VIII (FVIII)
Descripción de la medición	Los participantes fueron tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.
Período de tiempo	Las pruebas se realizaron durante todo el estudio en la detección, antes de la infusión de PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 después de la cirugía y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía).

Tabla 40: Descripción de la población Resultado #10

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, incluidos todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación, para el análisis de esta medición de resultados.

10 **Tabla 41: Grupos de información Resultado #10**

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 55: Valores medidos Resultado #10

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total al	

factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores del Factor VIII (FVIII)	
[Unidades: Participantes]	
Recuento de participantes	
Desarrollo de anticuerpos inhibidores contra VWF	0
Desarrollo de anticuerpos de unión total a VWF	1
Desarrollo de anticuerpos inhibidores contra FVIII	0

No se proporcionan análisis estadísticos para la cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos inhibidores y de unión total al factor de von Willebrand (VWF) y anticuerpos inhibidores del Factor VIII (FVIII)

5

Resultado secundario: Resultado #11

[000278] 11. Secundario: Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina) [Período de tiempo: Las pruebas se realizaron durante todo el estudio en la detección, antes de la infusión de PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 después de la cirugía y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía)].

10

Tabla 42: Resultado #11

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina)
Descripción de la medición	Los participantes fueron tratados con factor de von Willebrand recombinante (rVWF) con o sin ADVATE.
Período de tiempo	Las pruebas se realizaron durante todo el estudio en la detección, antes de la infusión de PK, antes de la cirugía, después de la cirugía en caso de sangrado excesivo o sangrado inexplicable, el día 7 después de la cirugía y en la visita de finalización del estudio (es decir, 14 ($\pm$ 2) días después de la cirugía).

15

Tabla 43: Descripción de la población Resultado #11

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de seguridad, incluidos todos los participantes que recibieron cualquier cantidad del producto en investigación, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 44: Grupos de información Resultado #11

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 59: Valores medidos Resultado #11

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	15
Cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina)	0
[Unidades: Participantes]	
Recuento de participantes	

5

No se proporcionan análisis estadísticos para la cantidad de participantes que desarrollaron anticuerpos contra proteínas de ovario de hámster chino (CHO), inmunoglobulina G (IgG) de ratón o furina recombinante (rFurina)

10

Resultado secundario: Resultado #12

[000279] 12. Secundario: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión (AUC 0-72 h/dosis) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

15

Tabla 45: Resultado #12

Tipo de medición	Secundaria
-------------------------	------------

Título de la medición	Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión (AUC 0-72 h/dosis)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50±5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El área bajo la curva de concentración en plasma/tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión se calculó mediante el uso de la regla trapezoidal lineal. Para el cálculo de la AUC(0-72h), los niveles a las 72 horas se interpolaron/extrapolaron de forma lineal desde los 2 puntos temporales de muestreo más cercanos. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación de FVIII (FVIII:C)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

Tabla 46: Descripción de la población Resultado #12

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 47: Grupos de información Resultado #12

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

5

Tabla 48: Valores medidos Resultado #12

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión (AUC 0-72 h/dosis) [Unidades: horas*IU/dL] Promedio geométrico (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	

Participantes analizados	11
VWF:RCo	31,91 (37,5%)
VWF:Ag	
Participantes analizados	11
VWF:Ag	57,08 (25,6%)
VWF:CB	
Participantes analizados	11
VWF:CB	63,91 (29,4%)
VWF:Ac	
Participantes analizados	11
VWF:Ac	54,61 (28,1%)
FVIII:C	
Participantes analizados	5
FVIII:C	67,49 (31,1%)

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo de 0 a 72 horas después de la infusión (AUC 0-72 h/dosis)

5

Resultado secundario: Resultado #13

[000280] 13. Secundario: Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo desde el momento 0 a infinito (AUC 0- ∞ /dosis) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

10

Tabla 49: Resultado #13

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo desde el momento 0 a infinito ($AUC_{0-\infty}/dosis$)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. rea bajo la curva de concentración en plasma/tiempo de desde el momento 0 a infinito y el área bajo la curva del primer momento desde el momento 0 a infinito se calculó como la suma de AUC o AUMC desde el momento 0 hasta el momento de la última concentración cuantificable más una corrección del área de cola calculada como C_t/λ_z y $C_t/\lambda_z(t+1/\lambda_z)$, respectivamente, donde C_t es la última concentración cuantificable, t es el momento de la última concentración cuantificable y λ_z es la constante de velocidad de disposición o terminal. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac), actividad de coagulación de FVIII (FVIII:C)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

Tabla 50: Descripción de la población Resultado #13

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 51: Grupos de información Resultado #13

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

5

Tabla 52: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11

Farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo desde el momento 0 a infinito (AUC 0-∞/dosis)

[Unidades: horas*IU/dL]

Promedio geométrico (coeficiente geométrico de variación)

VWF:RCo	
Participantes analizados	11
VWF:RCo	34,43 (43,3%)
VWF:Ag	
Participantes analizados	11
VWF:Ag	68,87 (31,5%)
VWF:CB	
Participantes analizados	11
VWF:CB	71,82 (34,1%)
VWF:Ac	
Participantes analizados	11
VWF:Ac	61,90 (32,2%)
FVIII:C	
Participantes analizados	3
FVIII:C	75,00 (30,9%)

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Área bajo la curva de concentración en plasma en función del tiempo desde el momento 0 a infinito (AUC 0-∞/dosis)

5 **Resultado secundario: Resultado #14**

[000281] 14. Secundario: Farmacocinética: Tiempo de residencia promedio (MRT) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas].

Tabla 53: Resultado #14

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Farmacocinética: Tiempo de residencia promedio (MRT)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El tiempo de residencia promedio se calculó como el área bajo la curva del primer momento desde el momento 0 a infinito dividido el área bajo la curva desde el momento 0 a infinito menos T/2, donde T es la duración de la infusión. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

Tabla 54: Descripción de la población Resultado #14

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

5 Tabla 55: Grupos de información Resultado #14

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 56: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Tiempo de residencia promedio (MRT) [Unidades: Horas] Promedio geométrico (coeficiente geométrico de variación)	

VWF:RCo	22,69 (41,3%)
VWF:Ag	37,92 (28,4%)
VWF:CB	29,35 (31,1%)
VWF:Ac	29,75 (28,6%)

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Tiempo de residencia promedio (MRT)

5 **Resultado secundario: Resultado #15**

[000282] 15. Secundario: Farmacocinética: Eliminación (CL) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas].

10

Tabla 57: Resultado #15

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Farmacocinética: Eliminación (CL)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. La eliminación se calculó como la dosis (IU/kg) dividido por el área bajo la curva desde el momento 0 a infinito. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.

Tabla 58: Descripción de la población Resultado #15

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 59: Grupos de información Resultado #15

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

5

Tabla 60: Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Eliminación (CL)	
[Unidades: dL/hora/kg]	
Promedio geométrico (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	0,02904 (43,3%)
VWF:Ag	0,01452 (31,5%)
VWF:CB	0,01392 (34,1%)
VWF:Ac	0,01616 (32,2%)

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Eliminación (CL)

10

Resultado secundario: Resultado #16

[000283] 16. Secundario: Farmacocinética: Recuperación gradual (IR) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 ($\pm$ 5) minutos, 60 ($\pm$ 5) minutos, 6 ($\pm$ 1) horas, 12 ($\pm$ 1) horas, 24 ($\pm$ 2) horas, 48 ($\pm$ 2) horas y 72 ($\pm$ 2) horas.]

Tabla 61: Resultado #16

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Farmacocinética: Recuperación gradual (IR)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. La recuperación gradual se calculó como $(C_{\text{máx}} \text{ menos } C_{\text{preinfusión}})$ dividido por la dosis (IU/kg), donde kg se refiere al peso corporal al momento de la dosificación y $C_{\text{máx}}$ fue la concentración máxima observada antes de la corrección para los valores previos a la infusión. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

Tabla 77: Descripción de la población Resultado #16

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

5

Tabla 62: Grupos de información Resultado #16

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Tabla 63: Valores medidos Resultado #16

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Recuperación gradual (IR)	

[Unidades: IU/dL]	
Promedio (desvío estándar)	
VWF:RCo	1,961 (0,45445)
VWF:Ag	1,991 (0,38395)
VWF:CB	2,780 (0,56640)
VWF:Ac	2,635 (0,38050)

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Recuperación gradual (IR)

Resultado secundario: Resultado #17

- 5 [000284] 17. Secundario: Farmacocinética: Semivida de la fase de eliminación ($Y_{1/2}$) [Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas].

Tabla 64: Resultado #17

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Farmacocinética: Semivida de la fase de eliminación ($Y_{1/2}$)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. La semivida terminal o de disposición ($T_{1/2}$) se calculó como $\ln 2 / \lambda_z$, donde λ_z es la constante de velocidad de eliminación terminal como se calcula en WinNonlin NCA mediante el uso de al menos tres concentraciones cuantificables. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

Tabla 65: Descripción de la población Resultado #17

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

Tabla 66: Grupos de información Resultado #17

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Valores medidos

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Semivida de la fase de eliminación (Y1/2)	
[Unidades: Horas]	
Promedio geométrico (coeficiente geométrico de variación)	
VWF:RCo	16,52 (42,7%)
VWF:Ag	26,88 (26,5%)
VWF:CB	21,07 (33,2%)
VWF:Ac	22,19 (28,5%)

5

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Semivida de la fase de eliminación (Y1/2)

Resultado secundario: Resultado #18

- 10 [000285] 18. Secundario: Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)
[Período de tiempo: Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas].

Tabla 67: Resultado #18

Tipo de medición	Secundaria
Título de la medición	Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)
Descripción de la medición	Esta evaluación solo fue necesaria para los sujetos sometidos a cirugía mayor. Los sujetos recibieron una infusión de PK en una dosis de 50 ± 5 IU/kg de rVWF:RCo dentro de los 42 días previos a la cirugía. El Vss se calculó como la eliminación multiplicado con el tiempo residencia promedio. Se realizó el análisis de PK para los siguientes analitos: actividad del cofactor de VWF y ristocetina (VWF:RCo), actividad del antígeno de VWF (VWF:Ag), actividad de unión a colágeno de VWF (VWF:CB), actividad de VWF medida con el ensayo INNOVANCE VWF Ac (VWF:Ac)
Período de tiempo	Las mediciones de PK se realizaron dentro de los 30 minutos previos a la infusión y después de la infusión a los 30 (± 5) minutos, 60 (± 5) minutos, 6 (± 1) horas, 12 (± 1) horas, 24 (± 2) horas, 48 (± 2) horas y 72 (± 2) horas.

Tabla 68: Descripción de la población Resultado #18

Se utilizó el conjunto de datos de análisis de PK, incluidos todos los participantes que se sometieron a evaluación de PK con datos recopilados en los puntos temporales relevantes, para el análisis de esta medición de resultados.

5 Tabla 69: Grupos de información Resultado #18

	Descripción
Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)	Participantes de cirugía tratados con el factor de von Willebrand recombinante (rVWF)

Valores medidos Resultado #18

	Factor de von Willebrand recombinante (rVWF)
Participantes analizados	11
Farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss) [Unidades: dL/kg] Promedio geométrico (coeficiente geométrico de variación)	

VWF:RCo	0,6591 (28,8%)
VWF:Ag	0,5506 (18,4%)
VWF:CB	0,4086 (24,0%)
VWF:Ac	0,4806 (21,5%)

No se proporcionan análisis estadísticos para la farmacocinética: Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)

- 5 [000286] Los ejemplos anteriores se proporcionan para ofrecer a los expertos en la técnica una descripción y divulgación completas de cómo elaborar y usar las modalidades de las composiciones, sistemas y métodos de la invención, y no se pretende que limiten el alcance de los que los inventores consideran su invención. Se pretende que las modificaciones de los modos descritos anteriormente para poner en práctica la invención que son obvias para los expertos se encuentren dentro del alcance
- 10 de las siguientes reivindicaciones. Todas las patentes y las publicaciones mencionadas en la memoria descriptiva indican los niveles de capacidad los expertos en la técnica a la que se refiere la invención. Todas las referencias citadas en esta descripción se incorporan mediante referencia en la misma medida que si cada referencia se hubiera incorporado mediante referencia en su totalidad de forma individual.
- 15 [000287] Todos los encabezados y designaciones de secciones se usan solo a efectos de claridad y referencia y no deben considerarse limitantes de ninguna manera. Por ejemplo, los expertos en la técnica apreciarán la utilidad de combinar diversos aspectos de diferentes encabezados y secciones, según corresponda, de acuerdo con el espíritu y el alcance de la invención descrita en la presente.
- 20 [000288] Todas las referencias citadas en la presente se incorporan a la presente mediante referencia en su totalidad y a todos los efectos como si se hubiese indicado específica e individualmente que cada publicación, patente, solicitud de patente u otra referencia individual se incorporara en su totalidad mediante referencia a todos los efectos.
- [000289] Se pueden realizar varias modificaciones y variaciones de esta solicitud sin apartarse de
- 25 su espíritu y alcance, como resultará evidente para los expertos en la técnica. Las modalidades y ejemplos específicos descritos en la presente se ofrecen a modo de ejemplo únicamente, y la solicitud

estará limitada únicamente por los términos de las reivindicaciones adjuntas, junto con el alcance completo de equivalentes que corresponden a dichas reivindicaciones.