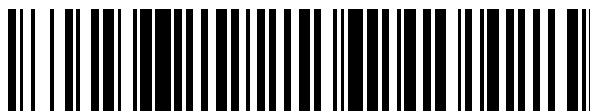


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 700 583**

51 Int. Cl.:

A61K 38/21 (2006.01)
A61K 38/37 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C12Q 1/68 (2008.01)
C07K 14/755 (2006.01)
A61K 47/50 (2007.01)
C12Q 1/6883 (2008.01)
A61K 47/68 (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.01.2013** **PCT/US2013/021332**
87 Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013** **WO13106789**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.01.2013** **E 13735995 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.08.2018** **EP 2802668**

54 Título: **Procedimientos para reducir la inmunogenicidad contra el Factor VIII en individuos sometidos a terapia con Factor VIII**

30 Prioridad:

12.01.2012 US 201261586103 P
06.07.2012 US 201261668961 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.02.2019

73 Titular/es:

BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (50.0%)
225 Second Avenue
Waltham, MA 02451, US y
PUGET SOUND BLOOD CENTER (50.0%)

72 Inventor/es:

JIANG, HAIYAN;
LIU, TONGYAO;
KRISHNAMOORTHY, SRIRAM;
JOSEPHSON, NEIL y
GLENN, PIERCE

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 700 583 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimientos para reducir la inmunogenicidad contra el Factor VIII en individuos sometidos a terapia con Factor VIII

Campo de la descripción

En términos generales, la presente descripción se refiere al campo de los productos terapéuticos para trastornos hemostáticos.

Antecedentes de la técnica

La hemofilia A es un trastorno hemorrágico ligado a X, causado por mutaciones y/o eliminaciones en el gen del Factor VIII (FVIII) que producen una deficiencia de actividad de FVIII (Peyvandi F. y col., *Haemophilia* 12:82-89 (2006)). La enfermedad se caracteriza por la hemorragia espontánea y el sangrado excesivo después de un traumatismo. Con el tiempo, la hemorragia repetida en los músculos y las articulaciones, que a menudo comienza en la primera infancia, produce artropatía hemofílica y daño articular irreversible. Este daño es progresivo y puede conducir a una movilidad de las articulaciones gravemente limitada, atrofia muscular y dolor crónico (Rodríguez-Merchan, E.C., *Semin. Thromb. Hemost.* 29:87-96 (2003)).

El dominio A2 es necesario para la actividad procoagulante de la molécula del FVIII. Los estudios muestran que el FVIII porcino tiene una actividad procoagulante seis veces mayor que el FVIII humano (Lollar & Parker, *J. Biol. Chem.* 266:12481-12486 (1991)), y que la diferencia en la actividad coagulante entre el FVIII humano y porcino parece estar basada en una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre uno o más residuos en los dominios A2 humano y porcino (Lollar, P., y col., *J. Biol. Chem.* 267:23652-23657(1992)).

El tratamiento de la hemofilia A es mediante terapia de reemplazo dirigida a la restauración de la actividad de FVIII a niveles normales del 1 al 5 % para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M., y col., *N. Engl. J. Med.* 344:1773-1779 (2001) p. ej.

Los productos de FVIII derivado de plasma (pdFVIII) y de FVIII humano recombinante (rFVIII) se utilizan para el tratamiento (terapia a demanda) y prevención (terapia de profilaxis) de episodios hemorrágicos. rFVIII se desarrolló para reducir el riesgo de transmisión de patógenos a través de la sangre tras la contaminación generalizada de productos de plasma con virus de VIH y hepatitis, y para asegurar un suministro adecuado del producto de FVIII. No obstante, la protección hemostática con los productos de FVIII actuales está limitada temporalmente debido a una semivida ($t_{1/2}$) corta de aproximadamente 8 - 12 horas, requiriéndose la administración de inyecciones profilácticas tres veces por semana o día por medio para la mayor parte de los pacientes con el fin de mantener los niveles de FVIII por encima del 1 %, un nivel que se ha establecido como de protección contra la mayoría de los episodios hemorrágicos espontáneos. Manco-Johnson y col., *New Engl J Med.* 357(6):535-44 (2007).

Numerosos estudios han demostrado que, incluso con dosis elevadas, la terapia a demanda no es eficaz para prevenir la artropatía. Aledort L. y col., *J Intern Med.* 236:391-399 (1994); Petrini P. y col., *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 13:280-287 (1991). Los beneficios de la terapia profiláctica se han demostrado en numerosos estudios clínicos. Aznar J. y col., *Haemophilia* 6(3):170-176 (2000), Feldman B. y col., *J Thromb Haemost.* 4:1228-1236 (2006), Kreuz W. y col., *Haemophilia* 4:413-417 (1998), Liesner R. y col., *B J Haem.* 92:973-978 (1996), Ljung R., *Haemophilia.* 4(4):409-412 (1998), Löfquist T. y col., *J Intern Med* 241:395-400 (1997), Nilsson I. y col., *B. J Int Med* 232:25-32 (1992), Risebrough N. y col., *Haemophilia.* 14:743-752 (2008), Van Den Berg H. y col., *Haemophilia* 9 (Suppl. 1):27-31 (2003), Van Den Berg H. y col., *Haematologica* 89(6):645-650 (2004) y Manco-Johnson y col., *supra*, establecieron que los niños que comenzaban profilaxis primaria después de su primer hemorragia articular presentaban significativamente menos hemorragias y menos daño articular que los niños tratados a demanda.

En comparación con el tratamiento a demanda, la terapia profiláctica también disminuye la discapacidad, la tasa de hospitalización y el tiempo de ausencia del colegio o del trabajo; Aznar J. y col., *Haemophilia* 6(3):170-176 (2000), Molho P. y col., *Haemophilia* 6(1):23-32 (2000) y mejora la calidad de vida para los pacientes y sus familias. Coppola A. y col., *Blood Transfus.* 6(2): 4-11 (2008). Sin embargo, la terapia profiláctica a menudo requiere el uso de dispositivos de acceso venoso central en niños, con los consiguientes riesgos esperados de infección, sepsis y trombosis. Además, a pesar de los beneficios, la aceptación de la profilaxis y su cumplimiento disminuye con la edad, en parte debido a las molestias y la invasividad. Geraghty S. y col., *Haemophilia* 12:75-81 (2006), Hacker M. y col., *Haemophilia* 7(4):392-396 (2001). Por lo tanto, un producto de rFVIII con una $t_{1/2}$ en plasma prolongada sería potencialmente beneficioso. Lillicrap D., *Current Opinion in Hematology* 17:393-397 (2010).

La reducción de la mortalidad, la prevención del daño articular y la mejora de la calidad de vida han sido logros importantes debido al desarrollo de pdFVIII y rFVIII. La protección prolongada contra la hemorragia representaría otro avance clave en el tratamiento de pacientes con hemofilia A. Sin embargo, hasta la fecha, no se han desarrollado productos que permitan una protección hemostática prolongada. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de procedimientos mejorados para tratar la hemofilia debido a la deficiencia de FVIII que sean más tolerables, de mayor duración y más eficaces que las terapias actuales.

Asimismo, 15-30 % de pacientes no tratados previamente desarrollan anticuerpos anti-FVIII neutralizantes (inhibidores) después de las transfusiones con productos de FVIII. Se han contemplado diversas técnicas para evitar dichas respuestas inmunitarias. Estas técnicas incluyen protocolos de tolerancia de dosis elevadas, uso de péptidos señuelo que imitan el anticuerpo anti-FVIII, sortear el reconocimiento inmune con moléculas híbridas de FVIII humano/porcino, neutralizar linfocitos T CD4 reactivos al FVIII con anticuerpos anticlonotípicos, utilizar epítomos CD4 universales, y bloquear la coestimulación de CTLA-4-Ig o anti-CD40L. Véase, p. ej., Lei y col., *Transfusion Medicine* 105: 4865-4870 (2005). También se ha estudiado la presentación de FVIII por células inmunes para inducir tolerancia. Por ejemplo, Lei y col. descubrieron que la presentación de dominios de FVIII en un esqueleto de Ig en células B prevenía o reducía anticuerpos. *Id.* Asimismo, Qadura y col. descubrieron que la presentación tolerogénica de FVIII utilizando células dendríticas inmaduras puede reducir la inmunogenicidad. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 6: 2095-2104 (2008). Sin embargo, dichos procedimientos son costosos, complicados (p. ej., al requerir coadministración de otros productos terapéuticos en combinación con FVIII o administración de células enteras en vez de proteínas relativamente simples), probablemente produzcan efectos secundarios no deseados, y/o resultan ineficaces. El documento US2011/0182896 describe que en pacientes tratados con polipéptidos quiméricos de factor de coagulación-Fc se ha disminuido el riesgo de desarrollar anticuerpos inhibidores. En consecuencia, sigue existiendo la necesidad de encontrar procedimientos para tratar la hemofilia provocada por deficiencia de FVIII que sean eficaces en pacientes que desarrollan respuestas inhibitorias.

Breve resumen

La invención se define en las reivindicaciones. La presente descripción proporciona procedimientos para administrar Factor VIII (FVIII) que mejoran la tolerancia inmunitaria. Los procedimientos comprenden administrar un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc (rFVIII-Fc) a un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto desarrollaría una respuesta inmunitaria inhibitoria si se le administrara una dosis equivalente de un polipéptido constituido por la porción de FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto ha desarrollado una respuesta inmunitaria inhibitoria o una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. La administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc puede ser suficiente para tratar una afección hemorrágica y para inducir tolerancia inmunitaria a FVIII. La administración puede ser profiláctica. En algunas realizaciones, la administración disminuye la incidencia del sangrado espontáneo o previene el sangrado.

La respuesta inmunitaria puede comprender anticuerpos inhibidores anti-FVIII. La titulación del anticuerpo es al menos 0,6 unidades Bethesda (UB), al menos 1,0 UB, o al menos 5,0 UB. La respuesta inmunitaria también puede comprender una respuesta inmunitaria mediada por células, por ejemplo, liberación de una citocina. La citocina puede ser IL-12, IL-4, o TNF- α , por ejemplo. La respuesta inmunitaria puede producir síntomas clínicos tales como mayor tendencia a la hemorragia, consumo elevado de FVIII, falta de respuesta a terapia con FVIII, menor eficacia de terapia con FVIII, y/o semivida más breve de FVIII.

Los sujetos con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria incluyen aquellos que presentan una mutación, eliminación o reordenamiento en un gen de FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto no produce una proteína de FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto tiene hemofilia grave. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un familiar (p. ej., un padre, primo, tía, tío, abuelo, hijo o nieto) que ha desarrollado una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII o a otra proteína terapéutica. En algunas realizaciones, el sujeto recibe de manera simultánea o recibió previamente una terapia que aumenta la función inmunitaria cuando se administra el FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto está recibiendo terapia con interferón o terapia antiviral en combinación con FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria tiene un polimorfismo genético asociado con un nivel aumentado de citocina, tal como TNF- α aumentado o IL10 aumentado. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria tiene un polimorfismo de TNF- α -308G>A o alelo 134 del microsatélite IL10G.

En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII no se ha expuesto previamente a FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta

inmunitaria inhibitoria al FVIII se ha expuesto a FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII ha tenido menos de 150, menos de 50 o menos de 20 días de exposición a FVIII.

- 5 En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII no ha desarrollado previamente una respuesta inmunitaria a FVIII o a otra proteína terapéutica. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII ha desarrollado previamente una respuesta inmunitaria a FVIII (pdFVIII o rFVIII) o a otra proteína terapéutica. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII ha desarrollado previamente una respuesta
- 10 inmunitaria a un producto de FVIII tal como ADVATE[®], RECOMBINATE[®], KOGENATE FS[®], HELIXATE FS[®], XYNTHA[®]/REFACTO AB[®], HEMOFIL-M[®], MONARC-M[®], MONOCLATE-P[®], HUMATE-P[®], ALPHANATE[®], KOATE-DVI[®], o HYATE:C[®]. En algunas realizaciones, los productos de FVIII son un FVIII de longitud completa, un FVIII maduro o un FVIII con dominio B eliminado.
- 15 Los procedimientos para administrar FVIII proporcionados en el presente documento pueden inducir tolerancia inmunitaria. En algunas realizaciones, la administración reduce el número de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto, la titulación de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto y/o el nivel de una citocina (p. ej., IL-12, IL-4, o TNF) en el sujeto en comparación con el número, titulación o nivel previo a la administración. En algunas realizaciones, la administración reduce el número de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto, la titulación de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto y/o el nivel
- 20 de una citocina (p. ej., IL-12, IL-4, o un TNF) en el sujeto en comparación con el número, titulación o nivel resultante de un tratamiento previo con un polipéptido constituido por un polipéptido de FVIII. En algunas realizaciones, la administración reduce el número de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto, la titulación de anticuerpos anti-FVIII en el sujeto y/o el nivel de una citocina (p. ej., IL-12, IL-4, o TNF) en el sujeto en comparación con el número, titulación o nivel que resultaría de la administración de un polipéptido constituido por un polipéptido de FVIII al sujeto.
- 25 Los procedimientos comprenden la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII o una porción Fc. La porción de FVIII puede ser FVIII humano, FVIII de longitud completa o FVIII que contiene una eliminación completa o parcial del dominio B. La porción de FVIII puede ser un polipéptido biológicamente activo, p. ej., un polipéptido de FVIII con actividad de coagulación. La porción de FVIII puede ser al menos 90 % idéntica, 95 %
- 30 idéntica, o idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6). La porción de FVIII también puede ser al menos 90 % idéntica, 95 % idéntica, o idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6). La porción Fc puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2
- 35 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

El polipéptido quimérico puede ser en forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido asociado con el polipéptido quimérico. El segundo polipéptido puede estar compuesto esencialmente por o estar compuesto por un Fc.

- 40 En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden la administración de un polipéptido quimérico a una dosis específica. La dosis puede ser, por ejemplo, una dosis de 10-100 UI/kg, una dosis de 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 UI/kg, o una dosis de 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 UI/kg.
- 45 En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico se administra a un sujeto con una afección hemorrágica. La afección hemorrágica puede ser, por ejemplo, un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, traumatismo de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica,
- 50 fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal o hemorragia en la vaina del iliopsoas. En algunas realizaciones, el trastorno hemorrágico de la coagulación es hemofilia A.

- La presente descripción también proporciona un procedimiento para administrar un factor de coagulación a un sujeto
- 55 con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al factor de coagulación que comprende administrar al sujeto un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc. También se proporciona un procedimiento para inducir la tolerancia inmunitaria a un factor de coagulación en un sujeto, donde el sujeto es un feto, comprendiendo el procedimiento administrar a la madre del feto un polipéptido que comprende un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc.

60

En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico disminuye la incidencia del sangrado espontáneo o previene el sangrado.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmunitaria al FVIII en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc. El sujeto ha desarrollado una respuesta inmunitaria inhibitoria al Factor VIII.

También se proporciona un procedimiento para prevenir o inhibir el desarrollo de un inhibidor de FVIII, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para inducir tolerancia inmunitaria a un factor de coagulación en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc. El sujeto ha desarrollado una respuesta inmunitaria inhibitoria al factor de coagulación.

También se proporciona un procedimiento para prevenir o inhibir el desarrollo de un inhibidor de un factor de coagulación que comprende administrar a un sujeto que lo necesita un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc.

En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano y el procedimiento de administrar FVIII es un procedimiento para tratar una afección hemorrágica en dicho sujeto. En algunas realizaciones, la afección hemorrágica se produce por un trastorno de coagulación de la sangre. En algunas realizaciones, el trastorno de coagulación de la sangre es hemofilia o enfermedad de von Willebrand. En algunas realizaciones, el trastorno de coagulación de la sangre es hemofilia A. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una afección que requiere tratamiento profiláctico o a demanda, tal como un episodio hemorrágico. En algunas realizaciones, el sujeto es un paciente que padece un trastorno hemorrágico o que se espera necesite tal tratamiento.

La presente descripción también proporciona un kit que comprende: (a) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc o una porción compañera de unión a FcRn y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) instrucciones para administrar la composición a un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación. El polipéptido quimérico comprende una porción de FVIII. En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico es un híbrido monómero-dímero de FVIII. En algunas realizaciones, las instrucciones además incluyen al menos una etapa para identificar un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación. En algunas realizaciones, la etapa para identificar los sujetos que necesitan tolerancia inmunitaria incluye uno o más del grupo constituido por: (a) identificar un sujeto que tiene una mutación o eliminación en el gen del factor de coagulación; (b) identificar un sujeto que tiene un reordenamiento en el gen del factor de coagulación; (c) identificar un sujeto que tiene un familiar que ha desarrollado previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación; (d) identificar un sujeto que recibe terapia con interferón; (e) identificar un sujeto que recibe terapia antiviral; (f) identificar un sujeto que tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación que está ligado a un riesgo aumentado de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria; y (g) dos o más combinaciones de estos. En algunas realizaciones, la mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación comprende una o más mutaciones seleccionadas de entre el grupo constituido por: (a) un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado; (b) un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada; (c) un polimorfismo genético asociado con un CTLA-4 disminuido; (d) una mutación en las moléculas CMH de clase II DR15 o DQB0602; y (e) tiene dos o más combinaciones de estos.

En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente descripción además comprenden medir el nivel de una respuesta inmunitaria inhibitoria después de la administración. En algunas realizaciones, los procedimientos de la presente descripción además comprenden comparar el nivel de la respuesta inmunitaria inhibitoria después de la administración con el nivel de la respuesta inmunitaria inhibitoria antes de la administración. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inhibitoria es el desarrollo de anticuerpos contra el FVIII. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inhibitoria es la secreción de citocina.

Breve descripción de los dibujos/figuras

La Figura 1 muestra una representación esquemática del monómero rFVIII_{IFc}.

Las Fig. 2A y 2B muestran un análisis SDS-PAGE con reducción y sin reducción de rFVIII_{IFc} (procesado o monocatenario). La Fig. 2C muestra la estructura de rFVIII_{IFc} analizada mediante CL/UV y CL/EM.

Las Fig. 3A, 3B y 3C muestran la caracterización bioquímica de rFVIII-Fc. La Fig. 3A muestra la activación del Factor X (FX) como una función de concentración de vesículas fosfolipídicas. La Fig. 3B muestra la activación del FX como una función de concentración de FX. La Fig. 3C muestra la activación del FX como una función de concentración de FIX (FIXa) activado.

5 La Fig. 4 muestra la activación del FX después de la escisión mediante Proteína C activada.

Las Fig. 5A, 5B, 5C y 5D muestran la actividad media grupal observada de FVIII ($\pm$ EE) respecto de perfiles temporales. Los perfiles se ordenan por nivel de dosis, agrupados por compuesto versus tiempo. La Fig. 5A corresponde a un ensayo en una etapa con una dosis de 25 UI/kg. La Fig. 5B corresponde a un ensayo en una etapa con una dosis de 65 UI/kg. La Fig. 5C corresponde a un ensayo cromogénico con una dosis de 25 UI/kg. La

10 Fig. 5D corresponde a un ensayo cromogénico con una dosis de 65 UI/kg.

Las Fig. 6A y 6B muestran la actividad media grupal observada ($\pm$ EE) de FVIII respecto de perfiles temporales, agrupada por nivel de dosis y compuesto versus tiempo. La Fig. 6A corresponde a un ensayo en una etapa. La Fig. 6B corresponde a un ensayo cromogénico.

Las Fig. 7A, 7B y 7C muestran la eficacia *in vivo* de FVIII-Fc monocatenario (rFVIII-Fc MC) en un modelo de transección de vena caudal de ratón con hemofilia A (HemA). La Fig. 7A muestra la relación entre dosis de FVIII y protección. Las dosis de rFVIII-Fc monocatenario se muestran como cuadrados, y las dosis de rFVIII-Fc procesado se muestran como círculos. La Fig. 7B muestra el porcentaje de supervivencia después de la transección de vena caudal y a continuación de la administración de 4,6 μ g/kg, 1,38 μ g/kg, y 0,46 μ g/kg de rFVIII-Fc o rFVIII-Fc MC. La Fig. 7C muestra el porcentaje de no sangrantes después de de transección de vena caudal, a continuación de la

20 administración de 4,6 μ g/kg (círculo negro o triángulo invertido), 1,38 μ g/kg (triángulo o diamante), y 0,46 μ g/kg (cuadrado y círculo gris) de rFVIII-Fc o rFVIII-Fc MC, respectivamente.

La Fig. 8 representa el diseño de estudio del estudio de fase 1/2a, con dosis crecientes, diseño secuencial para evaluar la seguridad y PK de rFVIII-Fc en comparación con ADVATE[®] después de una única dosis intravenosa de o bien 25 UI/kg (Cohorte A de dosis baja) o 65 UI/kg (Cohorte B de dosis alta).

25 La Fig. 9 muestra la correlación de la actividad de rFVIII mediante ensayos de etapa única (aPTT) y cromogénico. Los resultados miden la actividad de FVIII (UI/mL) a continuación de una inyección de ADVATE[®] ($\blacklozenge$) y rFVIII-Fc ($\square$).

Las Fig. 10A y 10B muestran perfiles farmacocinéticos de actividad de FVIII en plasma medios grupales para cohortes de dosis baja y de dosis alta. Las actividades de FVIII en plasma (ensayo aPTT de etapa única) versus curva de tiempo después de inyección intravenosa única de rFVIII-Fc o ADVATE[®] se muestran para 25 UI/kg (cohorte de dosis baja, n=6) (Fig. 10A); y 65 UI/kg (cohorte de dosis alta, n=10 [ADVATE[®]]; n=9 [rFVIII-Fc]) (Fig. 10B). Los

30 resultados presentados son $\pm$ error estándar de la media (EEM) medio grupal.

Las Fig. 11A y 11B muestran el efecto de niveles del antígeno del VWF de acuerdo con CI y $t_{1/2}$ de actividad de FVIII después de una inyección de ADVATE[®] o rFVIII-Fc. Se muestran la correlación entre los niveles del antígeno del VWF y la CI con ajuste de peso de ADVATE[®] ($R^2=0,5415$ y $p=0,0012$) y rFVIII-Fc ($R^2=0,5492$ y $p=0,0016$) (Fig. 11A);

35 y el $t_{1/2}$ de ADVATE[®] ($R^2=0,7923$ y $p<0,0001$) y rFVIII-Fc ($R^2=0,6403$ y $p=0,0003$) (Fig. 11B). Cada punto representa un sujeto individual.

Las Fig. 12A y 12B muestran resultados de ROTEM[®] en sangre entera *ex vivo* para sujetos individuales después de una inyección de ADVATE[®] o rFVIII-Fc. La sangre se tomó de sujetos antes y después de tratamiento con dosis de 25 UI/kg de ADVATE[®] y rFVIII-Fc (Fig. 12A); y 65 UI/kg de ADVATE[®] y rFVIII-Fc en puntos de tiempo determinados

40 (Fig. 12B). El tiempo de coagulación se determinó mediante NATTEM iniciado con Ca^{++} con un instrumento ROTEM[®]. Los resultados presentados son $\pm$ error estándar de la media (EEM) medio de lecturas de regiones triplicadas para cada muestra individual.

Las Fig. 13A y 13B comparan la actividad de rFVIII-Fc y rFVIII-Fc MC en un ensayo de generación de trombina (EGT). En la Fig. 13A se comparó el potencial endógeno de la trombina (PET) para rFVIII-Fc, rFVIII-Fc MC, rFVIII-Fc

45 completamente procesado y FVIII estándar para la OMS. En la Fig. 13B se comparó el pico de trombina para rFVIII-Fc, rFVIII-Fc MC, rFVIII-Fc completamente procesado y FVIII estándar para la OMS.

La Fig. 14 muestra una representación esquemática del monómero rFVIII-Fc. rFVIII-Fc es una fusión recombinante de FVIII humano con dominio B eliminado con Fc de IgG1 humana, sin intervención de secuencia enlazadora.

Las Fig. 15A, 15B, 15C y 15D muestran los perfiles farmacocinéticos (PK) comparando rFVIII-Fc y rFVIII en ratones con HemA (Fig. 15A), ratones C57BL/6 (Fig. 15B), ratones FcRn KO (Fig. 15C), y ratones transgénicos Tg32B con FcRn humano (Fig. 15D) después de una inyección en vena caudal de 125 UI/kg. Los resultados son $\pm$ DE media de 4 ratones por tratamiento en cada punto de tiempo. Las estimaciones de parámetros de PK se resumen en la Tabla

12.

La Fig. 16 compara la actividad aguda de rFVIII-Fc y rFVIII en un modelo sangrante de corte de cola de ratón con HemA. Los ratones con HemA macho recibieron una inyección en la vena caudal de 24 UI/kg, 72 UI/kg, o 216 UI/kg de rFVIII-Fc o rFVIII seguida de un corte de cola de 10 mm 5 minutos después de la dosis. Los resultados presentados son la pérdida de sangre individual y media durante 30 minutos después del corte de cola de 20 ratones en cada grupo de tratamiento. $P<0,05$ para vehículo vs. todos los demás tratamientos, y $P>0,05$ para ratones C57BL/6 vs. ratones con HemA tratados con 72 o 216 UI/kg de rFVIII-Fc, o 216 UI/kg de rFVIII.

60 Las Fig. 17A y 17B muestran la eficacia profiláctica de rFVIII-Fc respecto de rFVIII en el modelo sangrante de

- transección de vena caudal (TVT, por su sigla en inglés). Los ratones con Hema macho fueron lesionados por TVT o bien 24 horas después de tratamiento con vehículo, rFVIII, o rFVIII-Fc, o 48 horas después de tratamiento con rFVIII-Fc. La Fig. 17A muestra supervivencia después de TVT. $P < 0,001$ de acuerdo con prueba de Mantel-Cox de las curvas de supervivencia de animales que recibieron 12 UI/kg de rFVIII-Fc vs. rFVIII 24 horas antes de TVT. La Fig. 17B muestra resangrado dentro de las 24 horas seguidas a la TVT. $P < 0,002$ de acuerdo con prueba de Mantel-Cox de las curvas de no resangrado de animales que recibieron 12 UI/kg de rFVIII-Fc vs. rFVIII 24 horas antes de TVT.
- Las Fig. 18A y 18B muestran el tiempo de coagulación de sangre entera (TCSE) de rFVIII-Fc y rFVIII en perros con hemofilia A. El intervalo de TCSE normal en perros se muestra con las líneas discontinuas de guión largo. La zona que está por encima de las líneas discontinuas de guión corto (20 minutos) indica el punto en el cual se espera que la actividad de FVIII en plasma sea inferior a 1 % respecto de lo normal. La Fig. 18A muestra TCSE después de la administración de rFVIII-Fc. La Fig. 18B muestra TCSE después de la administración de rFVIII seguida de la administración de rFVIII-Fc en un estudio cruzado.
- Las Fig. 19A y 19B presentan datos de farmacocinética (PK) para rFVIII-Fc en comparación con rFVIII en perros con hemofilia A después de una dosis intravenosa. La Fig. 19A muestra la concentración de antígeno en plasma medida por el ensayo ELISA. La Fig. 19B muestra que la actividad de FVIII en plasma fue medida con ensayo cromogénico. $N = 4$ para rFVIII-Fc y $N = 2$ para rFVIII.
- La Fig. 20 muestra el diseño de un estudio para evaluar la inmunogenicidad de FVIII en ratones con Hema. La dosificación intravenosa (i.v.) con rFVIII-Fc; FVIII humano quimérico-Fc murino; BDD-FVIII (XYNTHA®); rFVIII de longitud completa (ADVATE®); y el control con vehículo se llevó a cabo el día 0, día 7, día 14, día 21 y día 35. Las muestras de sangre se tomaron el día 14, día 21, día 28, día 35 y día 42.
- Las Fig. 21A, 21B y 21C muestran recuentos de anticuerpo anti-FVIII total en experimentos de inmunogenicidad llevados a cabo en ratones con Hema de acuerdo con el estudio de diseño mostrado en la Fig. 20. La Fig. 21A corresponde a mediciones de anticuerpo anti-FVIII total después de dosificación i.v. repetida con 50 UI/kg de rFVIII-Fc; FVIII humano quimérico-Fc murino; BDD-FVIII (XYNTHA®); o rFVIII de longitud completa (ADVATE®). La Fig. 21B corresponde a mediciones de anticuerpo anti-FVIII total después de dosificación i.v. repetida con 100 UI/kg de rFVIII-Fc; FVIII humano quimérico-Fc murino; BDD-FVIII (XYNTHA®); rFVIII de longitud completa (ADVATE®). La Fig. 21C corresponde a mediciones de anticuerpo anti-FVIII total después de dosificación i.v. repetida con 250 UI/kg de rFVIII-Fc; FVIII humano quimérico-Fc murino; BDD-FVIII (XYNTHA®); rFVIII de longitud completa (ADVATE®).
- Las Fig. 22A, 22B, 22C, y 22D muestran mediciones de anticuerpo anti-FVIII en distintos momentos después de la administración de dosis de 50 UI/kg, 100 UI/kg, y 250 UI/kg de rFVIII-Fc; FVIII humano quimérico-Fc murino; BDD-FVIII (XYNTHA®); rFVIII de longitud completa (ADVATE®). La Fig. 22A muestra datos correspondientes a muestras recogidas el día 14. La Fig. 22B muestra datos correspondientes a muestras recogidas el día 21. La Fig. 22C muestra datos correspondientes a muestras recogidas el día 28. La Fig. 22D muestra datos correspondientes a muestras recogidas el día 42.
- La Fig. 23 muestra la correlación entre anticuerpos totales y neutralizantes contra FVIII.
- La Fig. 24 muestra el desarrollo del anticuerpo anti-hFc después del tratamiento con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg de rFVIII-Fc (rFVIII con Fc humano).
- La Fig. 25 es un diagrama que muestra los procedimientos experimentales para el aislamiento y análisis de esplenocitos de ratones con Hema en un estudio para medir la respuesta de linfocitos esplénicos a rFVIII-Fc en comparación con el FVIII disponible en el mercado.
- La Fig. 26 es un diagrama que muestra el procedimiento para tinción intracelular de citocinas utilizando FACS (clasificación de células activadas por fluorescencia). El procedimiento utiliza cinco colores, uno para el marcador de linfocitos CD4, y otros cuatro colores para las citocinas IL2, IL-4, IL-10, y TNF- α .
- Las Fig. 27A y 27B muestran gráficos de puntos de FACS representativos. La Fig. 27A corresponde a la tinción intracelular de citocinas del control de isotipos. La Fig. 27B corresponde a la tinción intracelular de citocinas de células doble positivo que contienen los marcadores de CD4 y TNF- α .
- La Fig. 28 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 e interleucina-2 (IL-2). Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráficas de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII-Fc con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA® (Xyn), y ADVATE® (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.
- La Fig. 29 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 y TNF- α . Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráficas de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII-Fc con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA® (Xyn), y ADVATE® (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.
- La Fig. 30 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 e interleucina-4 (IL-4). Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráficas de puntos de FACS a partir de

todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 5 La Fig. 31 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 e interleucina-10 (IL10). Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráficas de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 10 La Fig. 32 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 y marcador de células dendríticas PD-L1 (CD274). Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráfico de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 15 La Fig. 33 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 y marcador de células dendríticas CD80. Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráfico de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 20 La Fig. 34 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 y marcador de células Treg Foxp3. Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráfico de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 25 La Fig. 35 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 y la molécula inhibitoria de Th Tim3. Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráfico de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 30 La Fig. 36 muestra la tinción intracelular de citocinas por encima del control (vehículo) para CD4 y la molécula inhibitoria de Th CD279 (PD-1). Los porcentajes de células doble positivo se determinaron de acuerdo con gráfico de puntos de FACS a partir de todos los tratamientos con FVIII y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo. Las muestras corresponden a rFVIII^{hFc} con un Fc humano (hFc) o Fc de ratón (mFc), XYNTHA[®] (Xyn), y ADVATE[®] (Adv). Los tratamientos con FVIII se administraron con dosis de 50 UI/kg y 250 UI/kg.

- 35 La Fig. 37 es un diagrama que muestra el diseño del estudio de inmunogenicidad presentado en el Ejemplo 13. Se administraron FVIII (rFVIII^{hFc}, XYNTHA[®], ADVATE[®]) y control con vehículo a ratones con HemA el día 0, día 7, día 14, día 21, día 35 y día 53. Se extrajo sangre el día 0, día 14, día 21, día 28, y día 42. Se recogieron los bazo el día 56. Se administró FVIII con dosis de 50 UI/kg, 100 UI/kg, y 250 UI/kg.

- 40 La Fig. 38 muestra la metodología utilizada para el análisis de esplenocitos de ratón y para obtener el perfil de respuesta de linfocitos T en el Ejemplo 13.

La Fig. 39 muestra los niveles de anticuerpos anti-FVIII totales en muestras de sangre recogidas el día 42. Se administró rFVIII^{hFc}, BDD-rFVIII (XYNTHA[®]) y fl-rFVIII (ADVATE[®]) con dosis de 50 UI/kg, 100 UI/kg, y 250 UI/kg.

- 45 Las Fig. 40A, 40B y 40C muestran tinción intracelular de citocinas de linfocitos T CD4⁺ esplénicos de ratones con HemA tratados con distintas dosis de FVIII (rFVIII^{hFc}, BDD-rFVIII (XYNTHA[®]) o fl-rFVIII (ADVATE[®])). Cada figura muestra los resultados para IL-2 (panel izquierdo) y para TNF- α (panel derecho). La Figura 40A corresponde a ratones con HemA (N=4) inyectados con dosis de 50 UI/kg de FVIII. La Figura 40B corresponde a ratones con HemA (N=10) inyectados con dosis de 100 UI/kg de FVIII. La Figura 40C corresponde a ratones con HemA (N=4) inyectados con dosis de 250 UI/kg de FVIII.

- 50 La Fig. 41 muestra la tinción intracelular de citocinas para esplenocitos triple positivo CD4/CD25/Foxp3 aislados de ratones con HemA tratados con dosis de 100 UI/kg de rFVIII^{hFc}, BDD-rFVIII (XYNTHA[®]) o fl-rFVIII (ADVATE[®]).

- 55 Las Fig. 42A-H muestran PCR en tiempo real para citocinas relacionadas con tolerancia inmunitaria en ratones con HemA tratados con dosis de 100 UI/kg La Fig. 42A muestra los resultados para TGF- β , la Fig. 42B muestra los resultados para interleucina-10, la Fig. 42C muestra los resultados para la subunidad IL-12a de IL-35, y la Fig. 42D muestra los resultados para la subunidad EBI-3 de IL-35. La Fig. 42E muestra los resultados para Foxp3. La Fig.

42F muestra los resultados para IL2ra/CD25. La Fig. 42G muestra los resultados para CTLA4. La Fig. 42H muestra los resultados para IDO-1.

La Fig. 43 muestra el análisis FACS de células implicadas en la vía PD-L1-PD-1 en ratones tratados con dosis de 100 UI/kg. Los esplenocitos se tiñeron para cualquier superficie CD11c y PD-L1 (Fig. 43A), o CD4 y PD-1 (Fig. 43B).

- 5 Las franjas representan el porcentaje respecto del vehículo (* $p < 0,05$ vs. vehículo; + $p < 0,05$ entre tratamientos; prueba T).

La Fig. 44 es un diagrama que muestra el diseño de un estudio de comparación de inmunogenicidad para rFVIII[®], XYNTHA[®] y ADVATE[®] en ratones con HemA. Se administraron dosis de FVIII a ratones con HemA el día 0, día 7, día 14, día 21, y día 35. Se extrajo sangre el día 0, día 14, día 21, día 28, y día 42. Se administró FVIII con dosis de

- 10 50 UI/kg, 100 UI/kg, y 250 UI/kg.

La Fig. 45 muestra mediciones de anticuerpo anti-FVIII los días 14, 21, 28 y 42 después de la administración de dosis de 50 UI/kg de rFVIII[®]; BDD-FVIII (XYNTHA[®]); rFVIII de longitud completa (ADVATE[®]), así como los niveles de anticuerpos inhibidores el día 42.

- 15 La Fig. 46 muestra mediciones de anticuerpo anti-FVIII los días 14, 21, 28 y 42 después de la administración de dosis de 100 UI/kg de rFVIII[®]; BDD-FVIII (XYNTHA[®]); rFVIII de longitud completa (ADVATE[®]), así como los niveles de anticuerpos inhibidores el día 42.

La Fig. 47 muestra mediciones de anticuerpo anti-FVIII los días 14, 21, 28 y 42 después de la administración de dosis de 250 UI/kg de rFVIII[®]; BDD-FVIII (XYNTHA[®]); rFVIII de longitud completa (ADVATE[®]), así como los niveles de anticuerpos inhibidores el día 42.

- 20 La Fig. 48 muestra la correlación entre titulaciones de anticuerpos neutralizantes de FVIII y niveles de anticuerpos de unión total después de la administración de rFVIII y rFVIII[®].

La Fig. 49 es un diagrama que muestra el componente de obtención de perfil de respuesta de linfocitos T del estudio de comparación de inmunogenicidad para rFVIII[®], XYNTHA[®] y ADVATE[®] en ratones con HemA mostrado en la Fig. 44. Se administraron dosis adicionales de FVIII a ratones con HemA el día 53, y se recogieron los bazo el día 56.

- 25 La Fig. 50 (panel derecho) muestra la tinción intracelular de citocinas para esplenocitos triple positivo CD4/CD25/Foxp3 aislados de ratones con HemA tratados con dosis de 100 UI/kg de rFVIII[®], BDD-rFVIII (XYNTHA[®]) o fl-FVIII (ADVATE[®]). La Fig. 50 (panel izquierdo) es un diagrama que muestra el mecanismo de acción de los linfocitos T reguladores.

La Fig. 51 es un diagrama que muestra el diseño de un estudio de tolerización inmunitaria de rFVIII[®]. Se administraron dosis de 50 UI/kg de rFVIII[®] por vía intravenosa a ratones con HemA el día 0, día 7, día 21, y día 35. Se extrajo sangre el día 0, día 14, día 21, día 28, y día 42, seguidos de un periodo de descanso de una semana. A continuación los ratones se sometieron a reexposición a dosis de 250 UI/kg de rFVIII[®] el día 49 (día 0 de la reexposición), día 56 (día 7 de la reexposición), día 63 (día 14 de la reexposición), y día 70 (día 21 de la reexposición). La sangre se extrajo durante la reexposición el día 63 (día 14 de la reexposición), día 70 (día 21 de la reexposición), y día 77 (día 28 de la reexposición).

- 35 La Fig. 52 muestra mediciones de anticuerpo anti-FVIII total el día 14, 21, y 28 después de la reexposición a dosis de 250 UI/kg de rFVIII[®]. Los ratones con HemA fueron pretratados con 50 UI/kg de rFVIII[®] o con control con vehículo. Los resultados indican que rFVIII[®] induce la tolerancia inmunitaria en ratones con HemA.

La Fig. 53 es un diagrama que muestra el reciclaje de IgG y rFVIII[®] mediante FcRn.

- 40 La Fig. 54 es un diagrama que representa tipos celulares y arquitectura celular alrededor de un sinusoides hepático.

La Fig. 55 es un diagrama que muestra el diseño de un ensayo de depuración en el cual los macrófagos y las células de Kupffer se agotan con CLODROSOME[®] (ENCAPSOME[®] administrado como control) antes de inyección i.v. de FVIII o rFVIII[®]. Se utilizaron tres modelos de ratón con desactivación génica: HemA, DKO, y FcRn-KO. Las muestras de sangre se recogieron en el punto de tiempo determinado (4 muestras por punto de tiempo).

- 45 La Fig. 56 muestra una tinción representativa de una sección de hígado de ratón con HemA con un anticuerpo contra Iba-1, un marcador de macrófagos específico. Los paneles A y A' muestran tratamiento con ENCAPSOME[®] de control de ratones con HemA. Los paneles B y B' muestran tratamiento con CLODROSOME[®] de ratones con HemA. Los paneles A' y B' muestran las máscaras para la cuantificación que destacan las células de Kupffer teñidas, la superficie total del tejido y las zonas vacías.

- 50 La Fig. 57 muestra un análisis cuantitativo inmunohistoquímico (IHC) de zonas teñidas positivamente con un anticuerpo marcado contra F4/80 después de tratamiento con CLODROSOME[®] o ENCAPSOME[®], y un análisis de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) que identifica células monocíticas circulantes en células sanguíneas teñidas con el mismo anticuerpo marcado contra F4/80.

- 55 La Fig. 58 muestra un análisis RT-PCR de la expresión del receptor 1 similar a mucina con módulo de factor de crecimiento epidérmico marcador de macrófagos (Emr1) (F4/80) en el hígado, bazo, y pulmón de ratones con HemA tratados con ENCAPSOME[®] o CLODROSOME[®].

La Fig. 59 muestra depuración de rFVIII y rFVIII[®] en ratones con HemA de control y ratones con HemA con macrófagos/células de Kupffer agotados.

- 60 La Fig. 60 muestra depuración de rFVIII y rFVIII[®] en ratones DKO de control (ratones que carecen de FVIII y VWF) y ratones DKO con macrófagos/células de Kupffer agotados.

La Fig. 61 muestra depuración de rFVIII y rFVIIIc en ratones FcRn-KO de control (ratones que carecen del receptor de reciclaje FcRn) y ratones FcRn-KO con macrófagos/células de Kupffer agotados.

La Fig. 62 muestra titulaciones por Bethesda de ratones nacidos de madres inmunizadas el día 16 de gestación con el principio activo de FVIII indicado o control (sin tratar). El panel A muestra el diseño experimental, representando los tiempos de tratamiento y dosis de rFVIIIc o XYNTHA[®] (BDD-FVIII) para ratonas embarazadas y crías nacidas de ellas. Los paneles B y C muestran titulaciones por Bethesda para rFVIIIc de crías nacidas de ratonas tratadas con rFVIIIc, XYNTHA[®], o de control (sin tratar), agrupadas de acuerdo con cohorte de tratamiento (Panel B) o agrupadas por madres individuales (Panel C).

La Fig. 63 muestra titulaciones por Bethesda de ratones nacidos de madres inmunizadas el día 15-17 de gestación con el principio activo de FVIII indicado o control (sin tratar). El panel A muestra el diseño experimental, representando los tiempos de tratamiento y dosis de rFVIIIc o XYNTHA[®] (BDD-FVIII) para ratonas embarazadas y crías nacidas de ellas. Los paneles B y C muestran titulaciones por Bethesda para rFVIIIc de crías nacidas de ratonas tratadas con rFVIIIc, XYNTHA[®], o de control (sin tratar), agrupadas de acuerdo con cohorte de tratamiento (Panel B) o agrupadas por madres individuales (Panel C).

Las Fig. 64A y 64B muestran la expresión superficial de células dendríticas de CD80 y CD274, respectivamente, determinada por tinción de esplenocitos de ratones tratados con 100 UI/kg de rFVIIIc, FVIII con dominio B eliminado (BDD-FVIII; XYNTHA[®]) o FVIII de longitud completa (fl-FVIII; ADVATE[®]) para estos dos antígenos junto con CD11c y CMH de Clase II. Los resultados muestran porcentaje de esplenocitos $\pm$ EEM ($n = 7 - 9$; $*p < 0,05$ vs. vehículo; $\dagger p < 0,05$ vs. rFVIIIc; prueba T). Las Fig. 64 C y 64 D muestran los niveles de expresión de ARNm de D274 e IDO1, respectivamente, determinados por PCR en tiempo real a partir de esplenocitos normalizados a niveles de GAPDH. Las franjas muestran niveles de expresión relativa ($2^{-\Delta Ct}$) $\pm$ EEM ($n = 4 - 9$; $*p < 0,05$ vs. vehículo; $\dagger p < 0,05$ vs. rFVIIIc; prueba T).

La Fig. 65 muestra un mapa de calor que representa los perfiles de expresión de todos los genes en una matriz de PCR en tiempo real entre los tres grupos analizados, es decir, esplenocitos de ratones con HemaA tratados con vehículo, con 50 UI/kg y con 250 UI/kg de rFVIIIc. El ADNc de cada muestra se utilizó para monitorizar la expresión de genes individuales utilizando una matriz de PCR en tiempo real constituida por genes centrados en moléculas asociadas a tolerancia y anergia.

La Fig. 66 muestra un perfil de expresión de genes candidato que fueron identificados como regulados positiva o negativamente por los esplenocitos de ratones con HemaA tratados con 50 UI/kg de rFVIIIc, en comparación con el grupo tratado con 250 UI/kg de rFVIIIc. Los resultados ilustran el cambio en la expresión de genes por encima del grupo de vehículo. El corte para el cambio en veces en la regulación fue 2, es decir, cambio en veces por encima de 2 se consideró regulación positiva y por debajo de 0,5, se consideró regulación negativa. Todos los genes candidato pertenecientes al grupo de 50 UI/kg aquí mostrado fueron significativamente regulados ($p < 0,05$ vs. vehículo así como el grupo de 250 UI/kg; $n = 8 - 11$).

La Fig. 67 muestra una comparación de perfil de proliferación de linfocitos T entre ratones con HemaA que recibían dos inyecciones semanales de o bien 50 UI/kg o 250 UI/kg de rFVIIIc. Las franjas representan una disminución en IFM de CFSE respecto del control en linfocitos T + EEM ($*p < 0,05$, prueba T, $n = 3 - 5$) de los grupos de 250 UI/kg y 50 UI/kg.

Las Fig. 68A-D muestran perfiles de secreción de IFN γ de linfocitos T de ratones con HemaA que recibían dos inyecciones semanales de o bien 250 UI/kg de rFVIIIc (Fig. 68A), o 50 UI/kg de rFVIIIc (Fig. 68B), o 250 UI/kg de rFVIIIc-N297A (Fig. 68C), o 50 UI/kg de rFVIIIc-N297A (Fig. 68D). Las franjas representan las veces por encima del vehículo de secreción de IFN γ $\pm$ EEM ($*p < 0,05$, prueba T; $n = 3 - 5$).

Descripción detallada

La presente descripción proporciona un procedimiento para tratar la hemofilia A con Factor VIII (FVIII) (procesado, monocatenario, o una combinación de los mismos) utilizando un intervalo de dosificación más largo y/o mayor ABC de la que es posible con los productos de FVIII conocidos en la actualidad. La presente descripción también proporciona procedimientos para inducir tolerancia inmunitaria a FVIII. La presente descripción también proporciona polipéptidos quiméricos de FVIII mejorados y procedimientos para producirlos.

En este sentido, la presente descripción proporciona, en términos generales, un procedimiento para inducir tolerancia inmunitaria a un factor de coagulación en un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor coagulación y una porción Fc. También se proporciona un procedimiento para prevenir o inhibir el desarrollo de un inhibidor de un factor de coagulación que comprende administrar a un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación un polipéptido quimérico, donde el polipéptido quimérico comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc.

El tratamiento de la hemofilia A es mediante terapia de reemplazo dirigida a la restauración de la actividad de FVIII a niveles normales del 1 al 5 % para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M. y col., *N. Engl. J. Med.*

344:1773-9 (2001), el cual se incorpora a la presente por referencia en su totalidad. Existen productos de FVIII recombinantes y derivados de plasma disponibles para tratar episodios hemorrágicos a demanda o para prevenir episodios hemorrágicos mediante tratamiento profiláctico. Basándose en la semivida breve de estos productos (8 - 12 horas) (White G.C., y col., *Thromb. Haemost.* 77:660-7 (1997); Morfini, M., *Haemophilia* 9 (supl. 1):94-99; sesión 5 100 (2003)), los regímenes de tratamiento requieren administración intravenosa frecuente, comúnmente de dos a tres veces a la semana para la profilaxis y de una a tres veces al día para el tratamiento a demanda (Manco-Johnson, M.J., y col., *N. Engl. J. Med.* 357:535-544(2007)). Dicha administración frecuente es dolorosa y molesta. Otro gran reto asociado a los productos de FVIII disponibles en la actualidad es el desarrollo de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes en pacientes que reciben terapias con FVIII. Las respuestas inmunitarias inhibitorias a FVIII 10 pueden comprender anticuerpos anti-Factor VIII y/o respuestas inmunitarias mediadas por células.

La presente descripción proporciona un procedimiento para administrar FVIII a un sujeto humano que lo necesita (p. ej., un paciente humano) con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. El procedimiento comprende la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc.

15 En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce la cantidad de anticuerpos contra FVIII en el sujeto en comparación con la cantidad antes de la administración. En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico se administra a un sujeto con una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII, y la administración puede reducir la respuesta inmunitaria inhibitoria. La respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII puede ser una respuesta 20 inmunitaria inhibitoria al anticuerpo y/o una respuesta inmunitaria mediada por células. La administración de un polipéptido quimérico de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento puede disminuir o neutralizar la respuesta inmunitaria inhibitoria. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los anticuerpos anti-FVIII disminuyen o se eliminan en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc. La disminución puede ser, por ejemplo, una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce la titulación de anticuerpos contra FVIII en el sujeto en comparación con la titulación antes de la administración. En algunas realizaciones, la titulación de los anticuerpos anti-FVIII disminuye en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que 30 comprende una porción de FVIII y una porción Fc. Por consiguiente, la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc puede reducir los inhibidores a menos de 20, menos de 10, menos de 5, menos de 4, menos de 3, menos de 2, menos de 1, o menos de 0,6 unidades Bethesda (UB).

En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce el nivel de una citocina en el sujeto en 35 comparación con el nivel antes de la administración. En algunas realizaciones, los niveles de citocina disminuyen en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc. La citocina puede ser, por ejemplo, IL-12, IL-4, y/o TNF- α . La disminución puede ser, por ejemplo, una reducción del 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o 90 %.

40 En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico se administra a un sujeto que previamente desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. La administración de un polipéptido quimérico a dichos sujetos, de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, puede resultar en una respuesta inmunitaria disminuida en comparación con la respuesta previa. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se producen menos anticuerpos anti-FVIII en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico de acuerdo con los 45 procedimientos del presente documento de los que se produjeron después de la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII. En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce la cantidad de anticuerpos contra FVIII en el sujeto en comparación con la cantidad en el sujeto después de un tratamiento previo con un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

50 En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce la titulación de anticuerpos contra FVIII en el sujeto en comparación con la titulación en el sujeto después de un tratamiento previo con un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII. En algunas realizaciones, la titulación de los anticuerpos anti-FVIII es inferior en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc que la que se produjo después de la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de 55 FVIII. En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce el nivel de una citocina en el sujeto en comparación con el nivel en el sujeto después de un tratamiento previo con un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII. En algunas realizaciones, los niveles de citocina, (p. ej., IL-12, IL-4, y/o TNF- α) son inferiores en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc que los niveles después de la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

60

En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce la cantidad de anticuerpos antifactor de coagulación en el sujeto en comparación con la cantidad que resultaría de la administración de un polipéptido compuesto por la porción de factor de coagulación o un polipéptido que comprende la porción de factor de coagulación, pero que no comprende la porción Fc al sujeto. En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico se administra a un sujeto que previamente no desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. La administración de un polipéptido quimérico a dichos sujetos, de acuerdo con los procedimientos proporcionados en el presente documento, puede resultar en una respuesta inmunitaria inferior que la que resultaría de la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII. Por lo tanto, en algunas realizaciones, se producen menos anticuerpos anti-FVIII en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico de acuerdo con los procedimientos del presente documento de los que se producirían con la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce la titulación de anticuerpos antifactor de coagulación en el sujeto en comparación con la titulación que resultaría de la administración de un polipéptido compuesto por la porción de factor de coagulación o un polipéptido que comprende la porción de factor de coagulación, pero que no comprende la porción Fc al sujeto. En algunas realizaciones, la titulación de los anticuerpos anti-FVIII es inferior en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc de la que se produciría con la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII. En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico reduce el nivel de una citocina (p. ej., IL-12, IL-4, y/o TNF- α) en el sujeto en comparación con el nivel que resultaría de la administración de un polipéptido compuesto por la porción de factor de coagulación o un polipéptido que comprende la porción de factor de coagulación, pero que no comprende la porción Fc al sujeto. En algunas realizaciones, los niveles de citocina, (p. ej., IL-12, IL-4, y/o TNF- α) son inferiores en un sujeto después de la administración de un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc de lo que serían después de la administración de un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

Los procedimientos de la presente descripción también pueden comprender, antes de la administración del polipéptido quimérico, identificar que el sujeto tiene una o más características seleccionadas de entre el grupo compuesto por: (a) tiene una mutación o eliminación en el gen que codifica el factor de coagulación; (b) tiene un reordenamiento en el gen que codifica el factor de coagulación; (c) tiene un familiar que ha desarrollado previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación; (d) recibe terapia con interferón; (e) recibe terapia antiviral; (f) tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación que está ligado a un riesgo aumentado de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria; y (g) tiene dos o más combinaciones de estos. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación comprende una o más mutaciones seleccionadas de entre el grupo constituido por: (i) un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado; (ii) un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada; (iii) un polimorfismo genético asociado con un CTLA-4 disminuido; (iv) una mutación en las moléculas CMH de clase II DR15 o DQB0602; y (v) dos o más combinaciones de estos. En algunas realizaciones, el polimorfismo está asociado con TNF- α aumentado es 308G>A. En algunas realizaciones, el polimorfismo asociado con IL10 aumentada es el alelo 134 del microsatélite de la IL10G.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para administrar FVIII a un sujeto humano que lo necesite (p. ej., paciente humano), que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de FVIII quimérico, p. ej., un polipéptido de FVIII-Fc quimérico, o un híbrido de dicho polipéptido, en un intervalo de dosificación al menos alrededor de una vez y media más largo que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es del FVIII (un polipéptido constituido por dicha porción de FVIII), p. ej., sin la porción Fc. La presente descripción también está dirigida a un procedimiento para aumentar el intervalo de dosificación de administración de FVIII en un sujeto humano que lo necesita que comprende administrar el polipéptido de FVIII quimérico.

El intervalo de dosificación puede ser de al menos alrededor de una y media a seis veces más largo, una y media a cinco veces más largo, una y media a cuatro veces más largo, una y media a tres veces más largo, o una y media a dos veces más largo, que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es de FVIII (un polipéptido compuesto por dicha porción de FVIII), por ejemplo, sin la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser de al menos alrededor de una y media, dos, dos y media, tres, tres y media, cuatro, cuatro y media, cinco, cinco y media o seis veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es de FVIII (un polipéptido compuesto por dicha porción de FVIII), por ejemplo, sin la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser alrededor de cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más.

El intervalo de dosificación puede ser al menos alrededor de uno y medio a 5, uno y medio, 2, 3, 4 o 5 días o más.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para la administración de FVIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de FVIII quimérico, p. e j., un polipéptido de FVIII-Fc quimérico, o un híbrido de tal polipéptido, para obtener un área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo (ABC) al menos alrededor de una y un cuarto de veces mayor que el ABC obtenido por una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es de FVIII (un polipéptido compuesto por dicha porción de FVIII) p. ej., sin la porción Fc. Por lo tanto, la presente descripción incluye un procedimiento para aumentar o extender el ABC de actividad de FVIII en un paciente humano que lo necesita que comprende administrar el polipéptido de FVIII quimérico.

La presente descripción también proporciona un procedimiento para administrar FVIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido que comprende un FVIII y un Fc o un híbrido de tal polipéptido, en un intervalo de dosificación de alrededor de cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más.

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden llevar a la práctica en un sujeto que necesite tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

«Administrar», como se usa en el presente documento, significa proporcionar un polipéptido de FVIII farmacéuticamente aceptable de la descripción a un sujeto a través de una ruta farmacéuticamente aceptable. Las rutas de administración pueden ser intravenosas, p. ej., inyección intravenosa e infusión intravenosa. Las vías de administración adicionales incluyen, p. ej., administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal y pulmonar. Los polipéptidos quiméricos y las proteínas híbridas se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

La expresión «área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo (ABC)», como se usa en el presente documento, es igual que el término de la técnica en farmacología, y se basa en la velocidad y el grado de absorción de FVIII después de la administración. El ABC se determina durante un periodo de tiempo especificado, tal como 12, 18, 24, 36, 48 o 72 horas, o para el infinito utilizando la extrapolación basada en la pendiente de la curva. A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, el ABC se determina para el infinito. La determinación de ABC puede llevarse a cabo en un solo sujeto, o en una población de sujetos para los que se calcula el promedio.

El «dominio B» de FVIII, como se usa en el presente documento, es el mismo que el dominio B conocido en la técnica que se define por la identidad de secuencia de aminoácidos interna y los sitios de escisión proteolítica por trombina, p. ej., los residuos Ser741-Arg1648 de FVIII humano de longitud completa. Los otros dominios de FVIII humano se definen por los siguientes residuos de aminoácidos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; A3, residuos Ser1690-Ile2032; C1, residuos Arg2033-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1690-Tyr2332. Por lo general, la secuencia restante, residuos Glu1649-Arg1689, se denomina péptido de activación de cadena ligera de FVIII. Las ubicaciones de los límites para todos los dominios, incluidos los dominios B, para el FVIII porcino, de ratón y canino también se conocen en la técnica. En una realización, el dominio B de FVIII se elimina («FVIII con dominio B eliminado» o «BDD FVIII»).

Un ejemplo de BDD FVIII es REFACTO® (BDD FVIII recombinante), que tiene la misma secuencia que la porción de FVIII de la secuencia en la Tabla 2A(i) (aminoácidos 1 a 1457 o 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2). En una realización, el FVIII con dominio B eliminado contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto, que corresponde a arginina en el residuo 754 de FVIII con dominio B eliminado, que corresponde al residuo de arginina 773 de la SEQ ID NO: 2, o al residuo 1.648 de FVIII de longitud completa, que corresponde al residuo de arginina 1.667 de la SEQ ID NO: 6. Los números de residuo de secuencia utilizados en el presente documento sin referirse a ningún número de SEQ ID corresponden a la secuencia de FVIII sin la secuencia del péptido señal (19 aminoácidos) a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, S743/Q1638 de FVIII de longitud completa corresponde a S762/Q1657 de SEQ ID NO: 6 debido a la secuencia de péptido señal de 19 aminoácidos.

Un «FVIII con dominio B eliminado» puede tener las eliminaciones completas o parciales descritas en las patentes de EE. UU. N.º 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112, y 6.458.563, a cada una de las cuales se hace referencia en el presente documento. En algunas realizaciones, una secuencia de FVIII con dominio B eliminado comprende cualquiera de las eliminaciones descritas en la col. 4, línea 4 hasta la col. 5, línea 28 y en los ejemplos 1 - 5 de la patente de EE. UU. N.º 6.316.226 (también en la patente de EE. UU. N.º 6.346.513). En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado tiene una eliminación en la col. 2, líneas 26-51 y en los ejemplos 5 - 8 de la patente de

EE. UU. N.º 5.789.203 (también en las patentes de EE. UU. N.º 6.060.447, 5.595.886, y 6.228.620).

- En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado tiene una eliminación descrita en la col. 1, líneas 25 a col. 2, línea 40 de la patente de EE. UU. N.º 5.972.885; col. 6, líneas 1 - 22 y ejemplo 1 de la patente de EE. UU. N.º 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente de EE. UU. N.º 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente de EE. UU. N.º 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2, y ejemplo 1 de la patente de EE. UU. N.º 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la patente de EE. UU. N.º 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26, y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la patente de EE. UU. N.º 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente de EE. UU. N.º 6.458.563. En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado tiene una eliminación de la mayor parte del dominio B, pero aún contiene secuencias aminoterminal del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario en dos cadenas de polipéptidos (es decir, sitio de procesamiento intracelular), como se describe en la publicación internacional WO91/09122.
- En algunas realizaciones, un FVIII con dominio B eliminado se construye con una eliminación de los aminoácidos 747-1638, es decir, prácticamente una eliminación completa del dominio B. Hoebe R.C., y col. *J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990). Un FVIII con el dominio B eliminado también puede contener una eliminación de los aminoácidos 771-1666 o los aminoácidos 868-1562 del FVIII. Meulien P., y col. *Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988). Las eliminaciones del dominio B adicionales que son parte de la invención incluyen, p. ej., eliminación de aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5939-5942 (1986)), 797 a 1562 (Eaton y col., *Biochemistry* 25:8343-8347 (1986)), 741 a 1646 (Kaufman (solicitud publicada del PCT N.º WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver y col., *DNA* 6:553-564 (1987)), 741 a 1648 (Pasek (solicitud del PCT N.º 88/00831)), 816 a 1598 o 741 a 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) N.º 82:16-25, EP 295597)), a los que se refiere en el presente documento. Cada una de las eliminaciones anteriores puede realizarse en cualquier secuencia de FVIII.
- En una realización, la porción de FVIII con dominio B eliminado en el polipéptido quimérico se procesa en dos cadenas conectadas (o asociadas) mediante un enlace metálico, comprendiendo la primera cadena una cadena pesada (A1-A2-parcial B) y comprendiendo la segunda cadena una cadena ligera (A3-C1-C2). En otra realización, la porción de FVIII con dominio B eliminado es un FVIII monocatenario. El FVIII monocatenario puede comprender un sitio de procesamiento intracelular, que corresponde a arginina en el residuo 754 de FVIII con dominio B eliminado (residuo 773 de la SEQ ID NO: 2), o en el residuo 1648 de FVIII de longitud completa (residuo 1657 de la SEQ ID NO: 6).
- El enlace metálico entre la cadena pesada y la cadena ligera puede ser de cualquier metal conocido en la técnica. Por ejemplo, el metal puede ser un ión metálico divalente. Los metales que se pueden utilizar para asociar la cadena pesada y la cadena ligera incluyen, sin carácter restrictivo, Ca^{2+} , Mn^{2+} , o Cu^{2+} . Fatouros y col., *Intern. (J. Pharm.* 155(1): 121-131 (1997); Wakabayashi y col., *JBC.* 279(13): 12677-12684 (2004).
- En algunas realizaciones, la porción de FVIII en el polipéptido quimérico comprende el dominio A1 de FVIII. En algunas realizaciones, la porción de FVIII en el polipéptido quimérico comprende el dominio A2 de FVIII. En algunas realizaciones, la porción de FVIII en el polipéptido quimérico comprende el dominio A3 de FVIII. En algunas realizaciones, la porción de FVIII en el polipéptido quimérico comprende el dominio C1 de FVIII. En algunas realizaciones, la porción de FVIII en el polipéptido quimérico comprende el dominio C2 de FVIII.
- El término «polipéptido quimérico», como se usa en el presente documento, significa un polipéptido que incluye dentro de él al menos dos polipéptidos (o subsecuencias o péptidos) de diferentes fuentes. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, p. ej., dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más polipéptidos de diferentes fuentes, tales como diferentes genes, diferentes ADNc, o diferentes animales u otras especies. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, p. ej., uno o más enlazadores que unen las diferentes subsecuencias. Por lo tanto, las subsecuencias se pueden unir directamente o se pueden unir indirectamente, a través de enlazadores, o de ambas formas, dentro de un único polipéptido quimérico. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, p. ej., péptidos adicionales tales como secuencias señal y secuencias tales como 6His y FLAG que ayudan en la purificación o detección de proteínas. Además, los polipéptidos quiméricos pueden tener adiciones de aminoácidos o péptidos en los extremos N y/o C.
- En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico comprende una porción de factor de coagulación (p. ej., una porción de FVIII) y una porción de factor de no coagulación (p. ej., una porción no de FVIII). Las porciones de factor de no coagulación (p. ej., porciones no de FVIII) incluyen, por ejemplo, un Fc. Los polipéptidos quiméricos de FVIII-Fc ejemplares incluyen, p. ej., las SEQ ID NO:2 o 6 (Tabla 2), con o sin sus secuencias señal y el polipéptido Fc quimérico de la SEQ ID NO:4 (Tabla 2).

Como se utiliza en el presente documento, el término «porción» cuando se aplica a un polipéptido quimérico se refiere a uno de los componentes o restos de dicho polipéptido quimérico (p. ej., «un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc» o la «porción de FVIII del polipéptido quimérico»). Dicho de otro modo, el término «porción» se utiliza para indicar la fuente de distintos componentes en el polipéptido quimérico, pero no se utiliza para indicar un fragmento de la proteína de FVIII o un fragmento de una región Fc.

El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia al menos un 90 % o un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos un 90 % o un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2), donde la secuencia tiene actividad de FVIII. La actividad de FVIII se puede medir mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), ensayo cromogénico, u otros procedimientos conocidos. El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o idéntica a la secuencia de aminoácidos de FVIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

En algunas realizaciones, la porción de FVIII comprende un dominio A3 de FVIII. En algunas realizaciones, la porción de FVIII comprende FVIII humano. En algunas realizaciones, la porción de FVIII tiene una eliminación completa o parcial del dominio B. En algunas realizaciones, la porción de FVIII es al menos 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6). En algunas realizaciones, la porción de FVIII es idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6). La porción de FVIII es al menos 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6). En algunas realizaciones, la porción de FVIII es idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2; o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6). En algunas realizaciones, la porción de FVIII tiene actividad de coagulación.

En algunas realizaciones, la porción Fc es idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6). En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico es en forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido en asociación con el polipéptido quimérico, donde el segundo polipéptido está compuesto esencialmente por o está compuesto por la porción Fc o el compañero de unión a FcRn.

En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII tiene una semivida aumentada ($t_{1/2}$) con respecto a un polipéptido compuesto por la misma porción de FVIII sin la porción que no es de FVIII. Un polipéptido de FVIII quimérico con una $t_{1/2}$ aumentada puede denominarse en el presente documento FVIII de acción prolongada. Los polipéptidos de FVIII quiméricos de acción prolongada incluyen, p. ej., FVIII fusionado con Fc (incluyendo, p. ej., polipéptidos de FVIII quiméricos en forma de híbrido tal como un híbrido monómero-dímero de FVIII/Fc; véase el Ejemplo 1, Fig. 1, y Tabla 2A; y las patentes de EE. UU. N.º 7.404.956 y 7.348.004), y FVIII fusionado con albúmina.

Las expresiones «cultivo», «cultivar» y «que cultiva», como se usan en el presente documento, significan incubar células en condiciones *in vitro* que permitan el crecimiento o división celular o el mantenimiento de células en un estado vivo. El término «células cultivadas», como se usa en el presente documento, significa células que se propagan *in vitro*.

El término «Factor VIII», abreviado a lo largo de la presente solicitud como «FVIII», como se utiliza en el presente documento, significa un polipéptido de FVIII funcional en su función normal en la coagulación, a menos que se indique lo contrario. Por lo tanto, el término FVIII incluye polipéptidos variantes que son funcionales. Las proteínas de FVIII pueden ser las proteínas de FVIII humano, porcino, canino y murino. Como se describe en la sección de la técnica anterior, se conocen las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa, así como muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Los ejemplos de secuencias de FVIII humano se muestran como subsecuencias en las SEQ ID NO:2 o 6 (Tabla 2). Los polipéptidos de FVIII incluyen, p. ej., FVIII de longitud completa, FVIII de longitud completa menos Met en el extremo N, FVIII maduro (menos la secuencia señal), FVIII maduro con un Met adicional en el extremo N, y/o FVIII con una eliminación total o parcial del dominio B. Las variantes el FVIII incluyen eliminaciones del dominio B, ya sean eliminaciones parciales o completas.

Se conocen muchas variantes funcionales del FVIII, como se analiza anteriormente y a continuación. Además, se

han identificado cientos de mutaciones no funcionales en el FVIII en pacientes con hemofilia, y se ha determinado que el efecto de estas mutaciones en la función del FVIII se debe más al lugar que ocupan dentro de la estructura tridimensional del FVIII que a la naturaleza de la sustitución (Cutler y col., *Hum. Mutat.* 19:274-8(2002)). Además, las comparaciones entre FVIII de seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente sean necesarios para la función (Cameron y col., *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); documento US 6.251.632), a los que se hace referencia en el presente documento.

El gen FVIII humano se aisló y expresó en células de mamíferos (Toole, J. J., y col., *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., y col., *Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., y col., *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., y col., *Nature* 312:337-342 (1984); la publicación internacional WO 87/04187; la publicación internacional WO 88/08035; la publicación internacional WO 88/03558; la patente de EE. UU. N.º 4.757.006), y la secuencia de aminoácidos se dedujo de ADNc. Capon y col., patente de EE. UU. N.º 4.965.199, describe un procedimiento de ADN recombinante para producir FVIII en células huésped de mamífero y la purificación de FVIII humano. Se ha informado sobre la expresión de FVIII humano en células CHO (ovario de hámster chino) y BHKC (células de riñón de hámster recién nacido). El FVIII humano se ha modificado para eliminar parte o todo el dominio B (patentes de EE. UU. N.º 4.994.371 y 4.868.112), y se ha realizado la sustitución del dominio B de FVIII humano por el dominio B del factor V humano (patente de EE. UU. N.º 5.004.803, a la que se hace referencia en el presente documento). La secuencia de ADNc que codifica el FVIII humano y la secuencia de aminoácidos predicha se muestran en las SEQ ID NO:1 y 2, respectivamente, de la publicación de solicitud de EE. UU. N.º 2005/0100990, a la que se hace referencia en el presente documento.

La patente de EE. UU. N.º 5.859.204, Lollar, J. S., informa sobre mutantes funcionales de FVIII que tienen antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La patente de EE. UU. N.º 6.376.463, Lollar, J. S., también informa sobre mutantes de FVIII con inmunorreactividad reducida. La publicación de solicitud de EE. UU. N.º 2005/0100990, Saenko y col., informa sobre mutaciones funcionales en el dominio A2 del FVIII.

Se describen varias moléculas de FVIII funcionales, incluyendo eliminaciones de dominio B, en las siguientes patentes de EE. UU. N.º 6.316.226 y 6.346.513, ambas cedidas a Baxter; patente de EE. UU. N.º 7.041.635 cedida a In2Gen; patente de EE. UU. N.º 5.789.203, patente de EE. UU. N.º 6.060.447, patente de EE. UU. N.º 5.595.886, y patente de EE. UU. N.º 6.228.620 cedida a Chiron; patente de EE. UU. N.º 5.972.885 y patente de EE. UU. N.º 6.048.720 cedida a Biovitrum, patente de EE. UU. N.º 5.543.502 y patente de EE. UU. N.º 5.610.278 cedida a Novo Nordisk; patente de EE. UU. N.º 5.171.844 cedida a Immuno Ag; patente de EE. UU. N.º 5.112.950 cedida a Transgene S.A.; patente de EE. UU. N.º 4.868.112 cedida a Genetics Institute.

La secuencia de FVIII porcino se publica, (Toole, J. J., y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5939-5942 (1986)), y se ha informado de la secuencia de ADNc porcino completa obtenida de la amplificación por PCR de secuencias de FVIII de un banco de ADNc de bazo de cerdo (Healey, J. F. y col., *Blood* 88:4209-4214 (1996)). El FVIII híbrido humano/porcino que tenía sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades y secuencias de aminoácidos específicas se describieron en la patente de EE. UU. N.º 5.364.771 por Lollar y Runge, y en la publicación internacional WO 92/20093. Más recientemente, se informó sobre el nucleótido y las correspondientes secuencias de aminoácidos de los dominios A1 y A2 de FVIII porcino y un FVIII quimérico con dominios porcinos A1 y/o A2 sustituidos por los dominios humanos correspondientes en la publicación internacional WO 94/11503. La patente de EE. UU. N.º 5.859.204, Lollar, J. S., también describe el ADNc porcino y las secuencias de aminoácidos deducidas. La patente de EE. UU. N.º 6.458.563, concedida a Emory, describe un FVIII porcino con dominio B eliminado.

El FVIII (o porción de FVIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos 90 % o 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; y aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6), donde dicha porción de FVIII tiene actividad de FVIII. La porción de FVIII (o porción de FVIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; y aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

El FVIII (o porción de FVIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos 90 % o 95 % idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 y aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6), donde dicha porción de FVIII tiene actividad de FVIII. El FVIII (o porción de FVIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 y aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

El término «dosis equivalente», como se usa en el presente documento, significa la misma dosis de actividad de

FVIII que se expresa en Unidades Internacionales, que es independiente del peso molecular del polipéptido en cuestión. Una unidad internacional (UI) de actividad de FVIII corresponde aproximadamente a la cantidad de FVIII en un mililitro de plasma humano normal. Existen varios ensayos para medir la actividad de FVIII, incluido el ensayo de sustrato cromogénico de la Farmacopea Europea y un ensayo de coagulación en una etapa.

5

«Fc», como se usa en el presente documento, se refiere a compañeros de unión al receptor Fc neonatal funcional (FcRn), a menos que se especifique lo contrario. Un compañero de unión a FcRn es cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn con el consiguiente transporte activo por el receptor FcRn del compañero de unión a FcRn. Por lo tanto, el término Fc incluye cualquier variante de Fc de IgG que sea funcional.

- 10 La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister y col., *Nature* 372:379 (1994)). El área de contacto principal del Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los compañeros de unión a FcRn incluyen, p. ej., IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de
- 15 aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3.

Las referencias hechas a la numeración de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, están todas basadas en Kabat y col. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Departamento de Salud

20 Pública de los Estados Unidos, Bethesda; MD. (El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamíferos, incluidos los seres humanos. Se conocen las secuencias de FcRn humano, FcRn de rata, y FcRn de ratón (Story y col., *J. Exp. Med.* 180: 2377 (1994)). Un Fc puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina con o sin la región bisagra de la inmunoglobulina. Se proporcionan variantes de Fc ejemplares en las publicaciones internacionales WO 2004/101740 y WO 006/074199.

25

Un Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede contener una o más mutaciones, y combinaciones de mutaciones. Por ejemplo, un Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede contener mutaciones que confieren una semivida aumentada tal como M252Y, S254T, T256E, y combinaciones de estos, como se describe en Oganessian y col., *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009), H433K, N434F, y combinaciones de estos, como se describe en

30 Vaccaro y col., *Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005), y los mutantes se describen en las páginas 1 - 2, párrafo [0012], y Ejemplos 9 y 10 de la publicación de solicitud de EE. UU. N.º 2009/0264627 A1 y los mutantes se describen en la página 2, párrafo [0014] a [0021] de la publicación de solicitud de EE. UU. N.º 20090163699 A1.

- El Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) también puede incluir, p. ej., las siguientes mutaciones: La región Fc
- 35 de IgG puede modificarse de acuerdo con procedimientos bien reconocidos tales como mutagénesis dirigida a sitio, y similares, para producir fragmentos modificados de IgG o Fc o porciones de los mismos, que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen, p. ej., modificaciones alejadas de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que conservan o incluso mejoran la unión a FcRn. Por ejemplo, los siguientes residuos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humana (Fcγ1) pueden sustituirse sin pérdida
- 40 significativa de afinidad de unión a Fc para FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A,
- 45 E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, y K447A, donde, por ejemplo, P238A representa prolina de tipo salvaje sustituida por alanina en el número de posición 238. Además de alanina, otros aminoácidos se pueden sustituir por los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones especificadas
- 50 anteriormente.

- Las mutaciones pueden introducirse individualmente en Fc dando lugar a más de cien compañeros de unión a FcRn distintos del Fc nativo. Además, las combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales se pueden introducir juntas, dando lugar a cientos de compañeros de unión a FcRn adicionales. Algunas de estas mutaciones
- 55 pueden conferir nuevas funcionalidades al compañero de unión a FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, mejorando así la semivida circulante del compañero de unión a FcRn, y hacer que el compañero de unión a FcRn sea incapaz de unirse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y FcγRIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge y col. 1995, *Transplantation* 60:847, Friend y col. 1999, *Transplantation* 68:1632, Shields y col. 1995, *J. Biol. Chem.* 276:6591.
- 60

Adicionalmente, al menos tres receptores de Fc gamma humanos parecen reconocer un sitio de unión en IgG dentro de la región bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, puede surgir otro ejemplo de nueva funcionalidad y una potencial inmunogenicidad disminuida a partir de mutaciones de esta región, como por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de IgG1 humana «ELG» por la secuencia correspondiente de IgG2 «PVA» (con una eliminación de aminoácido). Se ha demostrado que FcγRI, FcγRII y FcγRIII, que median diversas funciones efectoras, no se unirán a IgG1 cuando se hayan introducido dichas mutaciones (Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77 (1995), y Armour y col., *Eur. J. Immunol.* 29:2613 1999). Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad que surge a partir de las mutaciones descritas anteriormente, la afinidad por FcRn puede aumentar en algunos casos más allá de la de tipo salvaje. Esta afinidad aumentada puede reflejar un aumento de la tasa «de asociación», una disminución de la tasa «de disociación» o tanto un aumento de la tasa «de asociación» como una disminución de la tasa «de disociación». Las mutaciones que se cree imparten una mayor afinidad por FcRn incluyen, p. ej., T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields y col., *J. Biol. Chem.* 276:6591 (2001)).

15 La porción Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser al menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6). La porción Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 y aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

20 Los polipéptidos y proteínas «híbridos», como se usan en el presente documento, significan una combinación de un polipéptido quimérico con un segundo polipéptido. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido en un híbrido pueden estar asociados entre sí a través de interacciones proteína-proteína, tales como carga-carga o interacciones hidrófobas. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido en un híbrido pueden estar asociados entre sí a través de un enlace disulfuro u otro u otros enlaces covalentes. Los híbridos se describen en las publicaciones internacionales WO 2004/101740 y WO 2006/074199. Véanse también las patentes de EE. UU. N.º 7.404.956 y 7.348.004. El segundo polipéptido puede ser una segunda copia del mismo polipéptido quimérico o puede ser un polipéptido quimérico no idéntico. Véanse, p. ej., la Figura 1, el Ejemplo 1 y la Tabla 2.

30 En una realización, el segundo polipéptido es un polipéptido que comprende un Fc. En otra realización, el polipéptido quimérico es un polipéptido de FVIII-Fc quimérico y el segundo polipéptido está compuesto esencialmente por Fc, p. ej., el polipéptido híbrido del Ejemplo 1, que es una proteína de fusión recombinante rFVIII-Fc compuesta por una sola molécula de FVIII humano recombinante con el dominio B eliminado (BDD-rFVIII) fusionada con el dominio de Fc dímérico de la IgG1 humana, sin intervención de una secuencia enlazadora intermedia. Este polipéptido híbrido se denomina en el presente documento proteína de fusión a Fc monomérica de FVIII-Fc, híbrido de monómero de FVIII-Fc, híbrido de FVIII-Fc monomérico y monómero-dímero de FVIII-Fc. Véanse el Ejemplo 1, Fig. 1, y la Tabla 2A. Los Ejemplos proporcionan datos preclínicos y clínicos para este polipéptido híbrido.

El segundo polipéptido en un híbrido puede comprender o estar compuesto esencialmente por una secuencia al menos un 90 % o un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos un 90 % o un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4). El segundo polipéptido puede comprender o estar compuesto esencialmente por una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

La Fig. 1 es un esquema que muestra la estructura de un polipéptido quimérico FVIII-Fc con el dominio B eliminado, y su asociación con un segundo polipéptido que es un polipéptido de Fc. Para obtener este híbrido, se obtuvo la secuencia codificante de FVIII recombinante humano con el dominio B eliminado por reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) a partir de ARN poli A de hígado humano (Clontech) usando cebadores específicos de FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia de señal nativa para FVIII. La eliminación del dominio B fue de serina 743 (S743; 2287 pb) a glutamina 1638 (Q1638; 4969 pb) para una eliminación total de 2682 pb. A continuación, la secuencia de codificación para Fc recombinante humano se obtuvo por RT-PCR a partir de un banco de ADNc de leucocitos humanos (Clontech) usando cebadores específicos de Fc. Los cebadores se diseñaron de manera que la secuencia de FVIII con dominio B eliminado se fusionara directamente al extremo N de la secuencia de Fc sin un enlazador intermedio. La secuencia de ADN de FVIII-Fc se clonó en el vector de expresión doble de mamífero pBUDCE4.1 (Invitrogen) bajo el control del promotor de CMV. Se obtuvo una segunda secuencia de Fc idéntica que incluía la secuencia señal de Igk de ratón por RT-PCR y se clonó cadena abajo del segundo promotor, EF1α, en el vector de expresión pBUDCE4.1.

El vector de expresión de rFVIII_{FC} se transfectó en células 293 de riñón embrionario humano (HEK293H; Invitrogen) usando reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se generaron líneas celulares clonales estables mediante selección con Zeocin (Invitrogen). Se usó una línea celular clonal, 3C4-22, para generar FVIII_{FC} para la caracterización *in vivo*. El FVIII_{FC} recombinante se produjo y se purificó (McCue y col. 2009) en Biogen Idec (Cambridge, MA). Se esperaba que la estrategia de transfección descrita anteriormente produjera tres productos, es decir, híbridos de rFVIII_{FC} monomérico, híbridos de rFVIII_{FC} dimérico y Fc dimérico. Sin embargo, esencialmente no se detectó rFVIII_{FC} dimérico en el medio acondicionado de estas células. Más bien, el medio acondicionado contenía Fc y rFVIII_{FC} monomérico. Es posible que el tamaño del rFVIII_{FC} dimérico fuera demasiado grande e impidiera la secreción eficaz de la célula. Este resultado fue beneficioso ya que hizo que la purificación del monómero fuera menos complicada que si las tres proteínas hubieran estado presentes. El material utilizado en estos estudios tenía una actividad específica de aproximadamente 9.000 UI/mg.

«Intervalo de dosificación», como se usa en el presente documento, significa la cantidad de tiempo que transcurre entre las múltiples dosis que se administran a un sujeto. La comparación del intervalo de dosificación puede llevarse a cabo en un único sujeto o en una población de sujetos y a continuación puede calcularse el promedio obtenido en la población.

El intervalo de dosificación cuando se administra un polipéptido de FVIII quimérico, p. ej., un polipéptido FVIII-Fc quimérico (un polipéptido que comprende un FVIII o un híbrido) de la presente descripción puede ser al menos alrededor de una vez y media mayor que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es de FVIII, p. ej., sin la porción Fc (un polipéptido compuesto por dicho FVIII). El intervalo de dosificación puede ser al menos alrededor de una y media a seis veces más largo, una y media a cinco veces más largo, una y media a cuatro veces más largo, una y media a tres veces más largo, o una y media a dos veces más largo, que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es de FVIII, p. ej., sin la porción Fc (un polipéptido compuesto por dicho FVIII).

El intervalo de dosificación puede ser al menos alrededor de una y media, dos, dos y media, tres, tres y media, cuatro, cuatro y media, cinco, cinco y media o seis veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho FVIII sin la porción que no es de FVIII, p. ej., sin la porción Fc (un polipéptido compuesto por dicho FVIII). El intervalo de dosificación puede ser alrededor de cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más. El intervalo de dosificación puede ser al menos alrededor de uno y medio a 5, uno y medio, 2, 3, 4 o 5 días o más. Para el tratamiento a demanda, el intervalo de dosificación de dicho polipéptido quimérico o híbrido es alrededor de una vez cada 24-36, 24-48, 24-72, 24-96, 24-120, 24-144, 24-168, 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, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, o 72 horas o más.

En una realización, la dosis efectiva es 25-65 UI/kg (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, 61, 62, 63, 64, o 65 UI/kg) y el intervalo de dosificación es una vez cada 3 - 5, 3 - 6, 3 - 7, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 o más días, o tres veces a la semana, o no más de tres veces a la semana. En otra realización, la dosis efectiva es de 65 UI/kg y el intervalo de dosificación es una vez por semana, o una vez cada 6 - 7 días. Las dosis se pueden administrar de manera repetida siempre y cuando sean necesarias (p. ej., al menos 10, 20, 28, 30, 40, 50, 52, o 57 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 años).

En ciertas realizaciones, la dosis efectiva para el tratamiento a demanda es 20-50 UI/Kg (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, o 50 UI/kg). El tratamiento a demanda puede ser una dosificación de una vez o una dosificación repetida. Para la dosificación repetida, el intervalo de dosificación puede ser cada 12-24 horas, cada 24-36 horas, cada 24-48 horas, cada 36-48 horas, o cada 48-72 horas. Por consiguiente, el término «dosificación repetida» se refiere a la administración de más de una dosis en un periodo de tiempo. Las dosis administradas en un régimen de «dosificación repetida» se denominan «dosis repetidas». En algunas realizaciones, cada una de las dosis repetidas se separa de otra en al menos alrededor de 12 horas, en al menos alrededor de 24 horas, en al menos alrededor de dos días, en al menos alrededor de tres días, en al menos alrededor de cuatro días, en al menos alrededor de cinco días, en al menos alrededor de seis días, en al menos alrededor de siete días, en al menos alrededor de ocho días, en al menos alrededor de nueve días, en al menos alrededor de diez días, en al menos alrededor de 11 días, en al menos alrededor de 12 días, en al menos alrededor de 13 días, en al menos alrededor de 14 días, o en al menos alrededor de 15 días. En algunas realizaciones, las dosis repetidas comprenden al menos alrededor de dos dosis, al menos alrededor de cinco dosis, al menos alrededor de 10 dosis, al menos alrededor de 20 dosis, al menos alrededor de 25 dosis, al menos alrededor de 30 dosis, al menos alrededor de 35 dosis, al menos alrededor de 40 dosis, al menos alrededor de 45 dosis, al menos alrededor de 50 dosis, al menos alrededor de 55 dosis, al menos alrededor de 60

dosis, al menos alrededor de 65 dosis, o al menos alrededor de 70 dosis. Las dosis repetidas comprenden de alrededor de dos dosis a alrededor de 100 dosis, de alrededor de cinco dosis a alrededor de 80 dosis, de alrededor de 10 dosis a alrededor de 70 dosis, de alrededor de 10 dosis a alrededor de 60 dosis, de alrededor de 10 dosis a alrededor de 50 dosis, de alrededor de 15 dosis a alrededor de 40 dosis, de alrededor de 15 dosis a alrededor de 30 dosis, de alrededor de 20 dosis a alrededor de 30 dosis, o de alrededor de 20 dosis a alrededor de 40 dosis. Las dosis repetidas comprenden alrededor de dos dosis, alrededor de cinco dosis, alrededor de 10 dosis, alrededor de 15 dosis, alrededor de 20 dosis, alrededor de 25 dosis, alrededor de 30 dosis, alrededor de 35 dosis, alrededor de 40 dosis, alrededor de 45 dosis, alrededor de 50 dosis, alrededor de 55 dosis, alrededor de 60 dosis, alrededor de 65 dosis, alrededor de 70 dosis, alrededor de 75 dosis, alrededor de 80 dosis, alrededor de 90 dosis, o alrededor de 100 dosis.

En algunas realizaciones, al sujeto además se le administra, después de las dosis repetidas, una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor de coagulación que comprende el factor de coagulación, pero que no comprende una porción Fc. Este factor de coagulación puede ser un factor de coagulación de longitud completa o maduro. En algunas realizaciones, dicho factor de coagulación puede ser ADVATE®, RECOMBINATE®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI®, e HYATE:C®.

Los términos «de acción prolongada» y «de larga duración» se utilizan de manera intercambiable en el presente documento. «Factores de coagulación de larga duración» o «factores de coagulación de acción prolongada» (p. ej., FVII de acción prolongada, FVIII de acción prolongada, y FIX de acción prolongada) son factores de coagulación, p. ej., FVII, FVIII, o FIX, que tienen una semivida aumentada (también denominada en el presente documento $t_{1/2}$, $t_{1/2}$ beta, semivida de eliminación y HL) respecto de un factor de coagulación de referencia, p. ej., FVII, FVIII o FIX. La actividad de FVIII «más prolongada» se puede medir con cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica, p. ej., ensayo aPTT, ensayo cromogénico, ROTEM, EGT, y etc. En una realización, la actividad de FVIII «más prolongada» se puede mostrar mediante la $T_{1/2}$ beta (actividad). En otra realización, la actividad de FVIII «más prolongada» se puede mostrar mediante el nivel de antígeno de FVIII presente en el plasma, p. ej., mediante $T_{1/2}$ beta (antígeno). En otras realizaciones, el polipéptido de FVIII de acción prolongada o de larga duración funciona durante más tiempo en una cascada de coagulación, p. ej., está activo durante un periodo más prolongado, en comparación con el polipéptido de FVIII de tipo salvaje, REFACTO® o ADVATE®.

La semivida aumentada de un factor de coagulación de acción prolongada, p. ej., un FVIII de acción prolongada, se puede deber a la fusión con uno o más polipéptidos de factor de no coagulación tal como, p. ej., Fc. La semivida aumentada puede deberse a una o más modificaciones, tales como, p. ej., pegilación. El factor de coagulación de acción prolongada ejemplar (p. ej., polipéptidos de FVIII de acción prolongada) incluyen, p. ej., factores de coagulación quiméricos (p. ej., polipéptidos de FVIII quiméricos que comprenden Fc), y factores de coagulación quiméricos que comprenden albúmina (p. ej., polipéptidos de FVIII quiméricos que comprenden albúmina). Los factores de coagulación de acción prolongada ejemplares adicionales (p. ej., polipéptidos de FVIII de acción prolongada) incluyen, p. ej., factores de coagulación pegilados (p. ej., FVIII pegilado).

El polipéptido «de referencia», p. ej., en el caso de un factor de coagulación de acción prolongada (p. ej., un polipéptido de FVIII quimérico de acción prolongada), es un polipéptido compuesto esencialmente por la porción de factor de coagulación del polipéptido quimérico. Por ejemplo, en el caso de un FVIII de acción prolongada, el polipéptido de referencia es la porción de FVIII del polipéptido quimérico, p. ej., la misma porción de FVIII sin la porción Fc, o sin la porción de albúmina. Del mismo modo, el polipéptido de referencia en el caso de un FVIII modificado es el mismo FVIII sin la modificación, p. ej., un FVIII sin la pegilación.

En algunas realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a un sujeto:

- 50 un tiempo medio de residencia (TMR) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 14-41,3 horas;
- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,22-5,19 mL/hora/kg o menos;
- una $t_{1/2}$ beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 11-26,4 horas;
- una recuperación progresiva (valor K) (actividad; observado) en dicho sujeto de alrededor de 1,38-2,88 UI/dL por UI/kg;
- 55 un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 37,7 - 79,4 mL/kg; y
- un ABC/dosis medio (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 19,2 - 81,7 UI*h/dL por UI/kg;

En algunas realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

60

- una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) mayor de 1,38 UI/dL por UI/kg;
 una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) de al menos alrededor de 1,5, al menos alrededor de 1,85, o al menos alrededor de 2,46 UI/dL por UI/kg.
 una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de $2,33 \pm 1,08$ mL/hora/kg o menos;
- 5 una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 1,8 - 2,69 mL/hora/kg;
 una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes que es de alrededor de 65 % de la depuración de un polipéptido que comprende dicho FVIII sin modificación;
 un tiempo medio de residencia (TMR) (actividad) en dicha población de pacientes de al menos alrededor de 26,3 ± 8,33 horas;
- 10 un TMR (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 25,9 - 26,5 horas;
 un TMR (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 1,5 veces mayor que el TMR de un polipéptido que comprende dicho FVIII sin modificación;
 una $t_{1/2}$ beta media (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de $18,3 \pm 5,79$ horas;
- 15 una $t_{1/2}$ beta media (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 18-18,4 horas;
 una $t_{1/2}$ beta media (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 1,5 veces mayor que la $t_{1/2}$ beta media de un polipéptido que comprende dicho FVIII sin modificación;
 una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de alrededor de $2,01 \pm 0,44$ UI/dL por UI/kg;
- 20 una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de alrededor de 1,85-2,46 UI/dL por UI/kg;
 una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes que es alrededor de 90 % de la recuperación progresiva media de un polipéptido que comprende dicho FVIII sin modificación;
- 25 un V_{EE} medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de $55,1 \pm 12,3$ mL/kg;
 un V_{EE} medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 45,3 - 56,1 mL/kg;
 un ABC/dosis medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de $49,9 \pm 18,2$ UI*h/dL por UI/kg;
 un ABC/dosis medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 44,8 - 57,6 UI*h/dL por UI/kg;
- 30 En otras realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:
- una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto al que se le ha administrado el polipéptido quimérico es comparable a la $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en un sujeto al que se le ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por FVIII de longitud
- 35 completa, maduro, cuando se mide mediante un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 60,5 UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 1$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 2$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 3$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 4$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 5$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 6$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 7$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 8$ UI/dL, alrededor de $60,5 \pm 9$ UI/dL, o alrededor de $60,5 \pm 10$ UI/dL
- 40 medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 53,1 - 69 UI/dL medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 119 ± 1 UI/dL, alrededor de 119 ± 2 UI/dL, alrededor de 119 ± 3 UI/dL, alrededor de 119 ± 4 UI/dL, alrededor de 119 ± 5 UI/dL, alrededor de 119 ± 6 UI/dL, alrededor de 119 ± 7
- 45 UI/dL, alrededor de 119 ± 8 UI/dL, alrededor de 119 ± 9 UI/dL, alrededor de 119 ± 10 UI/dL, alrededor de 119 ± 11 UI/dL, alrededor de 119 ± 12 UI/dL, alrededor de 119 ± 13 UI/dL, alrededor de 119 ± 14 UI/dL, alrededor de 119 ± 15 UI/dL, alrededor de 119 ± 16 UI/dL, alrededor de 119 ± 17 UI/dL, o alrededor de 119 ± 18 UI/dL, medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 103 - 136 UI/dL medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando
- 50 se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 76,5 UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 1$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 2$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 3$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 4$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 5$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 6$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 7$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 8$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 9$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 10$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 11$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 12$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 13$ UI/dL, alrededor de $76,5 \pm 14$
- 55 UI/dL, o alrededor de $76,5 \pm 15$ UI/dL, medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 64,9 - 90,1 UI/dL medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
 una $C_{m\acute{a}x_OBS}$ en dicho sujeto de alrededor de 182 UI/dL, alrededor de 182 ± 2 UI/dL, alrededor de 182 ± 4 UI/dL,
- 60 alrededor de 182 ± 6 UI/dL, alrededor de 182 ± 8 UI/dL, alrededor de 182 ± 10 UI/dL, alrededor de 182 ± 12 UI/dL,

alrededor de 182 ± 14 UI/dL, alrededor de 182 ± 16 UI/dL, alrededor de 182 ± 18 UI/dL, o alrededor de 182 ± 20 UI/dL medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o

- 5 una $C_{\text{máx_OBS}}$ en dicho sujeto de alrededor de 146 - 227 UI/dL, alrededor de 146 ± 5 UI/dL, alrededor de 146 ± 10 UI/dL, alrededor de 227 ± 5 UI/dL, o alrededor de 146 ± 10 UI/dL medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

En ciertas realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

- 10 una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto que es al menos 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,89, o 1,90 veces superior a la $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en un sujeto al que le se ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por el FVIII de longitud
- 15 completa, maduro, cuando se mide mediante un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 18,8 horas, $18,8 \pm 1$ hora, $18,8 \pm 1$ hora, $18,8 \pm 2$ horas, $18,8 \pm 3$ horas, $18,8 \pm 4$ horas, $18,8 \pm 5$ horas, $18,8 \pm 6$ horas, $18,8 \pm 7$ horas, $18,8 \pm 8$ horas, $18,8 \pm 9$ horas, $18,8 \pm 10$ horas, o $18,8 \pm 11$ horas medida con un ensayo (aPTT) en una etapa;
- 20 una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 14,3 - 24,5 horas medida con un ensayo (aPTT) en una etapa;
- una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 16,7 horas, $16,7 \pm 1$ hora, $16,7 \pm 2$ horas, $16,7 \pm 3$ horas, $16,7 \pm 4$ horas, $16,7 \pm 5$ horas, $16,7 \pm 6$ horas, $16,7 \pm 7$ horas, $16,7 \pm 8$ horas, $16,7 \pm 9$ horas, $16,7 \pm 10$ horas, o $16,7 \pm 11$ horas medida con un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- 25 una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 13,8 - 20,1 horas medida con un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 19,8 horas, $19,8 \pm 1$ hora, $19,8 \pm 2$ horas, $19,8 \pm 3$ horas, $19,8 \pm 4$ horas, $19,8 \pm 5$ horas, $19,8 \pm 6$ horas, $19,8 \pm 7$ horas, $19,8 \pm 8$ horas, $19,8 \pm 9$ horas, $19,8 \pm 10$ horas, o $19,8 \pm 11$ horas medida con un ensayo (cromogénico) en dos etapas; o
- 30 una $t_{1/2\text{beta}}$ (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 14,3 - 27,5 horas medida con un ensayo (cromogénico) en dos etapas;

En ciertas realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

- 35 una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto es 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,60, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, o 0,70 veces inferior que la depuración en un sujeto al cual se le ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por el FVIII de longitud completa, maduro, cuando se mide con un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- 40 una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,68 mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $1,68 \pm 0,7$ mL/hora/kg, medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,31 - 2,15 mL/hora/kg medida por un ensayo
- 45 (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 2,32 mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $2,32 \pm 0,7$ mL/hora/kg, medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 50 una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,64 - 3,29 mL/hora/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,49 mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $1,49 \pm 0,7$ mL/hora/kg, medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del
- 55 polipéptido quimérico;
- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,16 - 1,92 mL/hora/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,52 mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $1,52 \pm 0,7$ mL/hora/kg, medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del
- 60

polipéptido quimérico; o

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,05 - 2,20 mL/hora/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

- 5 En algunas realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

- un TMR en dicho sujeto es al menos 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,89, 1,90, 1,91, 1,92 o 1,93 veces superior al TMR en un sujeto al que le se ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por FVIII de longitud completa, maduro, cuando se mide mediante un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- 10 un TMR (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 27 horas, 27 ± 1 hora, 27 ± 2 horas, 27 ± 3 horas, 27 ± 4 horas, 27 ± 5 horas, 27 ± 6 horas, 27 ± 7 horas, 27 ± 8 horas, 27 ± 9 horas, o 27 ± 10 horas, medido por un ensayo (aPTT) en una etapa;
- 15 un TMR (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 20,6 - 35,3 horas medido por un ensayo (aPTT) en una etapa;
- un TMR (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 23,9 - 28,5 horas medido por un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- un TMR (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 19,8 - 28,9 horas medido por un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- 20 un TMR (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 20,5 - 39,6 horas medido por un ensayo (cromogénico) en dos etapas.

- En algunas realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

- una recuperación progresiva en dicho sujeto que es comparable con la recuperación progresiva en un sujeto al que se le ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por FVIII de longitud completa, maduro, cuando se mide mediante un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- 30 una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 2,44 UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,1$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,2$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,3$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,4$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,5$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,6$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,7$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,8$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 0,9$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 1,0$ UI/dL por UI/kg, $2,44 \pm 1,1$ UI/dL por UI/kg, o $2,44 \pm 1,2$ UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 35 una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 2,12 - 2,81 UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 1,83 UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,1$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,2$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,3$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,4$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,5$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,6$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,7$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,8$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 0,9$ UI/dL por UI/kg, $1,83 \pm 1,0$ UI/dL por UI/kg, o $1,83 \pm 1,1$ UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 40 una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 1,59 - 2,10 UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 3,09 UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,1$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,2$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,3$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,4$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,5$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,6$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,7$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,8$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 0,9$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 1,0$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 1,1$ UI/dL por UI/kg, $3,09 \pm 1,2$ UI/dL por UI/kg, o $3,09 \pm 1,3$ UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 45 una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 2,80 UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,1$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,2$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,3$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,4$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,5$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,6$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,7$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,8$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 0,9$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 1,0$ UI/dL por UI/kg, $2,80 \pm 1,1$ UI/dL por UI/kg, o $2,80 \pm 1,2$ UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 50 una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 2,61 - 3,66 UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico; o
- 55 una recuperación progresiva en dicho sujeto de alrededor de 2,24 - 3,50 UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

- Incluso en otras realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

- un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto que es comparable con el V_{EE} en un sujeto al que se le ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por FVIII de longitud completa, maduro, cuando se mide mediante un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- 5 un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 45,5 mL/kg, 45,5 $\pm$ 1 mL/kg, 45,5 $\pm$ 2 mL/kg, 45,5 $\pm$ 3 mL/kg, 45,5 $\pm$ 4 mL/kg, 45,5 $\pm$ 5 mL/kg, 45,5 $\pm$ 6 mL/kg, 45,5 $\pm$ 7 mL/kg, 45,5 $\pm$ 8 mL/kg, 45,5 $\pm$ 9 mL/kg, 45,5 $\pm$ 10 mL/kg, o 45,5 $\pm$ 11 mL/kg, medido por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 10 un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 39,3 - 52,5 mL/kg medido por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 62,8 mL/kg, 62,8 $\pm$ 1 mL/kg, 62,8 $\pm$ 2 mL/kg, 62,8 $\pm$ 3 mL/kg, 62,8 $\pm$ 4 mL/kg, 62,8 $\pm$ 5 mL/kg, 62,8 $\pm$ 6 mL/kg, 62,8 $\pm$ 7 mL/kg, 62,8 $\pm$ 8 mL/kg, 62,8 $\pm$ 9 mL/kg, 62,8 $\pm$ 10 mL/kg, 62,8 $\pm$ 11 mL/kg, 62,8 $\pm$ 12 mL/kg, 62,8 $\pm$ 13 mL/kg, 62,8 $\pm$ 14 mL/kg, 62,8 $\pm$ 15 mL/kg, o 62,8 $\pm$ 16 mL/kg, medido por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 15 un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 55,2 - 71,5 mL/kg medido por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 35,9 mL/kg, 35,9 $\pm$ 1 mL/kg, 35,9 $\pm$ 2 mL/kg, 35,9 $\pm$ 3 mL/kg, 35,9 $\pm$ 4 mL/kg, 35,9 $\pm$ 5 mL/kg, 35,9 $\pm$ 6 mL/kg, 35,9 $\pm$ 7 mL/kg, 35,9 $\pm$ 8 mL/kg, 35,9 $\pm$ 9 mL/kg, 35,9 $\pm$ 10 mL/kg, 35,9 $\pm$ 11 mL/kg, 35,9 $\pm$ 12 mL/kg, o 35,9 $\pm$ 13 mL/kg, medido por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se
- 20 administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 30,4 - 42,3 mL/kg medido por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 43,4 mL/kg, 43,4 $\pm$ 1 mL/kg, 43,4 $\pm$ 2 mL/kg, 43,4 $\pm$ 3 mL/kg, 43,4 $\pm$ 4 mL/kg, 43,4 $\pm$ 5 mL/kg, 43,4 $\pm$ 6 mL/kg, 43,4 $\pm$ 7 mL/kg, 43,4 $\pm$ 8 mL/kg, 43,4 $\pm$ 9 mL/kg, 43,4 $\pm$ 10 mL/kg, 43,4 $\pm$ 11 mL/kg, 43,4 $\pm$ 12 mL/kg, 43,4 $\pm$ 13 mL/kg, 43,4 $\pm$ 14 mL/kg, 43,4 $\pm$ 15 mL/kg, o 43,4 $\pm$ 16 mL/kg, medido por un
- 25 ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o
- un V_{EE} (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 38,2 - 49,2 mL/kg medido por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.
- 30 Incluso en otras realizaciones, el FVIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:
- un ABC_{INF} en dicho sujeto es al menos 1,45, 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77,
- 35 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,89, 1,90 veces superior al ABC_{INF} en un sujeto al que se le ha administrado la misma cantidad de un polipéptido compuesto por FVIII de longitud completa, maduro, cuando se mide mediante un ensayo (aPTT) en una etapa o un ensayo (cromogénico) en dos etapas;
- un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 1.440 - 316 h*UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 40 un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 1.160 - 1.880 UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 1.480 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 100 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 200 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 300 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 400 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 500 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 600 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 700 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 800 h*UI/dL por UI/kg, 1.480 $\pm$ 900 h*UI/dL por
- 45 UI/kg, o 1.480 $\pm$ 1.000 h*UI/dL por UI/kg, medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 2.910 $\pm$ 1.320 h*UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 1.980 - 3.970 UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (aPTT) en una etapa
- 50 cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 2.800 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 100 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 200 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 300 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 400 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 500 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 600 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 700 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 800 h*UI/dL por UI/kg, 2.800 $\pm$ 900 h*UI/dL por
- 55 UI/kg, o 2.800 $\pm$ 1.000 h*UI/dL por UI/kg, medida por un ensayo (aPTT) en una etapa cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 1.660 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 100 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 200 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 300 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 400 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 500 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 600 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 700 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 800 h*UI/dL por UI/kg, 1.660 $\pm$ 900 h*UI/dL por
- 60 UI/kg, o 1.660 $\pm$ 1.000 h*UI/dL por UI/kg, medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 1.300 - 2.120 h*UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 4.280 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 100 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 200 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 300 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 400 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 500 h*UI/dL por UI/kg,

- 5 4.280 ± 600 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 700 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 800 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 900 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 1.000 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 1.100 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 1.200 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 1.300 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 1.400 h*UI/dL por UI/kg, 4.280 ± 1.500 h*UI/dL por UI/kg, o 4.280 ± 1.600 h*UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o

- 10 un ABC_{INF} en dicho sujeto de alrededor de 2.960 - 6.190 h*UI/dL por UI/kg medida por un ensayo (cromogénico) en dos etapas cuando se administra alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

El término «tratamiento a demanda», como se usa en el presente documento, significa un tratamiento que está destinado a llevarse a cabo en un periodo de tiempo breve y que sea en respuesta a una afección existente, tal

- 15 como un episodio hemorrágico, o una necesidad percibida, tal como una cirugía planeada. Los términos «tratamiento a demanda» y «tratamiento episódico» se utilizan de forma intercambiable. Las afecciones que pueden requerir tratamiento a demanda (episódicos) incluyen, p. ej., un episodio hemorrágico, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, traumatismo de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica,
- 20 fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal o hemorragia en la vaina del iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen, p. ej., cirugía menor, cirugía mayor, extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica o cirugía de reemplazo de
- 25 articulaciones.

En una realización, el tratamiento a demanda (episódico) resuelve más del 80 % (más del 80 %, más del 81 %, más del 82 %, más del 83 %, más del 84 %, más del 85 %, más del 86 %, más del 87 %, más del 88 %, más del 89 %, más del 90 %, más del 91 %, más del 92 %, más del 93 %, más del 94 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97

- 30 %, más del 98 %, más del 99 %, o el 100 %) o 80 - 100 %, 80 - 90 %, 85 - 90 %, 90 - 100 %, 90 - 95 %, o 95 - 100 % de las hemorragias (p. ej., hemorragias espontáneas) en una sola dosis. En una realización, más del 80 % (más del 81 %, más del 82 %, más del 83 %, más del 84 %, más del 85 %, más del 86 %, más del 87 %, más del 88 %, más del 89 %, más del 90 %, más del 91 %, más del 92 %, más del 93 %, más del 94 %, más del 95 %, más del 96 %, más del 97 %, más del 98 %, o el 100 %) o 80 - 100 %, 80 - 90 %, 85 - 90 %, 90 - 100 %, 90 - 95 %, o 95 - 100 % de
- 35 los episodios hemorrágicos son calificados como excelentes o buenos por los médicos después del tratamiento a demanda (episódico). En otras realizaciones, más del 5 %, (más del 6 %, más del 7 %, más del 8 %, más del 9 %, más del 10 %, más del 11 %, más del 12 %, más del 13 %, más del 14 %, más del 15 %, más del 16 %, más del 17 %, más del 18 %, más del 19 %, más del 20 %), o 5 - 20 %, 5 - 15 %, 5 - 10 %, 10 - 20 %, o 10 - 15 % de los episodios hemorrágicos son calificados como buenos por los médicos después del tratamiento a demanda
- 40 (episódico).

Los términos «polipéptido», «péptido» y «proteína» se usan de manera intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por residuos de aminoácidos unidos de manera covalente.

- 45 Los términos «polinucleótido» y «ácido nucleico» se usan de forma intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por residuos de nucleótidos unidos de manera covalente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, monocatenario o bicatenario, vectores, plásmidos, fagos o virus. Los polinucleótidos incluyen, p. ej., los de la Tabla 1, que codifican los polipéptidos de la Tabla 2 (véase la Tabla 1). Los polinucleótidos también incluyen, p. ej., fragmentos de los polinucleótidos de la Tabla 1, p. ej., los que codifican fragmentos de los
- 50 polipéptidos de la Tabla 2, tales como FVIII, Fc, secuencia señal, 6His y otros fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 2.

El término «tratamiento profiláctico», como se usa en el presente documento, significa administrar un polipéptido de FVIII en dosis múltiples a un sujeto durante un periodo de tiempo para aumentar el nivel de actividad de FVIII en el plasma de un sujeto. El nivel aumentado puede ser suficiente para disminuir la incidencia de sangrado espontáneo o para prevenir el sangrado, p. ej., en el caso de una lesión imprevista. Durante el tratamiento profiláctico, el nivel de proteína en plasma del sujeto no puede caer por debajo del nivel inicial para ese sujeto, o por debajo del nivel de FVIII que caracteriza la hemofilia grave (<1 UI/dl [1 %]).

- 60 En una realización, el régimen de profilaxis se «adapta» al paciente individual, por ejemplo, determinando los datos

- de PK para cada paciente y administrando el FVIII de la presente descripción en un intervalo de dosificación que mantiene un nivel mínimo del 1 - 3 % de actividad de FVIII. Se pueden hacer ajustes cuando un sujeto experimenta episodios hemorrágicos inaceptables definidos como ≥ 2 episodios hemorrágicos espontáneos durante un periodo de dos meses consecutivos. En este caso, el ajuste se dirigirá a niveles mínimos del 3 - 5 %. En otra realización, el tratamiento profiláctico da como resultado la prevención y el control de la hemorragia, el control sostenido de la hemorragia, la protección sostenida contra la hemorragia, y/o el beneficio sostenido. La profilaxis, p. ej., la protección sostenida se puede demostrar mediante un ABC aumentado hasta el último punto de tiempo medido (ABC-ÚLTIMO) y una depuración reducida, dando como resultado un aumento de la $t_{1/2}$ terminal en comparación con FVIII de acción corta. La profilaxis se puede demostrar por una mejor $C_{\text{máx}}$, un mejor $T_{\text{máx}}$ y/o un mayor tiempo medio de residencia frente al FVIII de acción corta. En algunas realizaciones, la profilaxis no produce episodios hemorrágicos espontáneos dentro de alrededor de 24, 36, 48, 72 o 96 horas (p. ej., 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, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 96 horas), después de la inyección (p. ej., la última inyección). En ciertas realizaciones, la profilaxis da como resultado más del 30 % (p. ej., más del 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, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, o el 90 %, por ejemplo, más del 50 %) de reducción media en los episodios de hemorragia al año con una dosificación de una vez a la semana (p. ej., 65 UI/kg).
- El término «sujeto», como se utiliza en el presente documento, significa un ser humano. El sujeto puede ser un paciente que en ese momento padece un trastorno hemorrágico o que se espera necesite tal tratamiento. En algunas realizaciones, el sujeto nunca ha sido tratado con el factor de coagulación en el pasado (es decir, el sujeto es un sujeto no tratado previamente o un paciente no tratado previamente). En algunas realizaciones, el sujeto es un feto y los procedimientos comprenden administrar el polipéptido quimérico a la madre del feto y la administración al sujeto se lleva a cabo desde la madre a través de la placenta. En algunas realizaciones, el sujeto es un niño o un adulto. En algunas realizaciones, el sujeto es un niño de menos de un año de edad, de menos de dos años de edad, de menos de tres años de edad, de menos de cuatro años de edad, de menos de cinco años de edad, de menos de seis años de edad, de menos de siete años de edad, de menos de ocho años de edad, de menos de nueve años de edad, de menos de diez años de edad, de menos de once años de edad, o de menos de doce años de edad. En algunas realizaciones, el niño es de menos de un año de edad. En algunas realizaciones, el sujeto niño o adulto desarrolla un trastorno hemorrágico, donde el inicio de los síntomas del trastorno hemorrágico se produce después de un año de edad. En algunas realizaciones, la administración del polipéptido quimérico al sujeto es suficiente para prevenir, inhibir o reducir el desarrollo de una respuesta inmunitaria seleccionada de entre una respuesta inmunitaria humoral, una respuesta inmunitaria mediada por células, o tanto una respuesta inmunitaria humoral como una respuesta inmunitaria mediada por células contra el factor de coagulación.

- En algunas realizaciones descritas en el presente documento, el sujeto presenta riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. Un sujeto puede correr el riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII porque, por ejemplo, el sujeto previamente desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII o tiene actualmente una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII después del tratamiento con un producto de FVIII derivado de plasma. En algunas realizaciones, el sujeto desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII después del tratamiento con un producto de FVIII recombinante. En algunas realizaciones, el sujeto desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII después del tratamiento con una proteína de FVIII de longitud completa. En algunas realizaciones, el sujeto desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII después del tratamiento con proteína de FVIII que contiene una eliminación, p. ej., una eliminación completa o parcial del dominio B.

- En algunas realizaciones, el sujeto desarrolló una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII después del tratamiento con un producto de FVIII seleccionado de entre el grupo compuesto por ADVATE[®], RECOMBINATE[®], KOGENATE FS[®], HELIXATE FS[®], XYNTHA[®]/REFACTO AB[®], HEMOFIL-M[®], MONARC-M[®], MONOCLATE-P[®], HUMATE-P[®], ALPHANATE[®], KOATE-DVI[®], o HYATE:C[®].

- En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria después del tratamiento con un factor de coagulación, p. ej., FVIII, comprende la producción de anticuerpos inhibidores contra el factor de coagulación. En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpos inhibidores es al menos 0,6 unidades Bethesda (UB). En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpos inhibidores es al menos 5 UB. En algunas realizaciones, la concentración de anticuerpos inhibidores es al menos 0,5, al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,5, al menos 2,0, al menos 3,0, al menos 4,0, al menos 5,0, al menos 6,0, al menos 7,0, al menos 8,0, al menos 9,0, o al menos 10,0 UB.

60

En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria después del tratamiento con un factor de coagulación, p. ej., FVIII, comprende una respuesta inmunitaria mediada por células. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria mediada por células. La respuesta inmunitaria mediada por células puede comprender esa liberación de una citocina seleccionada de entre el grupo compuesto por IL-12, IL-4 y TNF- α .

5

En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria después del tratamiento con un factor de coagulación, p. ej., FVIII, comprende un síntoma clínico seleccionado de entre el grupo compuesto por: mayor tendencia a la hemorragia, consumo elevado de factor de coagulación, falta de respuesta a terapia con factor de coagulación, menor eficacia de terapia con factor de coagulación, y semivida más breve del factor de coagulación. En algunas realizaciones, el sujeto tiene una mutación o eliminación en el gen del factor de coagulación. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un reordenamiento en el gen del factor de coagulación. En algunas realizaciones, el sujeto tiene hemofilia grave. En algunas realizaciones, el sujeto tiene un familiar que desarrolló previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación. En algunas realizaciones, el sujeto recibe terapia con interferón. En algunas realizaciones, el sujeto recibe terapia antiviral.

10

En algunas realizaciones, el sujeto en riesgo desarrolló previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria a una proteína terapéutica que no es el FVIII.

15

Asimismo, el sujeto también puede correr riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII como resultado de diversos factores mediambientales o genéticos que aumentan la probabilidad de que el sujeto desarrolle una respuesta inmunitaria inhibitoria. Los factores que aumentan la probabilidad de que un sujeto desarrolle una respuesta inmunitaria inhibitoria son conocidos. Véase Kasper, C. «Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians», *Treatment of Hemophilia* 34 (2004), al que se hace referencia en el presente documento. Por ejemplo, los inhibidores surgen más comúnmente en hemofilia grave, (p. ej., nivel inicial de FVIII inferior a 1 %) que en hemofilia leve o moderada. Véase *Report of Expert Meeting on FVIII Products and Inhibitor Development*, Agencia Europea de Medicamentos (28 de febrero de 2006 - 2 de marzo de 2006).

20

Como resultado del hecho de que los factores genéticos pueden aumentar la probabilidad de que un sujeto desarrolle una respuesta inmunitaria inhibitoria, un sujeto con al menos un miembro de la familia (p. ej., un hermano o hermana, padre o madre, hijo o hija, abuelo o abuela, tía, tío o primo) que ha desarrollado una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII u otra proteína terapéutica puede presentar riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII.

30

Los inhibidores son comunes en pacientes con mutaciones genéticas que impiden la expresión de FVIII tales como eliminaciones genéticas considerables, mutaciones sin sentido que producen codones de terminación prematura, e inversiones considerables en el gen del FVIII. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII comprende una mutación, eliminación o reordenamiento del gen del FVIII. En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII comprende una mutación en FVIII que no deja que el FVIII se una a los linfocitos T. Se ha observado una asociación de inhibidores con reordenamientos considerables de genes del FVIII. Véase Astermark y col., *Blood* 107:3167-3172 (2006). Por lo tanto, en algunas realizaciones, una proteína de fusión de FVIII-Fc se administra a un sujeto con un reordenamiento considerable en un gen del FVIII, por ejemplo, una inversión del intrón 22 o una inversión del intrón 1. En algunas realizaciones, se administra FVIII-Fc a un sujeto con dos reordenamientos considerables en FVIII. También se ha observado una asociación de inhibidores con mutaciones nulas. Astermark y col., *Blood* 108:3739-3745 (2006). Por ende, en algunas realizaciones, una proteína de fusión de FVIII-Fc se administra a un sujeto con una mutación nula.

35

40

45

Los inhibidores también surgen más comúnmente después del tratamiento con factores de coagulación exógenos solo en algunas ocasiones. Por lo tanto, en algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria ha tenido menos de 200, 175, 150, 125, 100, 75, 50, 25, 20, 15, 10, o 5 días de exposición. En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria no se ha expuesto previamente a tratamiento con FVIII.

50

En algunas realizaciones, el sujeto es un feto. La tolerancia inmunitaria se puede inducir en un feto administrando un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc a la madre del feto.

55

Los inhibidores también surgen comúnmente en la descendencia de raza negra africana. Véase, p. ej., Kasper, C. «Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians», *Treatment of Hemophilia* 34 (2004). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una

60

respuesta inmunitaria inhibitoria es de descendencia de raza negra africana.

Las mutaciones genéticas en genes que no sean FVIII también se han relacionado con un riesgo aumentado de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria. Por ejemplo, el polimorfismo del TNF- α -308G>A dentro de Hap2, que se asocia con niveles de transcripción inducibles y constitutivos aumentados de TNF, se ha relacionado con un riesgo aumentado de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria. Véase Astermark y *col.*, Blood 108: 3739-3745 (2006). Por consiguiente, en algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria tiene un polimorfismo genético asociado al TNF- α aumentado. En algunas realizaciones, el polimorfismo es el polimorfismo del TNF- α -308G>A. En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria tiene un polimorfismo en un gen de IL10, p. ej., un polimorfismo asociado a la secreción aumentada de IL10. En algunas realizaciones, se administra FVIII-Fc a un sujeto con el alelo 134 del microsatélite de la IL10G en la región remota del gen de la IL10. Véase Astermark y *col.* Hemostasis, Thrombosis, and Vascular Biology 108: 3739-3745 (2006).

En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria tiene un polimorfismo genético asociado a la expresión disminuida del CTLA-4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico). En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria tiene una mutación en las moléculas CMH (Complejo Mayor de Histocompatibilidad) de clase II DR15 (HLA-DR15) o DQB0602. Otras moléculas CMH de clase II asociadas con el desarrollo de una respuesta inmunitaria inhibitoria en sujetos con hemofilia son A3, B7, C7, DQA0102, C2, DQA0103, DQB0603, y DR13 (véase Inhibitors in Patients with Hemophilia, E.C. Rodriguez-Merchan & C.A. Lee, Eds., Blackwell Science, Ltd., 2002).

En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria no se ha expuesto previamente al factor de coagulación, p. ej., FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria a un factor de coagulación, p. ej., FVIII, se ha expuesto a FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria a un factor de coagulación, p. ej., FVIII, ha tenido menos de 150, menos de 50 o menos de 20 días de exposición a FVIII. En algunas realizaciones, el sujeto ha tenido al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 días de exposición al factor de coagulación. En algunas realizaciones, el sujeto ha tenido al menos 25, 30, 35, 40, 45, o 50 días de exposición al factor de coagulación. En algunas realizaciones, el sujeto ha tenido al menos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140 o 150 días de exposición al factor de coagulación.

En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inhibitoria es una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII se desarrolló en respuesta a un producto de FVIII seleccionado de entre el grupo compuesto por: ADVATE®, RECOMBinate®, KOGENATE FS®, HELIXATE FS®, XYNTHA®/REFACTO AB®, HEMOFIL-M®, MONARC-M®, MONOCLATE-P®, HUMATE-P®, ALPHANATE®, KOATE-DVI®, e HYATE:C®. En algunas realizaciones, la respuesta inmunitaria inhibitoria es una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII desarrollada en respuesta a un producto de FVIII recombinante.

En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria recibe o ha recibido recientemente una terapia inmunoestimuladora. Por ejemplo, se ha informado sobre inhibidores en pacientes VHC positivo con hemofilia A que se están sometiendo a tratamiento con interferón, así como en pacientes VIH positivo con hemofilia A que tienen un síndrome inflamatorio de reconstitución inmunitaria asociado con terapia anti-retroviral. Véase Report of Expert Meeting on FVIII Products and Inhibitor Development, Agencia Europea de Medicamentos (28 de febrero de 2006 - 2 de marzo de 2006). Por lo tanto, en algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria está recibiendo terapia con interferón. En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria está recibiendo una terapia antirretroviral y tiene un síndrome inflamatorio de reconstitución inmunitaria.

Una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII se puede determinar de acuerdo con respuestas clínicas a tratamiento con FVIII. Se conocen presentaciones clínicas de los inhibidores de FVIII y se describen en, por ejemplo, Kasper, C. «Diagnosis and Management of Inhibitors to Factors VIII and IX - An Introductory Discussion for Physicians», *Treatment of Hemophilia* 34 (2004). Por ejemplo, la presencia de un inhibidor hace que se dificulte el control de las hemorragias, por lo que las respuestas inmunitarias al FVIII se evidencian con una mayor tendencia a la hemorragia, consumo elevado de FVIII, falta de respuesta a terapia con FVIII, menor eficacia de terapia con FVIII, y/o semivida más breve de FVIII.

Las respuestas inmunitarias inhibitorias al FVIII también se pueden determinar utilizando pruebas de laboratorio como la prueba Bethesda o la modificación de Nijmegen de la prueba Bethesda. Un nivel de al menos 0,6 unidades Bethesda (UB) puede indicar la presencia de una respuesta inmunitaria inhibitoria. Un nivel de al menos 5 UB puede

indicar la presencia de un inhibidor de titulación elevada. También se pueden utilizar las mediciones de recuperación *in vivo* y semivida de la infusión de FVIII en bolo.

En algunas realizaciones, un sujeto con riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria ha tenido previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria con una titulación máxima de al menos 0,5, al menos 0,6, al menos 0,7, al menos 0,8, al menos 0,9, al menos 1,0, al menos 1,5, al menos 2,0, al menos 3,0, al menos 4,0, al menos 5,0, al menos 6,0, al menos 7,0, al menos 8,0, al menos 9,0, o al menos 10,0 UB.

En algunas realizaciones proporcionadas en el presente documento, los procedimientos comprenden determinar si un sujeto tiene riesgo de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII y administrar al sujeto un polipéptido quimérico que comprende una porción de FVIII y una porción Fc si el sujeto está en riesgo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los procedimientos comprenden determinar si el sujeto tiene una mutación, eliminación o reordenamiento en el FVIII y, en caso afirmativo, administrar un polipéptido quimérico. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden determinar si el sujeto produce proteína de FVIII y, en caso negativo, administrar un polipéptido quimérico. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden determinar si el sujeto padece hemofilia leve, moderada o grave, y administrar un polipéptido quimérico si el sujeto padece hemofilia grave. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden determinar si el sujeto tiene una respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII, p. ej., evaluando manifestaciones clínicas de una respuesta inmunitaria, midiendo los niveles de anticuerpo anti-FVIII, titulaciones, o actividades, o midiendo respuesta inmunitaria mediada por células (p. ej., midiendo niveles de citocinas) y administrar un polipéptido quimérico si el sujeto tiene al menos uno de estos indicadores.

El término «dosis terapéutica», como se usa en el presente documento, significa una dosis que logra un objetivo terapéutico, como se describe en el presente documento. El cálculo de la dosis requerida de FVIII se basa en el hallazgo empírico de que, en promedio, 1 UI de FVIII por kg de peso corporal aumenta la actividad de FVIII en plasma en aproximadamente 2 UI/dL. La dosificación requerida se determina usando la siguiente fórmula: Unidades requeridas= peso corporal (kg) x aumento FVIII deseado (UI/dL o % de lo normal) x 0,5 (UI/kg por UI/dL)

Las dosis terapéuticas que pueden usarse en los procedimientos de la descripción son de alrededor de 10 - 100 UI/kg, más específicamente, 10 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 60, 60 - 70, 70 - 80, 80-90, o 90 - 100 UI/kg, y más específicamente, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 UI/kg.

Adicionalmente, las dosis terapéuticas que se pueden utilizar en los procedimientos de la presente descripción son de alrededor de 10 a alrededor de 150 UI/kg, más específicamente, de alrededor de 100 - 110, 110 - 120, 120 - 130, 130 - 140, 140 - 150 UI/kg, y más específicamente, de alrededor de 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 UI/kg.

El término «variante», como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido original, pero que conserva sus propiedades esenciales, p. ej., la actividad coagulante de FVIII, o la actividad de Fc (unión a FcRn). Normalmente, las variantes son, en general, muy similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido original. Las variantes incluyen, p. ej., fragmentos polipeptídicos y de polinucleótidos, eliminaciones, inserciones y versiones modificadas de polipéptidos originales.

Los polinucleótidos variantes pueden comprender, o como alternativa estar compuestos por, una secuencia de nucleótidos que es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia que codifica nucleótidos en las SEQ ID NO:1, 3, o 5 (la porción de FVIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto) o la cadena complementaria a la misma, la secuencia codificante de nucleótidos del mutante conocido y el FVIII recombinante o Fc tales como los descritos en las publicaciones y patentes citadas en el presente documento o la cadena complementaria correspondiente, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de las SEQ ID NO:2, 4, o 6 (la porción de FVIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos de polinucleótidos de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico (p. ej., los fragmentos descritos en el presente documento). Los polinucleótidos que se hibridan con estas moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de astringencia inferiores también se incluyen como variantes, como lo son los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos siempre que sean funcionales.

Los polipéptidos variantes pueden comprender, o como alternativa estar compuestos por, una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en las SEQ ID NO:2, 4, o 6 (la porción de FVIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (p. ej., los fragmentos descritos en el presente documento).

Por un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95 % «idéntica» a una secuencia de nucleótidos de referencia, se pretende que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico sea idéntica a la secuencia de referencia, a excepción de que la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales por cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tenga una secuencia de nucleótidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5 % de los nucleótidos en la secuencia de referencia puede eliminarse o sustituirse por otro nucleótido, o se pueden insertar en la secuencia de referencia varios nucleótidos hasta el 5 % de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. La secuencia consulta puede ser, por ejemplo, la secuencia completa que se muestra en la SEQ ID NO:1 o 3, el ORF (marco de lectura abierto, por su sigla en inglés), o cualquier fragmento especificado como se describe en el presente documento.

En la práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos o polipéptido de la presente descripción se puede determinar de manera convencional utilizando programas informáticos conocidos. En una realización, un procedimiento para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia consulta (secuencia de referencia u original) y una secuencia objeto, también denominada alineación de secuencia global, se puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y col., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). En una alineación de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo U en T. El resultado de dicha alineación de secuencia global es en porcentaje de identidad. En otra realización, los parámetros utilizados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = Unitaria, k-tupla = 4, Penalización por desemparejamiento = 1, Penalización de unión = 30, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Penalización por huecos = 5, Penalización por tamaño de huecos 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, el que sea más corto.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia consulta debido a eliminaciones 5' o 3', no debido a eliminaciones internas, se debe realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia consulta que son 5' y 3' de la secuencia objeto, que no están emparejadas/alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia consulta. Si un nucleótido está emparejado/alineado se determina con los resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB mencionado anteriormente utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es la que se usa para los fines de la presente descripción. Solo las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia objeto, como se muestra mediante la alineación FASTDB, que no están emparejadas/alineadas con la secuencia consulta, se calculan con el propósito de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan el 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejadas/número total de bases en la secuencia consulta), por lo que el 10 % se resta de la puntuación de porcentaje de identidad que se calcula con el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente emparejadas, el porcentaje de identidad final sería 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia consulta de 100 bases. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas, de manera que no hay bases en 5' o 3' de la secuencia objeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia consulta se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente descripción.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95 % «idéntica» a una secuencia de aminoácidos problema de la presente descripción, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia consulta, a excepción de que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos problema. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos problema, hasta un 5 % de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto pueden

insertarse, eliminarse, (indeles) o sustituirse por otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

5

En la práctica, se puede determinar de manera convencional si cualquier polipéptido particular es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 (la porción de FVIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto) o 4, o a una secuencia de polipéptido de FVIII o Fc conocida, usando programas informáticos conocidos. En una realización, un procedimiento para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia consulta (secuencia de referencia u original) y una secuencia objeto, también denominada alineación de secuencia global, se puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag y *col.*, *Comp. App. Biosci.* 6:237-245(1990), al que se hace referencia en el presente documento. En una alineación de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicha alineación de secuencia global se expresa en porcentaje de identidad. En otra realización, los parámetros preferidos utilizados en una alineación de aminoácidos FASTDB son: Matriz = PAM 0, k-tupla = 2, Penalización por desemparejamiento = 1, Penalización de unión = 20, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Tamaño de ventana = longitud de secuencia, Penalización por huecos = 5, Penalización por tamaño de huecos = 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, lo que sea más corto.

20

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia consulta debido a eliminaciones en N o C-terminal, no debido a eliminaciones internas, se debe realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos N y C-terminales de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de residuos de la secuencia consulta que son N y C-terminales de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con un residuo objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia consulta. Si un residuo está emparejado/alineado se determina por los resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB mencionado anteriormente utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación de porcentaje de identidad final es la que se usa para los fines de la presente descripción. Solamente los residuos en los extremos N y C de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con la secuencia consulta, se consideran con el propósito de ajustar manualmente la puntuación de porcentaje de identidad. Es decir, solo el residuo problema se sitúa fuera de los residuos N y C-terminales más lejanos de la secuencia objeto.

35

Por ejemplo, una secuencia objeto de residuos de 90 aminoácidos se alinea con una secuencia consulta de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La eliminación se produce en el extremo N de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Los 10 residuos no emparejados representan el 10 % de la secuencia (número de residuos en los extremos N y C no emparejados/número total de residuos en la secuencia consulta), por lo que el 10 % se resta de la puntuación de porcentaje de identidad que se calcula por el programa FASTDB. Si los 90 residuos restantes coincidieran perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 residuos con una secuencia consulta de 100 residuos. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas, de manera que no hay residuos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no se emparejen/estén alineados con la secuencia consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las posiciones de residuos fuera de los extremos N y C-terminales de la secuencia objeto, como se muestra en la alineación FASTDB, que no están emparejados/alineados con la secuencia consulta, se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente descripción.

50

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. En una realización, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o eliminaciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En otra realización, se producen las variantes de nucleótidos por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. En otras realizaciones, las variantes en las cuales los aminoácidos 5 - 10, 1 - 5 o 1 - 2 se sustituyen, eliminan o añaden en cualquier combinación. Las variantes de polinucleótidos se pueden producir por una variedad de razones, p. ej., para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambiar los codones en el ARNm humano por otros, p. ej. un huésped bacteriano, tal como *E. coli*).

60 Las variantes de origen natural se denominan «variantes alélicas» y se refieren a una de varias formas alternativas

de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar a nivel de polinucleótido y/o polipéptido y están incluidas en la presente descripción. Como alternativa, las variantes no de origen natural se pueden producir mediante técnicas de mutagénesis o mediante síntesis directa.

5

Usando los procedimientos conocidos de ingeniería de proteínas y tecnología de ADN recombinante, se pueden generar variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden eliminar del extremo N o del extremo C de la proteína secretada sin pérdida sustancial de la función biológica. Ron y col., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), informaron sobre variantes de proteínas KGF que tenían actividad de unión a heparina incluso después de eliminar 3, 8 o 27 residuos de aminoácidos amino terminales. De forma similar, el interferón gamma mostró una actividad hasta diez veces mayor después de eliminar 8 - 10 residuos de aminoácidos del extremo carboxi de esta proteína. (Dobeli y col., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988).

10

Además, una amplia evidencia demuestra que las variantes a menudo conservan una actividad biológica similar a la de la proteína de origen natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (*J. Biol. Chem* 268:22105-22111 (1993)) llevaron a cabo un extenso análisis mutacional de la citocina humana IL-1a. Utilizaron mutagénesis aleatoria para generar más de 3.500 mutantes de IL-1a individuales que promediaron 2,5 cambios de aminoácidos por variante en toda la longitud de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posible posición de aminoácido. Los investigadores descubrieron que «la mayor parte de la molécula podría alterarse con poco efecto sobre la [actividad de unión o biológica]». (Véase Resumen). De hecho, solo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difería significativamente en la actividad del tipo salvaje.

15

20

Como se ha indicado anteriormente, las variantes de polipéptidos incluyen, p. ej., polipéptidos modificados. Las modificaciones incluyen, p. ej., acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristilación, oxidación, pegilación (Mei y col., *Blood* 116:270-79 (2010), que se incorpora al presente documento por referencia en su totalidad), procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por transferencia de ARN a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación. En algunas realizaciones, el FVIII está modificado, p. ej., pegilado, en cualquier ubicación conveniente. En algunas realizaciones, el FVIII se pegila en un aminoácido expuesto en la superficie del FVIII, p. ej., una cisteína expuesta en la superficie, que puede ser una cisteína modificada genéticamente. Id. En algunas realizaciones, el FVIII modificado, p. ej., FVIII pegilado, es un FVIII de acción prolongada.

30

35

El término «volumen de distribución en estado estacionario (V_{EE})», como se usa en el presente documento, tiene el mismo significado que el término utilizado en farmacología, que es el espacio (volumen) aparente donde se distribuye un fármaco. V_{EE} = la cantidad de fármaco en el cuerpo dividida por la concentración en plasma en estado estacionario.

40

El término «alrededor», como se usa en el presente documento para un intervalo, modifica ambos extremos del intervalo. Por lo tanto, «alrededor de 10 - 20» significa «alrededor de 10 a alrededor de 20».

45

El polipéptido quimérico utilizado en el presente documento puede comprender FVIII procesado o FVIII monocaténario o una combinación de estos. El término «FVIII procesado», como se utiliza en el presente documento significa FVIII que ha sido escindido en arginina 1648 (para FVIII de longitud completa) o arginina 754 (para FVIII con dominio B eliminado), es decir, un sitio de procesamiento intracelular. Debido a la escisión en el sitio de procesamiento intracelular, el FVIII procesado comprende dos cadenas polipeptídicas, siendo la primera cadena una cadena pesada y la segunda cadena, una cadena ligera. Por ejemplo, la proteína de fusión procesada FVIII-Fc (es decir, cadena pesada y cadena ligera fusionadas con Fc) corre a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa en un análisis SDS-PAGE sin reducción, respectivamente, y a 90 kDa y 105 kDa en un análisis SDS-PAGE con reducción, respectivamente. Por lo tanto, en una realización, al menos alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, o alrededor de 100 % de la porción de FVIII en el polipéptido quimérico es FVIII procesado.

50

55

En otra realización, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de

60

98 %, alrededor de 99 %, o alrededor de 100 % de la porción de FVIII en el polipéptido quimérico es FVIII procesado. En una realización particular, el polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado está purificado (o aislado) del polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario, y al menos alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, o alrededor de 100 % de la porción de FVIII en el polipéptido quimérico es FVIII procesado.

Los términos «FVIII monocatenario» o «FVIII MC» como se utilizan en el presente documento significan FVIII que no ha sido escindido en el sitio de arginina (residuo 1648 para FVIII de longitud completa (es decir, residuo 1667 de la SEQ ID NO: 6) o residuo 754 para FVIII con dominio B eliminado (es decir, residuo 773 de la SEQ ID NO: 2). Por lo tanto, el FVIII monocatenario en el polipéptido quimérico utilizado en el presente documento comprende una única cadena. En una realización, el FVIII monocatenario contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto. La proteína de fusión de FVIII monocatenario-Fc puede correr a aproximadamente 220 kDa en un análisis SDS-PAGE sin reducción y a aproximadamente 195 kDa en un análisis SDS-PAGE con reducción.

En una realización, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario está purificado (o aislado) del polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado, y al menos alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 75 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 99 % o alrededor de 100 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico utilizado en el presente documento es FVIII monocatenario. En otra realización, al menos alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, o alrededor de 25 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario. En otras realizaciones, alrededor de 1 % - alrededor de 10 %, alrededor de 5 % - alrededor de 15 %, alrededor de 10 % - alrededor de 20 %, alrededor de 15 % - alrededor de 25 %, alrededor de 20 % - alrededor de 30 %, alrededor de 25 % - alrededor de 35 %, alrededor de 30 % - alrededor de 40 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico utilizado en el presente documento es FVIII monocatenario.

En una realización particular, alrededor de 1 %, alrededor de 5 %, alrededor de 10 %, alrededor de 15 %, alrededor de 20 %, o alrededor de 25 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico utilizado en el presente documento es FVIII monocatenario. En otras realizaciones, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, alrededor de 99 %, o alrededor de 100 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico utilizado en el presente documento es FVIII monocatenario. En algunas realizaciones, la relación del FVIII monocatenario respecto del FVIII procesado del polipéptido quimérico es (a) alrededor de 25 % de FVIII monocatenario y alrededor de 75 % de FVIII procesado; (b) alrededor de 20 % de FVIII monocatenario y alrededor de 80 % de FVIII procesado; (c) alrededor de 15 % de FVIII monocatenario y alrededor de 85 % de FVIII procesado; (d) alrededor de 10 % de FVIII monocatenario y alrededor de 90 % de FVIII procesado; (e) alrededor de 5 % de FVIII monocatenario y alrededor de 95 % de FVIII procesado; (f) alrededor de 1 % de FVIII monocatenario y alrededor de 99 % de FVIII procesado; o (g) alrededor de 100 % de FVIII procesado.

En otras realizaciones, la relación del FVIII monocatenario respecto del FVIII procesado del polipéptido quimérico es (a) alrededor de 30 % de FVIII monocatenario y alrededor de 70 % de FVIII procesado; (b) alrededor de 40 % de FVIII monocatenario y alrededor de 60 % de FVIII procesado; (c) alrededor de 50 % de FVIII monocatenario y alrededor de 50 % de FVIII procesado; (d) alrededor de 60 % de FVIII monocatenario y alrededor de 40 % de FVIII procesado; (e) alrededor de 70 % de FVIII monocatenario y alrededor de 30 % de FVIII procesado; (f) alrededor de 80 % de FVIII monocatenario y alrededor de 20 % de FVIII procesado; (g) alrededor de 90 % de FVIII monocatenario y alrededor de 10 % de FVIII procesado; (h) alrededor de 95 % de FVIII monocatenario y alrededor de 5 % de FVIII procesado; (i) alrededor de 99 % de FVIII monocatenario y alrededor de 1 % de FVIII procesado; o (j) alrededor de 100 % de FVIII monocatenario.

La porción de FVIII en el polipéptido quimérico utilizado en el presente documento tiene actividad de FVIII. La actividad de FVIII se puede medir mediante cualquiera de los procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, uno de dichos procedimientos puede ser un ensayo cromogénico. El mecanismo del ensayo cromogénico se basa en los principios de la cascada de la coagulación sanguínea, donde el FVIII activado acelera la conversión del Factor X en Factor Xa en presencia de Factor IX activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad del Factor Xa se evalúa por hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilida (pNA) específico del Factor Xa. La tasa inicial de liberación de p-nitroanilina medida a 405 nM es directamente proporcional a la actividad del Factor Xa y, por lo tanto, a la actividad de FVIII en la muestra.

El ensayo cromogénico está recomendado por el Subcomité de los factores FVIII y IX del Comité Científico de Estandarización (SSC) de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH). Desde 1994, el ensayo

cromogénico también ha sido el procedimiento de referencia de la Farmacopea Europea para la asignación de la potencia del concentrado de FVIII. Por lo tanto, en una realización, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario tiene actividad de FVIII comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde dicho FVIII procesado se fusiona con una de las dos porciones Fc), cuando la actividad de FVIII se mide *in vitro* mediante un ensayo cromogénico.

En otra realización, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario de esta descripción tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc).

Para activar el Factor X al Factor Xa, el Factor IX activado (Factor IXa) hidroliza un enlace arginina-isoleucina en el Factor X para formar el Factor Xa en presencia de Ca^{2+} , fosfolípidos de membrana, y un cofactor de FVIII. Por lo tanto, la interacción del FVIII con el Factor IX es fundamental en la vía de coagulación. En ciertas realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario puede interactuar con el Factor IXa a una tasa comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc).

Asimismo, el FVIII se une al Factor de von Willebrand mientras está inactivo en la circulación. El FVIII se degrada rápidamente cuando no está unido al factor vWF y se libera del vWF gracias a la acción de la trombina. En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario se une al factor de von Willebrand a un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc).

El FVIII se puede desactivar por la proteína C activada en presencia de calcio y fosfolípidos. La proteína C activada escinde la cadena pesada de FVIII después de arginina 336 en el dominio A1, lo cual altera un sitio de interacción de sustrato de Factor X, y se escinde después de arginina 562 en el dominio A2, lo cual potencia la disociación del dominio A2 así como también altera un sitio de interacción con el Factor IXa. Esta escisión también bisecciona el dominio A2 (43 kDa) y genera los dominios A2-N (18 kDa) y A2-C (25 kDa). Por lo tanto, la proteína C activada puede catalizar múltiples sitios de escisión en la cadena pesada. En una realización, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario está desactivado por la proteína C activada a un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc).

En otras realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario tiene actividad de FVIII *in vivo* comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc). En una realización particular, el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario es capaz de proteger un ratón con HemaA a un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado (p. ej., un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde dicho FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc) en un modelo de transección de vena caudal de ratón con HemaA.

El término «comparable» como se utiliza en el presente documento significa que una tasa comparada o nivel resultante de utilizar el polipéptido quimérico es igual a, sustancialmente igual a, o similar a la tasa o nivel de referencia. El término «similar» como se utiliza en el presente documento significa que una tasa o nivel comparados tiene una diferencia de no más del 10 % o no más del 15 % respecto de la tasa o nivel de referencia (p. ej., tasa de generación de FXa por un polipéptido quimérico consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde dicho FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc). El término «sustancialmente igual» significa que una tasa o nivel comparados tienen una diferencia de no más de 0,01 %, 0,5 % o 1 % respecto de la tasa o nivel de referencia.

La presente descripción además incluye una composición que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de FVIII, donde al menos alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o alrededor de 99 % del polipéptido quimérico comprende una porción de FVIII, que es FVIII monocatenario y una segunda porción. En otra realización, alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o alrededor de 99 % del polipéptido quimérico comprende una porción de FVIII, que es FVIII monocatenario y una segunda porción.

alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, alrededor de 96 %, alrededor de 97 %, alrededor de 98 %, o alrededor de 99 % del polipéptido quimérico de la composición es FVIII monocatenario. En otras realizaciones, la segunda porción es un Fc. Incluso en otras realizaciones, el polipéptido quimérico comprende otro resto de extensión de semivida, p. ej., albúmina.

5

Incluso en otras realizaciones, la composición de la presente descripción comprende una combinación de un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado y un polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario, (a) donde alrededor de 30 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y alrededor de 70 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (b) donde alrededor de 40 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y alrededor de 60 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (c) donde alrededor de 50 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y alrededor de 50 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (d) donde alrededor de 60 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario y alrededor de 40 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (e) donde alrededor de 70 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario y alrededor de 30 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (f) donde alrededor de 80 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario y alrededor de 20 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (g) donde alrededor de 90 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario y alrededor de 10 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (h) donde alrededor de 95 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario y alrededor de 5 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; (i) donde alrededor de 99 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario y alrededor de 1 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado; o (j) donde alrededor de 100 % de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario.

25 En ciertas realizaciones, la composición de la presente descripción tiene actividad de FVIII comparable a la composición que comprende FVIII procesado (p. ej., una composición que comprende un polipéptido quimérico, que está consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde dicho FVIII procesado se fusiona con una de las dos porciones Fc), cuando la actividad de FVIII se mide *in vitro* mediante un ensayo cromogénico.

30

En otras realizaciones, la composición de la descripción tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable a una composición que comprende FVIII procesado (p. ej., una composición que comprende un polipéptido quimérico, que está consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc). Incluso en otras realizaciones, la composición que comprende FVIII monocatenario puede interactuar con el Factor IXa a una tasa comparable a una composición que comprende FVIII procesado (p. ej., una composición que comprende un polipéptido quimérico, que está consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc).

35

En realizaciones adicionales, el FVIII monocatenario del polipéptido quimérico de la presente composición está desactivado por la proteína C activada a un nivel comparable a FVIII procesado de un polipéptido quimérico de una composición (p. ej., una composición que comprende un polipéptido quimérico, que está consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc). En una realización particular, la composición que comprende FVIII monocatenario tiene actividad de FVIII *in vivo* comparable a la composición que comprende FVIII procesado (p. ej., una composición que comprende un polipéptido quimérico, que está consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde el FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc). En algunas realizaciones, la composición que comprende FVIII monocatenario de la presente descripción es capaz de proteger un ratón con Hema a un nivel comparable a la composición que comprende FVIII procesado (p. ej., una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en o consiste en dos porciones Fc y FVIII procesado, donde dicho FVIII procesado se fusiona con un Fc de las dos porciones Fc) en un modelo de transección de vena caudal de ratón con Hema.

50

La presente descripción además proporciona un procedimiento para tratar una afección hemorrágica en un sujeto humano utilizando las composiciones descritas en el presente documento. Un procedimiento ejemplar comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición/formulación farmacéutica que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de FVIII, donde al menos alrededor de 30 %, alrededor de 40 %, alrededor de 50 %, alrededor de 60 %, alrededor de 70 %, alrededor de 80 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o alrededor de 99 % del polipéptido quimérico comprende una porción de FVIII, que es FVIII monocatenario y una segunda porción.

60

La afección hemorrágica se puede producir por un trastorno de coagulación sanguínea. Un trastorno de coagulación sanguínea también se puede denominar coagulopatía. En un ejemplo, el trastorno de coagulación sanguínea, que se puede tratar con una composición farmacéutica de la presente descripción, es hemofilia o enfermedad de von Willebrand (vWD). En otro ejemplo, el trastorno de coagulación sanguínea, que se puede tratar con una composición farmacéutica de la presente descripción, es hemofilia A.

En algunas realizaciones, el tipo de hemorragia asociado a la afección hemorrágica se selecciona de entre hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, traumatismo de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal, y hemorragia en la vaina del iliopsoas.

En otras realizaciones, el sujeto que padece la afección hemorrágica necesita tratamiento para cirugía, incluyendo, p. ej., profilaxis quirúrgica o manejo perioperatorio. En un ejemplo, la cirugía se selecciona de entre cirugía menor y cirugía mayor. Los procedimientos quirúrgicos ejemplares incluyen extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, cirugía de reemplazo de articulaciones (p. ej., reemplazo total de rodilla, reemplazo de cadera y similares), cirugía cardíaca y cesárea.

En otro ejemplo, el sujeto se trata de forma concomitante con FIX. Puesto que los compuestos de la presente descripción son capaces de activar el FIXa, se podrían utilizar para preactivar el polipéptido de FIXa antes de administrar FIXa al sujeto.

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden llevar a la práctica en un sujeto que necesite tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos 30 % de FVIII monocatenario se pueden formular para cualquier forma de administración adecuada incluyendo, por ejemplo, administración tópica (p. ej., transdérmica u ocular), oral, bucal, nasal, vaginal, rectal o parenteral.

El término parenteral como se utiliza en el presente documento incluye inyección subcutánea, intradérmica, intravascular (p. ej., intravenosa), intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal, intraocular, periocular, intraorbital, intrasinovial e intraperitoneal, así como cualquier técnica de inyección o infusión similar. La composición también puede ser, por ejemplo, una suspensión, emulsión, formulación de liberación sostenida, crema, gel o polvo. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos.

En un ejemplo, la formulación farmacéutica es una formulación líquida, p. ej., una disolución tamponada, isotónica, acuosa. En otro ejemplo, la composición farmacéutica tiene un pH que es fisiológico, o casi fisiológico. En otros ejemplos, la formulación acuosa tiene una osmolaridad y salinidad fisiológica o casi fisiológica. Puede contener cloruro sódico y/o acetato sódico. En algunos ejemplos, la composición de la presente descripción está liofilizada. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica no comprende una célula inmune. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica no comprende una célula.

La presente descripción también proporciona un kit que comprende (a) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido quimérico que comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) instrucciones para administrar la composición a un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación. El polipéptido quimérico del kit comprende una porción de FVIII. En otras realizaciones, el polipéptido quimérico del kit es un híbrido monómero-dímero de FVIII. En algunas realizaciones, las instrucciones además incluyen al menos una etapa para identificar un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación. En algunas realizaciones, la etapa para identificar los sujetos que necesitan tolerancia inmunitaria incluye uno o más del grupo constituido por:

- (i) identificar un sujeto que tiene una mutación o eliminación en el gen del factor de coagulación;
- (ii) identificar un sujeto que tiene un reordenamiento en el gen del factor de coagulación;
- (iii) identificar un sujeto que tiene un familiar que desarrolló previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación;
- (iv) identificar un sujeto que recibe terapia con interferón;
- (v) identificar un sujeto que recibe terapia antiviral;
- (vi) identificar un sujeto que tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de

coagulación que está ligado a un riesgo mayor de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria; y
(vii) dos o más combinaciones de estos.

En algunas realizaciones, la mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación
5 comprende una o más mutaciones seleccionadas de entre el grupo constituido por:

- (i) un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado;
- (ii) un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada;
- (iii) un polimorfismo genético asociado con CTLA-4 disminuido;
- 10 (iv) una mutación en moléculas CMH de clase II DR15 o DQB0602; y
- (v) tiene dos o más combinaciones de estos.

Opcionalmente puede haber un aviso asociado al uno o más envases del kit en la forma prescrita por un organismo
gubernamental que regula la fabricación, el uso o la venta de productos farmacéuticos o biológicos, y el aviso refleja
15 la aprobación por el organismo de la fabricación, el uso o la venta para administración en seres humanos.

Realizaciones de la descripción

E1. Un procedimiento para inducir tolerancia inmunitaria a un factor de coagulación en un sujeto que lo necesita, que
20 comprende administrar al sujeto un polipéptido quimérico, donde el polipéptido quimérico comprende una porción de
factor de coagulación y una porción Fc.

E2. Un procedimiento para prevenir o inhibir el desarrollo de un inhibidor de un factor de coagulación que comprende
administrar a un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación un polipéptido quimérico, donde
25 el polipéptido quimérico comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc.

E3. El procedimiento de la realización E1 o E2, donde el sujeto desarrollaría una respuesta inmunitaria inhibitoria
contra el factor de coagulación si se le administrara una dosis equivalente de un polipéptido constituido por el factor
de coagulación.

30 E4. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E3, donde el sujeto ha desarrollado una respuesta
inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación.

E5. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E4, donde el sujeto nunca ha sido tratado con el factor
35 de coagulación.

E6. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E5, donde la porción de factor de coagulación
comprende Factor VIII.

40 E7. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E5, donde el sujeto es un feto y el procedimiento
además comprende administrar el polipéptido quimérico a la madre del feto y la administración al sujeto se lleva a
cabo desde la madre a través de la placenta.

E8. El procedimiento de la realización E7, donde el resto de factor de coagulación comprende Factor VIII.

45 E9. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E6, donde el sujeto es un niño o un adulto.

E10. El procedimiento de la realización E9, donde el sujeto es un niño de menos de un año de edad, de menos de
dos años de edad, de menos de tres años de edad, de menos de cuatro años de edad, de menos de cinco años de
50 edad, de menos de seis años de edad, de menos de siete años de edad, de menos de ocho años de edad, de
menos de nueve años de edad, de menos de diez años de edad, de menos de once años de edad, o de menos de
doce años de edad.

E11. El procedimiento de la realización E10, donde el niño tiene menos de un año de edad.

55 E12. El procedimiento de la realización E11, donde el niño o adulto desarrolla un trastorno hemorrágico, donde el
inicio de los síntomas del trastorno hemorrágico se produce después de un año de edad.

E13. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E12 donde la administración es suficiente para
60 prevenir, inhibir o reducir el desarrollo de una respuesta inmunitaria seleccionada de entre una respuesta inmunitaria

humoral, una respuesta inmunitaria mediada por células, o tanto una respuesta inmunitaria humoral como una respuesta inmunitaria mediada por células contra el factor de coagulación.

5 E14. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E13, donde la composición se administra en dosis repetidas.

10 E15. El procedimiento de la realización E14, donde cada una de las dosis repetidas se separa de otra en al menos alrededor de 12 horas, en al menos alrededor de 24 horas, en al menos alrededor de dos días, en al menos alrededor de tres días, en al menos alrededor de cuatro días, en al menos alrededor de cinco días, en al menos alrededor de seis días, en al menos alrededor de siete días, en al menos alrededor de ocho días, en al menos alrededor de nueve días, en al menos alrededor de diez días, en al menos alrededor de 11 días, en al menos alrededor de 12 días, en al menos alrededor de 13 días, en al menos alrededor de 14 días, o en al menos alrededor de 15 días.

15 E16. El procedimiento de la realización E14 o E15, donde las dosis repetidas comprenden al menos alrededor de dos dosis, al menos alrededor de cinco dosis, al menos alrededor de 10 dosis, al menos alrededor de 20 dosis, al menos alrededor de 25 dosis, al menos alrededor de 30 dosis, al menos alrededor de 35 dosis, al menos alrededor de 40 dosis, al menos alrededor de 45 dosis, al menos alrededor de 50 dosis, al menos alrededor de 55 dosis, al menos alrededor de 60 dosis, al menos alrededor de 65 dosis, o al menos alrededor de 70 dosis.

20 E17. El procedimiento de la realización E16, donde las dosis repetidas comprenden desde alrededor de dos dosis a alrededor de 100 dosis, desde alrededor de cinco dosis a alrededor de 80 dosis, desde alrededor de 10 dosis a alrededor de 70 dosis, desde alrededor de 10 dosis a alrededor de 60 dosis, desde alrededor de 10 dosis a alrededor de 50 dosis, desde alrededor de 15 dosis a alrededor de 40 dosis, desde alrededor de 15 dosis a
25 alrededor de 30 dosis, desde alrededor de 20 dosis a alrededor de 30 dosis, o desde alrededor de 20 dosis a alrededor de 40 dosis.

30 E18. El procedimiento de la realización E16 o E17, donde las dosis repetidas comprenden alrededor de dos dosis, alrededor de cinco dosis, alrededor de 10 dosis, alrededor de 15 dosis, alrededor de 20 dosis, alrededor de 25 dosis, alrededor de 30 dosis, alrededor de 35 dosis, alrededor de 40 dosis, alrededor de 45 dosis, alrededor de 50 dosis, alrededor de 55 dosis, alrededor de 60 dosis, alrededor de 65 dosis, alrededor de 70 dosis, alrededor de 75 dosis, alrededor de 80 dosis, alrededor de 90 dosis, o alrededor de 100 dosis.

35 E19. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E14 a E18, donde al sujeto además se le administra, después de las dosis repetidas, una composición farmacéutica que comprende una proteína de factor de coagulación que comprende el factor de coagulación, pero que no comprende una porción Fc.

40 E20. El procedimiento de la realización E19, donde la proteína de factor de coagulación es de factor de coagulación maduro o de longitud completa.

E21. El procedimiento de la realización E19, donde la proteína de factor de coagulación comprende uno o más restos de extensión de semivida que no es una porción Fc.

45 E22. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E21, donde la administración trata uno o más episodios hemorrágicos.

E23. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E22, donde la administración previene uno o más episodios hemorrágicos.

50 E24. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E23, donde la administración es un tratamiento episódico de uno o más episodios hemorrágicos.

55 E25. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E23, donde el sujeto necesita profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio, o tratamiento para cirugía.

E26. El procedimiento de la realización E25, donde la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica o cirugía de reemplazo de articulaciones.

60 E27. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E13 a E26, donde la respuesta inmunitaria comprende

producción de anticuerpos inhibidores contra el factor de coagulación.

E28. El procedimiento de la realización E27, donde la concentración de anticuerpos es al menos 0,6 unidades Bethesda (UB).

5

E29. El procedimiento de la realización E28, donde la concentración de anticuerpos es al menos 5 UB.

E30. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E13 a E26, donde la respuesta inmunitaria comprende una respuesta inmunitaria mediada por células.

10

E31. El procedimiento de la realización E30, donde la respuesta inmunitaria mediada por células comprende la liberación de una citocina seleccionada de entre el grupo compuesto por IL-12, IL-4 y TNF- α .

E32. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E13 a E31, donde la respuesta inmunitaria comprende un síntoma clínico seleccionado de entre el grupo compuesto por: mayor tendencia a la hemorragia, consumo elevado de factor de coagulación, falta de respuesta a terapia con factor de coagulación, menor eficacia de terapia con factor de coagulación, y semivida más breve del factor de coagulación.

15

E33. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E32, donde el sujeto tiene una mutación o eliminación en el gen del factor de coagulación.

20

E34. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E32, donde el sujeto tiene un reordenamiento en el gen del factor de coagulación.

E35. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E34, donde el sujeto padece hemofilia grave.

25

E36. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E34, donde el sujeto tiene un familiar que ha desarrollado previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación.

E37. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E36, donde el sujeto recibe terapia con interferón.

30

E38. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E37, donde el sujeto recibe terapia antiviral.

E39. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E38, donde el sujeto tiene un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado.

35

E40. El procedimiento de la realización E39, donde el polimorfismo es 308G>A de TNF- α .

E41. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E40, donde el sujeto tiene un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada.

40

E42. El procedimiento de la realización E41, donde el polimorfismo es el alelo 134 del microsatélite IL10G.

E43. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E42, donde el sujeto tiene un polimorfismo genético asociado con expresión disminuida de CTLA-4.

45

E44. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E43, donde el sujeto tiene una mutación en moléculas CMH de clase II DR15 o DQB0602.

E45. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E44, donde el sujeto ha tenido menos de 150 días de exposición (DE) al factor de coagulación.

50

E46. El procedimiento de la realización E45, donde el sujeto ha tenido menos de 50 DE.

E47. El procedimiento de la realización E46, donde el sujeto ha tenido menos de 20 DE.

55

E48. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E3 a E47, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria al FVIII se desarrolló en respuesta a un factor de coagulación de FVIII de longitud completa o maduro.

E49. El procedimiento de las realizaciones E3 - E48, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria es una respuesta

60

inhibitoria al FVIII desarrollada en respuesta a un producto de FVIII recombinante.

E50. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E49, donde la administración reduce la cantidad de anticuerpos contra FVIII en el sujeto comparada con la cantidad antes de la administración.

5

E51. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E50, donde la administración reduce la titulación de anticuerpos contra FVIII en el sujeto comparada con la titulación antes de la administración.

E52. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E51, donde la administración reduce el nivel de una citocina en el sujeto comparado con el nivel antes de la administración.

10

E53. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E52, donde la administración reduce la cantidad de anticuerpos contra FVIII en el sujeto en comparación con la cantidad en el sujeto después de un tratamiento previo con un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

15

E54. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E53, donde la administración reduce la titulación de anticuerpos contra FVIII en el sujeto en comparación con la titulación en el sujeto después de un tratamiento previo con un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

E55. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E54, donde la administración reduce el nivel de una citocina en el sujeto en comparación con el nivel en el sujeto después de un tratamiento previo con un polipéptido compuesto por un polipéptido de FVIII.

E56. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E55, donde la administración reduce la cantidad de anticuerpos antifactor de coagulación en el sujeto en comparación con la cantidad que resultaría de la administración del polipéptido compuesto por la porción de factor de coagulación al sujeto.

25

E57. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E56, donde la administración reduce la titulación de anticuerpos antifactor de coagulación en el sujeto en comparación con la titulación que resultaría de la administración del polipéptido compuesto por la porción de factor de coagulación al sujeto.

30

E58. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E57, donde la administración reduce el nivel de una citocina en el sujeto en comparación con el nivel que resultaría de la administración del polipéptido compuesto por la porción de factor de coagulación al sujeto.

35

E59. El procedimiento de la realización E52, E55 o E58, donde la citocina se selecciona de entre el grupo compuesto por IL-12, IL-4, y TNF- α

E60. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E59, que además comprende, antes de la administración del polipéptido quimérico, identificar que el sujeto tiene una o más características seleccionadas de entre el grupo compuesto por:

40

(a) tiene una mutación o eliminación en el gen que codifica el factor de coagulación;

(b) tiene un reordenamiento en el gen que codifica el factor de coagulación;

45 (c) tiene un familiar que desarrolló previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación;

(d) recibe terapia con interferón;

(e) recibe terapia antiviral;

(f) tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación que está ligado a un riesgo mayor de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria; y

50

(g) dos o más combinaciones de estos.

E61. El procedimiento de la realización E60, donde la mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación comprende una o más mutaciones seleccionadas de entre el grupo constituido por:

55 (i) un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado;

(ii) un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada;

(iii) un polimorfismo genético asociado con CTLA-4 disminuido;

(iv) una mutación en moléculas CMH de clase II DR15 o DQB0602; y

(v) tiene dos o más combinaciones de estos.

60

- E62. El procedimiento de la realización E61, donde el polimorfismo asociado con TNF- α aumentado es 308G>A.
- E63. El procedimiento de la realización E61, donde el polimorfismo asociado con IL10 aumentada es el alelo 134 del microsatélite IL10G.
- 5 E64. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E62, donde la porción de FVIII comprende el dominio A3 de FVIII.
- E65. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E63, donde la porción de FVIII comprende FVIII humano.
- 10 E66. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E64, donde la porción de FVIII tiene una eliminación total o parcial del dominio B.
- 15 E67. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E66, donde la porción de FVIII es al menos 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).
- E68. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E66, donde la porción de FVIII es idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).
- 20 E69. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E66, donde la porción de FVIII es al menos 90 % o 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).
- 25 E70. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E66, donde la porción de FVIII es idéntica a una secuencia de aminoácidos de FVIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).
- 30 E71. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E6, y E8 a E70, donde la porción de FVIII tiene actividad de coagulación.
- E72. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E71, donde la porción Fc es idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).
- 35 E73. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E72, donde el polipéptido quimérico es en forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido en asociación con el polipéptido quimérico, donde el segundo polipéptido está compuesto esencialmente por o está compuesto por la porción Fc o el compañero de unión a FcRn.
- 40 E74. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E73, donde el polipéptido quimérico se administra con cada dosis de 10 - 100 UI/kg.
- E75. El procedimiento de la realización E74, donde la dosis es 10 - 20, 20 - 30, 30 - 40, 40 - 50, 50 - 60, 60 - 70, 70 - 80, 80 - 90, o 90 - 100 UI/kg.
- 45 E76. El procedimiento de la realización E75, donde la dosis es 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o 100 UI/kg.
- 50 E77. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E76, donde el sujeto tiene una afección hemorrágica seleccionada de entre el grupo compuesto por un trastorno hemorrágico de la coagulación, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, traumatismo de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal, y hemorragia en la vaina del iliopsoas.
- 55 E78. El procedimiento de la realización E77, donde el trastorno hemorrágico de la coagulación es hemofilia A.
- 60 E85. Un kit que comprende (a) una composición farmacéutica que comprende un polipéptido quimérico que

comprende una porción de factor de coagulación y una porción Fc o una porción compañera de unión a FcRn y un vehículo farmacéuticamente aceptable, y (b) instrucciones para administrar la composición a un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación.

5 E86. El kit de la realización E85, donde el polipéptido quimérico comprende una porción de FVIII.

E87. El kit de la realización E86, donde el polipéptido quimérico es un híbrido monómero-dímero de FVIII.

10 E88. El kit de cualquiera de las realizaciones E85 a E87, donde las instrucciones además incluyen al menos una etapa para identificar un sujeto que necesita tolerancia inmunitaria al factor de coagulación.

E89. El kit de la realización E88, donde la etapa para identificar los sujetos que necesitan tolerancia inmunitaria incluye una o más acciones del grupo constituido por:

- 15 (a) identificar un sujeto que tiene una mutación o eliminación en el gen del factor de coagulación;
- (b) identificar un sujeto que tiene un reordenamiento en el gen del factor de coagulación;
- (c) identificar un sujeto que tiene un familiar que desarrolló previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el factor de coagulación;
- (d) identificar un sujeto que recibe terapia con interferón;
- 20 (e) identificar un sujeto que recibe terapia antiviral;
- (f) identificar un sujeto que tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación que está ligado a un riesgo mayor de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria; y
- (g) dos o más combinaciones de estos.

25 E90. El kit de la realización E89, donde la mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el factor de coagulación comprende una o más mutaciones seleccionadas de entre el grupo constituido por:

- (i) un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado;
- (ii) un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada;
- 30 (iii) un polimorfismo genético asociado con CTLA-4 disminuido;
- (iv) una mutación en moléculas CMH de clase II DR15 o DQB0602; y
- (v) tiene dos o más combinaciones de estos.

35 E91. El procedimiento de cualquiera de las realizaciones E1 a E78, que además comprende medir el nivel de una respuesta inmunitaria inhibidora después de la administración.

E92. El procedimiento de la realización E91, que además comprende comparar el nivel de la respuesta inmunitaria inhibitoria después de la administración con el nivel de la respuesta inmunitaria inhibitoria antes de la administración.

40 E93. El procedimiento de las realizaciones E91 o E92, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria es el desarrollo de anticuerpos contra FVIII.

E94. El procedimiento de la realización E91 o E92, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria es la secreción de citocina.

45 Habiendo descrito la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente por referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen en la presente con fines de ilustración solamente y no pretenden ser limitantes de la invención.

50 Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación, expresión y purificación de rFVIII_{FC}

55 Todos los procedimientos de biología molecular se llevaron a cabo siguiendo técnicas estándar. La secuencia codificante de FVIII humano (número de acceso de GenBank NM_000132), incluyendo su secuencia señal nativa, se obtuvo por reacciones en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) de ARN poli A de hígado humano. Debido al gran tamaño del FVIII, la secuencia codificante se obtuvo en varias secciones a partir de
60 reacciones RT-PCR separadas, y se montó a través de diversas reacciones PCR, digestiones de restricción y

ligaduras en un vector de clonación intermedio que contiene una región codificante de FVIII con dominio B eliminado (BDD) con una fusión de serina 743 (S743) a glutamina 1638 (Q1638), eliminando 2682 pb del dominio B de FVIII de longitud completa. La secuencia de Fc de IgG1 humana (p. ej., número de acceso de GenBank Y14735) se obtuvo por PCR a partir de un banco de ADNc de leucocitos, y el casete de expresión final se hizo de tal modo que la

5 secuencia de BDD FVIII se fusionó directamente con el extremo N-terminal de la secuencia de Fc (bisagra, dominios CH2 y CH3, comenzando en D221 de la secuencia de IgG1, numeración de la UE) sin intervención de ningún enlazador. Para la expresión de la cadena de Fc sola, se creó la secuencia señal de cadena ligera de Igk (kappa) de ratón con oligonucleótidos sintéticos y se añadió a la secuencia codificante de Fc utilizando PCR para permitir la secreción de este producto de proteína. Las secuencias codificantes de cadena de Fc y FVIII-Fc se clonaron en un

10 vector de expresión dual, pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Las células HEK 293H (Invitrogen, Carlsbad, CA) se transfectaron con el plásmido pSYN-FVIII-013 utilizando reactivo de transfección Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA)), y se seleccionó una línea celular estable con zeocina. Las células se cultivaron en cultivo en suspensión libre de suero, y la proteína rFVIII-Fc se purificó a partir de

15 medios de recolección clarificados utilizando un proceso de purificación de cuatro columnas, incluyendo una etapa de purificación por afinidad específica de FVIII (McCue J. y col., *J. Chromatogr. A.*, 1216(45): 7824-30 (2009)), seguida de una combinación de columnas de intercambio aniónico y una columna de interacciones hidrófobas.

Ejemplo 2

Caracterización de rFVIII-Fc

(a) Caracterización bioquímica

25 Se sintetizó FVIII-Fc recombinante procesado como dos cadenas polipeptídicas, una cadena compuesta por BDD-FVIII (fusión de S743-Q1638, 1438 aminoácidos) fusionada con el dominio de Fc (bisagra, dominios CH2 y CH3) de IgG1 (226 aminoácidos, que se extienden de D221 a G456, numeración de la UE), para una longitud de cadena total de 1664 aminoácidos, estando la otra cadena compuesta por la misma región Fc sola (226 aminoácidos). Si bien se esperaba que las células transfectadas con el plásmido de expresión dual FVIII-Fc/Fc secretaran tres productos

30 (dímero de FVIII-Fc, monómero de FVIII-Fc, y dímero de Fc), solo se detectaron el monómero de FVIII-Fc y el dímero de Fc en los medios acondicionados. El FVIII-Fc purificado se analizó con el análisis SDS-PAGE sin reducción y con reducción (Fig. 2A y 2B). Para el análisis SDS-PAGE sin reducción, se observó que las franjas migraban a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa, acorde con los pesos moleculares predichos de la fusión de FVIII-Fc dímérico a la cadena pesada (HC) y la cadena ligera (LCFc2) de FVIII-Fc (Fig. 2A, carril 3). También se detectó una tercera

35 franja a aproximadamente 220 kDa, acorde con el peso molecular predicho para FVIII-Fc monocaténario (FVIII-Fc MC; HC+LCFc2), en el cual el residuo de arginina en la posición 754 (1648 respecto de la secuencia de longitud completa) no se escinde durante la secreción. Para el análisis SDS-PAGE con reducción, se observó la migración de franjas más grandes a aproximadamente 25 kDa, 90 kDa, 105 kDa, y 195 kDa, acorde con los pesos moleculares predichos para Fc monocaténario, HC, LCFc, y FVIII-Fc MC (Fig. 2B, carril 3). La cotransfección con PC5 humana,

40 miembro de las proteasas de tipo proproteína-convertasa subtilisina/kexina (PCSK), dio como resultado el procesamiento completo del producto rFVIII-Fc (Fig. 2A, 2B, carril 2).

El análisis densitométrico de distintos lotes de rFVIII-Fc después de SDS-PAGE mostró más de 98 % de pureza para las franjas esperadas. La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) también se utilizó para evaluar el grado de

45 agregación presente, y se observó que todos los lotes tenían niveles agregados a 0,5 % o menos.

La estructura de rFVIII-Fc se analizó adicionalmente mediante escisión, reducción y análisis de trombina mediante CL/UV y CL/EM. Los cuatro fragmentos de FVIII generados por trombina (mediante escisiones en tres residuos de arginina, en las posiciones 372, 740 y 795 (795 corresponde a 1689 respecto de la secuencia de FVIII de longitud

50 completa) se pueden detectar por absorbancia de UV (Fig. 2C), correspondientes a los siguientes segmentos de la proteína: Fc (pico 1), Fc de cadena ligera (pico 2); el dominio A1 de la cadena pesada (pico 3) y el dominio A2 de la cadena pesada (pico 4). El enlazador de dominio B de 14 aminoácidos y los péptidos relacionados con a3 de ~ 6 kDa no se detectan por absorbancia de UV debido a su tamaño reducido.

55 El polipéptido rFVIII-Fc producido sin enzimas de procesamiento cotransfectadas mostró 15 - 25 % de FVIII-Fc monocaténario (FVIII-Fc MC), el cual difiere del rFVIII-Fc procesado en un enlace peptídico único entre R754 y E755 (R1648/E1649 respecto del FVIII de longitud completa). Esta isoforma se purificó y caracterizó en todos los ensayos bioquímicos descritos anteriormente, y se descubrió que es comparable con rFVIII-Fc como se muestra a continuación. Se descubrió que la actividad de FVIII-Fc monocaténario purificado era similar a la de rFVIII-Fc en un

60 ensayo cromogénico así como mediante los diversos ensayos funcionales descritos a continuación.

(b) Medición de actividad de FVIII mediante ensayos cromogénico y aPTT en una etapa

La actividad de FVIII se midió con un ensayo cromogénico de FVIII. Se observó que la actividad específica media de cuatro lotes separados de rFVIII Fc fue 9.762 ± 449 UI/mg mediante el ensayo cromogénico, correspondiente a 2.148 ± 99 UI/nmol. La actividad de FVIII de FVIII monocatenario:Fc también se midió mediante el ensayo cromogénico y se comparó con el rFVIII Fc completamente procesado o rFVIII Fc DC (que contenía alrededor de 25 % de rFVIII Fc monocatenario). Como muestra la Tabla 3A, el rFVIII Fc monocatenario no mostró una diferencia significativa en actividad de FVIII en comparación con la actividad de FVIII de FVIII Fc completamente procesado o rFVIII Fc DC mediante el ensayo cromogénico, tanto en presencia como en ausencia del Factor de von Willebrand (VWF). La Tabla 3B muestra que la actividad total de rFVIII Fc MC, medida con el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) en una etapa, se observó en ausencia de VWF.

Tabla 3A: actividad de FVIII mediante ensayo cromogénico

Matriz	Muestra	Actividad específica cromogénica (UI/mg)	%CV*
Plasma con FVIII agotado	rFVIII Fc DC (25 % NP) (RECD-19189-09-013)	9.066	2,49
	rFVIII Fc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	8.194	2,72
	rFVIII Fc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular modificada)	9.577	8,34
Plasma con FVIII y vWF agotados	rFVIII Fc DC (25 % NP) (RECD-19189-09-013)	10.801	8,92
	rFVIII Fc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	9.498	4,70
	rFVIII Fc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular modificada)	9.569	4,54
*CV=coeficiente de variación			

Tabla 3B: actividad de FVIII mediante ensayo aPTT

Matriz	Muestra	Actividad específica de coagulación (aPTT) (UI/mg)	%CV
Plasma con FVIII agotado	rFVIII Fc DC (25 % NP) (RECD-19189-09-013)	8.210	5,88
	rFVIII Fc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	3.108	6,57
	rFVIII Fc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular modificada)	8.683	3,57
Plasma con FVIII y vWF agotados	rFVIII Fc DC (25 % NP) (RECD-19189-09-013)	15.621	6,47
	rFVIII Fc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	13.572	2,41
	rFVIII Fc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular modificada)	15.170	10,42

(c) Actividad en complejo Xasa

La actividad de FVIII también se midió en el contexto del complejo Xasa, incubando FIX activado y REFACTO® activado por trombina o proteína rFVIII Fc en una superficie de fosfolípidos en presencia de calcio, y monitorizando la conversión de FX a FXa medida por escisión de un sustrato cromogénico o fluorogénico, desde donde se determinaron las tasas de generación de FXa. A continuación este ensayo se modificó variando un componente del ensayo a la vez que se mantenían otros constantes para examinar las interacciones con cada componente individual.

La tasa de generación de FXa se determinó con una función que variaba las concentraciones de fosfolípidos para rFVIIIc DC, rBDD FVIII, y rFVIIIc monocatenario (Fig. 3A), utilizando vesículas fosfolipídicas sintéticas (25 % fosfatidilserina/75 % fosfatidilcolina). Se descubrió que ambas proteínas tenían un perfil de actividad similar, con actividad máxima a aproximadamente 156 μ M de fosfolípidos.

A continuación se determinó la tasa de generación de FXa con una función que variaba las concentraciones de FX, y se calcularon los valores K_m y $V_{m\acute{a}x}$ (Fig. 3B). Se descubrió que los perfiles de actividad para rFVIIIc DC, rBDD FVIII, y rFVIIIc monocatenario eran similares, con K_m y $V_{m\acute{a}x}$ similares (Tabla 4). Finalmente, la tasa de generación de FXa se determinó con una función que variaba las concentraciones de FIX (Fig. 3C). Los perfiles de actividad parecían similares, con K_d y $V_{m\acute{a}x}$ similares (Tabla 5). Se obtuvieron resultados similares utilizando plaquetas como fuente de fosfolípidos (datos no publicados, 2009).

Tabla 4. Parámetros de generación de FXa para proteínas de FVIII en fosfolípidos

Fuente de lípidos	Molécula	K_m (nM)	$V_{m\acute{a}x}$ (nM/mín)
25 %FS - 75 %FC	rFVIIIc DC	$55,0 \pm 5,9$	$65,6 \pm 8,6$
	rBDD FVIII	$51,0 \pm 8,7$	$73,5 \pm 10,1$
	rFVIIIc NP	$53,2 \pm 7,5$	$56,0 \pm 13,8$

Tabla 5. Interacciones de FIXa con proteínas de FVIII

Fuente de lípidos	Molécula	K_m (nM)	$V_{m\acute{a}x}$ (nM/mín)
25 %FS - 75 %FC	rFVIIIc DC	$2,8 \pm 0,4$	$4,5 \pm 0,3$
	rBDD FVIII	$2,5 \pm 0,3$	$4,0 \pm 1,0$
	rFVIIIc NP	$2,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,4$

(d) Desactivación por PCA

Una vez activo, el FVIII se desactiva mediante escisión por la proteína C activada (PCA), así como por la disociación del dominio A2. rFVIIIc y rBDD FVIII se activaron por trombina, y a continuación se incubaron con PCA durante distintos periodos de tiempo y la actividad se determinó en un ensayo de generación de FXa (Fig. 4). En ausencia de la activación por trombina, se detectó poca generación de FXa, y esta se incrementó de manera significativa con digestión con trombina. El tratamiento con PCA durante 90 minutos produjo una disminución significativa en las tasas de generación de FXa, similar a las muestras no activadas, y estos resultados fueron similares para rFVIIIc DC, rBDD FVIII, y rFVIIIc monocatenario.

(e) Afinidad por vWF

Las interacciones de FVIII con el factor de von Willebrand (vWF) se midieron con el análisis de interacciones biomoleculares en tiempo real (BIAcore), basado en tecnología de resonancia de plasmones superficiales (RPS), para determinar la cinética de unión de rFVIIIc y rBDD FVIII a vWF (Tabla 6). Los parámetros de tasa cinética K_a (tasa de asociación) y K_d (tasa de disociación), y la afinidad K_D (K_d/K_a) se determinaron para cada interacción de FVIII en condiciones idénticas. Se observó que tanto rFVIIIc como rBDD FVIII tenían una afinidad de unión en nM baja (K_D) para vWF, de $1,64 \pm 0,37$ y $0,846 \pm 0,181$ nM, respectivamente. Las proteínas tenían tasas de disociación similares, con una diferencia de dos veces en tasa de asociación que resultó en una diferencia de dos veces en la afinidad.

Tabla 6. Análisis de unión BIAcore de proteínas de FVIII a vWF

Analito	Ligando	N	Parámetros de tasa cinética		Tasa de disociación/Tasa de asociación KD (M)
			Tasa de asociación (M-1s-1)	Tasa de disociación (s-1)	
rFVIIIc DC	hWf	5	$7,92 \pm 1,51 \times 10^5$	$1,25 \pm 1,12 \times 10^{-3}$	$1,64 \pm 0,37 \times 10^{-9}$
rFVIIIc NP	hWf	5	$8,66 \pm 1,10 \times 10^5$	$1,09 \pm 0,09 \times 10^{-3}$	$1,28 \pm 0,22 \times 10^{-9}$
rBDD FVIII	hWf	5	$13,7 \pm 1,50 \times 10^5$	$1,14 \pm 0,12 \times 10^{-3}$	$0,846 \pm 0,181 \times 10^{-9}$

Como se muestra en la Tabla 6, se observó que la afinidad de rFVIII^h DC o rFVIII^h monocaténario con vWF estaba en el intervalo de nM bajo, aproximadamente dos veces superior a la de BDD FVIII solo. Con concentraciones fisiológicas, esto resultaría en una leve disminución en el porcentaje de rFVIII^h (procesado o monocaténario) formando un complejo con vWF en comparación con FVIII libre, no obstante, los estudios *in vivo* indicaron que la semivida de rFVIII^h es significativamente prolongada en FVIII de longitud completa o BDD FVIII a pesar de esta afinidad ligeramente inferior y, por lo tanto, esto no parece comprometer la semivida de la molécula. El rFVIII^h libre puede reciclarse más eficazmente a través de la vía del FcRn y por lo tanto contribuir a una mayor prolongación de la semivida.

10 Ejemplo 3

Ensayo clínico de Fase I/IIa de rFVIII^h

Se diseñó un estudio realizado por primera vez en seres humanos de Fase I/IIa, abierto, cruzado, con dosis crecientes, multicéntrico para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de una dosis única de rFVIII^h en sujetos con hemofilia A grave (definida como FVIII endógeno [FVIII] <1 UI/dL [1 %]). Se inscribieron un total de aproximadamente 12 pacientes previamente tratados y se les administró rFVIII^h a 25 o 65 UI/kg. Después del cribado (programado dentro de los 28 días previos a la primera dosis de ADVATE[®] [rFVIII]), el agente de comparación de referencia) y habiendo transcurrido un mínimo de 4 días (96 horas) sin tratamiento con FVIII antes de la primera inyección, aproximadamente 6 los sujetos recibieron una única dosis de 25 UI/kg de ADVATE[®] seguida de un perfil farmacocinético (PK) de 3 días (72 horas), a continuación se cruzaron y recibieron una dosis única y abierta de 25 UI/kg de rFVIII^h para obtención de perfil PK de 7 días (168 horas). Los primeros 3 sujetos recibieron la dosis secuencialmente. Para los primeros tres (3) sujetos que recibieron 25 UI/kg de rFVIII^h, cada sujeto se sometió a una evaluación de inhibidores a los 14 días (336 horas) después de la inyección de rFVIII^h. La dosificación del siguiente sujeto (solo para los tres primeros sujetos) se produjo una vez que se completó la prueba de inhibidores. Después de que el tercer sujeto completó la evaluación de inhibidores del día 14, los tres sujetos restantes con 25 UI/kg y los seis sujetos con 65 UI/kg se inscribieron secuencialmente con al menos 1 día de diferencia dentro de cada grupo de dosis.

Una semana después de que el último sujeto recibió la dosis de 25 UI/kg del rFVIII^h, se reunieron aproximadamente 6 sujetos únicos para la cohorte de 65 UI/kg. Cada sujeto en la cohorte de 65 UI/kg recibió una sola dosis de 65 UI/kg de ADVATE[®] seguida de obtención de perfil PK de 4 días (96 horas), después se cruzaron y recibieron una dosis única, abierta, de 65 UI/kg de rFVIII^h para obtención de perfil de 10 días (240 horas). Si se producía un episodio hemorrágico antes de la primera inyección de rFVIII^h en cualquier cohorte, se utilizaba el producto de FVIII previo al estudio del sujeto para el tratamiento y tenía que transcurrir un intervalo de al menos 4 días antes de recibir la primera inyección de rFVIII^h para el perfil PK.

Se hizo el seguimiento de todos los sujetos durante un periodo de evaluación de seguridad de 14 días (336 horas) y 28 días después de la administración de rFVIII^h con dosis de 25 UI/kg o 65 UI/kg por seguridad. Todos los sujetos se sometieron a un muestreo farmacocinético antes y después de la dosificación y también se les extrajeron muestras de sangre para el análisis de la actividad de FVIII en puntos de tiempo designados.

Los datos farmacocinéticos para el ensayo clínico de Fase I/IIa demostraron los siguientes resultados para FVIII^h. FVIII^h mostró un aumento de alrededor de 50 % en la exposición sistémica (ABC_{INF}), alrededor de 50 % de reducción en la depuración (CL), y alrededor de 50 - 70 % de aumento en la semivida de eliminación y TMR en comparación con ADVATE[®] (rFVIII de longitud completa). Además, FVIII^h mostró valores aumentados de C₁₆₈, TBLP₁, TBLP₃ y TBLP₅ en comparación con ADVATE[®].

Los parámetros de PK medidos fueron:

- 50 ABC_{INF}
Área bajo la curva concentración-tiempo de cero a infinito
- SV Beta
Semivida de la fase de eliminación; también conocida como $t_{1/2\beta}$
- 55 C₁₆₈
Actividad estimada de FVIII^h por encima del valor inicial proximalmente 168 h después de la dosis
- CL
Depuración
- TMR
- 60 Tiempo medio de residencia

TBLP1

Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII_{IFc} ha disminuido a aproximadamente 1 UI/dL por encima del valor inicial

TBLP3

- 5 Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII_{IFc} ha disminuido a aproximadamente 3 UI/dL por encima del valor inicial

TBLP5

Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII_{IFc} ha disminuido a aproximadamente 5 UI/dL por encima del valor inicial

10

Ejemplo 4

Farmacocinética (PK) de rFVIII_{IFc}

15

Se ha creado una proteína de fusión recombinante de FVIII-Fc (rFVIII_{IFc}) con el dominio B eliminado como un enfoque para extender la semivida del FVIII. La farmacocinética (PK) de rFVIII_{IFc} se comparó con rFVIII en ratones con hemofilia A. La semivida terminal fue el doble para rFVIII_{IFc} en comparación con rFVIII. Con el fin de confirmar que el mecanismo subyacente para la extensión de la semivida se debía a la protección de rFVIII_{IFc} por el FcRn, la PK se evaluó en ratones con desactivación génica carentes de FcRn y en ratones transgénicos con FcRn humano.

20

Se administró una sola dosis intravenosa (125 UI/kg) y se midió la concentración en plasma usando un ensayo de actividad cromogénica. La $C_{\text{máx}}$ fue similar entre rFVIII_{IFc} y rFVIII (XYNTHA®) en ambas cepas de ratón. Sin embargo, aunque la semivida de rFVIII_{IFc} fue comparable a la de rFVIII en los ratones con desactivación génica carentes de FcRn, la semivida para rFVIII_{IFc} se extendió aproximadamente dos veces más que la de rFVIII en los ratones transgénicos con hFcRn. Estos resultados confirmaron que el FcRn mediaba o era responsable de la semivida prolongada de rFVIII_{IFc} en comparación con rFVIII. Dado que la hemostasia en sangre entera medida por tromboelastometría de rotación (ROTEM®) se ha correlacionado con la eficacia de los factores de coagulación en modelos de hemorragia de ratones hemofílicos, así como en aplicaciones clínicas, se buscó evaluar la eficacia ex vivo de rFVIII_{IFc} en los ratones con hemofilia A usando ROTEM®.

30

A los ratones con hemofilia A se les administró una sola dosis intravenosa de 50 UI/kg de rFVIII_{IFc}, XYNTHA® (FVIII) o ADVATE® (FVIII). A los 5 minutos de la dosis, la formación de coágulos fue similar con respecto al tiempo de coagulación (TC), el tiempo de formación de coágulos (TFC) y el ángulo α . Sin embargo, rFVIII_{IFc} mostró un TC significativamente mejorado 72 y 96 horas después de la dosis, y el TFC y el ángulo α también mejoraron a las 96 horas en comparación con XYNTHA® (FVIII) y ADVATE® (FVIII), acordes con una PK prolongada de rFVIII_{IFc}. Estos resultados indicaron que rFVIII_{IFc} tiene un mecanismo definido de acción que da como resultado una semivida aumentada, y el potencial para proporcionar protección prolongada contra la hemorragia.

35

40 Ejemplo 5

Resultados del ensayo clínico de Fase I/IIa de rFVIII_{IFc}

Este ejemplo presenta los resultados del análisis final para determinar la actividad de FVIII de 16 pacientes tratados con 25 y 65 UI/kg de productos de FVIII. Véase el Ejemplo 3. rFVIII_{IFc} es una proteína de fusión recombinante que comprende una sola molécula de FVIII humano recombinante con el dominio B eliminado (BDD-rFVIII) fusionado al dominio de Fc dimérico de la IgG1 humana, sin intervención de ninguna secuencia enlazadora. Este constructo de proteínas también se denomina en el presente documento proteína híbrida heterodimérica rFVIII_{IFc}, proteína monomérica de fusión a Fc de FVIII_{IFc}, híbrido de monómero de FVIII_{IFc}, híbrido monomérico de FVIII_{IFc} y monómero-dímero de FVIII_{IFc}. Véanse el Ejemplo 1, Fig. 1, y la Tabla 2A.

50

Los estudios preclínicos con rFVIII_{IFc} han mostrado una prolongación de aproximadamente 2 veces de la semivida de la actividad de rFVIII en comparación con los productos de rFVIII disponibles en el mercado. El motivo de este estudio fue evaluar la seguridad y la tolerabilidad de una dosis única de rFVIII_{IFc} en una formulación líquida congelada y proporcionar datos sobre la PK en sujetos con hemofilia A grave. Para este estudio, 16 sujetos evaluables estaban disponibles para la evaluación de PK. Se administraron solo dos dosis de tanto rFVIII_{IFc} como ADVATE® con una dosis nominal de 25 (n = 6) y 65 UI/kg de peso corporal (n = 10) que se infundieron por vía intravenosa durante aproximadamente 10 minutos. Se obtuvieron muestras de sangre para las evaluaciones de PK en plasma antes de la infusión, así como hasta 10 días después de la dosificación. La PK de la actividad de FVIII para ADVATE® y rFVIII_{IFc} se caracterizó en este estudio usando un procedimiento dependiente de modelo.

60

Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la seguridad y la tolerabilidad de la administración única de dos dosis de rFVIIIc (25 y 65 UI/kg) en pacientes previamente tratados (PTP, por su sigla en inglés) con 12 años de edad o más que padecían hemofilia A grave. El objetivo secundario fue determinar los parámetros de farmacocinética (PK) determinados por actividad farmacodinámica (PD) de FVIII en el tiempo después de una administración única de 25 o 65 UI/kg de rFVIIIc en comparación con ADVATE® en ensayos cromogénicos y de coagulación en una etapa.

10 Diseño del estudio (véase Ejemplo 3)

Se recogieron muestras de sangre para las evaluaciones PK de actividad de FVIII en la visita de cribado (dentro de los 28 días antes de la dosificación de ADVATE®); el día 0 (inyección de ADVATE®) antes de la inyección y a los 10 y 30 minutos y 1, 3, 6 y 9 horas después de la inyección; el día 1 a las 24 horas después de la inyección de ADVATE®; el día 2 a las 48 horas después de la inyección de ADVATE®; el día 3 a las 72 horas después de la inyección de ADVATE®; y el día 4 a las 96 horas después de la inyección de una dosis elevada de ADVATE® (Cohorte B solamente).

Se recogieron muestras de sangre para evaluaciones PK de actividad de FVIII el día de la inyección de rFVIIIc justo antes de la administración de rFVIIIc, a los 10 y 30 minutos y 1, 3, 6 y 9 horas después de la inyección de rFVIIIc; el día 1 a las 24 horas después de la inyección de rFVIIIc; los días 2 a 5 a las 48, 72, 96 y 120 horas después de la inyección de rFVIIIc; el día 7 a las 168 horas después de la inyección de rFVIIIc; los días 8, 9 y 10 a las 192, 216 y 240 horas después de la inyección de una dosis elevada de rFVIIIc (Cohorte B solamente). La actividad de FVIII también se midió en la visita final del estudio (28 días después de la inyección de rFVIIIc) a las 672 horas después de la inyección de rFVIIIc.

Modelado farmacocinético

Abreviaturas

- TBLP1
Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII ha disminuido a aproximadamente 1 UI/dL por encima del valor inicial.
- TBLP3
Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII ha disminuido a aproximadamente 3 UI/dL por encima del valor inicial.

Cálculos

- $VK_M = C_{\max_M} / \text{Dosis real (UI/kg)}$
- $VK_OB = C_{\max_OB} / \text{Dosis real (UI/kg)}$
- $IVR_M = 100 \times C_{\max_M} \times \text{Volumen de plasma (dL)} / \text{Dosis total en UI}$
- donde el volumen de plasma en mL = $(23,7 \times \text{Alt. en cm}) + (9,0 \times \text{Peso en kg}) - 1.709$.
- $IVR_OB = 100 \times C_{\max_OB} \times \text{Volumen de plasma (dL)} / \text{Dosis total en UI}$
- donde el volumen de plasma en mL = $(23,7 \times \text{Alt. en cm}) + (9,0 \times \text{Peso en kg}) - 1.709$.

Resultados

(a) Farmacocinética de dosis única (ensayo en una etapa)

- La actividad observada del FVIII aumentó bruscamente después de la infusión intravenosa corta de o bien ADVATE® o rFVIIIc, con valores medios ($\pm$ DE) de $C_{\max}$ predichos por el modelo de $56,6 \pm 4,74$ y $121 \pm 28,2$ UI/dL para ADVATE® y $55,6 \pm 8,18$ y $108 \pm 16,9$ UI/dL para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Todos los pacientes tratados con ADVATE® y rFVIIIc mostraron aumentos en la actividad de FVIII relacionados con la dosis. El aumento observado tanto en $C_{\max}$ como ABC_{INF} fue ligeramente menor que

proporcional a la dosis en el intervalo de dosis evaluado.

Después del final de la infusión, la disminución de la actividad de FVIII observada mostró características de disminución monoexponencial hasta que se alcanzó el nivel inicial. La tasa de disminución de la actividad de FVIII fue más lenta para rFVIII Fc que para ADVATE® con valores medios de semivida de eliminación predichos por el modelo ($\pm$ DE) de $11,9 \pm 2,98$ y $10,4 \pm 3,03$ h para ADVATE® y $18,0 \pm 3,88$ y $18,4 \pm 6,99$ h para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de semivida de eliminación parecieron ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

- 10 La exposición sistémica total a FVIII (evaluada de acuerdo con ABC_{INF}) fue ~ 48 % y 61 % mayor después de la administración de rFVIII Fc respecto de ADVATE® a niveles de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores medios de ABC_{INF} predichos por el modelo ($\pm$ DE) fueron 974 ± 259 y 1.810 ± 606 h* UI/dL para ADVATE® y 1.440 ± 316 y 2.910 ± 1.320 h*UI/dL para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.
- 15 Similar a la semivida de eliminación, el TMR fue prolongado para rFVIII Fc con relación a ADVATE®. Los valores medios de TMR predichos por el modelo ($\pm$ DE) fueron $17,1 \pm 4,29$ y $14,9 \pm 4,38$ h para ADVATE® y $25,9 \pm 5,60$ y $26,5 \pm 10,1$ h para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de TMR parecen ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.
- 20 Además, se determinaron los valores de parámetros de PK primarios para CL y V. Los valores de CL para rFVIII Fc solo representaron ~ 66 % de los observados para ADVATE® con dosis equivalentes. Los valores medios de CL predichos por el modelo ($\pm$ DE) fueron $2,70 \pm 0,729$ y $4,08 \pm 1,69$ mL/h/kg para ADVATE® y $1,80 \pm 0,409$ y $2,69 \pm 1,25$ mL/h/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de V fueron comparables entre ADVATE® y rFVIII Fc con los valores medios de V predichos por el modelo ($\pm$ DE) de $43,9 \pm 4,27$ y $56,1 \pm 13,4$ mL/kg para ADVATE® y $45,3 \pm 7,23$ y $61,6 \pm 10,6$ mL/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Se observaron ligeros aumentos en los valores medios de CL y V al aumentar la dosis de ADVATE® y rFVIII Fc; sin embargo, el aumento de las desviaciones estándar a la dosis de 65 UI/kg, junto con los niveles de dosis limitados, confundieron una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros. Por ejemplo, el valor de CL medio geométrico del % de CV para el grupo de tratamiento con rFVIII Fc aumentó del 23,0 % (25 UI/kg) al 48,6 % (65 UI/kg).

Además de los parámetros de PK primarios, se determinaron los parámetros de PK secundarios (p. ej., valores K, IVR, etc.) para evaluar la duración del efecto del FVIII. También se observó evidencia de la diferencia de PK con rFVIII Fc lo que demostró valores aumentados de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® con dosis equivalentes. Los valores IVR y de K para ADVATE® y rFVIII Fc parecían ser comparables. Se observó un ligero aumento en los valores de TBLP1 y TBLP3 con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc. Por el contrario, se apreciaron ligeros descensos en los valores de IVR y K medios con el aumento de la dosis de ADVATE® y rFVIII Fc. Como se ha indicado anteriormente, una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros se confunde con niveles de dosis limitados.

- 40 El TBLP1 medio observado ($\pm$ DE) fue $2,88 \pm 0,733$ y $2,93 \pm 0,848$ UI/dL por UI/kg para ADVATE® y $4,28 \pm 0,873$ y $5,16 \pm 2,02$ UI/dL por UI/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. El TBLP3 medio observado ($\pm$ DE) fue $2,06 \pm 0,527$ y $2,26 \pm 0,666$ UI/dL por UI/kg para ADVATE® y $3,09 \pm 0,623$ y $3,93 \pm 1,59$ UI/dL por UI/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.
- 45 Los valores medios de IVR y K calculados usando los valores de $C_{m\acute{a}x}$ observados (restados con el fármaco inicial y residual dentro del modelo) fueron generalmente mayores que los valores determinados usando los valores de $C_{m\acute{a}x}$ predichos por el modelo; acorde con una ligera subestimación de la actividad máxima observada utilizando el modelo de un compartimento. Los valores de K medios ($\pm$ DE) observados fueron $2,57 \pm 0,198$ y $2,13 \pm 0,598$ UI/dL por UI/kg para ADVATE® y $2,46 \pm 0,330$ y $1,85 \pm 0,332$ UI/dL por UI/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de IVR medios ($\pm$ DE) observados fueron $94,1 \pm 15,6$ y $85,8 \pm 16,5$ % para ADVATE® y $89,5 \pm 11,9$ y $74,8 \pm 6,72$ % para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

(b) Farmacocinética de dosis única (ensayo cromogénico)

- 55 La actividad observada de FVIII aumentó bruscamente después de la infusión intravenosa corta de o bien ADVATE® o rFVIII Fc, con valores medios ($\pm$ DE) de $C_{m\acute{a}x}$ predichos por el modelo de $70,2 \pm 9,60$ y $157 \pm 38,6$ UI/dL para ADVATE® y $70,3 \pm 10,0$ y $158 \pm 34,7$ UI/dL para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

60

Todos los pacientes tratados con ADVATE® y rFVIIIc mostraron aumentos en la actividad de FVIII relacionados con la dosis. El aumento observado tanto en $C_{m\acute{a}x}$ como ABC_{INF} fue ligeramente menor que proporcional a la dosis en el intervalo de dosis evaluado.

- 5 Después del final de la infusión, la disminución de la actividad de FVIII observada mostró características de disminución monoexponencial hasta que se alcanzó el nivel inicial. La tasa de disminución de la actividad de FVIII fue más lenta para rFVIIIc que para ADVATE® con valores medios de semivida de eliminación predichos por el modelo ($\pm$ DE) de $10,7 \pm 1,98$ y $10,3 \pm 3,27$ h para ADVATE® y $16,2 \pm 2,92$ y $19,0 \pm 7,94$ h para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de semivida de eliminación parecieron ser
10 independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

- La exposición sistémica total a FVIII (evaluada de acuerdo con ABC_{INF}) fue $\sim 53\%$ y 84% mayor después de la administración de rFVIIIc respecto de ADVATE® con niveles de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores medios de ABC_{INF} predichos por el modelo ($\pm$ DE) fueron 1.080 ± 236 y 2.320 ± 784 h* UI/dL para ADVATE®
15 y 1.650 ± 408 y 4.280 ± 1.860 h*UI/dL para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

- Similar a la semivida de eliminación, el TMR fue prolongado para rFVIIIc con relación a ADVATE®. Los valores medios de TMR predichos por el modelo ($\pm$ DE) fueron $15,3 \pm 2,86$ y $14,8 \pm 4,72$ h para ADVATE® y $23,4 \pm 4,22$ y $27,3 \pm 11,4$ h para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de TMR parecen
20 ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

- Además, se determinaron los valores de parámetros de PK primarios para CL y V. Los valores de CL para rFVIIIc solo representaron $\sim 58 - 66\%$ de los observados para ADVATE® con dosis equivalentes. Los valores medios de CL predichos por el modelo ($\pm$ DE) fueron $2,39 \pm 0,527$ y $3,21 \pm 1,40$ mL/h/kg para ADVATE® y $1,57 \pm 0,349$ y $1,86 \pm$
25 $0,970$ mL/h/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de V fueron comparables entre ADVATE® y rFVIIIc con los valores medios de V predichos por el modelo ($\pm$ DE) de $35,8 \pm 5,52$ y $43,6 \pm 11,2$ mL/kg para ADVATE® y $35,9 \pm 6,65$ y $42,7 \pm 8,91$ mL/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Se observaron aumentos en los valores medios de CL y V al aumentar la dosis de ADVATE® y rFVIIIc; sin embargo, el aumento de las desviaciones estándar a 65 UI/kg junto con los niveles de dosis
30 limitados, confundieron una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros.

- Además de los parámetros de PK primarios, se determinaron los parámetros de PK secundarios (p. ej., valores K, IVR, etc.) para evaluar la duración del efecto del FVIII. También se observó evidencia de la diferencia de PK con rFVIIIc lo que demostró valores aumentados de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® con dosis
35 equivalentes. Los valores IVR y de K para ADVATE® y rFVIIIc parecían ser comparables.

- Se observó un ligero aumento en los valores de TBLP1 y TBLP3 con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIIIc. Por el contrario, se apreciaron ligeros descensos en los valores de IVR y K medios con el aumento de la dosis de ADVATE® y rFVIIIc. Como se ha indicado anteriormente, una evaluación de la dependencia de la dosis de estos
40 parámetros se confunde con niveles de dosis limitados.

- El TBLP1 medio observado ($\pm$ DE) fue $2,70 \pm 0,511$ y $3,09 \pm 0,978$ UI/dL por UI/kg para ADVATE® y $4,06 \pm 0,798$ y $5,66 \pm 2,38$ UI/dL por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. El TBLP3 medio observado ($\pm$ DE) fue $1,98 \pm 0,377$ y $2,39 \pm 0,718$ UI/dL por UI/kg para ADVATE® y $3,04 \pm 0,598$ y $4,44 \pm 1,84$
45 UI/dL por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

- Los valores medios de IVR y K calculados usando los valores de $C_{m\acute{a}x}$ observados (restados con el fármaco inicial y residual dentro del modelo) fueron generalmente mayores que los valores determinados usando los valores de $C_{m\acute{a}x}$ predichos por el modelo; acorde con una ligera subestimación de la actividad máxima observada utilizando el
50 modelo de un compartimento. Los valores de K medios ($\pm$ DE) observados fueron $3,08 \pm 0,429$ y $2,85 \pm 0,721$ UI/dL por UI/kg para ADVATE® y $3,12 \pm 0,451$ y $2,92 \pm 0,985$ UI/dL por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de IVR medios ($\pm$ DE) observados fueron $112 \pm 14,5$ y $116 \pm 26,9\%$ para ADVATE® y $113 \pm 16,3$ y $117 \pm 33,6\%$ para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

55 Conclusiones

- Todos los pacientes tratados con ADVATE® y rFVIIIc mostraron aumentos relacionados con la dosis comparables en $C_{m\acute{a}x}$ y ABC_{INF} en el intervalo de dosis evaluado. Los niveles máximos en plasma de actividad de ADVATE® y rFVIIIc se observaron generalmente dentro de la primera hora después del final de la infusión y permanecieron
60 detectables durante varios días después de la dosificación. Después del final de la infusión, la disminución en la

actividad de FVIII corregida respecto del valor inicial mostró una disminución monoexponencial hasta que se alcanzó el valor inicial para ambos productos. Los valores de los parámetros para la semivida de eliminación y el TMR parecían ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII. Se observaron ligeros aumentos en los valores medios de CL y V al aumentar la dosis de ADVATE® y rFVIIIIFc; sin embargo, el aumento de la variabilidad interindividual a 65 UI/kg, junto con los niveles de dosis limitados, confundieron una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros.

La comparación de la PK de actividad de rFVIIIIFc y ADVATE® puso de manifiesto un aumento aproximado del 48 - 61 % (ensayo en una etapa) o del 53 - 84 % (ensayo cromogénico) en la exposición sistémica, una reducción de la depuración aproximada del 30 - 40 %, y un aumento aproximado del 50 - 80 % tanto en la semivida de eliminación como en el TMR para rFVIIIIFc con respecto a ADVATE® a dosis comparables. También se observó evidencia de la diferencia de PK con rFVIIIIFc lo que demostró valores aumentados de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® con dosis equivalentes. Los valores IVR y de K para ADVATE® y rFVIIIIFc parecían ser comparables.

Los parámetros de PK obtenidos a partir de los resultados del ensayo cromogénico generalmente fueron acordes a los del ensayo en una etapa, excepto que el ensayo cromogénico produjo una estimación más alta de los parámetros de exposición (p. ej., $C_{\text{máx}}$, ABC_{INF} , etc.).

Las mejoras observadas en PK indican que rFVIIIIFc puede proporcionar una protección prolongada contra la hemorragia, lo que permite inyecciones menos frecuentes para las personas con Hemofilia A.

Ejemplo 6

Estudio clínico de fase 3 A-LONG de rFVIIIIFc

El estudio A-LONG se diseñó sobre la base del análisis de PK provisional del estudio realizado por primera vez en seres humanos de rFVIIIIFc (véase Ejemplo 3). A-LONG es una evaluación abierta, global, multicéntrica de fase 3 de la seguridad, la farmacocinética y la eficacia de la fusión FVIII Fc recombinante (FVIII:Fc) en la prevención y el tratamiento de la hemorragia en sujetos previamente tratados con hemofilia A grave (definida como FVIII endógeno $<1 \text{ UI/dL}$ [$<1 \%$]).

Los objetivos primarios del estudio A-LONG fueron (i) evaluar la seguridad y la tolerabilidad de rFVIIIIFc administrado como regímenes de tratamiento de profilaxis, semanal, a demanda y quirúrgico; y (ii) evaluar la eficacia de rFVIIIIFc administrado como regímenes de tratamiento de profilaxis adaptado, a demanda y quirúrgico. El objetivo secundario del estudio A-LONG fue (i) caracterizar el perfil de PK de rFVIIIIFc y comparar la PK de rFVIIIIFc con el producto comercializado actualmente, ADVATE®, (ii) evaluar las respuestas individuales con rFVIIIIFc, (iii) caracterizar el intervalo de dosis y horarios requeridos para evitar hemorragias en un régimen de profilaxis, mantener la homeostasis en un entorno quirúrgico, o tratar episodios hemorrágicos en un tratamiento a demanda, semanal, o entorno de profilaxis, y (iv) evaluar el consumo de rFVIIIIFc (p. ej., consumo total por año de rFVIIIIFc por sujeto).

Se inscribieron 165 sujetos en uno de tres regímenes: un régimen de profilaxis adaptado (grupo 1), un régimen de dosificación semanal (grupo 2) y un régimen a demanda (grupo 3). Además, rFVIIIIFc se evaluó en un subgrupo de manejo perioperatorio.

Criterios de inclusión clave: (i) varón, (ii) ≥ 12 años de edad y al menos 40 kg de peso, (iii) diagnosticado con hemofilia A grave definida como actividad de FVIII endógeno $<1 \%$ ($<1 \text{ UI/dL}$), y (iv) historial de ≥ 150 días de exposición previa documentada a cualquier producto de FVIII comercializado actualmente.

Grupo 1: régimen de profilaxis adaptado

El grupo 1 incluyó un grupo global y un subgrupo de PK. El régimen inicial fue dos veces por semana con 25 UI/kg el primer día, seguido de 50 UI/kg el cuarto día de la semana (día 4). A los sujetos se les administró rFVIIIIFc en este régimen de profilaxis semanal hasta que estuvieron disponibles los resultados de PK para rFVIIIIFc. Basándose en estos resultados, se estableció un régimen de profilaxis adaptado para cada individuo, donde se determinó la dosis y el intervalo para mantener un nivel mínimo del 1 - 3 % de actividad de FVIII. Después, a cada sujeto se le administró su régimen de profilaxis adaptado individualmente durante todo el estudio.

Se supervisaron los sujetos durante todo el estudio y se realizaron ajustes continuos de dosis e intervalos. Solamente se hicieron ajustes cuando un sujeto experimentaba episodios hemorrágicos inaceptables definidos como ≥ 2 episodios hemorrágicos espontáneos durante un periodo de dos meses consecutivos. En este caso, el ajuste se

dirigió a niveles mínimos del 3 - 5 %.

Grupo 2: régimen de dosificación semanal

- 5 Los sujetos se sometieron a obtención de perfil de PK de rFVIII Fc abreviado de acuerdo con se indica a continuación: lavado de al menos 96 horas; una sola dosis de 65 UI/kg de rFVIII Fc; muestreo abreviado que comienza con rFVIII Fc el día 0, incluida la preinyección y 10 ($\pm$ 2) minutos, 3 horas ($\pm$ 15 minutos), 72 ($\pm$ 2) horas [día 3], y 96 ($\pm$ 2) horas [día 4] desde el comienzo de la inyección. Después de la obtención de perfil de PK abreviado, a los sujetos se les administró una dosis fija de 65 UI/kg de rFVIII Fc cada 7 días al menos durante 28
10 semanas y hasta un máximo de 52 semanas.

Grupo 3: tratamiento episódico (a demanda)

- Los sujetos recibieron tratamiento episódico con rFVIII Fc según fue necesario para la hemorragia. Los sujetos se
15 inscribieron y se aleatorizaron, y se sometieron a obtención de perfil de PK de rFVIII Fc abreviado de acuerdo con la indicación a continuación:

- (i) lavado: al menos 96 horas.
- (ii) dosificación de rFVIII Fc día 0: una dosis única de 50 UI/kg de rFVIII Fc administrada bajo supervisión médica.
- 20 (iii) Muestreo abreviado comenzando con rFVIII Fc día 0: preinyección y 30 ($\pm$ 3) minutos, 3 horas ($\pm$ 15 minutos), 72 ($\pm$ 2) horas [día 3], y 96 ($\pm$ 2) horas [día 4] desde el inicio de la inyección.

- En los sitios de selección, se llevó a cabo un muestreo para EGT acorde con todos los puntos de tiempo de obtención de perfil de FL. Para el subconjunto de sujetos sometidos a muestreo para ROTEM/TEG, las muestras se
25 recogieron en los siguientes puntos de tiempo: preinyección y 3 horas ($\pm$ 15 minutos), 72 ($\pm$ 2) horas [día 3], y 96 ($\pm$ 2) horas [día 4] desde el inicio de la inyección.

- Entre las visitas programadas, los sujetos trataron los episodios hemorrágicos con dosis de rFVIII Fc entre 10 y 50 UI/kg, de acuerdo con la gravedad de la hemorragia.
30

Subgrupo de manejo perioperatorio

- Se administró rFVIII Fc antes de una cirugía siguiente en el subconjunto de pacientes que requerían un procedimiento quirúrgico mayor durante el estudio. La cirugía mayor se define como cualquier procedimiento
35 quirúrgico (optativo o de emergencia) que involucre anestesia general y/o asistencia respiratoria donde se penetra y se expone una cavidad corporal importante, o para el cual se produce un deterioro sustancial de las funciones físicas o fisiológicas (p. ej., laparotomía, toracotomía, craneotomía, reemplazo articular y amputación de extremidades).

- Como profilaxis durante la cirugía, los sujetos se trataron con 20 a 50 UI/kg de rFVIII Fc cada 12 a 24 horas. Antes de
40 la cirugía, el médico revisó el perfil de PK de rFVIII Fc del sujeto y evaluó el régimen de dosis de reemplazo de FVIII generalmente requerido para el tipo de cirugía programada y el estado clínico del sujeto. La recomendación para la dosificación apropiada de rFVIII Fc en el periodo de tratamiento quirúrgico, incluido cualquier tiempo de rehabilitación, tuvo en cuenta estos factores.

- 45 **Evaluación farmacocinética (PK):** todos los sujetos de todos los grupos pasaron por una evaluación de PK inicial después de su primera dosis de rFVIII Fc. Un subconjunto de sujetos del grupo 1 fue asignado a un subgrupo de PK secuencial específico de protocolo para comparar la PK de rFVIII Fc con Factor VIII recombinante (rFVIII, ADVATE[®] [procedimiento de factor anti-hemofílico (recombinante) libre de albúmina/plasma]) como se indica a continuación:

- 50 (i) antes del tratamiento en el grupo 1, se evaluó la PK después de una dosis única de 50 UI/kg de ADVATE[®]. A continuación se evaluó la PK en estos mismos sujetos después de una dosis única de 50 UI/kg de rFVIII Fc.
(ii) la PK de rFVIII Fc se repitió desde las 12 hasta las 24 semanas.

- Medidas de resultado de eficacia clave (incluidas en lectura inicial):** (i) tasa de hemorragias por año (ABR, por su sigla en inglés) en el grupo 1 versus grupo 3 (grupo de profilaxis individualizado comparado con grupo de
55 tratamiento episódico), (ii) cantidad de inyecciones requeridas para poner fin a un episodio hemorrágico, (iii) evaluaciones de los médicos encargados de la respuesta de los sujetos a la cirugía con rFVIII Fc utilizando una escala de 4 puntos.

- 60 **Medidas de resultado de PK:** PK de rFVIII Fc y ADVATE[®].

Medidas de resultado de seguridad clave: (i) incidencia de desarrollo de inhibidores; e (ii) incidencia de reacciones adversas (RA) que se producen fuera del periodo de manejo perioperatorio.

5 Resultados:

Sujetos: se inscribieron un total de 165 sujetos en el estudio. Grupo 1 (profilaxis individualizada), n = 118; grupo 2 (profilaxis semanal), n = 24; grupo 3 (tratamiento episódico), n = 23; subgrupo de manejo perioperatorio, n = 9, 9 cirugías (8 sujetos del grupo 1, y 1 del grupo 2). 92,7 % de los sujetos completaron el estudio.

10 **Eficacia:** ABR media (grupo de profilaxis individualizada: 1,6; grupo de profilaxis semanal: 3,6; grupo de tratamiento episódico: 33,6). En el grupo de profilaxis individualizada, el intervalo de dosificación medio fue 3,5 días durante los tres últimos meses del estudio. 30 por ciento de los pacientes en el grupo de profilaxis individualizada alcanzó un intervalo de dosificación medio de al menos 5 días. 98 % de los episodios hemorrágicos se controlaron con una o
15 dos inyecciones de rFVIIIc. En el manejo perioperatorio, los médicos encargados calificaron la eficacia hemostática de rFVIIIc como excelente o buena en el 100 % de las cirugías.

PK: la semivida terminal media geométrica de rFVIIIc fue aproximadamente 19,0 horas, 1,53 veces más extensa que la de ADVATE® (aproximadamente 12,4 horas).

20 **Seguridad:** no se detectaron inhibidores de rFVIIIc, y no se informó sobre casos de anafilaxis. En términos generales, rFVIIIc fue bien tolerado. Las RA más comunes, independientemente de causalidad, (incidencia ≥5 %) que se produjeron fuera del periodo de manejo perioperatorio fueron nasofaringitis, artralgia, dolor de cabeza e infección de las vías respiratorias altas. Doce sujetos (7,3 %) experimentaron al menos una RA grave (RAG) fuera
25 del periodo de manejo perioperatorio. De acuerdo con la evaluación del investigador, las RAG no estaban relacionadas con el fármaco

Resumen

30 Los regímenes profilácticos semanal e individualizado dieron como resultado tasas de hemorragia medias anuales bajas de un único dígito. En el grupo de profilaxis individualizado, el intervalo de dosificación medio fue 3,5 días. Durante los últimos 3 meses del estudio, 30 por ciento de los pacientes en el grupo de profilaxis individualizada alcanzó un intervalo de dosificación medio de al menos 5 días. 98 % de los episodios hemorrágicos se controlaron con una o dos inyecciones de rFVIIIc. La eficacia hemostática de rFVIIIc durante la cirugía fue calificada por los
35 médicos encargados como excelente o buena en el 100 % de las cirugías. La semivida de rFVIIIc fue aproximadamente 19,0 horas en comparación con 12,4 horas para ADVATE®. Ningún sujeto desarrolló un inhibidor o experimentó una reacción anafiláctica al rFVIIIc. En términos generales, el FVIIIc recombinante fue bien tolerado.

Ejemplo 7

40 Evaluación clínica ROTEM®

Además de la medición de actividad de FVIII en plasma por ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT) en una etapa, también se ha explorado la tromboelastometría rotacional de sangre entera (ROTEM®) para
45 evaluar la mejora en la hemostasia global por rFVIIIc y ADVATE® en 2 sujetos, específicamente, 1 en la cohorte de dosis baja y 1 en la cohorte de dosis alta.

rFVIIIc y ADVATE® parecen ser comparativamente activos en la formación de coágulos cuando se añaden a la sangre de los sujetos antes del tratamiento con rFVIIIc. El tiempo de coagulación (TC) fue lineal con respecto a la
50 dosis de rFVIIIc y ADVATE® en el intervalo de aproximadamente 1 % de 100 % de lo normal, y la respuesta a la dosis fue comparable entre rFVIIIc y ADVATE® en el mismo sujeto.

Después de la dosificación con ADVATE® y posteriormente rFVIIIc, se tomaron muestras de sangre entera citrada en diversos puntos de tiempo y se controló la formación de coágulos después de la recalcificación mediante
55 ROTEM®. A pesar del TC inicial variable debido a los niveles de residuos de FVIII antes de la dosificación de ADVATE® o rFVIIIc, ambos productos corrigieron eficazmente el TC a niveles comparables 30 minutos después de la inyección. Además, la mejora en el TC se mantuvo mejor a las 3 horas y después de las tres horas siguientes a la inyección de 25 UI/kg de rFVIIIc con respecto a ADVATE® en el sujeto que recibió esta dosis baja. Sin embargo, la mejora diferencial de rFVIIIc frente a ADVATE® fue mucho menos apreciable con la dosis de 65 UI/kg.

60

Ejemplo 8

Eficacia *in vivo* de rFVIII Fc y rFVIII monocatenario (MC) en ratones con Hema

- 5 El Factor VIII Fc recombinante (rFVIII Fc) está compuesto por una proteína de rFVIII con el dominio B eliminado (BDD) fusionado con el dominio de Fc de la inmunoglobulina humana G1 (IgG1). Antes de la secreción a partir de células HEK 293, la mayor parte del rFVIII Fc se procesa en una cadena pesada (HC) y una cadena ligera (LC+Fc) de FVIII. En la circulación, se forma un complejo con el rFVIII Fc y el factor de von Willebrand (VWF) y el rFVIII Fc se libera tras la activación de una manera que es imposible de distinguir del FVIII nativo. Se cree que la disociación
- 10 espontánea de la HC y LC contribuye con la pérdida de actividad de FVIII en plasma y durante el almacenamiento de medicamentos de FVIII. En el presente documento se describe una isoforma no procesada monocatenaria de rFVIII Fc (rFVIII Fc MC), que puede proporcionar una productibilidad superior y una mejor estabilidad en comparación con el FVIII nativo.
- 15 El rFVIII Fc MC se purificó a partir de rFVIII Fc, que contiene una fracción de la isoforma no procesada. En comparación con rFVIII Fc, rFVIII Fc MC mostró actividad cromogénica equivalente pero actividad reducida en aproximadamente un 60 % de acuerdo con el ensayo en una etapa (aPTT), (Tablas 3A y 3B). El ensayo de generación de trombina (EGT) se llevó a cabo utilizando trombograma automatizado calibrado (de Thrombinoscope®). En un ensayo de generación de trombina (EGT), el rFVIII Fc MC también mostró un potencial de
- 20 trombina reducido (Fig. 13A), y un máximo de trombina (Fig. 13B) en comparación con rFVIII Fc. No obstante, como se muestra en la Tabla 3B, la actividad completa de rFVIII Fc MC de acuerdo con aPTT se observó en ausencia de VWF, sugiriendo que la liberación de VWF se puede retrasar debido a los enlaces covalentes de la región ácida a3 a la HC después de la escisión de Arg 1680 en rFVIII Fc MC, a diferencia de la liberación de a3 y la disociación del FVIII completamente procesado. La disociación retrasada de VWF puede explicar la actividad reducida observada en
- 25 el ensayo aPTT y EGT, mientras que la actividad completa se observó en el ensayo cromogénico en dos etapas. Una tasa reducida de activación en presencia de VWF se confirmó en un ensayo de sustrato cromogénico modificado con trombina limitante como activador del FVIII.

La función *in vivo* de rFVIII Fc MC se evaluó en el modelo de transección de vena caudal de ratón con Hema (TVT).

- 30 En primer lugar los ratones se anestesiaron y a continuación se les inyectó 4,6 µg/kg, 1,38 µg/kg, o 0,46 µg/kg de o bien rFVIII Fc procesado (principio activo, que contiene alrededor de 75 % - 85 % de rFVIII Fc procesado) y rFVIII Fc monocatenario (MC) purificado 48 horas antes de la TVT. La cola se cortó desde la punta y se colocó inmediatamente en un tubo para recoger la sangre. El porcentaje de protección en la supervivencia se midió para rFVIII Fc procesado (principio activo) y FVIII Fc monocatenario (MC) como se muestra en la Tabla 7 y las Fig. 7A, 7B
- 35 y 7C.

Tabla 7. Eficacia *in vivo* de rFVIII Fc DC y rFVIII Fc monocatenario (MC)

Dosis (µg/kg)		4,6	1,38	0,46
% de protección en supervivencia	FVIII Fc DC	93	52	19
	rFVIII Fc monocatenario	93	64	14

- El resangrado de cola *in vivo* y la supervivencia se monitorizaron cada una hora hasta 12 horas después de la TVT y
- 40 se llevó a cabo una observación final a las 24 horas de la TVT. El rFVIII Fc MC y el rFVIII Fc demostraron eficacia *in vivo* equivalente en este modelo, con una DE50 de 1,17 µg/kg y 1,23 µg /kg respectivamente cuando la TVT se llevó a cabo 48 horas después de la infusión (Fig. 7A). Las curvas de supervivencia comparables 24 horas después de la TVT ($p \geq 0,65$) (Fig. 7B) y las tasas de resangrado (Fig. 7C) en ratones con Hema se observaron para rFVIII Fc MC y rFVIII Fc en cada nivel de dosis analizado, indicando que rFVIII Fc MC fue igual de eficaz que rFVIII Fc a pesar de su
- 45 actividad en aPTT aparentemente inferior. Por lo tanto, la activación *in vitro* retrasada de rFVIII Fc MC en presencia de VWF pareció no tener impacto significativo sobre su eficacia *in vivo*. Estas observaciones indicaron que rFVIII Fc MC representa una isoforma novedosa y eficaz de rFVIII Fc con potenciales aplicaciones clínicas.

Ejemplo 9

50

Ensayo clínico de estudio de fase 1/2a

- rFVIII Fc es una proteína de fusión recombinante compuesta por una única molécula de FVIII unida de manera covalente con el dominio de Fc de la IgG₁ humana para extender la semivida de rFVIII circulante. Este estudio
- 55 realizado por primera vez en seres humanos en sujetos de género masculino con hemofilia A grave, previamente tratados, investigó la seguridad y farmacocinética de rFVIII Fc. Dieciséis sujetos recibieron una dosis única de 25 o 65 UI/kg de ADVATE® seguida de una dosis igual de rFVIII Fc. La mayor parte de las reacciones adversas no

estaban relacionadas con el fármaco del estudio. Ninguno de los sujetos del estudio desarrolló anticuerpos anti-FVIIIc o inhibidores. En los distintos niveles de dosis, en comparación con ADVATE[®], rFVIIIc mostró una $t_{1/2}$ de eliminación y un tiempo medio de residencia 1,54 a 1,71 veces más largos, una depuración 1,49 a 1,56 veces inferior, y una exposición sistémica total 1,48 a 1,56 veces superior. ADVATE[®] y rFVIIIc mostraron concentraciones

- 5 máximas en plasma dependientes de dosis y recuperaciones comparables. El tiempo hasta 1 % de actividad de FVIII sobre el valor inicial fue aproximadamente 1,53 a 1,68 veces más largo que para ADVATE[®] en todos los niveles de dosis. Por lo tanto, rFVIIIc puede ofrecer un enfoque terapéutico viable para alcanzar una protección hemostática prolongada y una dosificación menos frecuente en pacientes con hemofilia A.
- 10 rFVIIIc es una proteína de fusión recombinante compuesta por una única molécula de rFVIII con dominio B eliminado unido de manera covalente con el dominio de Fc de la IgG₁. Las ventajas potenciales de las proteínas de fusión a Fc incluyen una mejor tolerabilidad y protección hemostática más prolongada, y el dominio de Fc representa una molécula natural sin toxicidad inherente conocida. Dumont J.A. y col., *BioDrugs* 20(3):151-60 (2006), Dumont J.A. y col., «Monomeric Fc fusion technology: an approach to create long-lasting clotting factors» en: Kontermann R.,
- 15 ed., *Therapeutic Proteins - Strategies to Modulate Half-Life*, Capítulo 11, Wiley VCH publisher; publicado previamente online, DOI: 10.1002/9783527644827.cap. 10. La adhesión al dominio de Fc de la IgG₁ permite la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que se expresa en muchos tipos de células, incluyendo células epiteliales. La expresión del FcRn permanece estable a lo largo de toda la vida y es responsable de proteger la IgG₁ y las proteínas de fusión a Fc de la degradación lisosomal, prolongando de este modo la $t_{1/2}$ de la proteína. Dumont J.A., y col.,
- 20 *BioDrugs* 20(3): 151-60 (2006), Roopenian D.C. y col., *Nat Rev Immunol.* 7(9):715-25 (Epub 17 de agosto de 2007). Muchas proteínas en la circulación se internalizan en las células que revisten la vasculatura mediante pinocitosis no específica y se dirigen a vías de degradación endosomal y lisosomal.

Las proteínas de Fc interactúan con el FcRn, residente dentro de los endosomas. Los endosomas que contienen

25 FcRn dirigen las proteínas de fusión a Fc nuevamente a la membrana plasmática, liberándolas dentro de la circulación de una manera dependiente del pH, Lencer W.I. and Blumberg R.S., *Trends Cell Biol.* 15(1):5-9 (2005) evitando así la degradación lisosomal. Este enfoque de reciclaje se ha utilizado con éxito para extender la $t_{1/2}$ de los productos biológicos terapéuticos; se han aprobado varios fármacos basados en fusión a Fc para uso clínico (p. ej., etanercept, romiplostim) y otros están en desarrollo. Huang C., *Curr Opin Biotechnol.* 20(6): 692-9). (Epub 4 de

30 noviembre de 2009), Schmidt S.R., *Curr Opin Drug Discov Devel.* 12(2):284-295 (2009).

Los datos preclínicos para rFVIIIc indican que el FVIII se puede rescatar de la degradación mediante una vía de protección natural mediada por el FcRn, extendiendo así la $t_{1/2}$. En ratones y perros con hemofilia A, la $t_{1/2}$ en plasma terminal para rFVIIIc fue aproximadamente 2 veces más extensa que con rFVIII. Dumont J. y col., *Blood.* 116(21)

35 Resumen 545 (2009), Liu T. y col., *J Thromb Haemost.* 9(S2):561 (2011). De acuerdo con estos datos, se llevó a cabo un estudio clínico realizado por primera vez en seres humanos para investigar la seguridad y PK de una proteína de fusión rFVIIIc de larga duración en sujetos con hemofilia A.

Diseño del estudio

- 40 Este estudio abierto, con dosis crecientes, multicéntrico de fase 1/2a en pacientes con hemofilia A grave previamente tratados investigó la seguridad de rFVIIIc y su farmacocinética (PK) en comparación con ADVATE[®] (procedimiento de factor anti-hemofílico (recombinante) libre de albúmina/plasma, octocog alfa, Baxter Healthcare) Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las directrices del Código de Regulaciones Federales de los Estados
- 45 Unidos (CFR, por su sigla en inglés) y la Guía Tripartita Armonizada de la ICH sobre la Buena Práctica Clínica. Antes de cualquier análisis, se obtuvieron la aprobación de las Juntas de Revisión Institucional participantes y los consentimientos informados por escrito de todos los sujetos. El diseño del estudio fue secuencial; una dosis única de 25 o 65 UI/kg de ADVATE[®] se administró seguida de una dosis igual de rFVIIIc (Figura 8). Ambos fármacos fueron
- 50 inyectados por vía intravenosa durante aproximadamente 10 minutos. Se esperaba que los dos niveles de dosis agruparan los intervalos de dosis terapéutica típicos. Se hizo seguimiento de los sujetos durante 28 días después de recibir rFVIIIc para análisis de seguridad, incluyendo análisis de anticuerpos anti-FVIII e inhibidores a los 14 y 28 días después de la inyección. La actividad de FVIII en plasma se midió en sujetos antes de la inyección, 10 y 30 minutos, 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96, 120, y 168 horas (7 días) después de la inyección de rFVIIIc, con muestras
- 55 adicionales a las 192, 216 y 240 horas (10 días) para sujetos que recibieron una dosis de 65 UI/kg de rFVIIIc. La actividad de FVIII en plasma se midió en los mismos puntos de tiempo después del tratamiento con ADVATE[®], durante 72 horas para el grupo de 25 UI/kg y 96 horas para el grupo de 65 UI/kg.

(a) Sujetos

- 60 Los sujetos de género masculino tenían al menos 12 años de edad y padecían hemofilia A grave (definida como

- nivel de actividad de FVIII <1 %) y tenían al menos 100 días de exposición previa documentada a concentrados de FVIII (pdFVIII o rFVIII). Fueron excluidos los sujetos con hipersensibilidad conocida a proteínas de ratón o hámster, historial de titulaciones de inhibidores o de inhibidores detectables en el cribado, o que estaban tomando cualquier medicación que pudiera afectar la hemostasia o fármacos inmunosupresores sistémicos, o que hubieran experimentado una infección bacteriana o viral activa (que no fuera hepatitis o VIH) en los 30 días después del cribado. El genotipo del sujeto, de conocerse, se registró durante el ingreso al estudio.

(b) Producto de tratamiento

- 10 Los transgenes rFVIII^h y Fc humanos se transfectaron de manera estable en células HEK293 y se analizó la línea celular exhaustivamente para determinar estabilidad, esterilidad y contaminación viral con el fin de asegurar seguridad. El medicamento purificado está compuesto por un FVIII monomérico con dominio B eliminado unido de manera covalente a través de su extremo carboxi al extremo N terminal de un monómero de Fc, lo cual forma un enlace de disulfuro con un segundo monómero de Fc durante la síntesis y la secreción desde las células. rFVIII^h se purificó mediante cromatografía y nanofiltración, y estuvo plenamente activo en los ensayos de coagulación en una etapa y cromogénico respecto de las preparaciones de FVIII disponibles en el mercado. Se suministró como un líquido congelado que contenía 1.000 UI cada 2 mL de disolución y se formuló con L-histidina (pH 7), cloruro sódico, cloruro de calcio, sacarosa, manitol y polisorbato 20. Para la inyección, el producto se diluyó con solución salina (0,9 % NaCl).

(c) Medidas de resultado

- El principal objetivo del estudio fue la seguridad, evaluada a través de la exploración física, del informe de las reacciones adversas (RA) que surgían de los tratamientos, del desarrollo de anticuerpos, y de la monitorización de laboratorio durante el tiempo. Los objetivos secundarios incluyeron parámetros derivados de análisis de PK. Las evaluaciones de laboratorio incluyeron tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), relación normalizada internacional, niveles de dímero D, antígeno del factor de von Willebrand (vWF), hematología estándar y análisis de química sanguínea y análisis de orina.
- 30 La actividad de FVIII se midió mediante el ensayo de coagulación en una etapa (aPTT) en un analizador BCS-XP de Siemens utilizando reactivos comerciales (Dade Actin FSL) con calibración contra un plasma de referencia normal (Precision Biologics CRYOcheck™) rastreado al 5º estándar internacional (IS, por su sigla en inglés) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para plasma humano. Además del ensayo aPTT, la actividad de FVIII se midió con un ensayo de sustrato cromogénico Rosen S., *Scand J Haematol Suppl.* 33(Supl. 40): 139-45 (1984)
- 35 utilizando un kit disponible en el mercado (Aniara BIOPHEN FVIII:C) conforme con las recomendaciones de la Farmacopea Europea. El ensayo cromogénico se calibró contra plasma de referencia humano normal (Instrumentation Laboratories ORKE45), que también tenía una potencia asignada contra el 5º IS de la OMS para plasma humano.
- 40 El límite inferior de cuantificación (LIC) para los ensayos en una etapa y cromogénico fue 0,5 UI/dL y 0,4 UI/dL, respectivamente. Los inhibidores de FVIII se midieron con el ensayo de Bethesda modificado por Nijmegen y menos de 0,6 UB/mL se consideró negativo. Se evaluaron los anticuerpos anti-rFVIII^h utilizando un inmunoensayo electroquimioluminiscente de formación de puentes que utiliza biotina y rFVIII^h sulfo-marcado. Se determinó que la sensibilidad del ensayo fue 89 ng/mL utilizando un anticuerpo monoclonal anti-FVIII humano como control
- 45 subrogado. Se llevó a cabo tromboelastometría rotacional de sangre entera (ROTEM®) de exploración en dos sujetos, una de cada nivel de dosis, en diversos puntos de tiempo para evaluar la mejora en la hemostasia global después de la inyección con ADVATE® y rFVIII^h.

(d) Análisis farmacocinéticos

- 50 Un modelo de disposición en un compartimento definido por usuario, que estima automáticamente el nivel de FVIII endógeno y la disminución residual posterior, se utilizó en WINNONLIN® para el análisis de los datos de actividad versus tiempo de FVIII en plasma en un sujeto individual después de una administración única de ADVATE® o rFVIII^h. Los tiempos reales de muestreo, dosis, y duración de la inyección se utilizaron para calcular parámetros incluyendo actividad máxima ($C_{\text{máx}}$), $t_{1/2}$, depuración (CL), volumen de distribución en estado estacionario (V_{EE}), área bajo la curva (tiempo cero extrapolado a infinito [AUC_{INF}]), tiempo medio de residencia (TMR), y recuperación incremental.

- Simulación Monte Carlo de perfil de actividad versus tiempo de rFVIII^h:** para construir perfiles de actividad-tiempo de FVIII después de regímenes de dosificación de 25 UI/kg o 65 UI/kg, se llevó a cabo una simulación Monte

Carlo utilizando el modelo de PK de poblaciones de ADVATE® y rFVIIIc. Las estimaciones medias de parámetros del modelo (CL, volumen de distribución) en la población analizada, la varianza entre individuos, y la variabilidad residual se estimaron de acuerdo con los datos de actividad del ensayo de coagulación en una etapa (aPTT) de ADVATE® y rFVIIIc de 16 sujetos en este estudio de fase 1/2a. Se hizo una simulación de quinientos sujetos con 15 puntos de muestreo para cada sujeto para cada régimen de dosificación. Se estimó el porcentaje de la población con actividad de FVIII por encima o igual de 1 % y 3 % en distintos tiempos después de los distintos regímenes de dosificación de ADVATE® o rFVIIIc.

Análisis estadísticos: los parámetros de PK seleccionados para rFVIIIc y ADVATE® se compararon utilizando un análisis de modelo de varianza. Los parámetros de PK se transformaron por logaritmo para estos análisis y las medias estimadas, diferencias medias e intervalos de confianza en la escala logarítmica se transformaron para obtener estimaciones para medias geométricas, relaciones de medias geométricas (RMG), e intervalos de confianza, respectivamente, sobre la escala original. La RMG es la media geométrica de la relación intrasujeto del valor de parámetro de PK de rFVIIIc respecto del valor de parámetro de PK de ADVATE®.

Resultados

Disposición de sujetos: diecinueve sujetos se inscribieron en el estudio; 16 se sometieron a evaluación de PK para tanto ADVATE® como rFVIIIc. Un sujeto se autoadministró su producto previo antes de completar el periodo de lavado después de la dosis con ADVATE® y, por lo tanto, fue excluido del análisis de PK, pero se incluyó en el análisis de seguridad. Tres sujetos se eliminaron del estudio antes de recibir cualquiera de los fármacos del estudio: uno se dio de baja de forma voluntaria; el segundo fue dado de baja por el investigador por no cumplir con los requisitos; y uno se dio de baja a petición del patrocinador debido a que la inscripción del estudio había finalizado. De los sujetos que recibieron las dosis, seis recibieron 25 UI/kg y 10 sujetos recibieron 65 UI/kg de tanto ADVATE® como rFVIIIc. La edad media fue 40,3 años (23 a 61 años). La identificación de genotipo se tomó para siete sujetos; se informó sobre inversión del intrón 22 para seis sujetos; y se informó sobre un defecto de cambio de marco en un sujeto. El genotipo era desconocido en nueve sujetos. Trece sujetos tenían anticuerpos de la hepatitis C, cuatro de los cuales también eran VIH positivo.

Seguridad: se informó sobre cuarenta y cuatro RA que surgían del tratamiento en 11 sujetos (69 %) durante el tratamiento y periodos de seguimiento. Esto incluyó el día de dosificación con ADVATE® o rFVIIIc durante un periodo de observación posdosificación de 28 días. La mayor parte de las reacciones se consideraron leves y ninguna produjo la baja del estudio. Una reacción, disgeusia, se produjo de manera temporal en un sujeto mientras recibía una dosis de 65 UI/kg de rFVIIIc y se consideró que estaba relacionada con rFVIIIc. Un sujeto experimentó un ataque de ansiedad después de recibir 65 UI/kg de rFVIIIc, lo cual dio como resultado 21 RA, 19 de las cuales se calificaron como leves, y dos de las cuales (dolor de cabeza y fobia) se calificaron como moderadas. El investigador consideró que ninguna estaba relacionada con rFVIIIc. No se informó sobre episodios hemorrágicos graves. No se detectó evidencia de reacciones alérgicas a la inyección. Todas las muestras de plasma dieron negativo para inhibidores de FVIII y anticuerpos anti-rFVIIIc. No se observaron signos de reacciones en el sitio de la inyección. No se informó sobre cambios clínicamente significativos en los valores anormales de laboratorio.

Farmacocinética:

Correlación entre aPTT y actividad cromogénica para rFVIIIc en plasma: las actividades de ADVATE® y rFVIIIc se determinaron en los mismos ensayos utilizando reactivos disponibles en el mercado y calibración contra estándares para plasma humano normales. Se observó una marcada correlación entre los resultados obtenidos por el ensayo de coagulación en una etapa y el ensayo cromogénico en muestras que tenían una actividad por encima del LIC. Se observaron coeficientes de correlación (Pearson R^2) de 0,94 y 0,95 entre los resultados de los dos ensayos para 151 muestras después de la dosificación de ADVATE® y 185 muestras después de la dosificación de rFVIIIc, respectivamente. En comparación con los resultados de aPTT, las actividades cromogénicas de FVIII fueron, en promedio, 21 % superiores para ADVATE® y 32 % superiores para rFVIIIc, valores no significativos desde el punto de vista estadístico (Fig. 9). Esta observación condujo a una estimación ligeramente superior de parámetros de exposición mediante la evaluación cromogénica para ambos fármacos. Las recuperaciones de FVIII aparentemente superiores mediante el ensayo cromogénico son típicas para productos de FVIII recombinante analizados en ensayos clínicos, y son acordes a la mayor parte de los productos de FVIII comercializados. Lee C.A. y col., *Thromb Haemost.* 82(6):1644-7 (dic. 1999), Mikaelsson M. y Oswaldsson U., *Semin Thromb Hemost.* 28(3):257-64 (junio 2002), Stroobants A.K. y col., *J Thromb Haemost.* 9 (Supl. 2) (2011).

Farmacocinética mejorada para rFVIIIc: las principales estimaciones de PK fueron derivadas de los datos de actividad del ensayo de coagulación (aPTT) en una etapa. En sujetos que recibieron 25 o 65 UI/kg de ADVATE®

seguido de una dosis igual de rFVIII Fc, la actividad de FVIII en plasma se incrementó bruscamente y alcanzó $C_{\text{máx}}$ dentro de la primera hora después de la dosificación. La posterior disminución de la actividad de FVIII observada mostró características de disminución monoexponencial hasta que se alcanzó la actividad de FVIII inicial. (Fig. 10A y 10B). La $C_{\text{máx}}$ aumentó proporcionalmente a la dosis, pero fue comparable entre dosis iguales de ADVATE® y rFVIII Fc (Tabla 8). La exposición total (ABC_{INF}) también aumentó proporcionalmente a la dosis. Sin embargo, el ABC_{INF} de rFVIII Fc fue 1,48 y 1,56 veces superior que el de ADVATE® con 25 UI/kg ($p=0,002$) y 65 UI/kg ($p<0,001$), respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de PK por ensayo (aPTT) en una etapa para rFVIII Fc y ADVATE® por grupo de dosis

Parámetro	Dosis: 25 UI/kg (N = 6)			Dosis: 65 UI/kg (N = 9)		
	ADVATE® M. geom. [IC de 95 %]	rFVIII Fc M. geom. [IC de 95 %]	Relación de medias geométricas [IC de 95 %] (valor de p)	ADVATE® M. geom. [IC de 95 %]	rFVIII Fc M. geom. [IC de 95 %]	Relación de medias geométricas [IC de 95 %] (valor de p)
$C_{\text{máx, OBS}}$ (UI/dL)	63,6 [59,1, 68,31]	60,5 [53,1, 69,0]	0,952 [0,819, 1,11] ($p = 0,440$)	133 [105, 168]	119 [103, 136]	0,895 [0,795, 1,01] ($p = 0,061$)
$ABC_{\text{INF}}(h*UI/dL)$	994 [723, 1.370]	1.480 [1.160, 1.880]	1,48 [1,26,1,76] ($p = 0,002$)	1.800 [1.350, 2.400]	2.800 [1.980, 3.970]	1,56 [1,33, 1,83] ($p <0,001$)
$t_{1/2}$ (h)	12,2 [9,14, 16,3]	18,8 [14,8, 23,8]	1,54 [1,40,1,69] ($p <0,001$)	11,0 [8,76, 13,9]	18,8 [14,3, 24,5]	1,70 [1,54, 1,89] ($p <0,001$)
TMR (h)	17,5 [13,1, 23,4]	27,0 [21,3, 34,2]	1,54 [1,40,1,69] ($p <0,001$)	15,8 [12,6, 19,9]	27,0 [20,6, 35,3]	1,71 [1,54, 1,89] ($p <0,001$)
CL (mL/hora/kg)	2,49 [1,80, 3,45]	1,68 [1,31, 2,15]	0,673 [0,569, 0,796] ($p = 0,002$)	3,61 [2,71, 4,83]	2,32 [1,64, 3,29]	0,642 [0,547, 0,753] ($p <0,001$)
V_{EE} (mL/kg)	43,9 [39,3, 49,0]	45,4 [39,3, 52,5]	1,04 [0,947,1,13] ($p = 0,357$)	57,4 [48,3, 68,3]	62,8 [55,2, 71,5]	1,09 [0,976,1,22] ($p = 0,107$)
Recuperación incremental (UI/dL por UI/kg)	2,56 [2,36, 2,78]	2,44 [2,12, 2,81]	0,952 [0,819,1,11] ($p = 0,444$)	2,04 [1,61, 2,59]	1,83 [1,59, 2,10]	0,894 [0,795,1,01] ($p = 0,060$)

IC = Intervalo de Confianza; M. geom. = Media geométrica; OBS = observada. Las medias estimadas, IC de 95 % para medias, y diferencias medias se transformaron para obtener medias geométricas estimadas, IC de 95 % para medias geométricas, y relaciones de medias geométricas, respectivamente.

10

Los valores de $t_{1/2}$, TMR, CL, y V_{EE} parecían no depender de la dosis (Tabla 8). La media geométrica $t_{1/2}$ de rFVIII Fc fue 18,8 horas para tanto el grupo de dosis de 25 UI/kg como de 65 UI/kg. Esto representa una mejora de 1,54 y 1,70 veces respecto de ADVATE® (12,2 horas y 11,0 horas) con dosis equivalentes ($p<0,001$), respectivamente (Tabla 8). La misma mejora intra-sujeto se observó en el TMR de rFVIII Fc (27,0 horas para ambos grupos de dosis) en comparación con ADVATE® (17,5 horas para 25 UI/kg y 15,8 horas para 65 UI/kg) ($p<0,001$). Acorde con la mejora en $t_{1/2}$ y TMR hubo una reducción correspondiente de 1,49 y 1,56 veces en CL intra-sujeto con dosis de 25 UI/kg ($p=0,002$) y 65 UI/kg ($p<0,001$), respectivamente. No hubo diferencias significativas en V_{EE} y recuperación incremental entre ADVATE® y rFVIII Fc. Por lo tanto, dentro de cada sujeto, rFVIII Fc demostró un perfil de PK mejorado en comparación con ADVATE®.

20

El perfil de PK mejorado de rFVIII Fc dio como resultado mayor tiempo posdosificación hasta 1 % de actividad de FVIII que fue 1,53 y 1,68 veces más extenso respectivamente, que con ADVATE® con 25 UI/kg ($p<0,001$) y 65 UI/kg ($p<0,001$) (los datos no se muestran), sugiriendo una duración terapéutica potencialmente más larga para rFVIII Fc. El perfil de PK favorable de rFVIII Fc respecto de ADVATE® también se demostró mediante la actividad de FVIII medida en el ensayo cromogénico (Tabla 9), que fue comparable con los datos derivados de los ensayos aPTT. Sin embargo, la estimación de exposición, es decir, $C_{\text{máx}}$ y ABC_{INF} , fue ligeramente superior de acuerdo con el ensayo cromogénico que de acuerdo con el ensayo de coagulación (aPTT) en una etapa tanto para ADVATE® como para rFVIII Fc.

25

Tabla 9
Parámetros de PK por ensayo (cromogénico) en dos etapas para rFVIII Fc y ADVATE® por grupo de dosis

Parámetro	Dosis: 25 UI/kg (N = 6)			Dosis: 65 UI/kg (N = 9)		
	ADVATE® M. geom. [IC de 95 %]	rFVIII Fc M. geom. [IC de 95 %]	Relación de medias geométricas [IC de 95 %] (valor de p)	ADVATE® M. geom. [IC de 95 %]	rFVIII Fc M. geom. [IC de 95 %]	Relación de medias geométricas [IC de 95 %] (valor de p)
C _{máx} OBS (UI/dL)	75,5 [65,5, 87,1]	76,5 [64,9, 90,1]	1,01 [0,940, 1,09] (p = 0,686)	175 [143, 215]	182 [146, 227]	1,04 [0,900, 1,20] (p = 0,571)
ABC _{INF} (h*UI/dL)	1.060 [822, 1.360]	1.660 [1.300, 2.120]	1,57 [1,38, 1,80] (p <0,001)	2.270 [1.670, 3.070]	4.280 [2.960, 6.190]	1,89 [1,61, 2,21] (p <0,001)
t _{1/2} (h)	10,5 [8,49, 12,9]	16,7 [13,8, 20,1]	1,59 [1,35, 1,87] (p <0,001)	10,8 [8,16, 14,2]	19,8 [14,3, 27,51]	1,84 [1,60, 2,12] (p <0,001)
TMR (h)	15,0 [12,2, 18,6]	23,9 [19,8, 28,9]	1,59 [1,35, 1,87] (p <0,001)	15,4 [11,7, 20,4]	28,5 [20,5, 39,6]	1,85 [1,61, 2,12] (p <0,001)
CL (mL/hora/kg)	2,35 [1,80, 3,06]	1,49 [1,16, 1,92]	0,636 [0,557, 0,727] (p <0,001)	2,87 [2,12, 3,89]	1,52 [1,05, 2,20]	0,530 [0,453, 0,620] (p <0,001)
V _{EE} (mL/kg)	35,5 [30,5, 41,3]	35,9 [30,4, 42,3]	1,01 [0,898, 1,14] (p = 0,822)	44,5 [36,7, 54,1]	43,4 [38,2, 49,4]	0,975 [0,863, 1,10] (p = 0,653)
Recuperación incremental (UI/dL por UI/kg)	3,05 [2,62, 3,54]	3,09 [2,61, 3,66]	1,01 [0,940, 1,09] (p = 0,679)	2,70 [2,20, 3,31]	2,80 [2,24, 3,50]	1,04 [0,900, 1,20] (p = 0,571)
IC = Intervalo de Confianza; M. geom. = Media geométrica; OBS = observada. Las medias estimadas, IC de 95 % para medias, y diferencias medias se transformaron para obtener medias geométricas estimadas, IC de 95 % para medias geométricas, y relaciones de medias geométricas, respectivamente.						

5

Correlación entre factor de von Willebrand y disposición de rFVIII Fc: puesto que la mayor parte del FVIII en circulación forma un complejo con VWF, Lenting P.J. y col., *J Thromb Haemost.* 5: 1353-60 (2007) y puesto que el estudio de asociación de todo el genoma ha identificado que los determinantes genéticos de los niveles de FVIII dependen principalmente de los niveles de VWF, Smith N.L. y col., *Circulation* 121:1382-1392 (2010) se examinó la asociación entre VWF y rFVIII Fc. Se observó una marcada correlación entre los niveles de VWF y CL y t_{1/2} para tanto rFVIII Fc como para ADVATE®. Como se muestra en las Fig. 11A y 11B, puesto que el nivel de VWF aumentó, la CL de rFVIII Fc (p=0,0016) y de ADVATE® (p=0,0012) disminuyó.

10

Se observó la relación inversa entre el nivel de VWF y t_{1/2}. Puesto que el nivel de VWF aumentó, la t_{1/2} de rFVIII Fc (p=0,0003) y de ADVATE® (p<0,0001) aumentó. Esta correlación indica que el resto de Fc de rFVIII Fc no altera la función de VWF de proteger el FVIII de la depuración.

15

Efectos de PK prolongada de rFVIII Fc en ROTEM® de sangre entera: antes de la administración del fármaco del estudio, a la sangre de un sujeto en cada grupo de dosis se le añadió una dosis igual de rFVIII Fc o ADVATE® y se analizó con ROTEM® de sangre entera. El tiempo de coagulación (TC) fue lineal con respecto a la dosis en el intervalo de aproximadamente 1 % a 100 % de lo normal, y la respuesta a la dosis fue comparable entre rFVIII Fc y ADVATE® en el mismo sujeto (los datos no se muestran), lo que indica potencia comparable de rFVIII Fc y ADVATE® en la formación de coágulos.

20

A pesar del TC inicial variable debido a los niveles residuales de FVIII previos a la administración de ADVATE® o rFVIII Fc, ambos productos corrigieron el TC de manera eficaz a niveles comparables 30 minutos después de la dosificación (véanse Fig. 12A y 12B). La mejora del TC se mantuvo mejor con rFVIII Fc que con ADVATE® al cabo de las 3 horas de una dosis de 25 UI/kg (Fig. 12A), y al cabo de 24 horas de una dosis de 65 UI/kg (Fig. 12B).

25

rFVIIIc fue bien tolerado por los sujetos con ambas dosis. No se observaron cambios clínicamente significativos en los parámetros de hematología, química sanguínea o de análisis de orina. La mayor parte de las RA fueron leves, no estaban relacionadas con rFVIIIc y desaparecieron sin dejar secuelas. No se produjeron RA graves o muertes durante el estudio, y ningún sujeto con ninguna de las dosis desarrolló anticuerpos neutralizantes o de unión a rFVIIIc.

rFVIIIc demostró un perfil de PK de actividad de FVIII significativamente mejorado respecto de ADVATE[®], con $t_{1/2}$ y TMR en los distintos niveles de dosis de 1,54 a 1,71 veces más extensos, medidos por el ensayo de coagulación (aPTT) en una etapa y 1,59 a 1,84 veces más extenso de acuerdo con el ensayo cromogénico en dos etapas. La actividad prolongada de rFVIIIc predice una posible eficacia prolongada, permitiendo un régimen de dosificación menos frecuente en el tratamiento profiláctico de pacientes con Hemofilia A.

Adoptando los parámetros de PK derivados de este estudio, la simulación Monte Carlo predijo que un porcentaje más alto de pacientes que recibían rFVIIIc mantendrían los niveles de FVIII por encima de 1 % o 3 % en comparación con pacientes que recibían dosis iguales de ADVATE[®] (Tabla 10). Por ejemplo, con una dosis de 25 UI/kg, se predijo que 12,2 % de los pacientes de ADVATE[®] versus 71,2 % de los pacientes de rFVIIIc iban a tener niveles mínimos de FVIII por encima de 1 % el día 4; con una dosis de 65 UI/kg, se predijo que 11,0 % de los pacientes de ADVATE[®] versus 66,4 % de los pacientes de rFVIIIc iban a tener niveles de FVIII por encima de 3 % el día 4. Se planean ensayos clínicos en mayores cantidades de pacientes para confirmar resultados de este estudio de fase 1/2a y de las predicciones de la simulación Monte Carlo.

Tabla 10. Porcentaje predicho de sujetos que alcanzaron los niveles mínimos de FVIII por encima de 1 % y 3 % de lo normal con un régimen de dosis determinada de ADVATE[®] o rFVIIIc

Punto de tiempo después de dosificación (día)	ADVATE [®]		rFVIIIc	
	25 UI/kg	65 UI/kg	25 UI/kg	65 UI/kg
	Porcentaje de sujetos con niveles mínimos de FVIII por encima de 1 %			
3	40,0	67,8	92,6	99,0
4	12,2	31,0	71,2	90,0
5	4,20	13,6	39,4	71,6
7	0,200	1,40	7,80	26,4
	Porcentaje de sujetos con niveles mínimos de FVIII por encima de 3 %			
3	10,6	34,6	62,2	91,0
4	1,60	11,0	25,4	66,4
5	0,200	3,20	7,00	36,2
7	0	0,200	0,400	6,60

Los ensayos de coagulación *in vitro* demuestran que no hay pérdida de actividad específica para rFVIIIc, en comparación con FVIII con dominio B eliminado o nativo, mediante o bien ensayos de coagulación o bien cromogénicos, utilizando reactivos disponibles en el mercado y estándares de referencia de FVIII comúnmente utilizados (Dumont y col., Blood (2012), publicado previamente online DOI:10.1182/blood-2011-08-367813). Asimismo, estos resultados indican que rFVIIIc se puede analizar de manera fiable en un entorno clínico mediante o bien el ensayo en una etapa o el procedimiento cromogénico.

En resumen, este ensayo clínico de fase 1/2a ha demostrado la seguridad y la $t_{1/2}$ prolongada de rFVIIIc en pacientes con hemofilia A grave. Un estudio de fase 3 pivotal se está llevando a cabo con rFVIIIc para establecer regímenes de dosificación de profilaxis eficaces para individuos con hemofilia A.

Ejemplo 10

Farmacocinética y eficacia de rFVIIIc en modelos de ratón y

perro con hemofilia A

La farmacocinética y eficacia de rFVIIIc en comparación con rFVIII fue evaluada en modelos de ratón y perro con hemofilia A, como apoyo para los estudios con humanos. rFVIIIc es una proteína heterodimérica que comprende un único FVIII con dominio B eliminado (BDD) unido de manera recombinante al dominio de Fc de la inmunoglobulina humana G1 (IgG1). Las fusiones a Fc dimérico tradicionales, creadas a través de la fusión de la proteína efectora

monomérica a un monómero de Fc y a continuación acopladas a través de un enlace de disulfuro para crear un dímero, no eran eficaces para proteínas de coagulación grandes, tales como FVIII. Por lo tanto, hemos desarrollado procedimientos para crear constructos de proteína de fusión a Fc novedosos en los cuales una única molécula efectora (monomérica) se une a Fc (Dumont J.A., y col., *BioDrugs* 20(3):151-60 (2006)), (Dumont J.A., y col., *Journal of aerosol medicine*. 18(3):294-303 (2005)), (Bitonti, y col., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101(26):9763-9768 (2004)). Hemos aplicado este enfoque a varias proteínas, incluyendo rFIX humano (Peters, R.T., y col., *Blood*. 115(10):2057-2064 (2010)), rFVIIa (Salas, J., y col., *J Thromb Haemost.* 9(s2):0-TU-026. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04380_2.x (2011)), y BDD rFVIII.

10 Procedimientos y materiales

Proteína de fusión recombinante de FVIII-Fc (rFVIII-Fc): el plásmido de expresión de rFVIII-Fc pBUDCE4.1 (Invitrogen) contenía dos casetes de expresión. Uno expresaba, bajo el control del promotor CMV, la secuencia señal de FVIII humano nativo seguida de BDD FVIII (fusión S743 a Q1638) directamente unida a la región Fc de la IgG1 humana (aminoácidos D221 a K457, numeración de la UE) sin la intervención de ninguna secuencia. El otro utilizaba el promotor EF1 α para expresar la región Fc sola con una secuencia señal de IgkB de ratón heteróloga. Las células 293 de riñón embrionario humano (HEK293H, Invitrogen) se transfectaron con este plásmido, y se generó una línea celular en suspensión clonal estable que expresaba rFVIII-Fc. La proteína fue purificada a partir de medio de cultivo celular definido utilizando un proceso de purificación de tres columnas, incluyendo una etapa de purificación por afinidad específica de FVIII (McCue J. y col., *J. Chromatogr. A.*, 1216(45): 7824-30 (2009)), seguida de una combinación de etapas cromatográficas de intercambio aniónico e interacciones hidrófobas.

FVIII recombinante (rFVIII): el BDD FVIII recombinante (REFACTO[®] y XYNTHA[®]), y FVIII de longitud completa (ADVATE[®]) se adquirieron en Novis Pharmaceuticals (Miami, FL) y se reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Animales: los ratones con hemofilia A (HemA) con desactivación del exón 16 de FVIII en un fondo 129 x B6 se obtuvieron del Dr. H. Kazazian en la University of Pennsylvania (Bi, L., y col., *Nat Genet.* 10(1):119-121 (1995)) y se criaron en Biogen Idec Hemophilia. Los ratones con desactivación génica de FcRn murino (FcRn KO) y los ratones transgénicos con FcRn humano (Tg32B) se derivaron de ratones C57BL/6J y se consiguieron a través del Dr. Derry Roopenian del laboratorio The Jackson Laboratory en Bar Harbor, ME. Los genotipos para ratones FcRn KO son mFcRn (-/-) y m β 2m (-/-), y para Tg32B son mFcRn (-/-), m β 2m (-/-), hFcRn (+/+), y h β 2m (+/+) Los ratones C57BL/6 se compraron en los laboratorios The Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME). Todas las actividades con animales fueron aprobadas por los Comités Institucionales del Cuidado de los Animales y se llevaron a cabo de acuerdo con la «Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio».

Los perros con hemofilia A eran de la colonia endocriada mantenida en el laboratorio Francis Owen Blood Research Laboratory de la University of North Carolina, Chapel Hill. Estos perros tienen un fenotipo hemofílico grave comparable a la forma grave de la enfermedad humana (Graham, J.B. y Buckwalter, J.A., y col., *The Journal of Exp. Med.* 90(2):97-111 (1949)), (Lozier, J.N., y col., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 99(20):12991-12996 (2002)).

Estudios farmacocinéticos (PK) en ratones: la PK de rFVIII-Fc y rFVIII (XYNTHA[®]) se evaluó en ratones con HemA, C57BL/6, FcRn KO, y Tg32B después de una dosis intravenosa de 125 UI/kg. Se recogió sangre de la vena cava en una décima parte del volumen de citrato sódico al 4 % a los 5 minutos, y 4, 8, 16, 24, 32, 48, 54, y 72 horas después de la dosificación para rFVIII-Fc a los 5 minutos, y 1, 4, 8, 16, 20, 24, 32, y 48 horas después de la dosificación para rFVIII (4 ratones/punto de tiempo/tratamiento). El plasma se sometió a congelación rápida en un baño de etanol/hielo seco y se almacenó a -80 °C hasta el análisis de actividad de FVIII utilizando un ensayo cromogénico específico de FVIII humano (kit Coatest SP para FVIII de DiaPharma [West Chester, OH]). Los parámetros farmacocinéticos se estimaron por modelado no compartimental utilizando WINNONLIN[®] versión 5.2 (Pharsight, Mountain View, CA).

Estudios de eficacia en ratones con HemA: todos los estudios de eficacia fueron ciegos. La eficacia aguda fue estudiada en el modelo sangrante de corte de cola. Los ratones macho con HemA (8 - 12 semanas de edad) se anestesiaron con un cóctel de 50 mg/kg de ketamina y 0,5 mg/kg de dexmedetomidina A continuación, la cola se sumergió en solución salina a 37 °C durante 10 minutos para dilatar la vena lateral y a continuación se aplicó la inyección en la vena caudal de rFVIII-Fc, rFVIII (ADVATE[®]), o vehículo. Cinco minutos más tarde, 1 cm distal de la cola se cortó y se recogió la sangre derramada en 13 mL de solución salina templada durante 30 minutos. Se cuantificó la pérdida de sangre de manera gravimétrica.

La eficacia profiláctica se estudió en el modelo sangrante de transección de vena caudal (TVT) como se describió

previamente (Pan, J. and Kim, J.Y., *Blood*. 114(13):2802-2811 (2009)) con la excepción de que los ratones con HemA recibieron una administración intravenosa única de 12 UI/kg de rFVIII^h, rFVIII (ADVATE[®]), o vehículo a las 24 o 48 horas antes de la transección de una vena caudal lateral. La dosis de 12 UI/kg se identificó a partir de un experimento previo de respuesta a dosis con rFVIII en el cual con una dosis de 12 UI/kg se consiguió 50 % de protección de ratones con HemA de una lesión TVT provocada 24 horas después de la dosificación (los datos no se muestran).

Estudios de perros con hemofilia A: en un estudio de PK/PD de dosis única de rFVIII^h, dos perros con hemofilia A sin tratamiento previo (M10 y M11) recibieron una dosis intravenosa de 125 UI/kg. Se recogieron muestras de sangre antes de la dosificación y después de la dosificación a los 5 y 30 minutos, y 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96, 144, y 168 horas para determinar tiempo de coagulación de sangre entera (TCSE). Las tomas de sangre para actividad de FVIII (ensayos aPTT y cromogénico), antígeno de rFVIII^h (ELISA), hematología y química sanguínea incluyeron los puntos de tiempo mencionados más arriba para TCSE así como 15 minutos y 3, 6 y 12 horas después de la dosificación.

En el siguiente estudio de diseño secuencial, se administró rFVIII (REFACTO[®]) por vía intravenosa con dosis de 114 UI/kg para el perro M12 y 120 UI/kg para el perro M38. Se midió el TCSE hasta que los tiempos de coagulación fueron ≥ 20 minutos (el tiempo acorde con FVIII:C ≤ 1 %), y las muestras también se recogieron en los puntos de tiempo especificados para pruebas de actividad de FVIII (ensayo aPTT y cromogénico), de antígeno (ELISA) y hematología. A continuación, se administraron 125 UI/kg de rFVIII^h por vía intravenosa a los mismos perros y se recogieron muestras de sangre para TCSE, aPTT, ELISA, hematología y química del suero. Los puntos de tiempo para TCSE incluyeron predosificación, y 5 y 30 minutos y 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, y 72 horas después de la dosificación de rFVIII y rFVIII^h. La sangre también se recogió 96, 120, 144 y 168 horas después de la dosificación con FVIII^h. Las extracciones de sangre para la actividad de FVIII y antígenos incluyeron los puntos de tiempo enumerados anteriormente para el TCSE, así como 15 minutos y 3, 6, 12 horas después de la dosificación. El TCSE y aPTT se llevaron a cabo como se describió previamente (Herzog, y col., *Nat Med*. 5(1):56-63 (1999)).

Ensayos cromogénicos de FVIII: la actividad de FVIII en plasma de perro con hemofilia A se analizó mediante un ensayo cromogénico automatizado en un instrumento Sysmex CA1500 (Sysmex, IL) con reactivos de Siemens Healthcare Diagnostics (Dallas, TX). La curva estándar se generó con el concentrado de FVIII del 7^o estándar internacional (código NIBSC 99/678) añadido en plasma agotado de FVIII humano (Stago, EE. UU.) con concentraciones que variaban de 1,5 a 0,016 UI/mL.

La actividad de FVIII en plasma de ratón con HemA se midió utilizando el ensayo para FVIII Coatest SP de Chromogenix (DiaPharma, Lexington, MA), siguiendo las instrucciones del fabricante. La curva estándar se generó utilizando rFVIII^h o rFVIII en serie diluido de 100 mU/mL a 0,78 mU/mL en tampón que contenía plasma de ratón con HemA sin tratamiento previo. Para medir la actividad de FVIII humano en plasma de ratón C57BL/6, FcRn KO, y Tg32B, primero se capturó rFVIII^h o rFVIII infundido en plasma de ratón mediante Amc GMA8016 específico de FVIII humano (Green Mountain Antibodies, VT) seguido del ensayo estándar Coatest.

ELISA específico de rFVIII y rFVIII^h: los niveles de antígeno de rFVIII y rFVIII^h en plasma de perro con hemofilia A se midieron con el ensayo ELISA seguido del protocolo estándar. El Amc GMA-8002 específico de dominio A1 de FVIII (Green Mountain Antibodies, Burlington, VT) se utilizó como el anticuerpo de captura. El anticuerpo F8C-EIA-D anti-FVIII policlonal conjugado con HRP (Affinity Biologicals) se utilizó para detectar rFVIII. El fragmento anti-(F(ab)₂) humano de burro conjugado con HRP 709-036-098 (Jackson Immunologicals) se utilizó para detectar rFVIII^h.

Análisis RPS de interacciones rFVIII^h-FcRn: los experimentos de resonancia de plasmones superficiales (RPS) se llevaron a cabo con un instrumento Biacore T100. Se adquirieron chips sensores CM5 de máxima calidad, tampones y reactivos de inmovilización en Biacore (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las preparaciones de FcRn monocatenario humano, canino y murino se inmovilizaron utilizando acoplamiento de aminos estándar en celdas de flujo adyacentes de un chip único a una densidad de aproximadamente 370 unidades de resonancia (UR), seguido de bloqueo con etanolamina. La asociación en estado estacionario de analitos que contienen Fc (FVIII^h e IgG) con FcRn inmovilizado de distintas especies se evaluó con inyección secuencial de analitos con 16 concentraciones (0,0625-2.000 nM) en tampón circulante de pH 6,0 (MES [ácido 4-morfolinoetanosulfónico] 50 mM, cloruro sódico 250 mM, cloruro de calcio 2 mM, Tween 20 al 0,01 % [monolaurato de polietilenglicol sorbitano]). Cada ciclo se llevó a cabo por duplicado y comprendía una fase de asociación de 45 minutos y una fase de disociación de 15 minutos, ambas a una tasa de flujo de 5 μ L/min, seguidas de regeneración con dos inyecciones de 60 segundos de Tris-HCl 1M a 25 μ L/min. Después de resta de referencia doble (celda de flujo vacía y tampón circulante solo), se trazaron las respuestas de unión registradas cerca del final de la fase de asociación como una función de concentración de analitos, y los valores de CE₅₀ (50 % de R_{máx}) se derivaron mediante análisis de regresión no lineal.

Análisis estadísticos: se llevaron a cabo la prueba t desapareada, la prueba ANOVA unidireccional, la prueba de Mann-Whitney, la prueba de Kruskal-Wallis con posterior prueba de Dunn, curvas de supervivencia y la prueba de Mantel-Cox asociada en GraphPad Prism 5 (Graph-Pad Software Inc., La Jolla, CA). Un valor de P de dos colas inferior a 0,05 se consideró significativo desde el punto de vista estadístico.

Resultados

Proteína de fusión recombinante de FVIII Fc (rFVIII Fc): rFVIII Fc es una fusión recombinante de FVIII humano con dominio B eliminado con Fc de IgG1 humana, sin intervención de una secuencia enlazadora (Fig. 14), que se produjo en células HEK 293H bien caracterizadas. rFVIII Fc se escinde de manera proteolítica e intracelular para conseguir una cadena pesada de ~90 kDa y una cadena ligera de ~130 kDa-Fc unidas entre sí de manera no covalente mediante una interacción de enlace metálico mediada por los dominios A1 y A3 de FVIII.

La actividad específica promedio de rFVIII Fc de catorce lotes separados fue 8.460 ± 699 UI/mg de acuerdo con el ensayo de coagulación (aPTT) en una etapa, y 9.348 ± 1.353 UI/mg de acuerdo con el ensayo cromogénico, correspondiente a 1.861 ± 154 y 2.057 ± 298 UI/nmol, respectivamente. La actividad específica de rFVIII Fc es comparable a la de FVIII humano de tipo salvaje en plasma (1.429 UI/nmol) (Butenas, S. y Mann, K.G., *Biochemistry (Mosc)*. 67(1):3-12 (2002)). Por lo tanto, la actividad de FVIII de rFVIII Fc no se ve afectada por la fusión del extremo C de FVIII humano al extremo N de Fc humano, y los resultados obtenidos con los ensayos cromogénico y aPTT difieren en aproximadamente 10 % uno de otro.

Unión de rFVIII Fc a FcRn: la afinidad de rFVIII Fc por FcRn monocatenario de ratón, canino y humano se evaluó utilizando resonancia de plasmones superficiales. Las tasas de asociación y disociación para el complejo entre rFVIII Fc y FcRn de ratón fueron muy inferiores a las de FcRn canino y humano. La unión media-máxima (CE_{50}) de rFVIII Fc a FcRn humano fue aproximadamente 4 veces más débil que a FcRn canino, y más de 20 veces más débil que a FcRn de ratón (Tabla 11). De manera similar, la IgG1 humana también mostró la mayor afinidad a FcRn murino, mientras que la afinidad de unión a FcRn canino fue inferior en comparación con FcRn murino, pero superior en comparación con FcRn humano (Tabla 11).

Tabla 11. Análisis de resonancia de plasmones superficiales de FcRn murino, canino y humano con rFVIII Fc e IgG1 humana

Muestra de Fc *	FcRn	Densidad de FcRn (UR)	CE_{50} (nM) [†]	$R_{máx}$ (UR)
rFVIII Fc	murino	370	$<1,5$ [†]	581,4
rFVIII Fc	canino	367	8,6	499,3
rFVIII Fc	humano	369	33,4	365,4
IgG1 humana	murino	378	$<22,4$ [†]	320,0
IgG1 humana	canino	367	196,3	282,2
IgG1 humana	humano	378	558,4	211,0

Se inyectaron *rFVIII Fc o IgG1 en una celda de flujo en la cual diversas moléculas de FcRn fueron conjugadas químicamente a densidades aproximadamente iguales (~370 RU).
[†] valores de CE_{50} (50 % de $R_{máx}$) fueron el promedio derivado de análisis de regresión no lineal de las curvas de respuesta a unión ajustadas a 16 concentraciones de analitos (0,0625-2.000 nM) repetido por duplicado.
[‡]Debido a las afinidades elevadas, las curvas de baja unión con concentraciones de analitos bajas no alcanzaron el equilibrio en las condiciones normales de funcionamiento del instrumento.

Mejora dependiente de FcRn en farmacocinética de rFVIII Fc en ratones: la interacción de Fc con FcRn es considerada el mecanismo subyacente para extender la semivida de IgG y proteínas de fusión a Fc. Para confirmar que este mecanismo de acción también es responsable de extender la semivida de rFVIII Fc, se compararon los perfiles farmacocinéticos (PK) de rFVIII Fc con rFVIII en ratones (HemA) con deficiencia de FVIII (Fig. 15A), ratones normales (C57BL/6) (Fig. 15B), ratones con deficiencia de FcRn (FcRn KO) (Fig. 15C), y ratones transgénicos con FcRn humano (Tg32B) (Fig. 15D) después de una administración única por vía intravenosa de 125 UI/kg.

Los parámetros de PK (Tabla 12) se determinaron mediante la medición cromogénica de la actividad de FVIII humano en plasma de ratón. La $t_{1/2}$ de rFVIII Fc fue 1,8 - 2,2 veces más extensa que la de rFVIII en ratones con HemA (13,7 vs 7,6 horas) y en ratones normales (9,6 vs 4,3 horas). La extensión de $t_{1/2}$ de rFVIII Fc respecto de rFVIII se suprimió en ratones FcRn KO (6,4 vs 6,9 horas) y se restauró en ratones transgénicos Tg32B con FcRn

humano (9,6 horas vs 4,1 horas). Por lo tanto, los resultados confirman que la interacción de rFVIII^h con el receptor FcRn es responsable de su $t_{1/2}$ extendida. Asimismo, acorde con la $t_{1/2}$ mejorada, rFVIII^h también mostró un TMR 1,6 - 2,4 veces más extenso y una exposición sistémica aumentada 1,2 - 1,8 veces (ABC) en comparación con rFVIII en ratones que expresan FcRn (HemaA, C57BL/6 y Tg32B) pero no en ratones FcRn KO.

5

Tabla 12. Resumen de parámetros de PK para rFVIII^h y rFVIII en distintas cepas de ratón

Cepa de ratón	HemaA [†]		C57BL/6 [†]		FcRn KO [†]		hFcRn transgénico (Tg32B) [†]	
	rFVIII ^h *	rFVIII*	rFVIII ^h *	rFVIII*	rFVIII ^h *	rFVIII*	rFVIII ^h *	rFVIII*
C _{máx} (mUI/mL)	2.613,6	2.710,4	2.356,2	2.000,1	2.734,9	2.458,4	3.135,3	3.137,0
Semivida (h)	13,7	7,6	9,6	4,3	6,4	6,9	9,6	4,1
TMR (h)	17,6	11,0	9,8	5,4	6,3	8,5	12,8	5,4
V _{EE} (mL/kg)	68,2	49,2	67,5	50,8	49,3	51,6	64,1	49,6
CL (mL/h/kg)	3,9	4,5	6,9	9,3	7,8	6,1	4,1	7,3
ABC (h*mUI/mL)	32.332,4	28.026,8	18.089,1	13.404,0	16.087,2	20.609,3	30.534,5	17.165,7

C_{máx}: actividad de FVIII en plasma máxima después de la infusión; TMR: tiempo medio de residencia; V_{EE}: volumen de distribución en estado estacionario; CL: depuración; ABC: área bajo la curva.
[†] Los parámetros de PK de rFVIII y rFVIII^h se compararon solamente dentro de la misma cepa de ratón y no en todas las cepas, porque la misma molécula puede mostrar distintas $t_{1/2}$ en distintas cepas de ratón.
 *La evaluación de PK de cada molécula utilizó una cohorte de 36 ratones, muestreados por vena cava terminal sangrante de 4 ratones en cada uno de los 9 puntos de tiempo. Las medias de grupo en cada punto de tiempo se utilizaron para modelado no compartimental en WINNONLIN[®] para derivar estimaciones de parámetros de PK.

rFVIII^h es completamente activo para tratar sangrados agudos en ratones con HemaA: para evaluar la eficacia aguda de rFVIII^h en comparación con rFVIII, los ratones con HemaA (16 - 20 ratones/grupo) se trataron con dosis crecientes (24, 72, y 216 UI/kg) de rFVIII^h o rFVIII y se les cortó la cola 5 minutos después de la dosificación. En comparación con ratones tratados con vehículo (n = 18) que tenían una pérdida de sangre media de 1 mL, los tratamientos tanto con rFVIII^h como con rFVIII dieron como resultado una protección significativamente mejorada (P<0,05, prueba de Kruskal-Wallis con posterior prueba de Dunn) (Fig. 16). La pérdida de sangre media disminuyó progresivamente con dosis mayores, alcanzando una reducción máxima a 0,23 mL con 72 UI/kg de rFVIII^h, y a 0,20 mL con 216 UI/kg de rFVIII. En general, la pérdida de sangre fue comparable en animales tratados con dosis iguales de rFVIII^h o rFVIII, indicando que ambos productos terapéuticos son comparativamente activos para resolver sangrados arteriales agudos.

Eficacia profiláctica prolongada de rFVIII^h en ratones con HemaA: para determinar si la PK prolongada conduce a una protección prolongada contra lesiones, se comparó la eficacia profiláctica de rFVIII^h y rFVIII en ratones con HemaA. Veinticuatro horas después de una dosis intravenosa de 12 UI/kg, se transeccionó una vena caudal lateral de ratones con HemaA. Después de la lesión, 49 % de los ratones tratados con rFVIII (n = 39) sobrevivieron, en comparación con 100 % de supervivencia en los ratones tratados con rFVIII^h (n = 19) (P<0,001, prueba de Mantel-Cox) (Fig. 17A). Para demostrar adicionalmente que rFVIII^h mantiene una mayor duración de la eficacia, los ratones con HemaA se lesionaron 48 horas después de la dosificación de 12 UI/kg de rFVIII^h. Sin embargo, 58 % de los ratones tratados con rFVIII^h (n = 40) sobrevivieron, lo cual se asemeja a lo alcanzado por los ratones tratados con rFVIII (49 %) lesionados a las 24 horas después de la dosificación (Fig. 17A). Tanto el tratamiento con rFVIII^h como con rFVIII son significativamente mejores que el grupo de control con vehículo con HemaA (n = 30) en el cual solo 3 % de los ratones sobrevivieron a la lesión (P<0,0001) (Fig. 17A). La eficacia profiláctica mejorada y prolongada de rFVIII^h también se hace evidente con la medición del resangrado después de la lesión (Fig. 17B). Si bien 100 % de los ratones con HemaA tratados con vehículo volvieron a sangrar dentro de las 10 horas después de la transección de vena caudal, 87 % de los ratones tratados con rFVIII y 47 % de los tratados con rFVIII^h volvieron a sangrar después de la lesión provocada 24 horas después de la dosificación, respectivamente (P=0,002, rFVIII^h vs rFVIII) (Fig. 17B). El perfil de resangrado para ratones tratados con rFVIII^h lesionados a las 48 horas es, en gran medida, comparable al de los ratones tratados con rFVIII lesionados 24 horas después de la dosificación. Por el contrario, tanto el perfil de supervivencia como de resangrado para ratones tratados con rFVIII lesionados a las 48 horas son indistinguibles del perfil para el grupo de control con vehículo (los datos no se muestran). Por lo tanto, los resultados indican que rFVIII^h protege a los ratones con HemaA contra la lesión de vena caudal dos veces más en comparación con la protección conseguida con la misma dosis pero de rFVIII.

40

PKIPD mejorada de rFVIII^h en perros con hemofilia A: la PK y farmacodinámica (PD) de rFVIII^h también se

estudiaron en perros con hemofilia A. Después de una dosis intravenosa de 125 UI/kg de rFVIII^hFc, el TCSE se corrigió inmediatamente a la normalidad, que es en el intervalo de 8 - 12 minutos en perros normales (Fig. 18A y B). El TCSE se mantuvo debajo de los 20 min, indicando actividad de FVIII >1 %, durante aproximadamente 4 días en 3 de 4 perros tratados con rFVIII^hFc y 3 días en el perro restante (Fig. 18A). En el perro M12 tratado con 114 UI/kg de rFVIII y en el perro M38 con 120 UI/kg de rFVIII, el TCSE también se corrigió a la normalidad inmediatamente después de la dosificación. No obstante, el TCSE permaneció por debajo de los 20 minutos durante 2 días en M12 y 3 días en M38, aproximadamente 1,5 - 2 veces más corto que el alcanzado por rFVIII^hFc (Fig. 18B). Asimismo, el tratamiento tanto con rFVIII^hFc como con rFVIII también mejoró el tiempo de coagulación aPTT de manera similar a los 5 minutos después de la dosificación.

10

La PK del antígeno de rFVIII^hFc (Fig. 19A) se determinó midiendo la concentración de rFVIII^hFc en plasma con un ensayo ELISA específico de rFVIII^hFc que detecta tanto las porciones de FVIII como Fc de la molécula. La $t_{1/2}$ del antígeno de rFVIII^hFc es $15,7 \pm 1,7$ h (Fig. 19A), similar a la $t_{1/2}$ de la actividad de rFVIII^hFc (Fig. 19B), según se mide con el ensayo cromogénico: $15,4 \pm 0,3$ h (Tabla 13). Existe una buena correlación entre los datos de actividad de FVIII y de antígeno de rFVIII^hFc, demostrando de este modo que la proteína rFVIII^hFc estaba completamente activa *in vivo*.

15

Tabla 13. Resumen de parámetros de PK para rFVIII^hFc y rFVIII en perros con hemofilia A

PK por medición de actividad de FVIII					
Tratamiento	C _{máx} (UI/mL)	ABC (h·UI/mL)	T _{1/2} (h)	CL (mL/h/kg)	V _{EE} (mL/kg)
rFVIII ^h Fc*	2,0 ± 0,54	25,9 ± 6,47	15,4 ± 0,3	5,1 ± 1,4	86,4 ± 14,0
rFVIII ^h †	2,0	18,2	7,4	6,5	64,0
PK por medición de antígeno de rFVIII ^h Fc y rFVIII					
Tratamiento	C _{máx} [ng/mL]	ABC (h·ng/mL)	T _{1/2} (h)	CL (mL/h/kg)	V _{EE} (mL/kg)
rFVIII ^h Fc*	210 ± 33	2.481 ± 970	15,7 ± 1,7	6,2 ± 3,0	86,1 ± 19,2
rFVIII ^h †	211	1.545	6,9	8,7	80,7
*Los resultados presentados son ±DE media de 4 perros.					
†Los resultados presentados son la media. DE no informada puesto que se utilizaron dos perros.					

En dos de los perros (M12 y M38) que también recibieron una dosis única de rFVIII 72 horas antes de la dosificación con rFVIII^hFc, se determinó que la $t_{1/2}$ del antígeno de rFVIII fue 6,9 horas y la actividad de rFVIII fue 7,4 horas. Por lo tanto, la semivida en plasma de rFVIII^hFc fue aproximadamente dos veces más extensa en comparación con la de rFVIII de acuerdo con mediciones de antígeno y actividad.

Además, los recuentos de plaquetas y de fibrinógeno se evaluaron para que sirvan como pruebas preliminares de trombogenicidad. Después de la dosificación con rFVIII^hFc o rFVIII, el número de plaquetas y la concentración de fibrinógeno en plasma no cambiaron respecto de los valores previos a la dosis (los datos no se muestran).

Debate

30

Estos estudios han mostrado que rFVIII^hFc es completamente activo para tratar sangrados agudos en ratones con HemA, además de retener la actividad específica normal. Otros estudios, no mencionados en el presente documento, han demostrado que rFVIII^hFc también es completamente funcional en la interacción con FIXa, FX, y fosfolípidos para formar el complejo Xasa (Peters y col., *J. Thromb Haemost.* DOI: 10.1111/jth.12076 (2012)).

Asimismo, la afinidad de unión al Factor de von Willebrand (VWF) fue comparable entre rFVIII^hFc y rFVIII, con una K_d de aproximadamente 1,4 y 0,8 nM para rFVIII^hFc y rFVIII, respectivamente (Peters y col., *J. Thromb Haemost.* DOI: 10.1111/jth.12076 (2012)).

La actividad de rFVIII^hFc no se vio afectada por la fusión del extremo C de FVIII con el extremo N de Fc puesto que los dominios C1 y C2 de FVIII estaban implicados en la unión de fosfolípidos que es esencial para la formación del complejo de protrombinasa en superficies de plaquetas activadas (Foster, P.A., y col., *Blood.* 75(10):1999-2004 (1990)). No obstante, este descubrimiento coincidía con la observación de que los residuos que se creía unían fosfolípidos, p. ej., K2092/F2093 en C1, M2199/F2200 y L2251/L2252 en C2, parecen formar una superficie distante de los residuos del extremo C de FVIII (Shen, B.W., y col., *Blood.* (2007); Ngo, J.C., y col., *Structure.* 16(4):597-606 (2008)).

45

La semivida de rFVIII^hFc se duplicó únicamente en ratones que expresaban o bien FcRn endógeno murino o humano transgénico, pero no en ratones FcRn KO (véanse Fig. 15 y Tabla 12), demostrando que el mecanismo de prolongar

la semivida de rFVIIIc está mediado por FcRn. Si bien se sabe que tanto las células endoteliales como hematopoyéticas contribuyen por igual en el reciclaje de la IgG internalizada en la superficie celular para facilitar la longevidad de la IgG y la protección contra la degradación, (Borvak, J., y col., *Int Immunol.* 10(9):1289-1298 (1998)), (Akilesh, S., y col., *J Immunol.* 179(7):4580-4588 (2007)) no se sabe específicamente qué tipo o tipos celulares que expresan FcRn son responsables de la captación y reciclaje de rFVIIIc. FcRn está ampliamente expresado en el endotelio vascular, epitelio del riñón, hígado, bazo, así como en CPA derivadas de médula ósea incluyendo macrófagos (Borvak, J., y col., *Int Immunol.* 10(9):1289-1298 (1998)), (Akilesh, S., y col., *J Immunol.* 179(7):4580-4588 (2007)), (Yoshida, M., y col., *Immunity.* 20(6):769-783 (2004)). Puesto que el FVIII circula mayormente (~98 %) en complejo con VWF (Lenting, P.J., y col., *J Thromb Haemost.* 5(7):1353-1360 (2007)), y ambas proteínas se colocaron con los macrófagos en el hígado y bazo cuando el FVIII recombinante y VWF se coinyectaron en ratones con deficiencia de VWF (van Schooten, C.J., y col., *Blood.* 112(5):1704-1712 (2008)), los macrófagos pueden cumplir una función en el rescate de rFVIIIc de la degradación y prolongación de la semivida. No obstante, los resultados también pueden ser indicativos de una vía previamente no reconocida para el catabolismo de FVIII, y rescate de la proteína permitidos por la fusión a Fc.

Los enfoques en los desarrollos para extender la semivida de los factores de coagulación incluyen pegilación (Rostin, J., y col., *Bioconjug Chem.* 11(3):387-396 (2000)), (Mei, B., y col., *Blood.* 116(2):270-279 (2010)), glucopegilación (Moss, J., y col., *J Thromb Haemost.* 9(7):1368-1374 (2011)), (Negrier, C., y col., *Blood.* (2011)), y conjugación con albúmina (Metzner, H.J., y col., *Thromb Haemost.* 102(4):634-644 (2009)), (Weimer, T., y col., *Thromb Haemost.* 99(4):659-667 (2008)). Independientemente de la modificación genética de la proteína utilizada, la semivida de las variantes de rFVIII modificadas parece ser como máximo dos veces más extensa que la del FVIII de tipo salvaje en una variedad de modelos animales pre-clínicos (Liu, T., y col., *Blood.* 112:511 (2008)), (Karpf, D.M., y col., 16(Supl. S4):40 (2010)). En los seres humanos se han demostrado resultados acordes, p. ej., se informó que rFVIIIc mejoraba la semivida aproximadamente 1,7 veces en comparación con ADVATE® en pacientes con hemofilia A (Powell, J.S., y col., *Blood.* (2012) publicado previamente online. DOI:10.1182/blood-2011-09-382846). Esta limitación de extender la semivida del FVIII parece estar relacionada con el VWF. En ratones con desactivación génica carentes de FVIII y VWF, en los experimentos preliminares se observó un aumento de 5 veces la semivida de rFVIIIc en comparación con rFVIII (Liu, T y col., resultados no publicados). Se informó previamente sobre hallazgos similares en ratones con desactivación génica carentes de VWF utilizando FVIII-Pegilado (Mei, B., y col., *Blood.* 116(2):270-279 (2010)). En conjunto, estos resultados indican que VWF puede ser un factor limitante para extender adicionalmente la semivida del FVIII.

Más allá de extender la semivida, rFVIIIc proporciona beneficios adicionales. Un reto importante con la terapia de reemplazo de FVIII es el desarrollo de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes (inhibidores). Esto sucede en 15 - 30 % de los pacientes no tratados previamente. rFVIIIc tiene el potencial de inducir tolerancia inmunitaria y, por ende, prevenir el desarrollo de anticuerpos neutralizantes. Se ha informado que las células B transducidas con vectores retrovirales, que presentan dominios de FVIII como proteínas de fusión a Ig, específicamente previenen o disminuyen los anticuerpos de FVIII existentes en ratones con HemaA (Lei, T.C. y Scott, D.W., *Blood.* 105(12):4865-4870 (2005)). También se ha descubierto que Fc contiene epítopos de linfocitos T reguladores capaces de inducir expansión de Treg y supresión de respuestas inmunitarias específicas de antígeno *in vitro* (De Groot, y col., *Blood.* 112(8):3303-3311 (2008)). Asimismo, la transferencia mediada por FcRn de IgG materna y proteínas de fusión a Fc a través de la placenta a la circulación fetal (Simister, N.E., *Vaccine.* 21(24):3365-3369 (2003)), Grubb, J.H., y col., *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 105(24):8375-8380 (2008)) podría inducir tolerancia neonatal a rFVIIIc proporcionando a la vez la protección necesaria en el recién nacido contra el sangrado durante el parto.

En conclusión, se ha demostrado que rFVIIIc proporciona una duración de la eficacia aproximadamente 2 veces más extensa respecto de rFVIII al proteger a ratones con HemaA de la lesión de transección de vena caudal y mejorar el TCSE en perros con HemaA. La eficacia prolongada se correlaciona bien con una $t_{1/2}$ de rFVIIIc extendida 2 veces, lo cual resulta de reciclar la proteína de fusión a Fc mediante una vía intracelular específica y bien establecida.

Ejemplo 11

Inmunogenicidad de rFVIIIc en ratones

130 ratones macho con hemofilia A, con 7 - 9 semanas de edad al inicio del estudio, se aleatorizaron en 13 grupos de tratamiento de acuerdo con edad y peso corporal (n = 10/grupo). Los ratones fueron tratados con dosificación intravenosa repetida de o bien rFVIIIc, rFVIII-mFc, XYNTHA® o ADVATE® con 50, 100 y 250 UI/kg, se usó una mezcla de los tres tampones de formulación para FVIIIc, XYNTHA® y ADVATE® para el grupo de control con vehículo. Los tiempos de administración IV fueron el día 0, día 7, día 14, día 21, día 35 después de la primera

inyección IV y se recogieron muestras de sangre por vía retroorbital el día (-1), día 14, día 21, día 28 y día 42 después del primer tratamiento (Fig. 20).

Inmediatamente después de la extracción de sangre, las muestras de plasma se aislaron a través de centrifugación y se desactivaron mediante tratamiento con calor de 30 minutos a 56 °C para garantizar la medición precisa de anticuerpos anti-FVIII. El desarrollo de anticuerpo anti-FVIII total (Fig. 21A, 21B y 21C), anticuerpo neutralizante anti-FVIII (Fig. 23) y anticuerpo anti-Fc total (Fig. 24) se investigó utilizando las muestras de plasma.

Cuando se trataron con 50 UI/kg de FVIII, 28 días después de la primera inyección, solo 1 de 10 ratones en el grupo de tratamiento con rFVIII-Fc, 2 de 10 ratones en el grupo de tratamiento con rFVIII-mFc desarrollaron anticuerpo anti-FVIII detectable en comparación con 5 de 10 ratones y 7 de 10 ratones para los ratones tratados con XYNTHA® y ADVATE® (Fig. 22C). Con 100 UI/kg, las cantidades de ratones que tenían anticuerpo anti-FVIII detectable el día 28 fueron 2, 5, 8 y 9 en el grupo de tratamiento con rFVIII-Fc, rFVIII-mFc, XYNTHA® y ADVATE® respectivamente (Fig. 22C). Con 250 UI/kg, una dosis suprafisiológica, las cantidades de ratones que tenían anticuerpo anti-FVIII detectable el día 28 fueron 10, 10, 7 y 7 en el grupo de tratamiento con rFVIII-Fc, rFVIII-mFc, XYNTHA® y ADVATE® respectivamente (Fig. 22C). Los datos correspondientes al día 14, día 21 y día 42 se muestran en las Fig. 22A, 22B y 22D, respectivamente.

En general, se observó una buena correlación entre los anticuerpos totales y neutralizantes contra FVIII ($R^2=0,7452$), y las titulaciones de los dos aumentaron con el tiempo (Fig. 23). Dentro del intervalo de dosis terapéutica (50 y 100 UI/kg), la cantidad de ratones que desarrollaron anticuerpos específicos de FVIII así como las titulaciones de anticuerpo en grupos de tratamiento con rFVIII-Fc fueron significativamente inferiores en comparación con ADVATE® ($p<0,05$), y marginalmente inferiores respecto de XYNTHA® ($p=0,05$). Los resultados indican una inmunogenicidad potencialmente baja de rFVIII-Fc.

Ejemplo 12

Respuesta de linfocitos esplénicos a rFVIII-Fc en comparación con

30 rFVIII disponible en el mercado

La respuesta de linfocitos esplénicos al Factor VIII recombinante (rFVIII) cuando se une o bien a un Fc humano (hFc, IgG1) o a un Fc de ratón (mFc, IgG2a) se determinó y se comparó con la respuesta de linfocitos esplénicos a rFVIII disponible en el mercado [FVIII de longitud completa (ADVATE®) y FVIII con dominio B eliminado (XYNTHA®/REFACTO AF®)].

A los ratones con HemA se les inyectó una vez a la semana durante seis semanas o bien 50 o 250 UI/kg de las moléculas analizadas. El día 56, cuatro ratones de cada grupo se sacrificaron y se aislaron los esplenocitos (Fig. 25). La mitad de los esplenocitos se utilizó para determinar el perfil de inmunogenicidad esplénica por tinción para citocinas intracelulares, marcadores de linfocitos T reguladores y células dendríticas utilizando citometría de flujo (FACS) (Fig. 26). La otra mitad de las células se utilizó para aislar ARN y llevar a cabo la obtención de perfil de vía utilizando ensayos basados en PCR en tiempo real. La Fig. 27A muestra un perfil de gráfico de puntos de FACS del control de isotipos. La Fig. 27B muestra un perfil de gráfico de puntos de FACS de una muestra que contiene esplenocitos CD4 y TNF- α positivo. Los porcentajes de células doble positivo se determinaron a partir de gráficos de puntos de todos los tratamientos y vehículo. El porcentaje de células doble positivo en ratones tratados con FVIII se obtuvo comparando con el grupo tratado con vehículo.

La tinción intracelular de citocinas se llevó a cabo mediante la cotinción para el marcador de linfocitos T auxiliares CD4 y citocinas como IL-2 (Fig. 28), IL-4 (Fig. 30), y TNF- α (Fig. 29). IL-2 es un mitógeno de linfocitos T implicado en la proliferación de linfocitos T, que secretan los linfocitos T activados en respuesta a FVIII en ratones con HemA. IL-4 se ha identificado como una citocina secretada por linfocitos T activados en respuesta a FVIII en ratones con HemA. TNF- α es una citocina proinflamatoria responsable de una mayor producción de anticuerpos en pacientes con hemofilia. Las intensidades de fluorescencia de cada una de las tinciones se midieron utilizando citometría de flujo.

De manera similar, la proporción de células dendríticas tolerogénicas e inmunogénicas fue determinada por tinción superficial y análisis de citometría de flujo de marcadores tales como PD-L1 (CD274) (Fig. 32) y CD80 (Fig. 33). PD-L1 es un ligando inhibidor que se acopla al receptor PD-1 en linfocitos T activados bloqueando de este modo la producción mediada por receptores de linfocitos T (RLT) de IL-2 y la proliferación. Una mayor expresión de CD de PD-L1 es un factor crítico que puede inhibir la inmunogenicidad y promover la tolerancia. CD80 es un marcador superficial observado por lo general en células dendríticas tras la fagocitación del antígeno y durante la maduración

para presentar antígeno a los linfocitos T. CD80 pertenece a un panel de correceptores al activar linfocitos T para proliferación. Una mayor tinción superficial de CD80 indica indirectamente una mejor maduración y presentación de antígeno por parte de las células dendríticas.

- 5 Asimismo, el porcentaje de células reguladoras (Treg) en el bazo se evaluó mediante cotinción para CD4 y Foxp3 (Fig. 34), un marcador para estas células. Foxp3 es un marcador intracelular de linfocitos T reguladores. Los linfocitos T Foxp3⁺ están implicados en el establecimiento, mantenimiento y transferencia adoptiva de tolerancia periférica mediada por linfocitos T.
- 10 También se evaluó la presencia de células que expresan tanto CD4 como Tim3 (Fig. 35) o marcadores CD279 (PD-1) (Fig. 36). Tim3 (proteína 3 que contiene el dominio de la mucina y el dominio de la inmunoglobulina de los linfocitos T) como regulador negativo de respuestas a linfocitos T auxiliares 1 (Th1). Tim3 también es expresada por células inmunes innatas y puede promover una respuesta proinflamatoria. Tim3 inhibe las respuestas mediadas por Th1, autoinmunes y aloinmunes y actúa por medio de su ligando, galectina-9, para inducir muerte celular en células Th1 pero no en Th2. CD279 (PD-1) es miembro de la familia CD28/CTLA-4 extendida de reguladores de linfocitos T.
- 15 PD-1 se expresa en la superficie de linfocitos T activados, células B y macrófagos, sugiriendo que, en comparación con CTLA-4, PD-1 regula las respuestas inmunes de manera negativa y más amplia.

- Entre las citocinas analizadas que son responsables de la inmunogenicidad y de la formación de inhibidores, en ratones a los que se les inyectó 50 UI/kg de rFVIII-hFc o rFVIII-mFc, se produjo una inhibición significativa en los niveles de IL-4 y TNF- α y los niveles de IL-2 no variaron en comparación con el grupo al que se le inyectó vehículo. Por el contrario, los niveles de estas citocinas fueron superiores en grupos que recibían 250 UI/kg de estas moléculas. Los ratones a los que se les inyectó 50 UI/kg de XYNTHA[®] o ADVATE[®] no mostraron ninguna inhibición, mientras que el grupo de 250 UI/kg mostró un aumento en contenido intracelular de IL-2, IL-4, y TNF- α . Asimismo,
- 20 hubo un mayor porcentaje de linfocitos T Foxp3 positivo en ratones a los cuales se les inyectó 50 UI/kg de rFVIII-mFc en comparación con otros tratamientos. Los ratones que recibieron 50 UI/kg de rFVIII-hFc y rFVIII-mFc mostraron un mayor porcentaje de células dendríticas esplénicas PD-L1 positivo (CD274), una señal inhibidora para activación y proliferación de linfocitos T. Estos grupos también registraron un mayor porcentaje de células dendríticas inmaduras como se ilustra con una disminución en la tinción de CD80.
- 30 Estos resultados indicaron que rFVIIIhFc con dosis de 50 UI/kg en ratones con hemaA mostró menor inmunogenicidad que el rFVIII disponible en el mercado [FVIII de longitud completa (ADVATE[®]) y FVIII con dominio B eliminado (XYNTHA[®]/REFACTO AF[®])]. Por consiguiente, rFVIIIhFc puede promover una menor producción de anticuerpos e inducir tolerancia inmunitaria.

35

Ejemplo 13

Biodistribución y depuración de rFVIIIhFc en ratones

- 40 La fusión recombinante de una única molécula de FVIII a la región constante de Fc de IgG1 (rFVIIIhFc) ha demostrado reducir la depuración en comparación con rFVIII de una manera dependiente del FcRn (Powell y col., 2012 Blood), utilizando una vía natural que recircula anticuerpos en el flujo sanguíneo. Asimismo, como se describe más arriba, un ensayo clínico de fase 1/2a en sujetos con hemofilia A demostró que rFVIIIhFc tiene una semivida 1,5 a 1,7 veces más larga que el FVIII recombinante de longitud completa (ADVATE[®]). Por consiguiente, se llevó a cabo
- 45 un estudio (i) para identificar los tipos celulares y órganos que contribuyen a la protección de rFVIIIhFc y (ii) para evaluar las contribuciones relativas del FVIII y dominios de Fc a la biodistribución y depuración de rFVIIIhFc en ratones.

- La depuración de rFVIIIhFc a rFVIII se comparó en modelos de ratón KO genéticamente modificados deficientes de o bien FVIII (HemaA) o bien de Factor von Willebrand (VWF). En estos modelos de ratón se utilizaron liposomas con clodronato por vía intravenosa para agotar las células de Kupffer y monocitos/macrófagos. La eficacia del agotamiento se cuantificó con inmunohistoquímica y análisis FACS. El análisis farmacocinético se llevó a cabo con un ensayo Coatest específico de FVIII después de una inyección intravenosa de rFVIIIhFc o rFVIII.
- 50

- 55 El agotamiento de células de Kupffer en ratones con HemaA aumentó la depuración de rFVIIIhFc. Asimismo, en ausencia de VWF (ratones con desactivación génica carentes de VWF/HemaA), el agotamiento de células de Kupffer y macrófagos aumentó la depuración de rFVIIIhFc a niveles similares a los de rFVIII, indicando que estas células son responsables de gran parte de la diferencia en depuración entre rFVIII y rFVIIIhFc en este modelo.

- 60 Estos estudios sugieren que las células de Kupffer pueden contribuir al reciclaje mediado por FcRn de rFVIIIhFc. Los

estudios que emplean trasplantes de médula ósea en ratones KO carentes de FcRn están intentando verificar este mecanismo. Estos estudios, combinados con experimentos de captación celular *in vitro* intentarán distinguir la contribución de las células de Kupffer de otros tipos celulares que expresan FcRn, incluyendo células endoteliales.

5 Ejemplo 14

Respuesta inmunitaria mediada por células a rFVIII-Fc en ratones con hemofilia A

El objetivo del presente estudio fue identificar las respuestas inmunitarias mediadas por células a FVIII recombinante, que interesa para diseñar un mejor manejo de la hemofilia A. Por lo tanto, se investigó la respuesta de linfocitos esplénicos a FVIII recombinante (rFVIII) cuando está unido al Fc humano (rFVIII-Fc; IgG1) en comparación con rFVIII de longitud completa disponible en el mercado (ADVATE®) y rFVIII con dominio B eliminado (XYNTHA®/REFACTO AF®). A los ratones con HemA se les inyectaron dosis de 50, 100 o 250 UI/kg 4 veces en semana seguidas de 2 dosis semana de por medio. Al final de las 8 semanas, los ratones de cada grupo fueron sacrificados y su perfil de inmunogenicidad de leucocitos esplénicos se determinó analizando citocinas intracelulares, marcadores de linfocitos T reguladores y células dendríticas utilizando citometría de flujo y obtención de perfil de ARN. En los ratones a los cuales se les inyectó 50 UI/kg de rFVIII-Fc, hubo una inhibición significativa en los niveles de IL-2, IL-4 y TNF- α (citocinas que promueven la inmunogenicidad). Los niveles de estas citocinas fueron superiores en grupos que recibían 250 UI/kg de esta molécula. Los ratones a los que se les inyectó 50 UI/kg de XYNTHA® o ADVATE® no mostraron ninguna inhibición, mientras que el grupo de 250 UI/kg mostró un aumento en contenido intracelular de IL-2, IL-4, y TNF- α . Asimismo, hubo un mayor porcentaje de linfocitos T Foxp3 positivo en ratones a los cuales se les inyectó 50 y 100 UI/kg de rFVIII-Fc en comparación con otros tratamientos. Los ratones que recibieron 50 y 100 UI/kg de rFVIII-Fc mostraron un mayor porcentaje de células dendríticas esplénicas PD-L1 positivo (CD279), una señal inhibidora para activación y proliferación de linfocitos T. Estos grupos también registraron un mayor porcentaje de células dendríticas inmaduras como se ilustra con una disminución en la tinción de CD80. Por lo tanto, tanto la dosis de 50 UI/kg como la de 100 UI/kg de rFVIII-Fc mostraron una inmunogenicidad y producción de anticuerpos inferiores en este modelo.

Introducción

El desarrollo de inhibidores de FVIII se reconoce como una complicación grave en el manejo de la hemofilia A. Se estima que la incidencia de formación de inhibidores oscila entre 20 % a 30 % en todos los casos de hemofilia A a 30 % - 40 % en casos de enfermedad grave. (Green, Haemophilia 17:831-838 (2011); Eckhardt y col. J. Thromb. Haemost. 9:1948-58 (2011)). La enfermedad con inhibidores positivos actualmente se maneja mediante inducción de tolerancia inmunitaria, que conlleva la administración frecuente de altas dosis de FVIII. Los mecanismos de formación de inhibidores en pacientes son prácticamente desconocidos y dependen de múltiples factores de riesgo y células y moléculas del sistema inmunitario.

El desarrollo de inhibidores en hemofilia conlleva una compleja interacción de múltiples tipos celulares, moléculas superficiales y proteínas secretadas del sistema inmunitario incluyendo linfocitos T, linfocitos B, células presentadoras de antígenos (CPA; células dendríticas y macrófagos), citocinas y componentes reguladores de estos tipos celulares. La producción de anticuerpos por parte de las células B depende de la ayuda óptima de los linfocitos T, que se activan por la presentación de antígenos de las CPA.

La tolerancia a péptidos y proteínas terapéuticos inyectados que incluyen FVIII recombinante está mediada por una clase de linfocitos T denominados linfocitos T reguladores (Treg) (Cao y col., J. Thromb. Haemost. 7(S1):88-91 (2009)). Se han identificado distintas moléculas clave que se correlacionan con la formación de inhibidores en pacientes con hemofilia. Estas incluyen la citocina proinflamatoria TNF- α , la citocina antiinflamatoria interleucina (IL)-10, y el marcador de Treg CTLA4, por mencionar solo algunas (Astermark y col., J. Thromb. Haemost. 5:263-5 (2007); Pavlova y col. J. Thromb. Haemost. 7:2006-15 (2009)).

En este estudio, se investigó la respuesta de linfocitos esplénicos a la proteína de fusión recombinante de Factor VIII-Fc (rFVIII-Fc) en comparación con rFVIII de longitud completa disponible en el mercado (fl-rFVIII; ADVATE®) y rFVIII con dominio B eliminado (BDD-rFVIII; XYNTHA®/REFACTO AF®).

Materiales y procedimientos

Materiales: los ratones con deficiencia de Factor FVIII (Bi y col. *Nat Genet.* 10:119-21 (1995)) se adquirieron originalmente a través del Dr. Kazazian (University of Pennsylvania, Filadelfia, PA) y se mantuvieron como colonias de cría o bien en Biogen Idec Hemophilia o en el laboratorio Charles River Laboratory.

Los anticuerpos utilizados para tinción y análisis FACS se obtuvieron o bien en BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) o en eBioscience (San Diego, CA, EE. UU.). Los anticuerpos utilizados se dirigieron contra marcadores superficiales murinos tales como CD4 (linfocitos T auxiliares), CD11c y CD80 (células dendríticas), PD-1, PD-L1, CD25 (células Treg), citocinas intracelulares (IL-2, IL-4, TNF- α), y factores de transcripción (Foxp3).

Diseño del estudio de inmunogenicidad: tres grupos de tratamiento recibieron dosis intravenosas de 50, 100 o 250 UI/kg, que fueron administradas en distintos días (Fig. 37). Cada tratamiento y nivel de dosis se administró a 10 ratones. Los animales se sacrificaron el día 56 por inhalación de CO₂ y se diseccionaron los bazo en PBS estéril.

Los esplenocitos se separaron utilizando el kit de disociación de bazo de ratón y un disociador gentleMACS (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania). Las suspensiones monocelulares de esplenocitos se fijaron o bien en formalina al 1 % para tinción FACS o se almacenaron en tampón de disociación para aislamiento de ARN (Roche).

Evaluaciones: los anticuerpos anti-FVIII se determinaron utilizando un ensayo ELISA desarrollado internamente. En resumen, se utilizó FVIII para revestir placas de 96 pocillos y se empleó para capturar anticuerpos de plasma de ratón recogido en distintos puntos de tiempo. Los anticuerpos específicos de FVIII se detectaron utilizando un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón. La obtención del perfil de respuesta de linfocitos T se llevó a cabo en esplenocitos de ratón aislados (Fig. 38). Los linfocitos y las células dendríticas en el bazo se tiñeron para determinar dianas superficiales e intracelulares.

Para la tinción superficial, se incubaron 1×10^6 esplenocitos totales con anticuerpos en concentraciones apropiadas. Para la tinción intracelular, las células se permeabilizaron con disolución BD Fix-Perm (BD Biosciences) y a continuación se llevó a cabo la incubación con anticuerpos contra citocinas en el mismo tampón. La tinción de Foxp3 se llevó a cabo utilizando anticuerpo en tampón de tinción de Foxp3 (BD Biosciences). La intensidad de la fluorescencia se registró utilizando BD FACS Canto II y un análisis realizado utilizando el software FLOWJO®.

Los linfocitos se cotiñeron con CD4 y marcadores intracelulares IL-2, TNF- α , e IL-4. Las células Treg se tiñeron para determinar marcadores superficiales CD4 y CD25 seguidos de Foxp3 intracelular. Los esplenocitos se tiñeron para determinar CD11c y PD-L1 (células dendríticas) o CD4 y PD-1 (linfocitos T CD4+) para identificar células implicadas en la vía PD-L1-PD-1. El ARN total fue aislado (Roche) y se transcribió de manera inversa a ADNc (Qiagen, Hilden, Alemania). Los cebadores para TGF- β , IL10, IL-12a, y EBI-3 se adquirieron en IDT technologies. La reacción en cadena de polimerasa (PCR) en tiempo real basada en SYBR Green se llevó a cabo con el sistema Quantitect (Qiagen) utilizando una máquina de PCR en tiempo real ABI 7900 Fast Block. Los datos se analizaron utilizando el software 7500 versión 2.0.5.

Resultados

Niveles de anticuerpo anti-FVIII total el día 42: los niveles de IgG anti-FVIII total el día 42 se analizaron a partir de plasma de ratones con hemofilia A a los cuales se les inyectó 50, 100 o 250 UI/kg de rFVIIIc, BDD-FVIII (XYNTHA®) o FVIII de longitud completa (fl-rFVIII) (ADVATE®) utilizando el ensayo ELISA. Con las dosis de 50 y 100 UI/kg el grupo de rFVIIIc mostró niveles de anticuerpo significativamente inferiores en comparación con BDD-rFVIII y fl-rFVIII de longitud completa, lo cual indicó una antigenicidad inferior a FVIII impartida por las inyecciones de rFVIIIc. Con la dosis de 250 UI/kg, los grupos no fueron significativamente distintos entre sí y mostraron niveles de anticuerpo elevados (Fig. 39).

Citocinas intracelulares (IL-2 y TNF- α) en células CD4+: los ratones que recibían 50 UI/kg en cada grupo de tratamiento fueron no respondedores de acuerdo con los niveles de anticuerpo contra FVIII, mientras que los ratones que recibían 250 UI/kg en cada grupo de tratamiento fueron respondedores con los niveles de anticuerpo más altos (los datos no se muestran). Con dosis de rFVIIIc de 50 y 100 UI/kg (Fig. 40A y Fig. 40B) se redujo el porcentaje de células CD4+ IL-2 y TNF- α positivo, lo cual indicó menor inmunogenicidad mientras que BDD rFVIII y rFVIII de longitud completa mostraron más células citocina positivo. Los tres tratamientos con la dosis de 250 UI/kg (Fig. 40C) elevaron el porcentaje de células citocina positivo, lo cual indicó una mayor inmunogenicidad con esta dosis. Se obtuvieron resultados similares para IL-4.

Células triple positivo CD4/CD25/Foxp3 (marcadores para células Treg): con la dosis de 100 UI/kg, el aumento de porcentaje de células Treg respecto del vehículo fue significativamente superior en el grupo de rFVIIIc ($P < 0,05$) en comparación con los grupos de BDD-rFVIII y fl-rFVIII (Fig. 41). Se obtuvieron resultados similares para la dosis de 50 UI/kg de rFVIIIc lo cual indicó que los tratamientos tanto con 50 como con 100 UI/kg de rFVIIIc pueden promover el predominio de las células Treg y suprimir las respuestas inmunitarias a FVIII.

Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real para citocinas relacionadas con tolerancia: el análisis PCR en tiempo real para citocinas relacionadas con tolerancia inmunitaria, a saber, TGF- β (Fig. 42A), IL-10 (Fig. 42B) y IL-35 (subunidades IL-12a y EBI-3, mostradas respectivamente en las Fig. 42C y 42D) se llevó a cabo utilizando 5 ARN aislado de ratones pertenecientes al grupo de tratamiento de 100 UI/kg. Los niveles de ARNm se regularon positivamente para las citocinas analizadas en el grupo de rFVIIIc (P<0,05) en comparación con los otros tratamientos con la dosis de 100 UI/kg, lo cual indicó la presencia de esplenocitos que expresaban activamente citocinas tolerogénicas promoviendo de este modo un microentorno inmunosupresor. Los marcadores de 10 inmunotolerancia de expresión de ARNm Foxp3 (Fig. 42E), CD25 (Fig. 42F), CTLA-4 (Fig. 42G), e indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO-1) (Fig. 42H) fueron superiores en esplenocitos totales del grupo de 100 UI/kg.

Análisis FACS de vía PD-L1-PD-1: el PD-L1 (CD274) en células dendríticas se acopla a PD-1 (CD279) en linfocitos T para promover vías inhibitoras que suprimen la activación y proliferación de linfocitos T, conduciendo de este modo a la supresión de las respuestas inmunitarias. Los esplenocitos del grupo de 100 UI/kg se tiñeron para 15 cualquier superficie CD11c y PD-L1 (Fig. 43A), o CD4 y PD-1 (Fig. 43B). Con la dosis de 100 UI/kg, el porcentaje de células dendríticas PD-L1 positivo y el porcentaje de linfocitos T PD-L1 positivo fueron superiores en los animales que recibían rFVIIIc (P<.05) en comparación con los que recibían BDD-FVIII y fl-rFVIII. Esto indicó la regulación positiva de vías inmunosupresoras tanto en células dendríticas como en linfocitos T por parte del rFVIIIc.

20 Debate

Los resultados experimentales mostrados más arriba indicaron que rFVIIIc con dosis de 50 y 100 UI/kg mostró baja inmunogenicidad y promovió tolerancia a FVIII como lo demuestran:

- 25 (a) un nivel inferior de citocinas proinmunogénicas (IL-2 y TNF- α) en linfocitos T CD4+ en comparación con otras moléculas de FVIII;
 - (b) una regulación positiva de linfocitos T reguladores y marcadores (Foxp3, CD25, PD-1, CTLA4) que son responsables de la tolerancia inmunitaria en ratones inyectados con rFVIIIc. La importancia de Treg Foxp3+ y la función de CTLA4 al promover la tolerancia a FVIII en hemofilia se describieron anteriormente (Cao y col., J. Thromb. Haemost. 7(S1):88-91 (2009); Astermark y col. J. Thromb. Haemost. 5:263-5 (2007)).
 - 30 (c) un nivel superior de citocinas tolerogénicas (IL-10, TGF- β , IL-35) en esplenocitos de ratones inyectados con rFVIII. Estos marcadores han mostrado ser citocinas inmunoregulatoras clave y determinantes esenciales de la tolerancia inmunitaria en distintos estudios (Bi y col., Nat. Genet. 10:119-21 (1995)).
 - (d) una elevación de la población de células dendríticas tolerogénicas (PD-L1, IDO-1, y CD80 disminuido) en ratones 35 después de la inyección con rFVIIIc.
- De manera simultánea, los ratones tratados con rFVIIIc también mostraron menos anticuerpos o ningún anticuerpo contra FVIII con dosis de 50 y 100 UI/kg (Liu y col., WFH Abstract #FB-WE-04.2-5 (2012)) y resistieron el ataque con 250 UI/kg una vez que se les indujo tolerancia con la dosis de 50 UI/kg de rFVIIIc.
- 40 **Conclusiones:** los ratones tratados con rFVIIIc mostraron menos anticuerpos o ningún anticuerpo contra FVIII con dosis de 50 y 100 UI/kg en comparación con terapias con FVIII tradicionales. De acuerdo con los estudios de linfocitos T y células dendríticas en ratones, se descubrió que rFVIIIc es menos inmunogénico que las terapias con FVIII tradicionales y que promueve las vías tolerogénicas. rFVIIIc reguló positivamente citocinas inmunoregulatoras clave en esplenocitos de ratones con hemofilia A que son indicativos de inmunotolerancia. En conjunto, estos 45 hallazgos indican la existencia de un microentorno tolerogénico en el bazo de ratones a los cuales se les han inyectado dosis bajas de rFVIIIc (50 y 100 UI/kg).

Estos estudios han demostrado por primera vez que rFVIIIc activa la señalización de células dendríticas, lo cual es un determinante crucial de la inmunotolerancia. Estos hallazgos indican la existencia de tolerancia inmunitaria 50 funcional a FVIII impartida por rFVIIIc en ratones con hemofilia A.

Ejemplo 15

Evaluación de respuestas de anticuerpo a rFVIIIc en comparación con XYNTHA® y

55 ADVATE® en ratones con hemofilia A

El desarrollo de anticuerpos inhibidores a FVIII de reemplazo se produce en 20 - 30 % de los pacientes sin tratamiento previo, siendo la complicación más grave en el tratamiento para la hemofilia. La inducción de la 60 tolerancia inmunitaria (ITI), que conlleva la administración frecuente de FVIII, se utiliza actualmente para tratar

pacientes que desarrollan inhibidores. No obstante, un subconjunto de estos pacientes no responde a ITI. Véase, p. ej., Green, *Haemophilia* 17:831-838 (2011); Eckhardt y col. *J. Thromb. Haemost.* 9:1948-58 (2011); Cao y col., *J. Thromb. Haemost.* 7(S1):88-91 (2009). El FVIII^h recombinante tiene una semivida aproximadamente 1,6 veces más extensa que la semivida de rFVIII y actualmente está en fase 2/3 de desarrollo clínico. Los experimentos descritos en el presente documento evalúan la inmunogenicidad y las propiedades de tolerancia inmunitaria de rFVIII^h en comparación con otras proteínas de reemplazo de rFVIII en ratones con hemofilia A (HemA).

(a) Comparación de inmunogenicidad para rFVIII^h, XYNTHA[®] y ADVATE[®] en ratones con HemA: respuesta de anticuerpo: cuatro grupos de ratones con HemA, con 9 - 12 ratones con HemA cada grupo, fueron tratados con dosis de 50 UI/kg, 100 UI/kg y 250 UI/kg de rFVIII^h, XYNTHA[®], ADVATE[®], y control con vehículo. Las dosis se administraron el día 0, día 7, día 14, día 21, y día 35. Se extrajo sangre el día 0, día 14, día 21, día 28, y día 42 (Fig. 44).

rFVIII^h indujo una respuesta de anticuerpo significativamente inferior con 50 UI/kg (Fig. 45) y con 100 UI/kg (Fig. 46) en comparación con XYNTHA[®] y ADVATE[®]. No obstante, todas las proteínas de FVIII mostraron una respuesta de anticuerpo similar con 250 UI/kg (Fig. 47). Las titulaciones de anticuerpo neutralizante se correlacionaron con los niveles de anticuerpo de unión total (Fig. 48).

(b) Comparación de inmunogenicidad para rFVIII^h, XYNTHA[®] y ADVATE[®] en ratones con HemA: obtención de perfil de respuesta de linfocitos T: para la obtención de perfil de respuesta de linfocitos T en esplenocitos, se administró una dosis adicional de rFVIII^h, XYNTHA[®], ADVATE[®], y control con vehículo el día 53. Los bazo se extrajeron el día 56 (Fig. 49). Los resultados indicaron que rFVIII^h promueve el predominio de células Treg CD4/CD25/Foxp3 positivo (Fig. 50, panel derecho).

Resumen: la administración de rFVIII^h dio como resultado una respuesta de anticuerpo significativamente inferior con XYNTHA[®] y ADVATE[®] con dosis de 50 y 100 UI/kg. El perfil tolerogénico después de dosis de 50 y 100 UI/kg de rFVIII^h indicó que rFVIII^h puede promover el predominio de células Treg y suprimir la respuesta inmunitaria a FVIII.

(c) Estudio de tolerización inmunitaria de rFVIII: para analizar si la administración repetida de rFVIII^h puede inducir tolerancia funcional *in vivo* se adoptó el siguiente régimen de dosificación. Los ratones con HemA (8 - 10 semanas de edad) recibieron inyecciones de 50 UI/kg de rFVIII^h o vehículo semanalmente durante 4 semanas (los días 0, 7, 14, 21) seguidas de una inyección el día 35. A partir del día 49 estos ratones fueron atacados con una dosis semanal de 250 UI/kg de rFVIII^h para determinar si los animales podían tolerar dosis elevadas de rFVIII^h. Las dosis de ataque se administraron los días 0, 7, 14 y 21 a partir del día 49 del estudio (véase la Fig. 51). Las muestras de sangre se recogieron en puntos de tiempo especificados para verificar la presencia de anticuerpos anti-FVIII utilizando el ensayo ELISA. Como se muestra en la Fig. 52, la dosificación repetida de rFVIII^h produjo una reducción significativa desde el punto de vista estadístico de los anticuerpos a rFVIII^h cuando se realizó el ataque con dosis elevadas de 250 UI/kg, mientras que los animales que recibían vehículo mostraron niveles más elevados de anticuerpos tras el ataque. Esto claramente indica que la administración repetida de rFVIII^h con dosis de 50 UI/kg de acuerdo con el esquema de dosificación seguido puede inducir tolerancia a dosis más elevadas de rFVIII^h (250 UI/kg).

Conclusión: con las dosis terapéuticas, se descubrió que rFVIII^h es (1) menos inmunogénico en comparación con XYNTHA[®] y ADVATE[®], y (2) capaz de inducir tolerancia inmunitaria a FVIII en ratones con HemA.

En la actualidad, se está determinando si dosis aun inferiores de rFVIII^h pueden producir tolerización inmunitaria a dosis más elevadas de rFVIII^h. En el presente estudio, se utilizan dosis inferiores de rFVIII^h, a saber 25 UI/kg y 10 UI/kg, durante la fase de inducción de la tolerancia. Estas serán seguidas de ataques con 250 UI/kg de rFVIII^h y medición de anticuerpos contra FVIII de acuerdo con se llevó a cabo para el estudio previo.

Ejemplo 16

Vías de depuración de rFVIII^h en ratones con hemofilia A

La proteína de fusión a Fc de FVIII de coagulación recombinante de larga duración (rFVIII^h) está actualmente en fase 3 de estudio clínico para tratamiento episódico y profiláctico de individuos con hemofilia A. En comparación con FVIII recombinante de longitud completa (ADVATE[®], Baxter Healthcare Corporation), rFVIII^h tiene una semivida 1,7 veces más extendida y una depuración significativamente reducida en pacientes con hemofilia A. Véase, Powell y col., *Blood* 119:3031-7(2012). Este perfil farmacocinético (PK) mejorado está mediado por la interacción de Fc con el

receptor Fc neonatal (FcRn). Véase Dumont y *col.*, Blood 119:3024-30 (2012). rFVIII^h está compuesto por un único FVIII de coagulación humano con el dominio B eliminado unido directamente al dominio de Fc de la inmunoglobulina humana G1, que se recicla naturalmente tras captación celular (endocitosis o pinocitosis) a través de interacción con FcRn (Fig. 53). Las células monocíticas (macrófagos y células dendríticas), incluyendo macrófagos residentes en el hígado (células de Kupffer), están implicadas en la depuración del factor de von Willebrand (VWF) y del FVIII (Fig. 54). Véase van Schooten y *col.*, Blood 112(5):1704-12 (2008).

Para dilucidar los tipos celulares implicados en la captación, depuración y reciclaje mediado por FcRn de rFVIII^h, se estudió el impacto del agotamiento de macrófagos y células de Kupffer en la depuración de rFVIII^h en modelos de ratón genéticamente modificados.

Materiales y procedimientos

La depuración de rFVIII^h y FVIII (BDD) se comparó en tres modelos de ratón con desactivación génica (KO): (1) hemofilia A (FVIII KO), deficientes de FVIII; (2) KO doble (DKO) carentes de FVIII y VWF, sin expresión de FVIII ni de VWF; y (3) FcRn-KO, sin expresión del FcRn. En los tres modelos, los macrófagos y las células de Kupffer se agotaron con CLODROSOME® (Encapsula NanoSciences, Inc), que es un análogo de TFA tóxico (clodronato) encapsulado en liposomas que es específicamente fagocitado por macrófagos y desencadena apoptosis. Véase van Rooijen & Hendriks, Methods Mol. Biol. 605:189-203 (2010).

Los ratones de control de cada grupo fueron tratados con liposomas no tóxicos ENCAPOSOME® (Fig. 55). Se aplicó una única inyección intravenosa de o bien FVIII o rFVIII^h (125 o 250 UI/kg) 24 horas después del tratamiento con liposomas. Las muestras de sangre se recogieron por vía retroorbital o por la vena cava en puntos de tiempo determinados (4 muestras por punto de tiempo).

A continuación se midió la actividad de FVIII humano en muestras de plasma mediante un ensayo cromogénico de FVIII, y se estimaron los parámetros de PK con el software WINNONLIN® (Pharsight Corp.) utilizando un modelo de análisis no compartimental.

El agotamiento de células de Kupffer y macrófagos se evaluó mediante tinción inmunohistoquímica, y se cuantificó utilizando el software Visiopharm (Hoersholm, Dinamarca) o mediante reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR).

Resultados

(a) Agotamientos de macrófagos y células de Kupffer: la Fig. 56 muestra una tinción representativa de secciones de hígado con un anticuerpo contra Iba-1, un marcador específico de macrófagos, 24 horas después de administrar ENCAPOSOME® de control (A, A') o tratamiento con CLODROSOME® (B, B') a ratones con hemofilia A. Los paneles A' y B' muestran las máscaras para la cuantificación que destacan las células de Kupffer teñidas (azul celeste), la superficie total del tejido (azul marino) y las zonas vacías (gris). Se obtuvieron perfiles de agotamiento similares en otras cepas de ratón. El análisis cuantitativo de las zonas teñidas positivamente mostró que >90 % de las células de Kupffer de hígado fueron agotadas y permanecieron bajas durante >3 días después del tratamiento con CLODROSOME® (n = 4) en comparación con los animales tratados con ENCAPOSOME® de control (Fig. 57). Las células monocíticas circulantes también se redujeron en >50 % en 24 horas de tratamiento con CLODROSOME®, de acuerdo con se evaluó con el análisis citométrico de flujo de células sanguíneas teñidas con un anticuerpo marcado contra F4/80+ (n = 4). En 48 horas, las células sanguíneas agotadas se recuperaron (Fig. 57). Acorde con el agotamiento observado de macrófagos en el hígado, el análisis RT-PCR de la expresión del receptor 1 similar a mucina con módulo de factor de crecimiento epidérmico marcador de macrófagos (Emr1) (F4/80) mostró que el tratamiento con CLODROSOME® disminuyó la expresión de ARNm de Emr1 >95 % en el hígado y pulmón de ratones con hemofilia A (Fig. 58). Emr1 es la denominación utilizada para la proteína humana. El homólogo de ratón se conoce como F4/80. Emr1 es una proteína transmembranal presente en la superficie celular de macrófagos maduros.

(b) Depuración de FVIII en modelos de ratón: a diferencia de los resultados previamente informados que sugieren que las células de Kupffer tienen una función vital en la depuración de tanto FVIII como VWF (van Schooten CJ, y *col.* Blood. 112(5):1704-12 (2008)), el agotamiento de células de Kupffer no produjo la reducción esperada en depuración de FVIII en ratones con hemofilia A (Fig. 59). Por el contrario, el agotamiento de células de Kupffer en ratones con hemofilia A aumentó significativamente la depuración de rFVIII^h (Fig. 59). De manera similar, en ratones DKO, el agotamiento de células de Kupffer no aumentó la depuración de FVIII y aumentó significativamente la depuración de rFVIII^h (Fig. 60). En ratones FcRn-KO, el agotamiento de células de Kupffer no afectó la

depuración de FVIII o rFVIII[®]Fc (Fig. 61).

Conclusiones: el agotamiento de macrófagos y células de Kupffer en ratones con hemofilia A y DKO (con deficiencia de FVIII y VWF) aumentó la depuración de rFVIII[®]Fc, pero no disminuyó la depuración de FVIII, indicando que los macrófagos y células de Kupffer pueden explicar gran parte de la diferencia en depuración entre FVIII y rFVIII[®]Fc en estos ratones. En ausencia de tanto VWF como FVIII (ratones DKO), el agotamiento de macrófagos y células de Kupffer aumentó la depuración de rFVIII[®]Fc a niveles cercanos a los de FVIII.

La falta de efecto del agotamiento de las células de Kupffer en la depuración de FVIII en ya sea ratones con hemofilia A o DKO marcó un contraste respecto de los estudios publicados anteriormente. Véase van Rooijen & Hendriks, *Methods Mol. Biol.* 605:189-203 (2010). El agotamiento de macrófagos y células de Kupffer en ratones FcRn-KO no produjo diferencias significativas de depuración entre FVIII y rFVIII[®]Fc, lo cual indicó una función potencial del FcRn en el reciclaje mediado por macrófagos de rFVIII[®]Fc.

En conjunto, estos estudios indicaron que el rFVIII[®]Fc fue protegido de una manera dependiente de macrófagos y/o células de Kupffer y que una vía natural en estas células puede contribuir al reciclaje mediado por FcRn de rFVIII[®]Fc.

Ejemplo 17

20 Tolerización inmunitaria a anticuerpos preexistentes contra el Factor VIII

Es muy probable que los pacientes que reciben rFVIII[®]Fc fueran tratados anteriormente con una terapia de rFVIII diferente. Alrededor de 30 % de los pacientes con hemofilia A desarrollan anticuerpos contra FVIII, lo cual constituye un problema importante de la terapia de reemplazo de FVIII actual. Actualmente, el único enfoque aprobado para inducir tolerancia en pacientes que tienen inhibidores de FVIII es administrarles dosis elevadas de FVIII durante un periodo de tiempo indefinido, es decir, hasta que al paciente se le ha inducido la tolerancia. Por lo tanto, resulta interesante determinar si bajas dosis de rFVIII[®]Fc pueden revertir la inmunogenicidad de FVIII inhibiendo las vías de señalización de linfocitos T y células B y desviando hacia la tolerancia.

En este estudio, los ratones con HemA (8 - 10 semanas de edad) recibirán inyecciones semanales una vez durante 5 semanas de 50 UI/kg de o bien BDD-FVIII (XYNTHA[®]) o fl-FVIII (ADVATE[®]). Los niveles de anticuerpos anti-FVIII se determinarán en muestras de sangre extraídas de estos animales en días especificados como se indica en el esquema. Después de la inducción de anticuerpos inhibidores, los animales se cambiarán a inyecciones de 50 UI/kg de rFVIII[®]Fc una vez por semana durante 5 semanas. Esta será la fase de inducción de tolerancia. Los niveles de anticuerpos anti-FVIII se determinarán nuevamente a partir de muestras de sangre extraídas como se indica. Después de la fase de tolerización, a los animales se les aplicarán otras cuatro inyecciones de XYNTHA[®] o ADVATE[®] con una dosis de 50 UI/kg y las muestras de sangre extraídas se analizarán para determinar anticuerpos anti-FVIII. En el caso de tolerización exitosa, el segundo ataque con XYNTHA[®] o ADVATE[®] no debería producir ningún anticuerpo contra FVIII, lo cual puede indicar la capacidad de rFVIII[®]Fc para inducir inmunotolerancia a FVIII.

Ejemplo 18

Inmunoterapia adoptiva de linfocitos T y transferencia de tolerancia inmunitaria.

Los linfocitos T reguladores (Treg) tienen un papel vital en la inducción y mantenimiento de la tolerancia periférica a FVIII y otros productos terapéuticos peptídicos. Uno de los estudios clave utilizados para determinar la presencia de tolerancia inmunitaria funcional es transferir células Treg aisladas de animales con tolerización a receptores, a los cuales posteriormente se ataca con dosis más elevadas de FVIII. La presencia de transferencia funcional de tolerancia se hace evidente por la falta de o la menor producción de anticuerpos en los ratones receptores atacados.

En este estudio, a los ratones con HemA (8 - 10 semanas de edad) se les inducirá tolerancia con inyecciones de 50 UI/kg de rFVIII[®]Fc o vehículo semanalmente durante 4 semanas (los días 0, 7, 14, 21) seguidas de dos inyecciones los días 35 y 53. Se recogerán muestras de plasma para determinar niveles de anticuerpos anti-FVIII utilizando el ensayo ELISA. El día 56 los ratones sin anticuerpos serán sacrificados y sus bazo serán aislados. Los esplenocitos de estos ratones se recogerán y se convertirán en suspensiones monocelulares utilizando el kit de aislamiento de esplenocitos (Miltenyi Biotec). Las células Treg de los esplenocitos totales se aislarán utilizando el kit de aislamiento basado en perlas magnéticas de Treg murinas CD4 CD25 (Miltenyi Biotec). Las Treg aisladas se enumerarán utilizando un contador celular. Una alícuota de la suspensión celular se fijará utilizando formalina al 3 % para análisis fenotípicos mediante FACS para determinar la pureza del aislado. A continuación, las Treg se inyectarán en ratones receptores el día 0 a 1×10^6 células/ratón en 200 µL de solución salina por vía IV.

A partir del día 1 los animales se atacarán con 250 UI/kg de rFVIII^h y a continuación se aplicarán inyecciones repetidas semanalmente una única vez los días 8, 15, 22, y 29. Las muestras de sangre se recogerán los días 15, 22, 29 y 36 para análisis de anticuerpos anti-FVIII en plasma utilizando el ensayo ELISA. En el caso de que se produzca una transferencia exitosa de tolerancia, los ratones que recibieron Treg de animales a los cuales se les indujo tolerancia con rFVIII^h no desarrollarán anticuerpos contra FVIII mientras que los ratones a los que se les inyectaron Treg aisladas de ratones donantes inyectados con vehículo muestran presencia de anticuerpos anti-FVIII.

Ejemplo 19

10

Identificación de mecanismos de inducción de tolerancia inmunitaria por rFVIII^h: estudios con células dendríticas y macrófagos

Uno de los rasgos clave que distingue rFVIII^h de otros medicamentos de FVIII es la presencia del resto de Fc que es un constituyente de origen natural. Este podría ser un factor responsable que suprime la respuesta inmunitaria y dirige una reacción de tolerancia inmunitaria. Las moléculas de Fc presentes en IgG y en rFVIII^h son capaces de interactuar con los receptores clásicos de Fc de IgG y FcRn. Entre los receptores de Fc, el subtipo FcγRIIb (FcγR2b) es un receptor inhibidor y envía señales supresoras que frenan la activación de los tipos celulares que alojan ese receptor. Los receptores de Fc que incluyen FcRn están principalmente localizados en células presentadoras de antígenos (CPA - células dendríticas, macrófagos y células B), pero no en linfocitos T. Por lo tanto, es posible que rFVIII^h se acople a FcR2b y/o FcRn en estas células para desviarse hacia un fenotipo tolerogénico.

Para determinar si rFVIII^h se acopla a FcR2b y/o FcRn en células dendríticas y macrófagos para desarrollar un fenotipo tolerogénico, se llevarán a cabo los siguientes experimentos:

25

1. Identificación de marcadores en los niveles de ARNm y superficie celular (proteína) en líneas celulares de macrófagos murinos, macrófagos esplénicos y células dendríticas esplénicas que son reguladas por rFVIII^h en comparación con FVIII solo o un mutante de FVIII^h (N297A) que no interactúa con receptores de Fc.
2. Sobreexpresión y desactivación génica de FcγR2b o FcRn en la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7 e investigar los efectos de rFVIII^h en estos receptores estudiando dianas cadena abajo.
3. Identificación de la posible implicación de otras vías de importancia tales como señalización mediada por RTT en la respuesta de CPA a rFVIII^h.

Ejemplo 20

35

Rutas alternativas para inducción de tolerancia

La tolerancia inmunitaria a rFVIII^h también se puede conseguir por una ruta mucosal. Dos posibles sitios para inducir tolerancia son la mucosa gastrointestinal y la mucosa respiratoria. La tolerancia oral a rFVIII^h se puede inducir ya sea alimentando a los animales o utilizando gavaje oral para llevar la molécula a la mucosa intestinal. La mucosa intestinal tiene órganos secundarios especializados, a saber, las placas de Peyer que contienen células presentadoras de antígenos (CPA) que son importantes en las respuestas inmunitarias reguladoras. Estas CPA pueden procesar antígenos y activar subconjuntos específicos de células dendríticas y Treg que se pueden desplazar a otros sitios en el cuerpo y programar otras células del sistema inmunitario para suprimir una respuesta inmunitaria en presencia de antígeno, en este caso FVIII proporcionado de manera exógena. Este fenómeno podría estar mediado por interacciones de Fc con FcRn y/o FcγR2b presentes en las CPA del sistema inmunitario de la mucosa intestinal. Es posible inducir tolerancia a la mucosa respiratoria mediante inhalación de aerosoles de rFVIII^h que pueden funcionar de acuerdo con el mismo mecanismo que para el intestino.

Para determinar si la tolerancia inmunitaria se puede conseguir por una ruta mucosal, se administrará XYNTHA[®] o ADVATE[®] por vía oral o en aerosol a ratones con Hema. Después de la inducción de anticuerpos inhibidores, los animales se pasarán a rFVIII^h. Esta será la fase de inducción de tolerancia. Los niveles de anticuerpos anti-FVIII se determinarán a partir de muestras de sangre extraídas de acuerdo con se indica. Después de la fase de tolerización, a los animales se les inyectará nuevamente XYNTHA[®] o ADVATE[®] y las muestras de sangre extraídas se analizarán para determinar anticuerpos anti-FVIII. En el caso de que se produzca una tolerización exitosa, el segundo ataque con XYNTHA[®] o ADVATE[®] no debería producir ningún anticuerpo contra FVIII, lo cual puede indicar la capacidad de rFVIII^h para inducir inmunotolerancia a FVIII después de administración mucosal.

Ejemplo 21

60

Inmunotolerancia a otros factores de coagulación

Para determinar si la inmunotolerancia puede ser conferida por el Fc a cargas útiles de factor de coagulación que no sea FVIII, se generan polipéptidos quiméricos que comprenden el factor de coagulación FVIIa fusionado a Fc (rFVIIaFc), o el factor de coagulación FIX fusionado a Fc (rFIXFc). La clonación, expresión y purificación de rFVIIaFc y rFIXFc se llevan a cabo de acuerdo con los procedimientos conocidos en la técnica. La caracterización bioquímica, biofísica y farmacocinética de rFVIIaFc y rFIXFc se llevan a cabo como se describe en los ejemplos mencionados anteriormente y/o utilizando los procedimientos conocidos en la técnica. La evaluación de las respuestas de anticuerpo a rFVIIaFc y rFIXFc en comparación con los factores de coagulación comerciales y los estudios de inmunotolerancia se llevan a cabo de acuerdo con se describe en los ejemplos anteriores. Los polipéptidos quiméricos que comprenden una carga útil de factor de coagulación y un resto de Fc tal como rFIXFc o FVIIaFc pueden inducir de manera eficaz la inmunotolerancia al factor de coagulación no modificado (es decir, FIX o FVII sin una porción Fc).

15 Ejemplo 22

Transferencia transplacentaria de tolerancia inmunitaria a FVIII utilizando rFVIII-Fc

El objetivo de este estudio fue determinar si la administración de rFVIII-Fc a ratonas embarazadas podía transferir la molécula al feto mediante la placenta (debido a la interacción de la porción Fc con el receptor FcRn en células de placenta), y si la exposición del sistema inmunitario fetal a rFVIII-Fc en una etapa temprana podía producir tolerancia programando el timo para que reconozca el FVIII como un autoantígeno y no desarrolle una reacción inmune a él.

Las ratonas embarazadas se infundieron con o bien una dosis (6U) de rFVIII-Fc o bien XYNTHA[®] por vía intravenosa con inyección retroorbital el día 16 de gestación o dos dosis (6U cada una) con inyección en vena caudal los días 15 y 17 de gestación. La inmunogenicidad de XYNTHA[®] se evaluó en las crías nacidas de las madres inmunizadas, después de que las crías habían alcanzado madurez (6 - 9 semanas de edad). Se eligió el día 16 del embarazo porque coincidía con el desarrollo de la molécula reguladora autoinmune, AIRE, que cumple una función crucial en la eliminación de linfocitos T autorreactivos del timo. Los resultados mostraron que en el primer experimento, que analizó la dosificación de ratonas embarazadas con una infusión única de rFVIII-Fc o XYNTHA[®] el día 16 de gestación, las crías nacidas de las ratonas embarazadas tratadas con rFVIII-Fc tenían titulaciones por Bethesda significativamente inferiores desde el punto de vista estadístico a XYNTHA[®], en comparación con crías nacidas de ratonas embarazadas tratadas con XYNTHA[®] (Fig. 62). En el segundo experimento, que analizó la dosificación de ratonas embarazadas los días 15 y 17 de gestación, las crías nacidas de madres embarazadas tratadas con rFVIII-Fc tenían titulaciones por Bethesda significativamente inferiores desde el punto de vista estadístico a XYNTHA[®], en comparación con crías nacidas de madres de control y una tendencia a titulaciones inferiores en comparación con crías nacidas de madres tratadas con XYNTHA[®] (Fig. 63).

La transferencia transplacentaria de proteína (rFVIII-Fc) de la circulación materna a la circulación fetal se evaluará detectando actividad de FVIII en crías nacidas de ratonas inmunizadas. Las acciones a nivel de linfocitos T se evaluarán por obtención de perfil de linfocitos T y estudios de transferencia de Treg en crías a las que se les indujo tolerancia a rFVIII-Fc.

Ejemplo 23

45 rFVIII-Fc regula marcadores tolerogénicos en células presentadoras de antígenos

Materiales y procedimientos:

50 **Ratones:** ratones con hemofilia A (HemA) (C57BL/6) con desactivación génica del exón 16 de FVIII en un fondo 129 × B6 (Bi, L., Lawler, A.M., Antonarakis, S.E., High, K.A., Gearhart, J.D., y Kazazian, H.H., Jr. 1995. Targeted disruption of the mouse factor VIII gene produces a model of haemophilia A. Nat Genet 10:119-121) se obtuvieron a través del Dr. H. Kazazian (University of Pennsylvania, Filadelfia, PA, EE. UU.) y se mantuvieron como colonias de cría ya sea en Biogen Idec Hemophilia o el laboratorio Charles River Laboratory o los laboratorios Jackson Laboratories. Todos los procedimientos con animales utilizados fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales (IACUC, por su sigla en inglés) y se llevaron a cabo de acuerdo con la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio.

Anticuerpos y reactivos: los anticuerpos utilizados para tinción y citometría de flujo se obtuvieron o bien en BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) o en eBioscience (San Diego, CA, EE. UU.). Los anticuerpos utilizados se

dirigieron contra marcadores superficiales murinos tales como CD4 y PD-1 (linfocitos T auxiliares), CD11c, CD80 y PD-L1 (células dendríticas), y CD25 (células Treg), citocinas intracelulares (IL-2, IL-4, TNF- α), y factores de transcripción (Foxp3). Los reactivos para tinción intracelular para citocinas y factores de transcripción se adquirieron en BD Biosciences. El FVIII^h recombinante con dominio B eliminado (rFVIII^h) y el FVIII recombinante con dominio B eliminado (rFVIII) se sintetizaron como en Peters y col. (Peters, R.T., Toby, G., Lu, Q., Liu, T., Kulman, J.D., Low, S.C., Bitonti, A.J., y Pierce, G.F. 2012. Biochemical and functional characterization of a recombinant monomeric Factor VIII-Fc fusion protein. *J. Thromb Haemost.* DOI: 10.1111/jth.12076).

Se adquirieron otros medicamentos de Factor VIII, a saber, rBDD FVIII XYNTA[®] (Wyeth Pharmaceuticals, Filadelfia, PA, EE. UU.), y FVIII de longitud completa ADVATE[®] (Baxter Healthcare Corporation, Westlake Village, CA, EE. UU.) y se reconstituyeron de acuerdo con las pautas del fabricante.

Inducción de tolerancia/inmunización en ratones: tres grupos de tratamiento compuestos por ratones con HemA macho de 8 - 10 semanas de edad recibieron dosis intravenosas de 50, 100, o 250 UI/kg, que fueron administradas los días 0, 7, 14, 21, 35, y 53. Cada tratamiento y nivel de dosis se administró a 10 ratones. Las muestras de sangre se recogieron por sangrado retroorbital los días 0 (antes de sangrado), 14, 21, 28 y 42, y se utilizaron para separar plasma y determinar niveles de anticuerpos anti-FVIII utilizando el ensayo ELISA. Los animales fueron inyectados una vez más el día 53 y sacrificados el día 56 por inhalación de CO₂ y los bazo se diseccionaron en PBS estéril. Los esplenocitos se separaron utilizando el kit de disociación de bazo de ratón y un disociador gentleMACS (Miltenyi Biotec, Colonia, Alemania). Las suspensiones monocelulares de esplenocitos se fijaron o bien en formalina al 3 % (Boston BioProducts) para tinción FACS o se almacenaron en tampón de disociación para aislamiento de ARN (Roche Applied Science, Indianápolis, IN). Para los estudios de análisis de tolerancia inmunitaria, en primer lugar los ratones recibieron inyecciones de 50 UI/kg los días 0, 7, 14, 21 y 35. Después de confirmar la ausencia de anticuerpos contra FVIII el día 42, a estos ratones se les administró 250 UI/kg de rFVIII^h una vez por semana; es decir, los días 49, 56, 63 y 70 (días 0, 7, 14 y 21 de reexposición). Los animales reexpuestos se analizaron para determinar niveles de anticuerpo anti-FVIII en sangrados recogidos los días 14, 21 y 28.

Ensayo ELISA de anticuerpos anti-FVIII: el protocolo que se siguió fue diseñado internamente en Biogen Idec Hemophilia. Antes del ensayo, todas las muestras de plasma se calentaron a 56 °C en un baño de agua para desactivar factores de coagulación residual introducidos por los tratamientos y enzimas anticoagulantes que podían descomponer los estándares revestidos en la placa. El día 1, se revistió una placa de microtitulación de alta adhesión de 96 pocillos (Thermo Immulon 2HB) con 1 µg/ml (100 µl/pocillo) de FVIII con dominio B eliminado en carbonato de sodio 0,05 M, a pH 9,6 y se incubó durante la noche (12 a 18 horas) a 4 °C. Al día siguiente se retiró el sobrenadante y la placa se lavó 4 veces con PBST (tampón fosfato salino con Tween 20 al 0,05 %). A continuación la placa se bloqueó con 200 µl por pocillo de PBST con suero equino desactivado por calentamiento al 10 %, a pH 7,4 durante 60 minutos a temperatura ambiente. El estándar utilizado para IgG de ratón fue un conjunto policlonal de anticuerpos monoclonales anti-FVIII preparados mezclando cantidades iguales de GMA8002 (A1), GMA8008 (C2), GMA8011(C1), GMA8015(A2), GMA8016 (A2), GMA8005 (A1/A3). Todos los anticuerpos monoclonales eran de Green Mountain Antibodies, Inc, Burlington, VT con los epítopos de dominio de FVIII mostrados entre paréntesis. Las muestras de prueba de plasma de ratón se diluyeron en tampón de bloqueo y contenían la misma concentración de plasma calentado que los estándares. A continuación se retiró el tampón de bloqueo y los estándares diluidos y las muestras se agregaron a 100 µl/pocillo por duplicado. La placa se incubó durante 2 horas a 37 °C con agitación en un agitador orbital. Después de lavarla 4 veces con PBST, 100 µl/pocillo de un anticuerpo de cabra anti-IgG-HRP de ratón, diluido 1:20000 en tampón de bloqueo se añadió y se incubó durante 60 minutos a 37 °C con agitación en un agitador orbital. La placa se lavó nuevamente 4 veces con PBST, y a continuación se añadieron 100 µl/pocillo de TMB y se incubaron a TA durante 5 a 10 minutos. Los resultados se leyeron con DO 650 con un lector de placas.

Ensayo Bethesda para determinar titulaciones de anticuerpos neutralizantes: este ensayo determinó la titulación de anticuerpos anti-FVIII neutralizantes en una muestra de plasma dada. En resumen, el ensayo se llevó a cabo mezclando muestras de plasma con concentraciones conocidas de FVIII recombinante e incubando a las 2 horas a 37 °C. Posteriormente, se analizó la actividad de FVIII residual en la mezcla utilizando un kit Coatest específico de FVIII, en presencia de Factor IXa, Factor X, fosfolípidos y CaCl₂. La actividad de FVIII se calculó utilizando una curva estándar para actividad de FVIII trazada utilizando rFVIII en ausencia de cualquier inhibidor.

Tinción FACS: se llevó a cabo la obtención de perfil de respuesta de linfocitos T y células dendríticas en esplenocitos de ratón aislados. Los linfocitos esplénicos y las células dendríticas se tiñeron para determinar dianas superficiales e intracelulares. Para la tinción superficial, se incubaron 1 x 10⁶ esplenocitos totales con anticuerpos en concentraciones apropiadas. Para la tinción intracelular, las células se permeabilizaron con disolución BD Fix-Perm (BD Biosciences) y a continuación se llevó a cabo la incubación con anticuerpos contra citocinas en el mismo tampón. La tinción de Foxp3 se llevó a cabo utilizando anticuerpo en tampón de tinción de Foxp3 (BD Biosciences).

La intensidad de la fluorescencia se registró utilizando BD FACS Canto II y un análisis realizado utilizando el software FLOWJO. Los linfocitos se cotifieron con CD4 y marcadores intracelulares IL-2, TNF- α , y IL-4. Los linfocitos T reguladores (Treg) se tiñeron para determinar marcadores superficiales CD4 y CD25 seguidos de Foxp3 intracelular. Los esplenocitos se tiñeron para determinar CD11c y PD-L1 (células dendríticas) o CD4 y PD-1 (linfocitos T CD4+) para identificar células implicadas en la vía PD-L1 - PD-1.

PCR en tiempo real y análisis por matriz de PCR en tiempo real: se aisló ARN total utilizando un kit de aislamiento de ARN (Roche Applied Science, Indianápolis, IN) y se transcribió de manera inversa a ADNc (Qiagen, Hilden, Alemania). Los cebadores de PCR en tiempo real para los genes analizados se diseñaron utilizando el algoritmo online disponible en el sitio web de IDT Technologies (www.idtdna.com) y se adquirieron en IDT technologies (Coralville, IA). La PCR en tiempo real basada en SYBR Green se llevó a cabo utilizando el sistema Quantitect (Qiagen, Hilden, Alemania) en una máquina de PCR en tiempo real ABI 7900 Fast Block (Applied Biosystems, Foster City, CA). Para matrices basadas en PCR en tiempo real, se mezclaron 500 ng de ADNc total con mezcla maestra de PCRc basada en SYBR Green, y se distribuyó en alícuotas en una matriz de placa de 96 pocillos (PAMM047Z, matriz de PCR de tolerancia inmunitaria y anergia de linfocitos T; SA Biosciences, Frederick, MD, EE. UU.) Las reacciones se llevaron a cabo con una máquina de PCR en tiempo real ABI 7900 Fast Block (Applied Biosystems, Foster City, CA). Los resultados se analizaron utilizando el software 7500 versión 2.0.5 y los niveles relativos de transcritos génicos se midieron con genes constitutivos endógenos como control utilizando el procedimiento de cuantificación relativa $2^{-\Delta Ct}$ (Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta Ct}$ Method. *Methods* 25, 402-408. Los genes constitutivos utilizados para normalización fueron GAPDH, HPRT, Hsp90ab, beta-actina, y GusB. Para cada muestra, se tomaron los valores Ct promedio para los genes constitutivos en conjunto y se utilizaron para calcular la ΔCt . Los ARNm que mostraban ciclos umbral (Ct) >35 fueron excluidos del análisis.

Proliferación de linfocitos T y determinación de niveles de Interferón- γ (IFN- γ): a ratones con HemA (8 - 10 semanas de edad) se les inyectaron medicamentos de FVIII una vez a la semana durante 2 semanas. Setenta y dos horas después de la segunda inyección los ratones se sacrificaron y se recogieron macrófagos peritoneales mediante lavado utilizando PBS estéril. Los linfocitos T esplénicos se aislaron utilizando el kit de aislamiento de linfocitos T CD4+ murinos basado en perlas magnéticas (Miltenyi Biotec, Alemania). Los linfocitos T se marcaron con 10 μ M de CFSE (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 15 minutos en PBS templado y se colocaron en placas de adhesión ultra-baja de 96 pocillos (Corning) junto con los macrófagos peritoneales a una densidad de 1×10^6 células por ml para cada una. A continuación las células se incubaron con 0,1, 1 y 10 nM de rFVIII o vehículo o micro-perlas CD3/CD28 (control positivo; Miltenyi Biotec) en medio X-VIVO 15 (Lonza) con anticuerpos coestimuladores, a saber, anti-CD28 y anti-CD49d (BD Biosciences), durante 96 horas a 37 °C. Al final de la incubación, los niveles de IFN γ en el sobrenadante de cultivo se midieron utilizando un kit ELISA de Meso Scale Devices (MSD). La proliferación de linfocitos T se determinó midiendo la intensidad de la fluorescencia (IFM) de CFSE en linfocitos T activados de acuerdo con dispersiones frontales y laterales, utilizando FACS (BD FACS CANTO II).

Análisis estadístico: los análisis estadísticos de los resultados se llevaron a cabo utilizando o bien la prueba T de Student desapareada o la prueba T de Mann-Whitney. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron significativos.

Resultados: las células dendríticas son células presentadoras de antígenos profesionales y alojan moléculas y enzimas clave que son fundamentales para desviar una respuesta inmunitaria hacia la tolerancia. Los esplenocitos de ratones con HemA a los que se les inyectaron medicamentos de FVIII o vehículo se tiñeron para localizar moléculas CMH de clase II y CD11c para activar las células dendríticas. La composición esplénica de las células dendríticas que expresan marcadores tales como CD80, un marcador superficial regulado positivamente en células dendríticas maduras que indican más presentación de antígenos y CD274 (PD-L1), el ligando para el receptor PD-1, se identificaron mediante cotinción con anticuerpos específicos a estas moléculas. Como se muestra en la Fig. 63A, los esplenocitos de la dosis de 100 UI/kg de rFVIIIc o BDD-FVIII inyectada en ratones con HemA mostraron una disminución significativa en el porcentaje de células dendríticas que expresan CD80, sugiriendo una abundancia de células dendríticas inmaduras.

Si bien los ratones que recibían fl-FVIII mostraron una disminución en el porcentaje de células dendríticas CD80+ en comparación con el vehículo, no se alcanzó significación estadística (FIG. 64A). La tendencia fue similar para los ratones que recibían la dosis de 50 UI/kg de rFVIIIc. Con la dosis de 250 UI/kg, ninguno de los tres tratamientos mostró alteraciones en el porcentaje de células dendríticas CD80+ entre los esplenocitos.

Los resultados del análisis FACS para células dendríticas esplénicas que expresan CD274 (PD-L1) revelaron que una dosis de 100 UI/kg de rFVIIIc mejoraba el porcentaje de estas células en comparación con el vehículo y otros tratamientos de FVIII (Fig. 64B). Esta molécula también era regulada por rFVIIIc a nivel de ARNm como se ilustra

con el análisis PCR en tiempo real (Fig. 64C). Esto sugiere que rFVIII^hFC regula la vía PD-L1:PD-1, una de las vías inmunosupresoras clave, reduciendo de este modo la inmunogenicidad a FVIII. Además de CD274, rFVIII^hFC también reguló positivamente los niveles de ARNm de indoleamina 2,3-dioxigenasa (IDO), una enzima clave que regula la proliferación y activación de linfocitos T afectando el metabolismo del triptófano (Fig. 64D).

Ejemplo 24

rFVIII^hFC con dosis reducidas potencia la expresión de marcadores de tolerancia inmunitaria y anergia en esplenocitos

Se llevaron a cabo procedimientos experimentales de acuerdo con los Materiales y procedimientos descritos en el Ejemplo 23.

Para identificar marcadores de tolerancia inmunitaria inducida por rFVIII^hFC, se emplearon matrices basadas en PCR en tiempo real centradas en genes específicos para tolerancia inmunitaria y anergia (SA Biosciences). Se utilizó ARNm aislado de esplenocitos obtenidos de ratones inyectados con 50 y 250 UI/kg de rFVIII^hFC y vehículo para identificar elementos de respuesta novedosos activados por este medicamento.

Los candidatos se identificaron de acuerdo con su nivel de expresión (2 veces por encima o por debajo del vehículo), y el valor de p basado en la prueba T de Student (<0.05). La expresión relativa de cada gen se determinó con el procedimiento $2^{-\Delta C_t}$ (Livak, K.J., y Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25:402-408) después de normalizar a los valores Ct promedio de un conjunto de 5 genes constitutivos (véase Ejemplo 23, Materiales y procedimientos).

De acuerdo con estos criterios, el análisis por matriz realizado reveló candidatos que eran regulados preferentemente por rFVIII^hFC con dosis de 50 UI/kg a nivel de esplenocitos, en comparación con ratones a los que se les había inyectado vehículo y 250 UI/kg (Fig. 65 y Fig. 66). Estos incluyeron regulación positiva estadísticamente significativa de genes específicos de tolerancia tales como Foxp3, CTLA-4, y CD25; genes asociados a anergia tales como Egr2, Dgka, y CBL-B; genes pertenecientes a la superfamilia de factores de necrosis tumoral (TNFRSF); prostaglandina sintasa 2 (PTGS2) y receptor de la prostaglandina E2 (PTGER2) (véase Fig. 66). Por el contrario, algunos de los genes regulados negativamente identificados utilizando esta matriz son moléculas proinflamatorias conocidas tales como CCL3 y STAT3 (Fig. 66).

Estos resultados indicaron la presencia de vías tolerogénicas y un microentorno tolerogénico dentro de los esplenocitos de animales que recibían 50 UI/kg de rFVIII^hFC. Los perfiles de expresión génica determinados utilizando la matriz se validarán con PCR en tiempo real con pares de cebadores individuales para los candidatos identificados.

Ejemplo 25

Los esplenocitos CD4⁺ del grupo de ratones de 250 UI/kg proliferan y producen niveles elevados de IFN- γ

Se llevaron a cabo procedimientos experimentales de acuerdo con los Materiales y procedimientos descritos en el Ejemplo 23.

Los estudios de proliferación de linfocitos T se emplearon para investigar respuestas de linfocitos T específicas de Factor VIII *ex vivo*. Los linfocitos T CD4⁺ aislados de ratones que recibían dos inyecciones semanales de o bien 50 o 250 UI/kg de rFVIII^hFC se marcaron con CFSE y se reconstituyeron con macrófagos peritoneales (células presentadoras de antígenos; CPA) y se incubaron en presencia de rFVIII con dominio B eliminado con tres concentraciones, 0,1, 1 y 10 nM.

El análisis FACS para proliferación basado en señales de dilución de CFSE reveló que los linfocitos T del grupo tratado con 250 UI/kg de rFVIII^hFC mostraron un aumento dependiente de la dosis en la proliferación, que fue estadísticamente significativo a 10 nM (Fig. 67). En paralelo, los linfocitos T de ratones tratados con 50 UI/kg de rFVIII^hFC no mostraron un aumento significativo en la proliferación con concentraciones crecientes de rFVIII *ex vivo* en comparación con el vehículo (Fig. 67).

Los niveles de IFN medidos de los sobrenadantes de cultivo de estas incubaciones revelaron un perfil similar acorde con el patrón de proliferación de linfocitos T, es decir, un aumento dependiente de la dosis en la secreción de linfocitos T derivado de ratones tratados con 250 UI/kg de rFVIII^hFC (Fig. 68A) mientras que no se observaron

cambios en los niveles de linfocitos T de ratones tratados con 50 UI/kg de rFVIIIIFc (Fig. 68B).

Para diseccionar el o los mecanismos de acción de rFVIIIIFc para suprimir la respuesta inmunitaria a FVIII, se emplearon dos constructos mutantes: uno que no se une al receptor Fcγ (denominado rFVIIIIFc-N297A) y el otro que carece de unión al receptor FcRn (denominado rFVIIIIFc-IHH). Estos constructos se utilizaron para identificar las interacciones del rFVIIIIFc con uno de estos receptores al producir la acción inmunosupresora. Con este propósito, se analizó el perfil de secreción de IFNγ de linfocitos T derivados de ratones que recibieron dos inyecciones semanales de rFVIIIIFc-N297A con dosis de 250 UI/kg (Fig. 68C) y 50 UI/kg (Fig. 68D).

- 10 Las comparaciones, realizadas una al lado de la otra, de la secreción de IFNγ de linfocitos T derivados de 250 UI/kg de rFVIIIIFc y rFVIIIIFc-N297A revelaron que el nivel de la citocina era muy reducido en los linfocitos T de animales que recibían el mutante, aunque se registraron niveles significativamente más elevados en comparación con el vehículo. Sin embargo, los niveles de IFNγ del grupo de 50 UI/kg de la proteína mutante no mostraron una diferencia significativa respecto de los del grupo de 50 UI/kg de rFVIIIIFc. Esto sugiere que la mayor producción de anticuerpos
- 15 y proliferación de linfocitos T observadas con dosis más elevadas de rFVIIIIFc podría ser el resultado de la interacción del Fc con los receptores Fcγ que se suprime con el mutante de no unión de Fcγ.

- La descripción anterior de las realizaciones específicas revelará de manera completa la naturaleza general de la invención que otros, aplicando conocimiento dentro de la experiencia en la técnica, pueden modificar y/o adaptar
- 20 fácilmente para diversas aplicaciones de dichas realizaciones específicas, sin realizar experimentos indebidos y sin alejarse del concepto general de la presente invención. Por consiguiente, dichas adaptaciones y modificaciones pretenden estar comprendidas dentro del significado e intervalo de equivalentes de las realizaciones descritas, de acuerdo con la enseñanza y apoyo presentados en el presente documento. Se ha de entender que la fraseología o terminología del presente documento tiene fines descriptivos y no restrictivos, de modo que la terminología o
 - 25 fraseología de la presente memoria descriptiva deberá ser interpretada por el experto en la técnica de acuerdo con las enseñanzas y el apoyo.

Tabla 1: Secuencias de polinucleótidos

A. FVIIIc con dominio B eliminado						
(i) Secuencia de ADN de cadena de FVIIIc con dominio B eliminado (péptido señal de FVIII subrayado, región Fc en negrita) (SEQ ID NO:1, que codifica la SEQ ID NO:2)						
661	A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC					
721	TGTGCGCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCTC
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATTCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTTTG
901	TAGAATTAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC
961	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGCT	CATTACACTT	AAGAACATGG
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CATGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGTCAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC
1201	TGTGCGCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTACAGGCC
1261	TCAATGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
1321	TGCACAAAT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA
1381	CAAAGAAGTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAAATGC
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCCTCA	ATATTCTCTG
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTGTT	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAATC	TCGCCAATAA
1621	CTTTCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGACAC	GTTTCTACTG	TTTTGTCTATA
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACCT	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAACTT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG
1921	ACTGGGATTA	TGCTCCCTTA	GTCCTCGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATACA
2041	CAGATGAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTGAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAAGAATCAA	GCAAGCAGAC
2161	CATATAACAT	CTACCCCTAC	GGAATCACTG	ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC	AGGAGAATA	TTCAAATATA
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA	CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTAAAT	ATGGAGAGAG	ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA	GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA	ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC	AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCTCCA
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT	TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTTTTTGC
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTTCTGTCT
2701	TCTTCTCTGG	ATATACTTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCTATTTC
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCTG	TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT
2821	GCCACAATC	AGACTTTTCG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG
2881	ACAAGAACAC	TGCTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTTCAGCA	TACTTGCTGA
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCACTC	TTGAAACGCC
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTTCA	AAGAAAAAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCTAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA
3241	GTGTCCTTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC
3301	CCTTATACCG	TGGAGAATA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCTTCT
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTTACT	TTTGGAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA
3541	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG
3601	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACATAACACA	CTGAACCCCTG
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA
3721	CCAAAAGCTG	GTACTTCACT	GAAAAATATG	AAAGAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC
3781	AGATGGAAGA	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA
3841	TGGATACACT	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTCGATGG	TATCTGCTCA
3901	GCATGGGCAG	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTTCA	TGGACATGTG	TTCAGTGTAC
3961	GAAAAAAGA	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG

4021	TGGAAATGTT	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGG	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC
4081	TACATGCTGG	GATGAGCACA	CTTTTCTCTG	TGTACAGCAA	TAAGTGTCTG	ACTCCCCTGG
4141	GAATGGCTTC	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGT
4201	GGGCCCCAAA	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAAGG
4261	AGCCCTTTTC	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GATTATTAC	GGCATCAAGA
4321	CCCAGGGTGC	CCGTGAGAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA
4381	ATCTTGATGG	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT
4441	TCTTTGGCAA	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTAAACCCT	CCAATTATTG
4501	CTCGATACAT	CCGTTTGCAC	CCAACTCATT	ATAGCATTCT	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT
4561	TGATGGGCTG	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT
4621	CAGATGCACA	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT
4681	CAAAAGCTCG	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC
4741	CAAAAGAGTG	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAACCTACT
4801	AGGAGGTAAA	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTCCCTCAT	TCCAGCAGTC
4861	AAGATGGCCA	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA
4921	ATCAAGATCT	CTTCACACCT	GTGGTGAACT	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGCTACC
4981	TTCAATTTCA	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT
5041	TCGAGGCACA	GGACCTCTAC	GACAAAACCTC	ACACATGCCC	ACCGTGCCCA	GCTCCAGAAC
5101	TCC TGGGGCGG	ACCGT CAGTC	TTCT CTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT
5161	CCCG GAACCC	TGAG GTCA	TGCG TGGTGG	TGGAC GTGAG	CCAC GAAAGC	CCTGAG GTCA
5221	AGTT CAACTG	GTAC GTGGAC	GGCG TGGAGG	TGCATA ATGC	CAAGACA AG	CCGCGG GAGG
5281	AGCAG TACAA	CAGC ACGTAC	CGTG TGGTCA	GCCT CTCAC	CGTCT GCAC	CAGGAC TGGC
5341	TGAAT GGCAA	GGAG TACAAG	TGCA AGGTCT	CCAACA AAAG	CCTCC CAGCC	CCCAT CGAGA
5401	AAACC ATCTC	CAAAG CCAAA	GGGC AGCCCC	GAGA ACCACA	GGTGT ACACC	CTGCCCC CAT
5461	CCCGG GATGA	GCTG ACCAA	AACC AGGTCA	GCCT GACCTG	CCTGGT CAAA	GGCTT CTATC
5521	CCAGC GACAT	CGCC GTGGAG	TGGG AGAGCA	ATGGG CAGCC	GGAGA ACAAC	TACA AGACCA
5581	CGCT CCCCGT	GT TGGACTCC	GACG GCTCCT	TCTT CCTCTA	CAGCA AGCTC	ACCGT GGACA
5641	AGAGC AGGTG	GCAG CAGGGG	AACG TCTTCT	CATG CTCCGT	GATG CATGAG	GCTCT GCACA
5701	ACCA CTACAC	GCAG AAGAGC	CTCT CCCTGT	CTCC GGGTAA	A	
(ii) Secuencia de ADN de Fc (péptido señal de Igk de ratón subrayado) (SEQ ID NO:3, que codifica SEQ ID NO:4)						
7981	ATGGA GACAGACACA					
8041	<u>CTCCTGCTAT</u>	<u>GGGTACTGCT</u>	<u>GCTCTGGGTT</u>	<u>CCAGGTTCCA</u>	<u>CTGGTGACAA</u>	<u>AACTCACACA</u>
8101	TGCCCCACCGT	GCCCAGCACC	TGAACTCCTG	GGAGGACCGT	CAGTCTTCCT	CTTCCCCCCA
8161	AAACCCAAGG	ACACCCCTCAT	GATCTCCCGG	ACCCCTGAGG	TCACATGCGT	GGTGGTGGAC
8221	GTGAGCCACG	AAGACCCTGA	GGTCAAGTTC	AACCTGGTACG	TGGACGGCGT	GGAGGTGCAT
8281	AATGCCAAGA	CAAAGCCGCG	GGAGGAGCAG	TACAACAGCA	CGTACCGTGT	GGTCAGCGTC
8341	CTCACCGTCC	TGCACCAGGA	CTGGCTGAAT	GGCAAGGAGT	ACAAGTGCAA	GGTCTCCAAC
8401	AAAGCCCTCC	CAGCCCCCAT	CGAGAAAACC	ATCTCCAAAG	CCAAAGGGCA	GCCCCGAGAA
8461	CCACAGGTGT	ACACCCCTGCC	CCCATCCCGC	GATGAGCTGA	CCAAGAACCA	GGTCAGCCTG
8521	ACCTGCCTGG	TCAAAGGCTT	CTATCCCAGC	GACATCGCCG	TGGAGTGGGA	GAGCAATGGG
8581	CAGCCGGAGA	ACAACCTACAA	GACCACGCCCT	CCCGTGTTGG	ACTCCGACGG	CTCCTTCTTC
8641	CTCTACAGCA	AGCTCACCGT	GGACAAGAGC	AGGTGGCAGC	AGGGGAACGT	CTTCTCATGC
8701	TCCGTGATGC	ATGAGGCTCT	GCACAACCAC	TACACGCAGA	AGAGCCTCTC	CCTGTCTCCG
8761	GGTAAA					
B. FVIII _h de longitud completa						
(i) Secuencia de ADN de FVIII _h de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado, región Fc en negrita) (SEQ ID NO:5, que codifica la SEQ ID NO:6)						
661	ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG					
721	<u>CTTCTTTCTG</u>	<u>TGCCTTTTGC</u>	<u>GATTCTGCTT</u>	<u>TAGTGCCACC</u>	<u>AGAAGATACT</u>	<u>ACCTGGGTGC</u>
781	AGTGGAACTG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG	TGGACGCAAG
841	ATTTCCCTCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT	ACAAAAAGAC
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC	CACCTGGGAT
961	GGGTCTGCTA	GGTCTTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA	TTACACTTAA
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT	GGAAAGCTTC
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG	ATAAAGTCTT
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCTTGAAA	GAGAATGGTC	CAATGGCCTC

1201	TGACCCACTG	TGCCTTACCT	ACTCATATCT	TTCTCATGTG	GACCTGGTAA	AAGACTTGAA
1261	TTCAGGCCIC	ATIGGAGCCC	TACTAGTATG	TAGAGAAGGG	AGTCTGGCCA	AGGAAAAGAC
1321	ACAGACCTTG	CACAAATTTA	TACTACTTTT	TGCTGTATTT	GATGAAGGGA	AAAGTTGGCA
1381	CTCAGAAACA	AAGAACTCCT	TGATGCAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC	GGGCCTGGCC
1441	TAAATGCGAC	ACAGTCAATG	CTTATGTAAA	CAGCTCTCTG	CCAGCTCTGA	TTGGATGCCA
1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AAATGGGCACC	ACTCCTGAAG	TGCACTCAAT
1561	ATTCCTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCCT	TGAAAACTC-
1621	UCCAAATACT	TTCTTACTG	CTCAAACT	CTTCATGGAC	CTTCGACACT	TTCTACTCTT
1681	TTGTCTATTC	TCTTCCACCC	AACATGATGG	CATGGAAGCT	TATGTCAAAG	TAGACAGCTG
1741	TCCAGAGGAA	CCCAACTAC	GAATGAAAAA	TAATGAAGAA	GCGGAAGACT	ATGATGATGA
1801	TCCTACTGAT	TCTGAAATCG	ATCTGGTCAG	CTTTCATGAT	GACAACTCTC	CTTCTTTTAT
1861	GGCATACACA	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACTTGG	GTACATTACA	TTGCTGCTGA
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CTCGCCCCC	GATGACAGAA	GTTATAAAAG
1981	TCAATATTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG	TACAAAAAAG	TCCGATTTAT
2041	GGCATACACA	GATGAAACCT	TAAAGACTCG	TGAAGCTATT	CAGCATGAAT	CAGGAATCTT
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATATTTA	AGATCAAGC
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCAGCG	AATCACTGAT	GTCCGTCTCT	TGTATTCAAG
2221	GAGATTACCA	AAAGGTGTAA	AACATTTGAA	GGATTTTCCA	ATTCTGCCAG	GAGAAATATT
2281	CAAAATATAA	TGGACAGTGA	CTGTAGAAGA	TGGGCCAACT	AAATCAGATC	CTCGGTGCCT
2341	GACCCGCTAT	TACTCTAGTT	TCGITAATAT	GGAGAGAGAT	CTAGCTTCAG	GACTCATTGG
2401	CCCAATCTCC	ATCTGCTACA	AAGAATCTGT	AGATCAAAGA	GGAACCCAGA	TAATGTCTGA
2461	CAAGAGGAGC	GTCTCTCTGT	TTTCTGTATT	TGATGAGAAC	CGAAGCTGGT	ACCTCAGAGA
2521	GAATATACAA	CGCTTTCTCC	CCAATCCAGC	TGGAGTGCAG	CTTGAGGATC	CAGAGTTCCA
2581	AGCCTTCCAA	ATCATGCACA	GCATCAATGG	CTATGTTTTT	GATAGTTTGC	AGTTGTCACT
2641	TTGTTTGGAT	GAGGTGGCAT	ACTGGTACAT	TCTAAGCATT	GGAGCACAGA	CTGACTTCCT
2701	TTCTGTCTTC	TTCTCTGGAT	ATACCTTCAA	ACACAAAATG	GTCTATGAAG	ACACACTCAC
2761	CTCATTTCCA	TTCTCAGGAG	AAACTGTCTT	CATGTGATG	GAAAACCCAG	GTCTATGGAT
2821	TCTGGGGTGC	CACAACTCAG	ACTTTCGGAA	CAGAGGCATG	ACCGCTTAC	TGAAGGTTTC
2881	TAGTTGTGAC	AAGAACAATG	GTGATTATTA	CGAGGACAGT	TATGAAGATA	TTTCAGCATA
2941	CTTGTCTGAT	AAAAACAATG	CCATGAACC	AAGAAGCTTC	TCCCAGAATT	CAAGACACCC
3001	TAGCACTAGG	CAAAAGCAAT	TAAATGCCAC	CACAATTCCA	GAAAATGACA	TAGAGAAGAC
3061	TGACCCCTTG	TTTGCCACACA	GAACACCTAT	GCCTAAAATA	CAAAATGTCT	CCTCTAGTGA
3121	TTTGTGTGAT	CTCTTGCGAC	AGAGTCCCTAC	TCCACATGGG	CTACTCTTAT	CTGATCTCCA
3181	AGAAGCCAAA	TATGAGACTT	TTTCTGATGA	TCCATCACCT	GGAGCAATAG	ACAGTAATAA
3241	CAGCCTGTCT	GAAATGACAC	ACTTCAGGCC	ACAGCTCCAT	CACAGTGGGG	ACATGGTATT
3301	TACCTCTGAG	TCAGGCCCTC	AATTAAGATT	AAATGAGAAA	CTGGGGACAA	CTGCAGCAAC
3361	AGAGTTGAAG	AAACTTGATT	TCAAAAGTTT	TAGTACATCA	AATAATCTGA	TTTCAACAAT
3421	TCCATCAGAC	AATTTGGGAG	CAGGTACTGA	TAATACAAGT	TCTTAGGAC	CCCAAGTAT
3481	GCCAGTTGAT	TATGATAGTC	AATTAGATAC	CACCTCTATT	GSCAAAAGT	CATCTCCCTC
3541	TACTGAGTCT	GGTGGACCTC	TGAGCTTGAG	TGAAGAAAAT	AATGATTCAA	AGTTGTTAGA
3601	ATCAGGTTTA	ATCAATAGCC	AAGAAAAGTT	ATGGGGAAAA	AATGTATCGT	CAACAGAGAG
3661	TGGTAGGTTA	TTTAAAGGGA	AAAGAGCTCA	TGGACCTGCT	TTGTGTGACTA	AAGATAATGC
3721	CTTATTCAAA	GTTAGCATCT	CTTGTGTTAA	GACAAACAAA	ACTTCCAATA	ATTCAAGCAAC
3781	TAATAGAAAG	ACTCACATTT	ATGGCCCATC	ATTAATTAAT	GAGAAATAGT	CATCAGTCTG
3841	GCAAAATATA	TTAGAAAGTG	ACACTGAGTT	TAAAAAAGTG	ACACCTTTGA	TTTATGACAG
3901	AATGCTTATG	GACAAAAATG	CTACAGCTTT	GAGGCTAAAT	CATATCTCAA	ATAAACTAC
3961	TTTATCAAAA	AACATGGAAA	TGGTCCCAAC	GAAAAAAGAG	GCCCCCATTC	CACCAAGTGC
4021	ACAAAATCCA	GATATGTCGT	TCTTTAAGAT	GCTATTCTTG	CCAGAATCAG	CAAGGTGGAT
4081	ACAAAGGACT	CATGGAAAGA	ACTCTCTGAA	CTCTGGGCAA	GGCCCCAGTC	CAAGCAATT
4141	AGTATCTTTA	GGACCCAGAA	AATCTGTGGA	AGGTCAGAAT	TTCTGTCTG	AGAAAAACAA
4201	AGTGGTAGTA	GGAAAGGGTG	AATTTACAAA	GGAGCTAGGA	CTCAAAGAGA	TGGTTTTTCC
4261	AAGCAGCAGA	AACCTATTTT	TACTAACTT	GGATAATTTA	CATGAAAATA	ATACACACAA
4321	TCAAGAAAAA	AAAATTTCAG	AAGAAATAGA	AAAGAAGGAA	ACATTAATCC	AAGAGAAATG
4381	AGTTTTGCTT	CAGATACATA	CAGTGACTGG	CACATAAGAT	TTTATGAAGA	ACCTTTTCTT
4441	ACTGAGCACT	AGGCAAAATG	TAGAAGGTTT	ATATGACGGG	GCATATGCTC	CAGTACTTCA
4501	AGATTTTATG	TCATTAAATG	ATCAACAAA	TAGAACAAAG	AAACACACAG	CTCATTTCTC
4561	AAAAAAGGGG	GAGGAAGAAA	ACTTGGAAAG	CTTGGGAAAT	CAAAACCAAGC	AAATTGTAGA
4621	GAAATATGCA	TGCACCACAA	GGATATCTCC	TAATACAAGC	CAGCAGAATT	TTGTACGCGA
4681	ACGTAGTAAG	AGAGCTTTGA	AACAATTGAG	ACTCCCACTA	GAAGAAACAG	AACCTGAAAA
4741	AAGGATAATT	GTGGATGACA	CCTCAACCCA	GTGGTCCAAA	AACATGAAAC	ATTGACCCCC
4801	GAGCACCCCT	ACACAGATAG	ACTACAATGA	GAAGGAGAAA	GSGGCCATTA	CTCAGTCTCC
4861	CTTATCAGAT	TSCCTTACGA	GGAGTCTATG	CATCCCTCAA	GCAAAATAGAT	CTCCATTACC
4921	CAATGCAAA	GTATCATCAT	TTCATCTAT	TAGACCTATA	TATCTGACCA	GGTCTCTTAC
4981	CCAAGACAA	TCTTCTCATC	TCCAGCAGC	ATCTTATAGA	AAGAAAGATT	CTGGGGTCCA
5041	AGAAAGCAGT	CATTTCTTAC	AAGGAGCCAA	AAAAAATAAC	CTTCTTTTAG	CCATCTTAAC
5101	CTTGGAGATG	ACTGGTGATC	AAAGAGAGGT	TGGTCTCCTG	GSGACAAGTG	CCACAAATTC

5161	AGTCACATAC	AAGAAAGTTG	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA	CCAGACTTGC	CCAAACATC
5221	TGGCAAAGTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGAA	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGA	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAAGA	GTGGAAATCC	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCGAAATA	GAAGTCACCT	GGGCAAGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA
5941	GTTCAGAAA	GTGTTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATACCG
6001	TGGAGAATA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCTCTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAATC	TTGTCAAGCC
6181	TATCAAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA
6241	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG	ATGTGCACTC
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCCTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCAACATC	TTGATGAGA	CTAAAAGCTG
6421	GTACTTCACT	GAAAATATGG	AAAGAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGGAAG
6481	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTCTGATG	TATCTGCTCA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTTCA	TGGACATGTG	TTCACTGTAT	GAAAAAAGA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAATGTTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGA	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCTTGG	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAAGGACA	TATGGACAGT	GGGCCCCAAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACCAAGG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCAOCCAT	GATTATTAC	GGCATCAAGA	CCCAGGGTGC
7021	CCGTCAGAA	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA
7141	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTAAACCCT	CCAATTATTG	CTCGATACAT
7201	CCGTTTGAC	CCAACCTATT	ATAGCATTCG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT	TGATGGGCTG
7261	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT	CAGATGCACA
7321	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT	CAAAAGCTCG
7381	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC	CAAAAGAGTG
7441	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAACCTACT	AGGGAGTAA
7501	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTCTCTATC	TCCAGCAGTC	AAGATGGCCA
7561	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA	ATCAAGACTC
7621	CTTCACACCT	GTGGTGAAGT	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGTACCC	TTCTGAATCA
7681	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT	GCGAGGCACA
7741	GGACCTCTAC	GACAAAACCT	ACACATGCC	ACCGTGCCCA	GCTCCAGAAC	TCTTGGGCGG
7801	ACCGTCAGTC	TTCTCTTCC	CCCCAAAACC	CAAGGACACC	CTCATGATCT	CCCGGACCCC
7861	TGAGGTGACA	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA	AGTTCAACTG
7921	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG	TGCATAATGC	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG	AGCAGTACAA
7981	CAGCACGTAC	CGTGTGGTCA	GCGTCTCAC	CGTCTGCAC	CAGGACTGGC	TGAATGGCAA
8041	GGAGTACAAG	TGCAAGGTCT	CCAACAAAGC	CCTCCCAGCC	CCCATCGAGA	AAACCATCTC
8101	CAAAGCCAAA	GGGCAGCCCC	GAGAACCA	GGTGACACC	CTGCCCCCAT	CCCGGGATGA
8161	GCTGACCAAG	AACCAGGTCA	GCCTGACCTG	CCTGGTCAAA	GGCTTCTATC	CCAGCGACAT
8221	CGCCGTGGAG	TGGGAGAGCA	ATGGGCAGCC	GGAGAACAAC	TACAAGACCA	CGCCTCCCGT
8281	GTTGGACTCC	GACGGCTCCT	TCTTCTCTA	CAGCAAGCTC	ACCGTGGACA	AGAGCAGGTG
8341	GCAGCAGGGG	AACGTCTTCT	CATGCTCCGT	GATGCATGAG	GCTCTGCACA	ACCATTACAC
8401	GCAGAAGAGC	CTCTCCCTGT	CTCCGGGTAA	A		

(ii) Fc (misma secuencia que A (ii) (SEQ ID NO:3))

Tabla 2: Secuencias polipeptídicas

A. Híbrido monomérico de FVIII-Fc con dominio B eliminado (monómero-dímero BDD FVIII-Fc): creado coexpresando las cadenas de BDD FVIII-Fc y Fc.
Construito = fusión HC-LC-Fc. Un casete de expresión de Fc se cotransfecta con BDDFVIII-Fc para generar el monómero BDD FVIII-Fc. Para la cadena de BDD FVIII-Fc, la secuencia de Fc se muestra en negrita; la secuencia de HC se muestra con doble subrayado; la secuencia del dominio B restante se muestra en cursiva. Los péptidos señal están subrayados.
i) cadena de FVIII-Fc con dominio B eliminado (secuencia señal de 19 aminoácidos subrayada) (SEQ ID NO: 2)

<u>MQIELSTCFFLCILRFCS</u> <u>ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFFFTSVVYKTLFVEFTDHLFNI</u> <u>AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVI</u> <u>TLKNMASHPVSLHAGVSYWKASEGAAYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGEMASDPLCLITYSYLSHVDLVKDLNSGL</u> <u>IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVIRSLPGLIGCHRKSVYWHVI</u> <u>GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTITELTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHGDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE</u> <u>DYDDDLTDSEMDVVRFDNDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAAPDRSYKSQYLNNGFQIRGRKYYKVRFMA</u> <u>YTDTEFTKTREAIQHESGILGPELLYGEVGDITLLIFKNQASRPYKIYFPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFEILPGEIFKYKWTVT</u> <u>VEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLI</u> <u>CYKESVDQRGNQIMSDKRNIVLEFSVFEDENRSWYLTENIQRFLENPAGVQ</u> <u>LEDEPFOASHIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYNYILSIGAOTDLSVFESGYTEKHKMVEYEDTLTLEPFESGETVFMGMENPGLW</u> <u>ILGCHNSDFNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKHNAIEPRSFSONPPVLRHOREITRTTLQSDQEEIDYDDTI</u> <u>SVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTTHYFIAAVERLWDYCMSSSPHVLNRRAQSGSVFQFKKVVFEFTDCSFTQPLYRGELNE</u> <u>HLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSIYEEDQRQGAEPKKNFVKPNETKTYFWKVQHMMAPTKDEFDCXAWAYFSD</u> <u>VDLEKDVHSGGLIGPLLCHTNTLNPAGHQVTVQEFALFTTFTDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM</u> <u>DTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALENLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMST</u> <u>LFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGIKTQGARQKFSYLI</u> <u>SQFIIMYSLDGKKWOTYRGJSTGTLMVFFGHVDSGGIKHNIENPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNGCSMPLGMESKA</u> <u>ISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVGTTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQ</u> <u>WTLFFQNGKVKVFPQGNQDSFTIPVHSLDPELLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALP</u> <u>APIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPFVLDSGGSFFLYSKLTVDKSR</u> <u>WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
ii) cadena de Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos de la cadena de Igk de ratón subrayado) (SEQ ID NO: 4)
<u>METDTILLWVLLWVPGSTG</u> <u>DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP</u> <u>PKPKDTLMI</u> <u>SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL</u> <u>TVLHLQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLTPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> <u>TTPFVLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>
B. Híbrido monomérico de FVIII_h de longitud completa (monómero-dímero de FVIII_h de longitud completa): creado coexpresando las cadenas de FVIII_h y Fc.
Constructo = fusión HC-B-LC-Fc. Un casete de expresión de Fc se cotransfecta con FVIII_h-Fc de longitud completa para generar el monómero de FVIII_h de longitud completa. Para la cadena de FVIII_h, la secuencia de Fc se muestra en negrita; la secuencia de HC se muestra con doble subrayado; la secuencia del dominio B se muestra en cursiva. Los péptidos señal están subrayados.
i) Cadena de FVIII_h de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado) (SEQ ID NO:6)
<u>MQIELSTCFFLCILRFCS</u> <u>ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPVRPKSFFFTSVVYKTLFVEFTDHLFNI</u> <u>AKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDVTVI</u> <u>TLKNMASHPVSLHAGVSYWKASEGAAYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGEMASDPLCLITYSYLSHVDLVKDLNSGL</u> <u>IGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVIRSLPGLIGCHRKSVYWHVI</u> <u>GMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPTITELTAQTLMDLGQFLLFCHISSHQHGDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAE</u> <u>DYDDDLTDSEMDVVRFDNDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAAPDRSYKSQYLNNGFQIRGRKYYKVRFMA</u>

YTDFTFKTREATQHESGILGPLYGEVGDITLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHKIDFPILPGEIFKYKWTVT VEDGETKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRSNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLENFAGVQ LEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDITLTFPFSGETVFMSEHNPGLW ILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKHNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPNFA HRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHSAGDMVFTPESSGLQLRLN EKLGTAAATELKKLDFKVSSTSNLITIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITLFGKKSSPLTESGGPLSLSEENNSK LLESCLMNSQESSWCKNVSSTESCRLFKCKRAHCPALLTKDNALFKVSISSLKTNKTSNNSATNRKTHIDCPSLLIENSPSVWQNI LESDETFKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSSKNMEMVQKKEGPIFPDAQNPDMGFFKMLFLPESARWIQRTHCKNSL NSGQGPSPKQLVSLGPEKSVGQNFLEKKNKVVVGKEFTKDVGLKEMVFPSSRNLFNLNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETL IQENVLPQIHTVTGTKNFMKNLFLSTRQNVESYDGAAYAPVLQDFRSLNDSTNRKHTAHFSKKCEENLEGLGNQTKQIVEK YACTRISINTSQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPSLSDCLTR SHSIPQANRSPPIAKVSSFPSIRPIYLTRVLFDQNSSHLPAASYRKKDQSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSL GTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPKTSKGVLELLPKVHIYQKDLFPPTETSNQSGPHGLDLVEGSLQGTGEGAIKNNEANRPGKVPFLR VATESAKTFSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEWKSQEKSEKTAFAKKKDTILSLNACESNHAAIAINECQNKPEIEVTWAKQCRTER LCSQNPVLRKHQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIYDEDENQSPRSFQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLN RAQGSVQCFKKVVFQEFDTGSEFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSYEEQORQGAEPKKNF VKPNETKTYFWKQVHHMPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLGPLLVCHTNTLNPAGRQVTVQEFALFFITFDETSKSWYFT EIMERNCRAPCHIQMEDPTFKENYREHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLQMGSHENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNL YPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLAGMSTLFLVYSNCKQTFLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWST KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGGKQWYRGHSTGTLMVFFGNVDSSGKHHIFNPPIIARYIR LHPHTYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAI SDAQITASSYFTMFATWSPSKARLHLQGRSHAWRPQVNNPKEWLQVDFQK TMKVTGVTQGVKSLLTSMYKFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLTRYLRIHPQSWVHQIALRME VLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
ii) Cadena de Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos de la cadena de Igk de ratón subrayado) (SEQ ID NO: 4)
METDTLLLVLLLVWVPGSTG DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNATKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYCKKVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPVLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> Biogen Idec MA Inc. Puget Sound Blood Center
- 5 <120> PROCEDIMIENTOS PARA REDUCIR LA INMUNOGENICIDAD CONTRA EL FACTOR VIII EN INDIVIDUOS SOMETIDOS A TERAPIA CON FACTOR VIII
- <130> P42991EP-PCT
- 10 <140> EP13735995.6
- <141> 12-01-2013
- <150> US 61/668,961
- 15 <151> 06-07-2012
- <150> US 61/586,103
- <151> 12-01-2012
- 20 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 25 <211> 5052
- <212> ADN
- <213> Homo sapiens
- <400> 1
- 30

ES 2 700 583 T3

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgagggttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctgtt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat	900
cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa	1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctcccttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcttaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320
aagtacaaaa aagtcgatt tatggcatat acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct	1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tcccaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttggttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctctcaaa acccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgctgc agtgagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc	2580
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc	2700
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat	2760
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttggaaag tgcaacatca tatggcacc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940

ES 2 700 583 T3

ctggtctgcc	acactaacac	actgaaccct	gctcatggga	gacaagtgac	agtacaggaa	3000
tttgctctgt	ttttcaccat	ctttgatgag	acaaaaagct	ggtacttcac	tgaaaatatg	3060
gaaagaaact	gcagggtccc	ctgcaatatc	cagatggaag	atcccacttt	taaagagaat	3120
tatcgcttcc	atgcaatcaa	tggctacata	atggatacac	tacctggctt	agtaatggct	3180
caggatcaaa	ggattcgatg	gtatctgctc	agcatgggca	gcaatgaaaa	catccattct	3240
attcattttca	gtggacatgt	gttcaactgta	cgaaaaaaag	aggagtataa	aatggcactg	3300
tacaatctct	atccagggtgt	ttttgagaca	gtggaaatgt	taccatccaa	agctggaatt	3360
tggcgggtgg	aatgccttat	tggcgagcat	ctacatgctg	ggatgagcac	actttttctg	3420
gtgtacagca	ataagtgtca	gactcccctg	ggaatggctt	ctggacacat	tagagatttt	3480
cagattacag	cttcaggaca	atatggacag	tgggccccaa	agctggccag	acttcattat	3540
tccggatcaa	tcaatgcctg	gagcaccaag	gagccctttt	cttggatcaa	ggtggatctg	3600
ttggcaccaa	tgattattca	cggcataca	acccagggtg	cccgtcagaa	gttctccagc	3660
ctctacatct	ctcagtttat	catcatgtat	agtcttgatg	ggaagaagtg	gcagacttat	3720
cgaggaaatt	ccactggaac	cttaaatggtc	ttctttggca	atgtggattc	atctgggata	3780
aaacacaata	tttttaacct	tccaattatt	gctcgataca	tccgtttgca	cccaactcat	3840
tatagcattc	gcagcactct	tcgcatggag	ttgatgggct	gtgatttaaa	tagttgcagc	3900
atgccattgg	gaatggagag	taaagcaata	tcagatgcac	agattactgc	ttcatcctac	3960
tttaccaata	tgtttgccac	ctggtctcct	tcaaaagctc	gacttcacct	ccaagggagg	4020
agtaatgcct	ggagacctca	ggtgaataat	ccaaaagagt	ggctgcaagt	ggacttccag	4080
aagacaatga	aagtcacagg	agtaactact	cagggagtaa	aatctctgct	taccagcatg	4140
tatgtgaagg	agttcctcat	ctccagcagt	caagatggcc	atcagtggac	tctctttttt	4200
cagaatggca	aagtaaaggt	ttttcaggga	aatcaagact	ccttcacacc	tgtggtgaac	4260
tctctagacc	caccgttact	gactcgctac	cttcgaattc	acccccagag	ttgggtgcac	4320
cagattgccc	tgaggatgga	ggttctgggc	tgcgaggcac	aggacctcta	cgacaaaact	4380
cacacatgcc	caccgtgccc	agctccagaa	ctcctgggcg	gaccgtcagt	cttcctcttc	4440
ccccaaaaac	ccaaggacac	cctcatgata	tcccggaccc	ctgaggtcac	atgcgtggtg	4500
gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	4560
gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	4620
agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaaggtc	4680
tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	4740
cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccaggtc	4800

ES 2 700 583 T3

```

agcctgacct gcctgggtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc      4860
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggaactc cgacggctcc      4920
ttcttctctt acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc      4980
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg      5040
tctccgggta aa                                                                5052

```

<210> 2

<211> 1684

5 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe
1                               5                               10                               15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
                20                               25                               30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
                35                               40                               45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
                50                               55                               60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile
65                               70                               75                               80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
                85                               90                               95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
                100                              105                              110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
                115                              120                              125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
                130                              135                              140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu
145                              150                              155                              160

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
                165                              170                              175

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile

```

10

ES 2 700 583 T3

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

ES 2 700 583 T3

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685

ES 2 700 583 T3

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
 755 760 765
 Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
 770 775 780
 Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
 785 790 795 800
 Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
 805 810 815
 Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
 820 825 830
 Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
 835 840 845
 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 850 855 860
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
 865 870 875 880
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile
 885 890 895
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 900 905 910
 Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg
 915 920 925
 Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940

ES 2 700 583 T3

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
 995 1000 1005
 Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
 1010 1015 1020
 Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
 1025 1030 1035
 Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
 1040 1045 1050
 Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
 1055 1060 1065
 Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
 1070 1075 1080
 Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
 1085 1090 1095
 Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
 1100 1105 1110
 Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
 1115 1120 1125
 Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
 1130 1135 1140
 Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
 1145 1150 1155
 Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
 1160 1165 1170
 Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser

ES 2 700 583 T3

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

ES 2 700 583 T3

Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val	Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr
1415						1420					1425			
Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His	Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala
1430						1435					1440			
Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu	Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp
1445						1450					1455			
Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly
1460						1465					1470			
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
1475						1480					1485			
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
1490						1495					1500			
Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
1505						1510					1515			
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr
1520						1525					1530			
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln
1535						1540					1545			
Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
1550						1555					1560			
Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
1565						1570					1575			
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp
1580						1585					1590			
Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly
1595						1600					1605			
Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln
1610						1615					1620			
Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp
1625						1630					1635			
Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg
1640						1645					1650			

ES 2 700 583 T3

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
1655 1660 1665

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1670 1675 1680

Lys

<210> 3

<211> 741

5 <212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacaaaactc acacatgccc accgtgcccc gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc      120
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      180
tgcgtgggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac      240
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      300
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      360
tgcaagggtc ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag      480
aaccagggtc gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc      600
gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggt gcagcagggg      660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccgggtaa a                                              741

```

<210> 4

<211> 247

<212> PRT

15 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1          5          10          15

Gly Ser Thr Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
20          25          30

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
35          40          45

```

ES 2 700 583 T3

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
50 55 60

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp
65 70 75 80

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
85 90 95

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
100 105 110

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu
115 120 125

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
130 135 140

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys
145 150 155 160

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
165 170 175

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
180 185 190

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
195 200 205

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
210 215 220

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
225 230 235 240

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
245

<210> 5

<211> 7734

5 <212> ADN

ES 2 700 583 T3

<213> Homo sapiens

<400> 5

	atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
5	accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120

ES 2 700 583 T3

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
 acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctccta ccatccaggc tgagggtttat 300
 gatacagtggt tcattacact taagaacatg gcttcccac cgtgcagtct tcatgctgtt 360
 ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgacagac cagtcaaagg 420
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
 tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat 720
 gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacaggctc 780
 ctgccaggctc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacat 900
 cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
 gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa 1020
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
 gaagcggag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt cagggttgat 1140
 gatgacaact ctcttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
 cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
 aagtacaaaa aagtcagatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
 attcagcatg aatcaggaat ctggggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg 1440
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
 actaaatcag atcctcggtg cctgacccgc tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaagaatc tgtagatcaa 1740
 agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tcccaatcc agctggagtg 1860
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt 1920
 tttgatagtt tgcagttgtc agtttggttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980

attggagcac	agactgactt	cctttctgtc	ttcttctctg	gatatacctt	caaacacaaa	2040
atggtctatg	aagacacact	caccctattc	ccattctcag	gagaaactgt	cttcatgtcg	2100
atggaaaacc	caggtctatg	gattctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagaggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagtgtg	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttcagc	atacttgctg	agtaaaaaca	atgccattga	accaagaagc	2280
ttctcccaga	attcaagaca	ccctagcact	aggcaaaagc	aatttaatgc	caccacaatt	2340
ccagaaaatg	acatagagaa	gactgaccct	tggtttgcac	acagaacacc	tatgcctaaa	2400
atacaaaatg	tctcctctag	tgatttggtg	atgctcttgc	gacagagtcc	tactccacat	2460
gggctatcct	tatctgatct	ccaagaagcc	aaatatgaga	ctttttctga	tgatccatca	2520
cctggagcaa	tagacagtaa	taacagcctg	tctgaaatga	cacacttcag	gccacagctc	2580
catcacagtg	gggacatggt	atttaccctt	gagtcaggcc	tccaattaag	attaaatgag	2640
aaactgggga	caactgcagc	aacagagttg	aagaaacttg	atttcaaagt	ttctagtaca	2700
tcaaataatc	tgatttcaac	aattccatca	gacaatttgg	cagcaggtac	tgataataca	2760
agttccttag	gacccccaag	tatgccagtt	cattatgata	gtcaattaga	taccactcta	2820
tttggcacaa	agtcacatcc	ccttactgag	tctggtggac	ctctgagctt	gagtgaagaa	2880
aataatgatt	caaagtgtgt	agaatcaggt	ttaatgaata	gccaaagaa	ttcatgggga	2940
aaaaatgtat	cgtcaacaga	gagtggtagg	ttattttaa	ggaaaagagc	tcatggacct	3000
gctttgttga	ctaaagataa	tgcttattc	aaagttagca	tctctttgtt	aaagacaaac	3060
aaaacttcca	ataattcagc	aactaataga	aagactcaca	ttgatggccc	atcattatta	3120
attgagaata	gtccatcagt	ctggcaaaat	atattagaaa	gtgacactga	gtttaaaaaa	3180
gtgacacctt	tgattcatga	cagaatgctt	atggacaaaa	atgctacagc	tttgaggcta	3240
aatcatatgt	caaataaaac	tacttcatca	aaaaacatgg	aatgggtcca	acagaaaaaa	3300
gagggcccca	ttccaccaga	tgacacaaat	ccagatatgt	cgttcttta	gatgctattc	3360
ttgccagaat	cagcaaggtg	gatacaaagg	actcatggaa	agaactctct	gaactctggg	3420
caaggcccca	gtccaaagca	attagtatcc	ttaggaccag	aaaaatctgt	ggaaggtcag	3480
aatttcttgt	ctgagaaaaa	caaagtggta	gtaggaaagg	gtgaatttac	aaaggacgta	3540
ggactcaaag	agatggtttt	tccaagcagc	agaaacctat	ttcttactaa	cttgataat	3600
ttacatgaaa	ataatacaca	caatcaagaa	aaaaaaattc	aggaagaaat	agaaaagaag	3660
gaaacattaa	tccaagagaa	tgtagttttg	cctcagatac	atacagtga	tggcactaag	3720
aatttcatga	agaacctttt	cttactgagc	actaggcaaa	atgtagaagg	ttcatatgac	3780
ggggcatatg	ctccagtact	tcaagatttt	aggtcattaa	atgattcaac	aaatagaaca	3840
aagaaacaca	cagctcattt	ctcaaaaaaa	ggggaggaag	aaaacttgga	aggcttgga	3900

ES 2 700 583 T3

aatcaaacca	agcaaattgt	agagaaatat	gcatgcacca	caaggatatc	tcctaataka	3960
agccagcaga	atthttgtcac	gcaacgtagt	aagagagctt	tgaaacaatt	cagactccca	4020
ctagaagaaa	cagaacttga	aaaaaggata	attgtggatg	acacctcaac	ccagtgggtcc	4080
aaaaacatga	aacattttgac	cccagagcacc	ctcacacaga	tagactacaa	tgagaaggag	4140
aaaggggcca	ttactcagtc	tcccttatca	gattgcctta	cgaggagtca	tagcatccct	4200
caagcaaata	gatctccatt	acccattgca	aaggtatcat	catttccatc	tatttagacct	4260
atatatctga	ccagggtcct	attccaagac	aactcttctc	atcttccagc	agcatcttat	4320
agaaagaaa	attctgggggt	ccaagaaagc	agtcattttct	tacaaggagc	caaaaaaat	4380
aacctttctt	tagccattct	aaccttggag	atgactgggtg	atcaaagaga	ggttgggtcc	4440
ctggggacaa	gtgccacaaa	ttcagtcaca	tacaagaaag	ttgagaacac	tgttctccc	4500
aaaccagact	tgcccaaaac	atctggcaaa	gttgaattgc	ttccaaaagt	tcacatttat	4560
cagaaggacc	tattccctac	ggaaactagc	aatgggtctc	ctggccatct	ggatctcgtg	4620
gaagggagcc	ttcttcaggg	aacagaggga	gcgattaagt	ggaatgaagc	aaacagacct	4680
ggaaaagtcc	cctttctgag	agtagcaaca	gaaagctctg	caaagactcc	ctccaagcta	4740
ttggatcctc	ttgcttggga	taaccactat	ggtactcaga	taccaaaga	agagtggaaa	4800
tcccaagaga	agtcaccaga	aaaaacagct	tttaagaaaa	aggataccat	tttgtccctg	4860
aacgcttggtg	aaagcaatca	tgcaatagca	gcaataaatg	agggacaaaa	taagcccga	4920
atagaagtca	cctgggcaaa	gcaaggtagg	actgaaaggc	tgtgctctca	aaaccacca	4980
gtcttgaaac	gccatcaacg	ggaaataact	cgtactactc	ttcagtcaga	tcaagaggaa	5040
attgactatg	atgataccat	atcagttgaa	atgaagaagg	aagattttga	catttatgat	5100
gaggatgaaa	atcagagccc	ccgcagcttt	caaaagaaaa	cacgacacta	ttttattgct	5160
gcagtggaga	ggctctggga	ttatgggatg	agtagctccc	cacatgttct	aagaaacagg	5220
gctcagagtg	gcagtgtccc	tcagttcaag	aaagttgttt	tccaggaatt	tactgatggc	5280
tcctttactc	agcccttata	ccgtggagaa	ctaaatgaac	atttgggact	cctggggcca	5340
tatataagag	cagaagttga	agataatatc	atggtaactt	tcagaaatca	ggcctctcgt	5400
ccctattcct	tctattctag	ccttatttct	tatgaggaag	atcagaggca	aggagcagaa	5460
cctagaaaaa	actttgtcaa	gcctaataaa	accaaactt	acttttggaa	agtgcaacat	5520
catatggcac	ccactaaaga	tgagtttgac	tgcaaagcct	gggcttattt	ctctgatgtt	5580
gacctggaaa	aagatgtgca	ctcaggcctg	attggacccc	ttctgggtctg	ccacactaac	5640
acactgaacc	ctgctcatgg	gagacaagtg	acagtacagg	aatttgctct	gtttttcacc	5700
atctttgatg	agaccaaag	ctgggtacttc	actgaaaata	tggaagaaa	ctgcagggct	5760

ES 2 700 583 T3

ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc	5820
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga	5880
tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat	5940
gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt	6000
gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt	6060
attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt	6120
cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga	6180
caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc	6240
tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aaagtgatc tgttggcacc aatgattatt	6300
cacggcatca agaccaggg tgcccgctcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt	6360
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga	6420
accttaatgg tcttcttttg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac	6480
cctccaatta ttgctcgata catcogtttg caccocactc attatagcat tcgcagcact	6540
cttcgcgatg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag	6600
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcatcct actttaccaaa tatgtttgcc	6660
acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctgggacact	6720
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca	6780
ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc	6840
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtggt actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag	6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctccctcaca cctgtggtga actctctaga ccacccgtta	6960
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg	7020
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg ccacccgtgc	7080
ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac	7140
accctcatga tctcccgga ccttgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa	7200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca	7260
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg tacctgtgtg tcagcgtcct caccgtcctg	7320
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca	7380
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac	7440
accctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc	7500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac	7560
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgga tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag	7620
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgtc cgtgatgcat	7680
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa	7734

ES 2 700 583 T3

<210> 6
<211> 2578
<212> PRT
5 <213> Homo sapiens

<400> 6

ES 2 700 583 T3

Met	Gln	Ile	Glu	Leu	Ser	Thr	Cys	Phe	Phe	Leu	Cys	Leu	Leu	Arg	Phe	1	5	10	15
Cys	Phe	Ser	Ala	Thr	Arg	Arg	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ala	Val	Glu	Leu	Ser	20	25	30	
Trp	Asp	Tyr	Met	Gln	Ser	Asp	Leu	Gly	Glu	Leu	Pro	Val	Asp	Ala	Arg	35	40	45	
Phe	Pro	Pro	Arg	Val	Pro	Lys	Ser	Phe	Pro	Phe	Asn	Thr	Ser	Val	Val	50	55	60	
Tyr	Lys	Lys	Thr	Leu	Phe	Val	Glu	Phe	Thr	Asp	His	Leu	Phe	Asn	Ile	65	70	75	80
Ala	Lys	Pro	Arg	Pro	Pro	Trp	Met	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Ile	Gln	85	90	95	
Ala	Glu	Val	Tyr	Asp	Thr	Val	Val	Ile	Thr	Leu	Lys	Asn	Met	Ala	Ser	100	105	110	
His	Pro	Val	Ser	Leu	His	Ala	Val	Gly	Val	Ser	Tyr	Trp	Lys	Ala	Ser	115	120	125	
Glu	Gly	Ala	Glu	Tyr	Asp	Asp	Gln	Thr	Ser	Gln	Arg	Glu	Lys	Glu	Asp	130	135	140	
Asp	Lys	Val	Phe	Pro	Gly	Gly	Ser	His	Thr	Tyr	Val	Trp	Gln	Val	Leu	145	150	155	160
Lys	Glu	Asn	Gly	Pro	Met	Ala	Ser	Asp	Pro	Leu	Cys	Leu	Thr	Tyr	Ser	165	170	175	
Tyr	Leu	Ser	His	Val	Asp	Leu	Val	Lys	Asp	Leu	Asn	Ser	Gly	Leu	Ile	180	185	190	
Gly	Ala	Leu	Leu	Val	Cys	Arg	Glu	Gly	Ser	Leu	Ala	Lys	Glu	Lys	Thr	195	200	205	

ES 2 700 583 T3

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220
 Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240
 Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255
 Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270
 Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285
 Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
 450 455 460

ES 2 700 583 T3

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu
 465 470 475 480
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720

ES 2 700 583 T3

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
725 730 735

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
740 745 750

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
755 760 765

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
770 775 780

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
785 790 795 800

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
805 810 815

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
820 825 830

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
835 840 845

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
850 855 860

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
865 870 875 880

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
885 890 895

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
900 905 910

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
915 920 925

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
930 935 940

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
945 950 955 960

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu

ES 2 700 583 T3

				965						970						975
Ser	Ser	Trp	Gly	Lys	Asn	Val	Ser	Ser	Thr	Glu	Ser	Gly	Arg	Leu	Phe	
			980						985				990			
Lys	Gly	Lys	Arg	Ala	His	Gly	Pro	Ala	Leu	Leu	Thr	Lys	Asp	Asn	Ala	
		995					1000					1005				
Leu	Phe	Lys	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Leu	Lys	Thr	Asn	Lys	Thr	Ser		
	1010					1015					1020					
Asn	Asn	Ser	Ala	Thr	Asn	Arg	Lys	Thr	His	Ile	Asp	Gly	Pro	Ser		
	1025					1030					1035					
Leu	Leu	Ile	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Val	Trp	Gln	Asn	Ile	Leu	Glu		
	1040					1045					1050					
Ser	Asp	Thr	Glu	Phe	Lys	Lys	Val	Thr	Pro	Leu	Ile	His	Asp	Arg		
	1055					1060					1065					
Met	Leu	Met	Asp	Lys	Asn	Ala	Thr	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	His	Met		
	1070					1075					1080					
Ser	Asn	Lys	Thr	Thr	Ser	Ser	Lys	Asn	Met	Glu	Met	Val	Gln	Gln		
	1085					1090					1095					
Lys	Lys	Glu	Gly	Pro	Ile	Pro	Pro	Asp	Ala	Gln	Asn	Pro	Asp	Met		
	1100					1105					1110					
Ser	Phe	Phe	Lys	Met	Leu	Phe	Leu	Pro	Glu	Ser	Ala	Arg	Trp	Ile		
	1115					1120					1125					
Gln	Arg	Thr	His	Gly	Lys	Asn	Ser	Leu	Asn	Ser	Gly	Gln	Gly	Pro		
	1130					1135					1140					
Ser	Pro	Lys	Gln	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Pro	Glu	Lys	Ser	Val	Glu		
	1145					1150					1155					
Gly	Gln	Asn	Phe	Leu	Ser	Glu	Lys	Asn	Lys	Val	Val	Val	Gly	Lys		
	1160					1165					1170					
Gly	Glu	Phe	Thr	Lys	Asp	Val	Gly	Leu	Lys	Glu	Met	Val	Phe	Pro		
	1175					1180					1185					
Ser	Ser	Arg	Asn	Leu	Phe	Leu	Thr	Asn	Leu	Asp	Asn	Leu	His	Glu		
	1190					1195					1200					

ES 2 700 583 T3

Asn	Asn	Thr	His	Asn	Gln	Glu	Lys	Lys	Ile	Gln	Glu	Glu	Ile	Glu
1205						1210					1215			
Lys	Lys	Glu	Thr	Leu	Ile	Gln	Glu	Asn	Val	Val	Leu	Pro	Gln	Ile
1220						1225					1230			
His	Thr	Val	Thr	Gly	Thr	Lys	Asn	Phe	Met	Lys	Asn	Leu	Phe	Leu
1235						1240					1245			
Leu	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Val	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ala	Tyr
1250						1255					1260			
Ala	Pro	Val	Leu	Gln	Asp	Phe	Arg	Ser	Leu	Asn	Asp	Ser	Thr	Asn
1265						1270					1275			
Arg	Thr	Lys	Lys	His	Thr	Ala	His	Phe	Ser	Lys	Lys	Gly	Glu	Glu
1280						1285					1290			
Glu	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Gly	Asn	Gln	Thr	Lys	Gln	Ile	Val	Glu
1295						1300					1305			
Lys	Tyr	Ala	Cys	Thr	Thr	Arg	Ile	Ser	Pro	Asn	Thr	Ser	Gln	Gln
1310						1315					1320			
Asn	Phe	Val	Thr	Gln	Arg	Ser	Lys	Arg	Ala	Leu	Lys	Gln	Phe	Arg
1325						1330					1335			
Leu	Pro	Leu	Glu	Glu	Thr	Glu	Leu	Glu	Lys	Arg	Ile	Ile	Val	Asp
1340						1345					1350			
Asp	Thr	Ser	Thr	Gln	Trp	Ser	Lys	Asn	Met	Lys	His	Leu	Thr	Pro
1355						1360					1365			
Ser	Thr	Leu	Thr	Gln	Ile	Asp	Tyr	Asn	Glu	Lys	Glu	Lys	Gly	Ala
1370						1375					1380			
Ile	Thr	Gln	Ser	Pro	Leu	Ser	Asp	Cys	Leu	Thr	Arg	Ser	His	Ser
1385						1390					1395			
Ile	Pro	Gln	Ala	Asn	Arg	Ser	Pro	Leu	Pro	Ile	Ala	Lys	Val	Ser
1400						1405					1410			
Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe
1415						1420					1425			
Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys
1430						1435					1440			

ES 2 700 583 T3

Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys
1445						1450					1455			
Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly
1460						1465					1470			
Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser
1475						1480					1485			
Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp
1490						1495					1500			
Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His
1505						1510					1515			
Ile	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser
1520						1525					1530			
Pro	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr
1535						1540					1545			
Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val
1550						1555					1560			
Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser
1565						1570					1575			
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln
1580						1585					1590			
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys
1595						1600					1605			
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys
1610						1615					1620			
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys
1625						1630					1635			
Pro	Glu	Ile	Glu	Val	Thr	Trp	Ala	Lys	Gln	Gly	Arg	Thr	Glu	Arg
1640						1645					1650			
Leu	Cys	Ser	Gln	Asn	Pro	Pro	Val	Leu	Lys	Arg	His	Gln	Arg	Glu
1655						1660					1665			
Ile	Thr	Arg	Thr	Thr	Leu	Gln	Ser	Asp	Gln	Glu	Glu	Ile	Asp	Tyr
1670						1675					1680			

ES 2 700 583 T3

Asp	Asp	Thr	Ile	Ser	Val	Glu	Met	Lys	Lys	Glu	Asp	Phe	Asp	Ile
1685						1690					1695			
Tyr	Asp	Glu	Asp	Glu	Asn	Gln	Ser	Pro	Arg	Ser	Phe	Gln	Lys	Lys
1700						1705					1710			
Thr	Arg	His	Tyr	Phe	Ile	Ala	Ala	Val	Glu	Arg	Leu	Trp	Asp	Tyr
1715						1720					1725			
Gly	Met	Ser	Ser	Ser	Pro	His	Val	Leu	Arg	Asn	Arg	Ala	Gln	Ser
1730						1735					1740			
Gly	Ser	Val	Pro	Gln	Phe	Lys	Lys	Val	Val	Phe	Gln	Glu	Phe	Thr
1745						1750					1755			
Asp	Gly	Ser	Phe	Thr	Gln	Pro	Leu	Tyr	Arg	Gly	Glu	Leu	Asn	Glu
1760						1765					1770			
His	Leu	Gly	Leu	Leu	Gly	Pro	Tyr	Ile	Arg	Ala	Glu	Val	Glu	Asp
1775						1780					1785			
Asn	Ile	Met	Val	Thr	Phe	Arg	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Ser
1790						1795					1800			
Phe	Tyr	Ser	Ser	Leu	Ile	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Gln	Arg	Gln	Gly
1805						1810					1815			
Ala	Glu	Pro	Arg	Lys	Asn	Phe	Val	Lys	Pro	Asn	Glu	Thr	Lys	Thr
1820						1825					1830			
Tyr	Phe	Trp	Lys	Val	Gln	His	His	Met	Ala	Pro	Thr	Lys	Asp	Glu
1835						1840					1845			
Phe	Asp	Cys	Lys	Ala	Trp	Ala	Tyr	Phe	Ser	Asp	Val	Asp	Leu	Glu
1850						1855					1860			
Lys	Asp	Val	His	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Val	Cys	His
1865						1870					1875			
Thr	Asn	Thr	Leu	Asn	Pro	Ala	His	Gly	Arg	Gln	Val	Thr	Val	Gln
1880						1885					1890			
Glu	Phe	Ala	Leu	Phe	Phe	Thr	Ile	Phe	Asp	Glu	Thr	Lys	Ser	Trp
1895						1900					1905			
Tyr	Phe	Thr	Glu	Asn	Met	Glu	Arg	Asn	Cys	Arg	Ala	Pro	Cys	Asn

1910		1915		1920
Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His 1925 1930 1935				
Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met 1940 1945 1950				
Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser 1955 1960 1965				
Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr 1970 1975 1980				
Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr 1985 1990 1995				
Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly 2000 2005 2010				
Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly 2015 2020 2025				
Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro 2030 2035 2040				
Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala 2045 2050 2055				
Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His 2060 2065 2070				
Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser 2075 2080 2085				
Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile 2090 2095 2100				
Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser 2105 2110 2115				
Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr 2120 2125 2130				
Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn 2135 2140 2145				

Val	Asp	Ser	Ser	Gly	Ile	Lys	His	Asn	Ile	Phe	Asn	Pro	Pro	Ile
2150						2155					2160			
Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Arg	Leu	His	Pro	Thr	His	Tyr	Ser	Ile	Arg
2165						2170					2175			
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn	Ser	Cys
2180						2185					2190			
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp	Ala	Gln
2195						2200					2205			
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr	Trp	Ser
2210						2215					2220			
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Ala	Trp
2225						2230					2235			
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val	Asp	Phe
2240						2245					2250			
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly	Val	Lys
2255						2260					2265			
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile	Ser	Ser
2270						2275					2280			
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn	Gly	Lys
2285						2290					2295			
Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro	Val	Val
2300						2305					2310			
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg	Ile	His
2315						2320					2325			
Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu	Val	Leu
2330						2335					2340			
Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro
2345						2350					2355			
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu
2360						2365					2370			
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro
2375						2380					2385			

ES 2 700 583 T3

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

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido quimérico que comprende una porción de Factor VIII y una porción Fc para usar con el fin de reducir una respuesta inmunitaria inhibitoria al Factor VIII en un sujeto humano, donde el sujeto ha desarrollado una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el Factor VIII.
2. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde la porción del Factor VIII comprende Factor VIII procesado o Factor VIII monocatenario o una combinación de estos.
3. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria al Factor VIII comprende la producción de anticuerpos inhibidores al Factor VIII, una respuesta inmunitaria mediada por células, o un síntoma clínico seleccionado de entre el grupo compuesto por mayor tendencia a la hemorragia, consumo elevado de Factor VIII, falta de respuesta a terapia con Factor VIII, menor eficacia de terapia con Factor VIII, semivida más breve de Factor VIII
4. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria al Factor VIII comprende la producción de anticuerpos inhibidores anti-Factor VIII.
5. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 4, donde la concentración de los anticuerpos anti-Factor VIII es al menos 0,6 unidades Bethesda (UB).
6. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 4 o 5, donde la concentración de los anticuerpos anti-Factor VIII es al menos 1,0 UB.
7. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el sujeto es un feto.
8. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 7, donde el polipéptido quimérico se ha de administrar a la madre del feto.
9. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la respuesta inmunitaria inhibitoria al Factor VIII se selecciona de entre el grupo compuesto por:
 - a) liberación de IL-12;
 - b) liberación de IL-4; y
 - c) liberación de TNF- α .
10. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que
 - (a) reduce la cantidad de anticuerpos anti-Factor VIII en el sujeto en comparación con la cantidad antes de la administración del polipéptido quimérico;
 - (b) reduce la titulación de anticuerpos anti-Factor VIII en el sujeto en comparación con la titulación antes de la administración del polipéptido quimérico; y/o
 - (c) reduce el nivel de una citocina en el sujeto en comparación con el nivel antes de la administración del polipéptido quimérico.
11. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el sujeto se identifica por tener una o más características seleccionadas de entre el grupo compuesto por:
 - (a) tiene una mutación o eliminación en el gen que codifica el Factor VIII;
 - (b) tiene un reordenamiento en el gen que codifica el Factor VIII;
 - (c) tiene un familiar que desarrolló previamente una respuesta inmunitaria inhibitoria contra el Factor VIII;
 - (d) recibe terapia con interferón;
 - (e) recibe terapia antiviral; y
 - (f) tiene una mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el Factor VIII que está ligado a un riesgo mayor de desarrollar una respuesta inmunitaria inhibitoria.
12. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con la reivindicación 11, donde la mutación genética en un gen que no es el gen que codifica el Factor VIII comprende una mutación seleccionada de entre el grupo compuesto por:

- (a) un polimorfismo genético asociado con TNF- α aumentado; y
- (b) un polimorfismo genético asociado con IL10 aumentada.

13. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde
5 la porción de Factor VIII comprende FVIII humano que tiene una eliminación total o parcial del dominio B.

14. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que
es un híbrido monómero-dímero que comprende un primer polipéptido que comprende la porción de Factor VIII y la
porción Fc y un segundo polipéptido quimérico compuesto por una porción Fc.
10

15. El polipéptido quimérico para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que
es apropiado para disminuir un episodio hemorrágico, tratar una afección hemorrágica, o ambos.

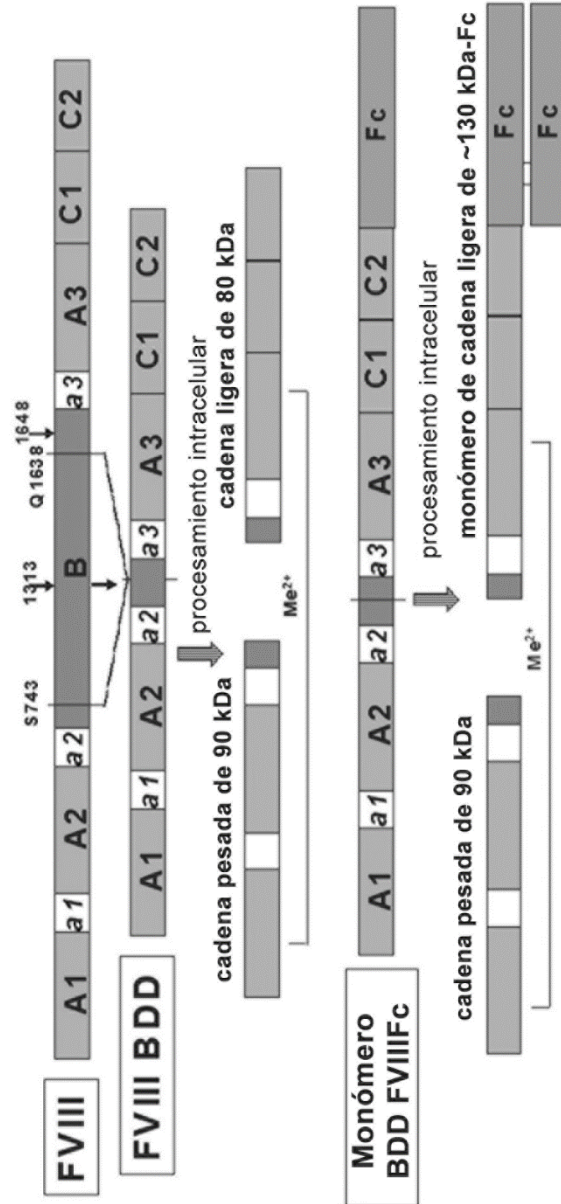


Figura 1

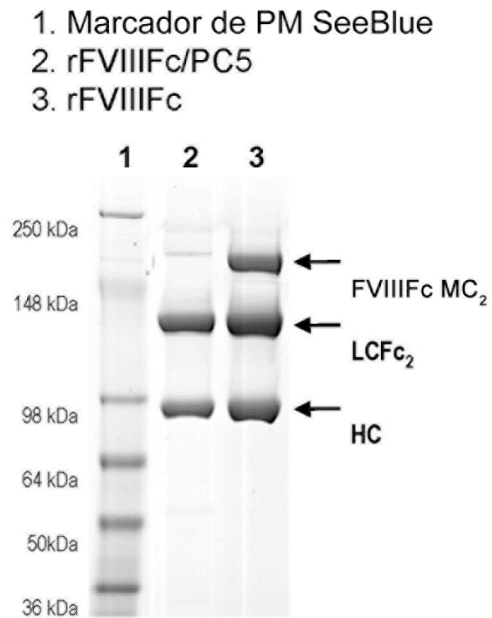


Figura 2A

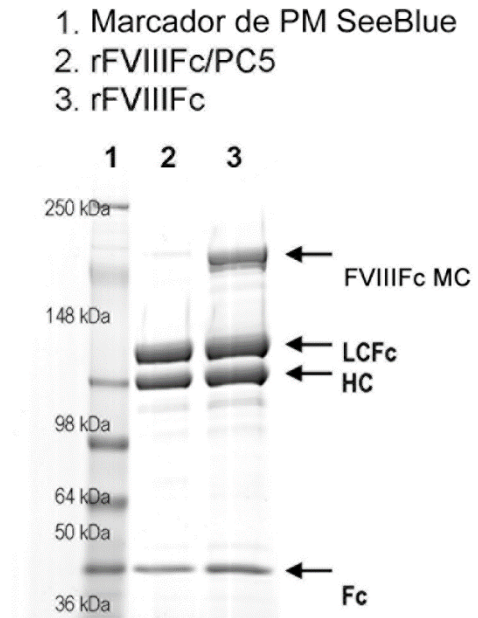


Figura 2B

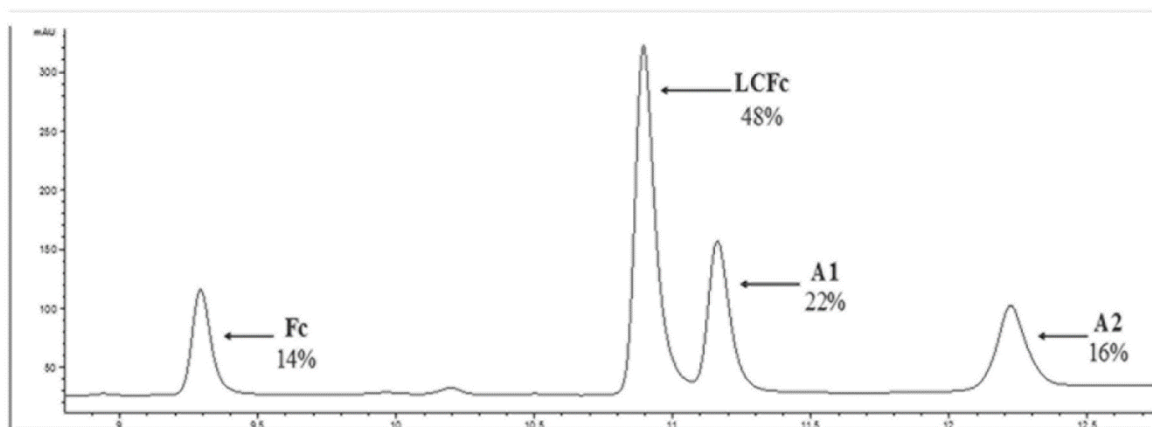


Figura 2C

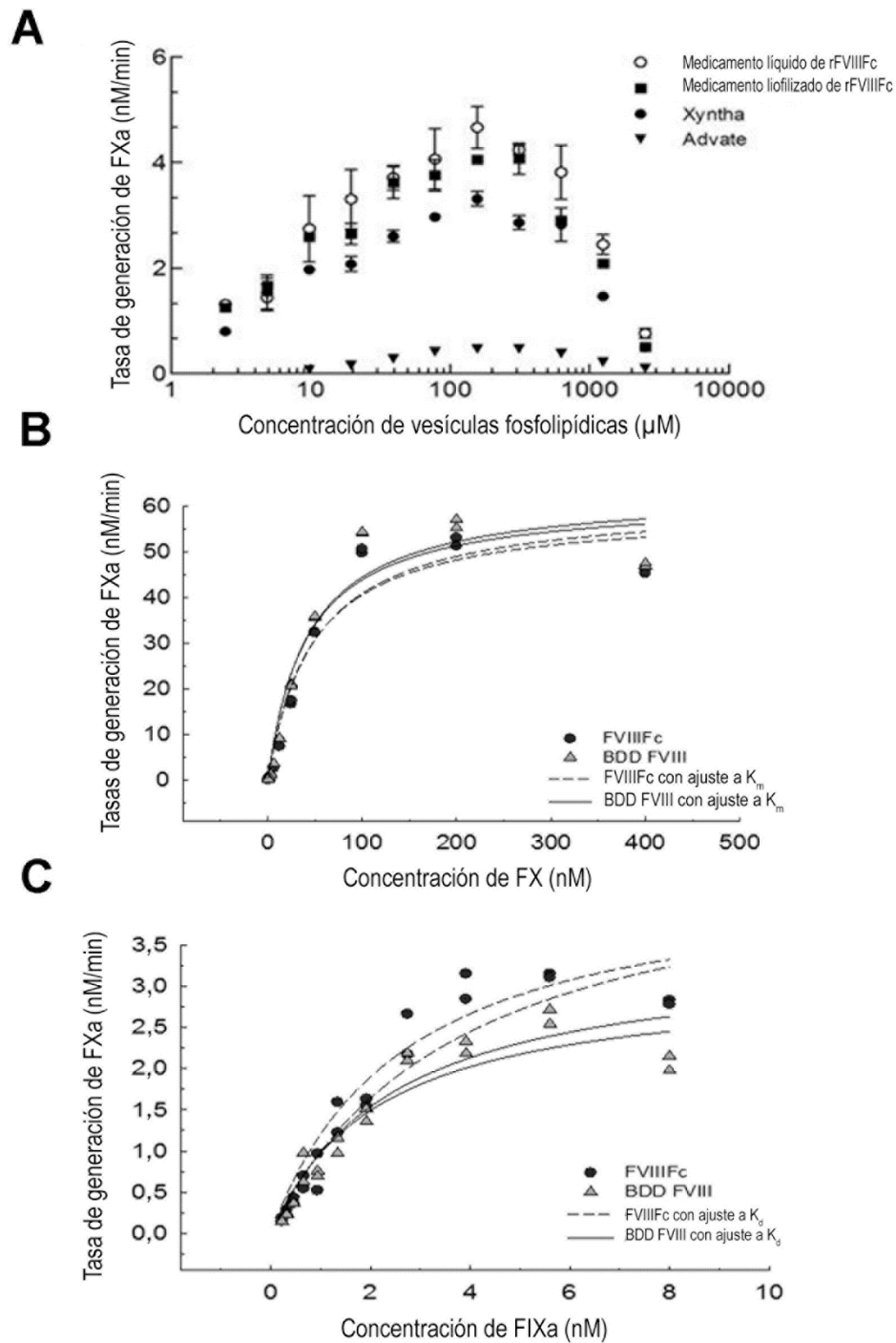


Figura 3

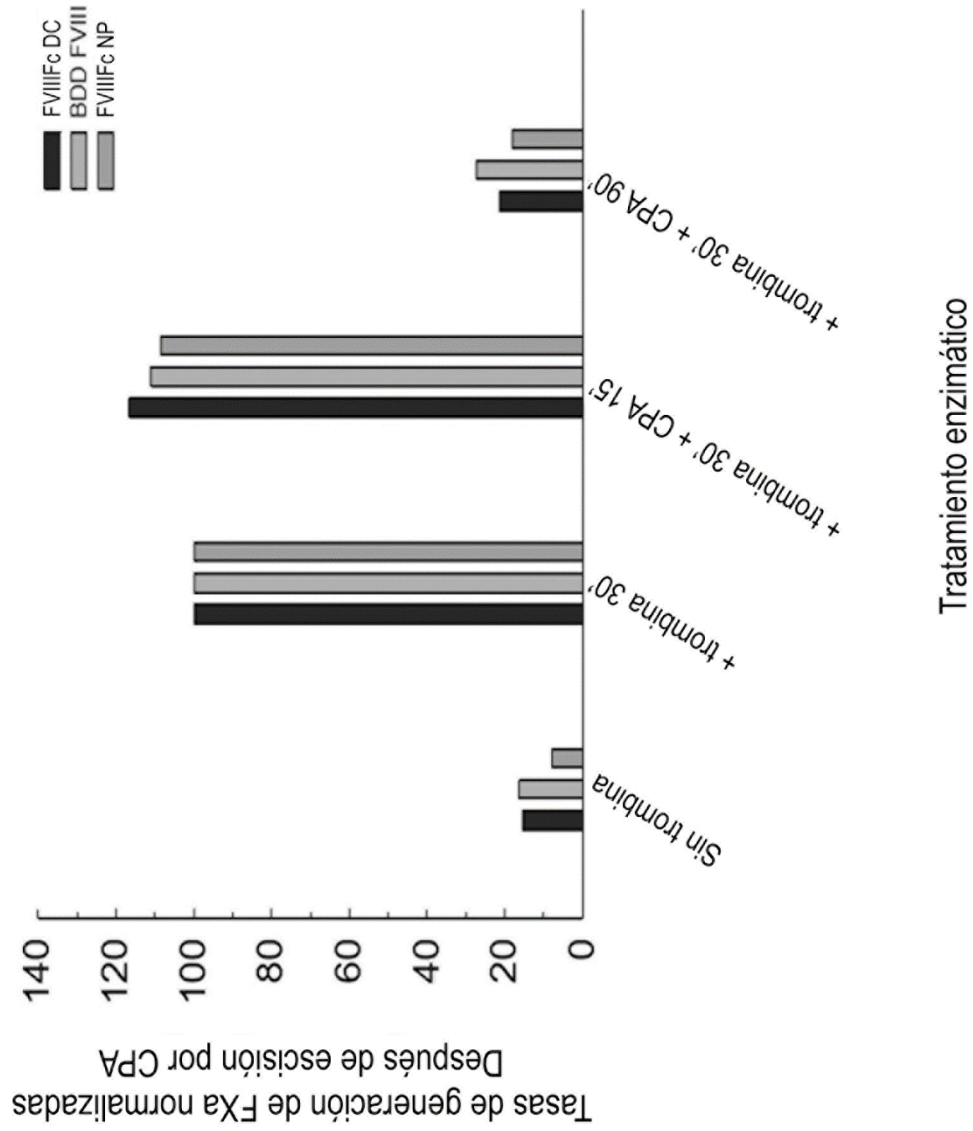


Figura 4

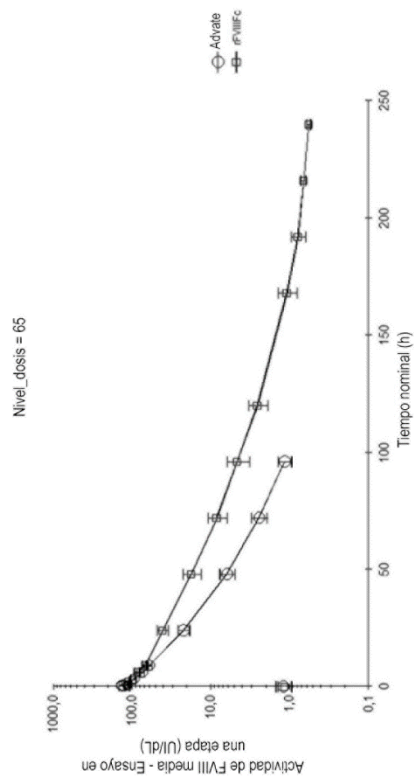


Figura 5B

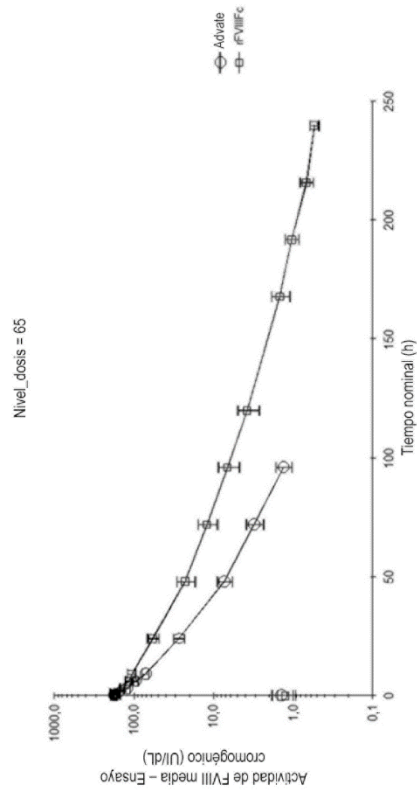


Figura 5D

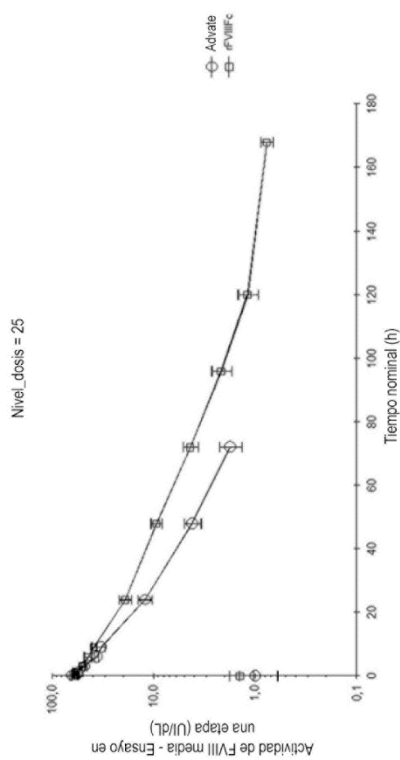


Figura 5A

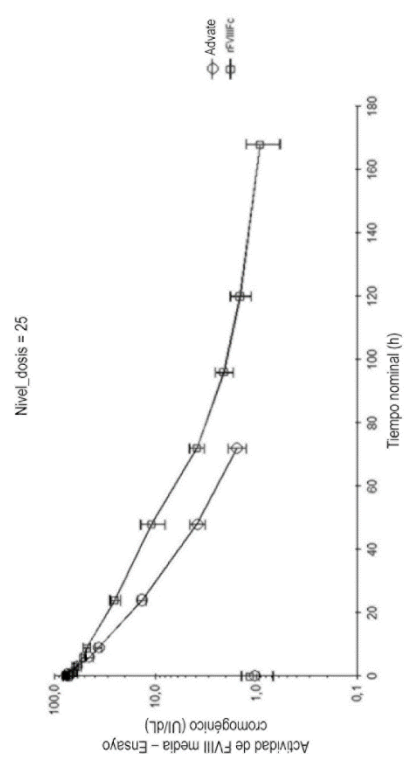


Figura 5C

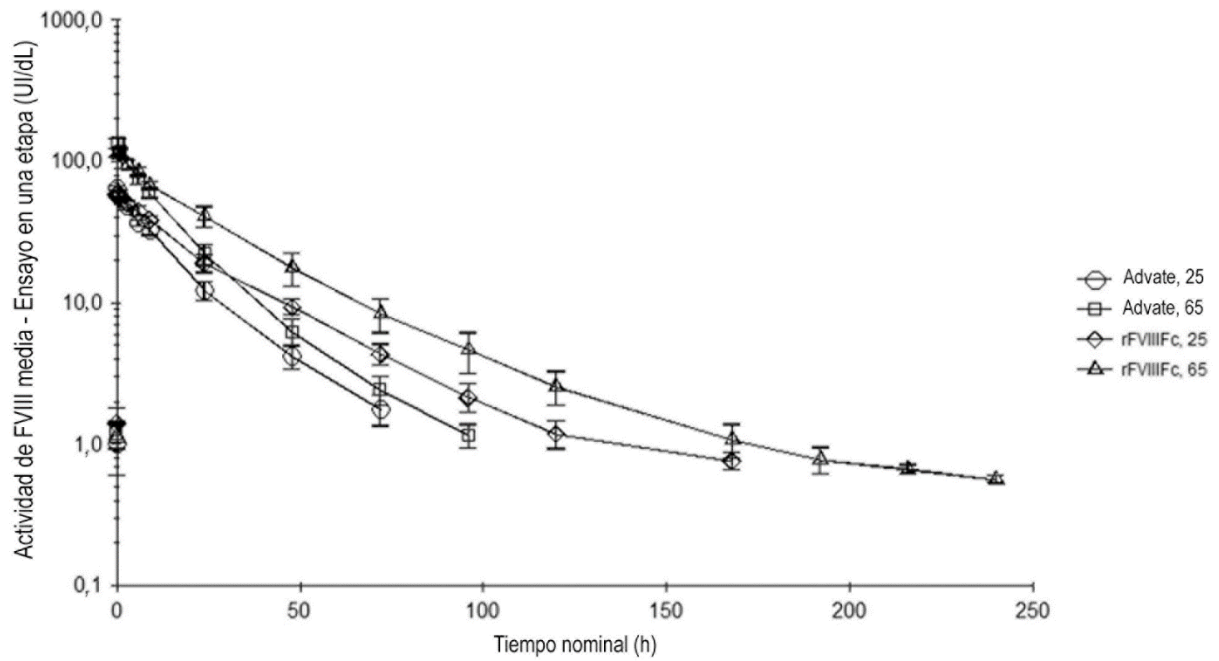


Figura 6A

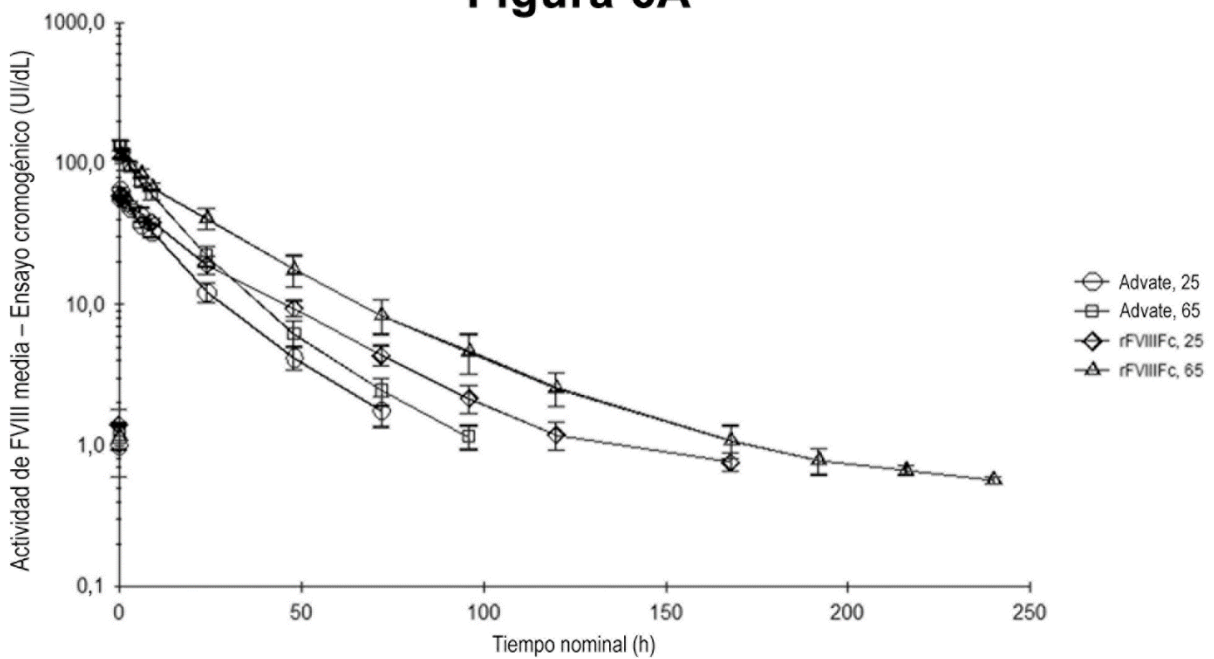


Figura 6B

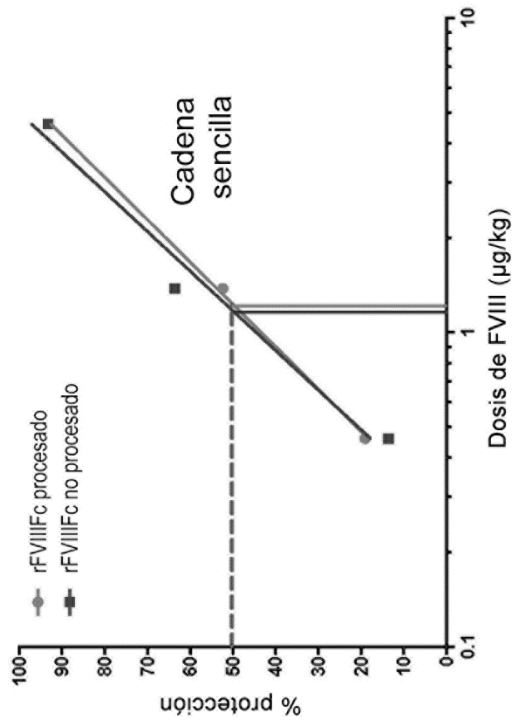


Figura 7A

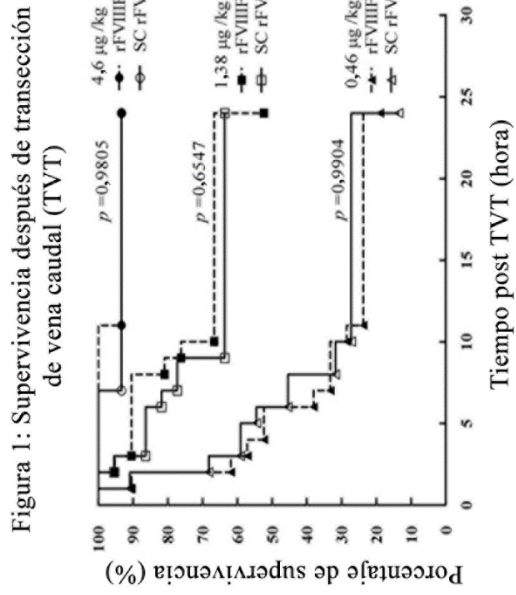


Figura 7B

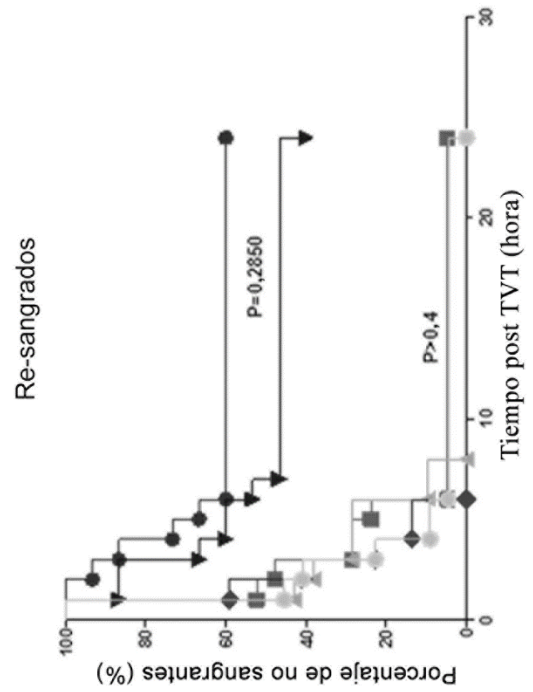


Figura 7C

Diseño de estudio

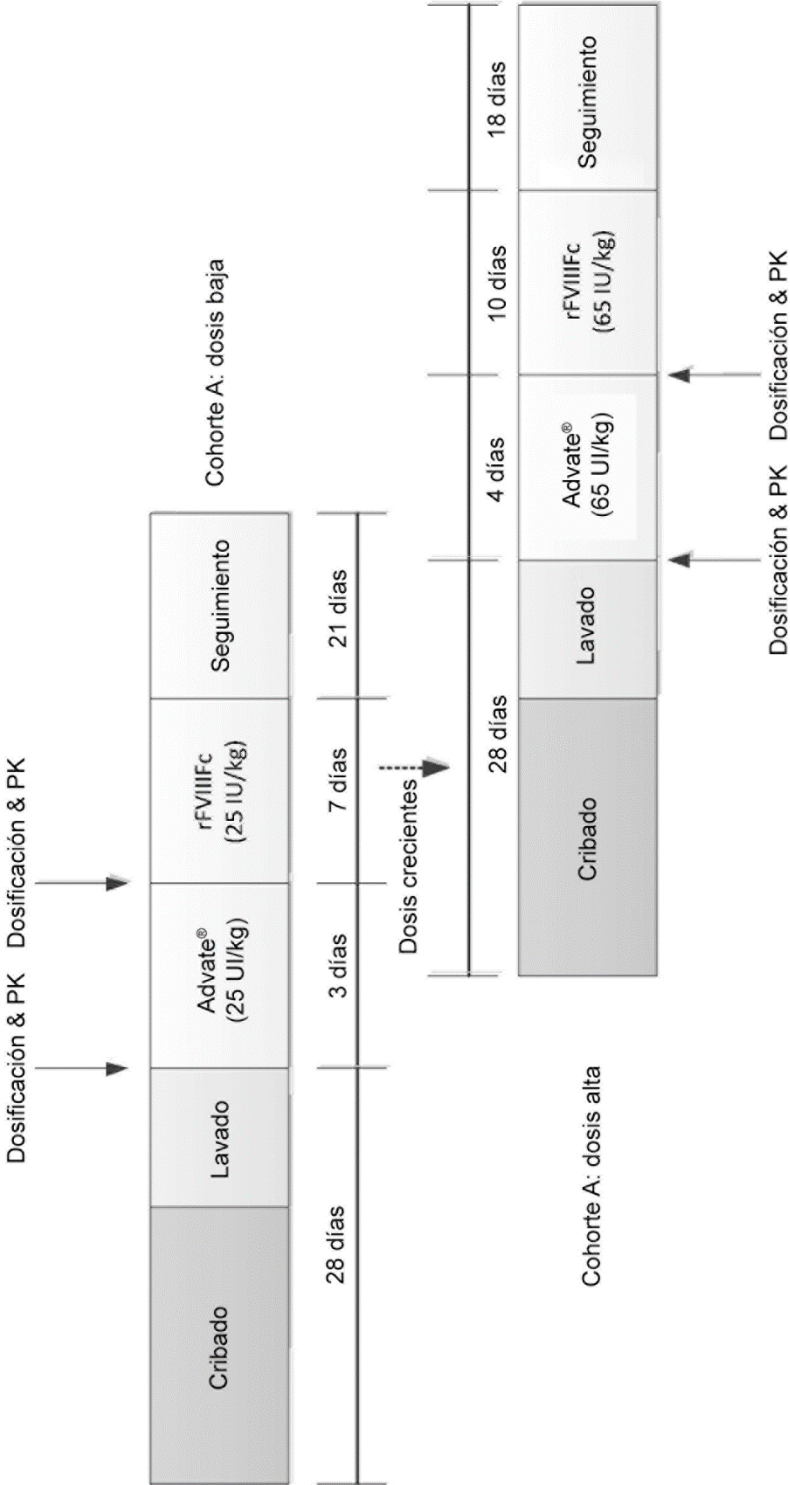


Figura 8

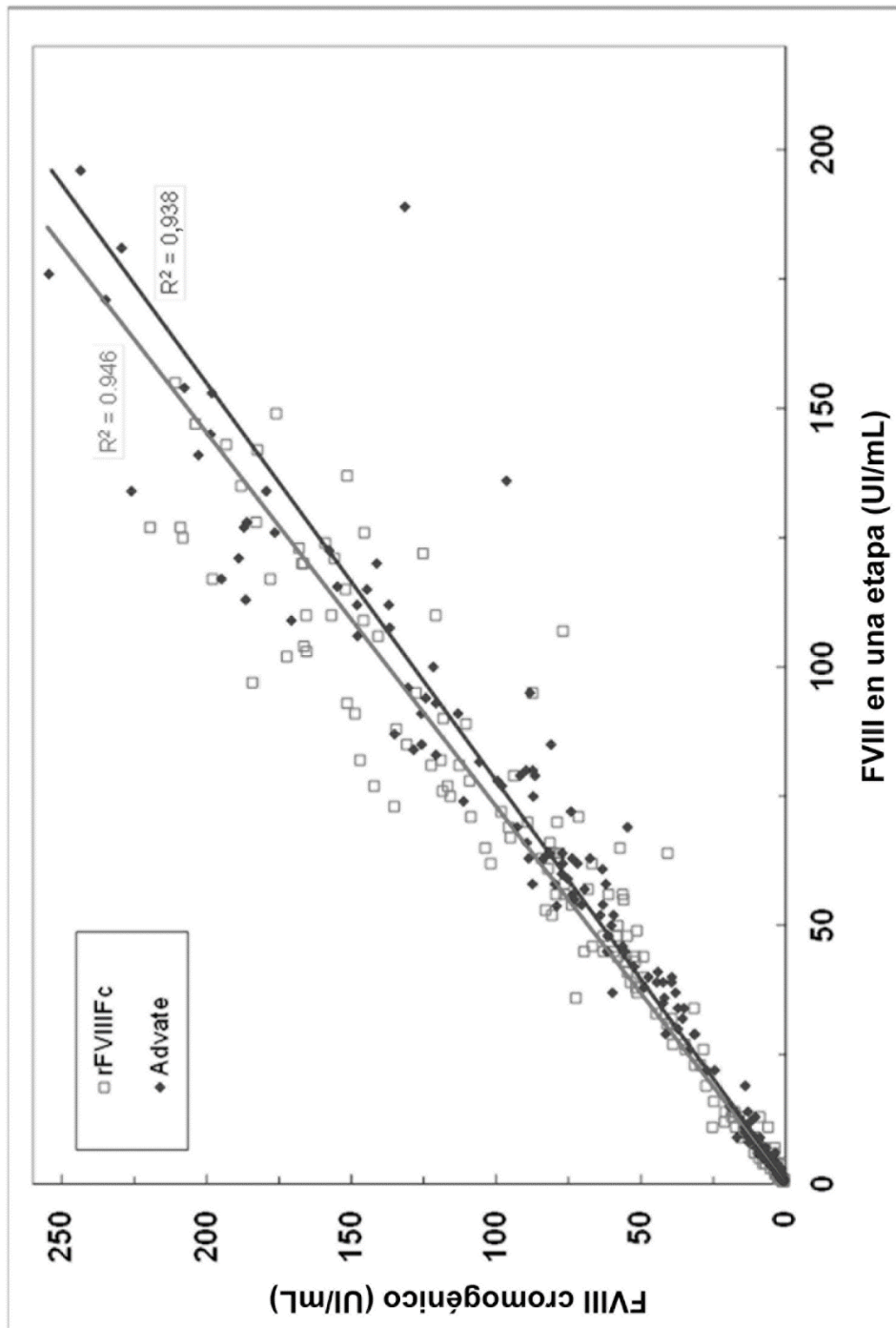


Figura 9

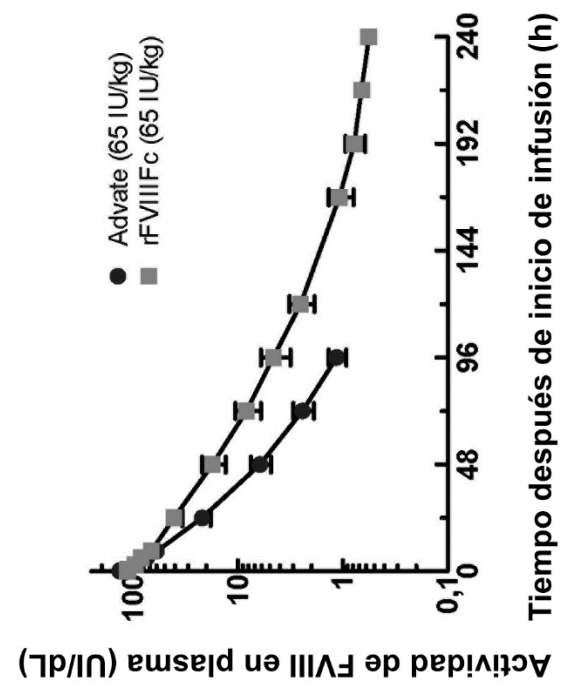


Figura 10B

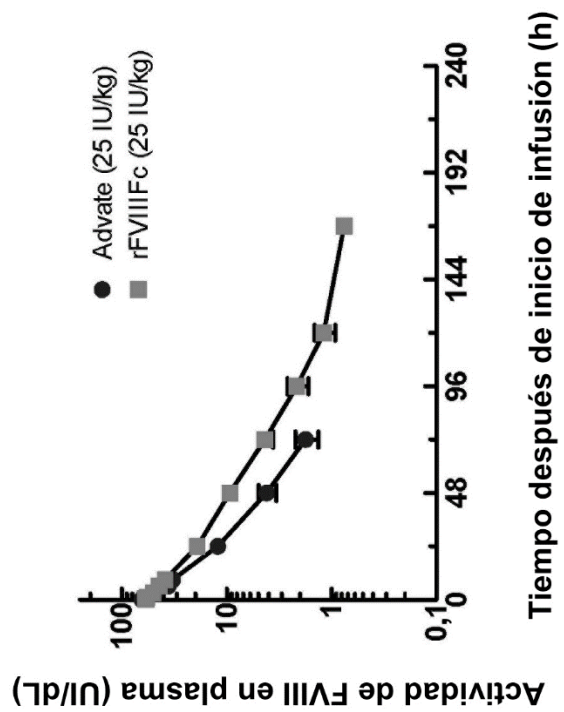


Figura 10A

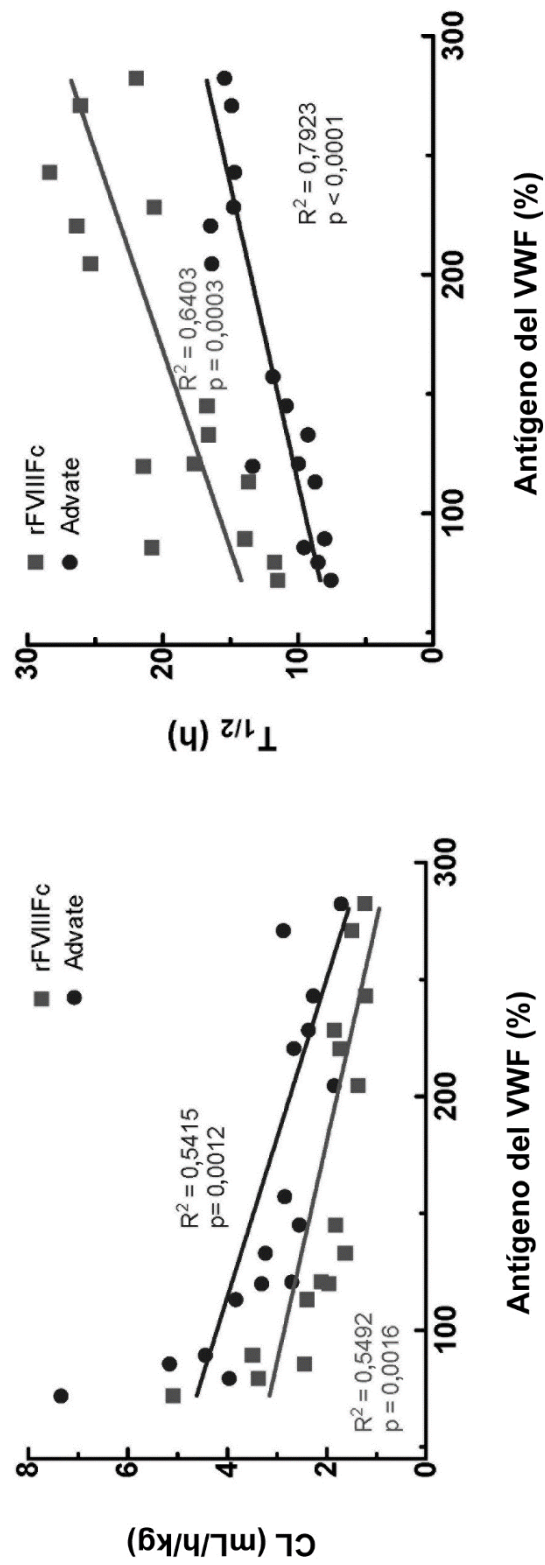


Figura 11A

Figura 11B

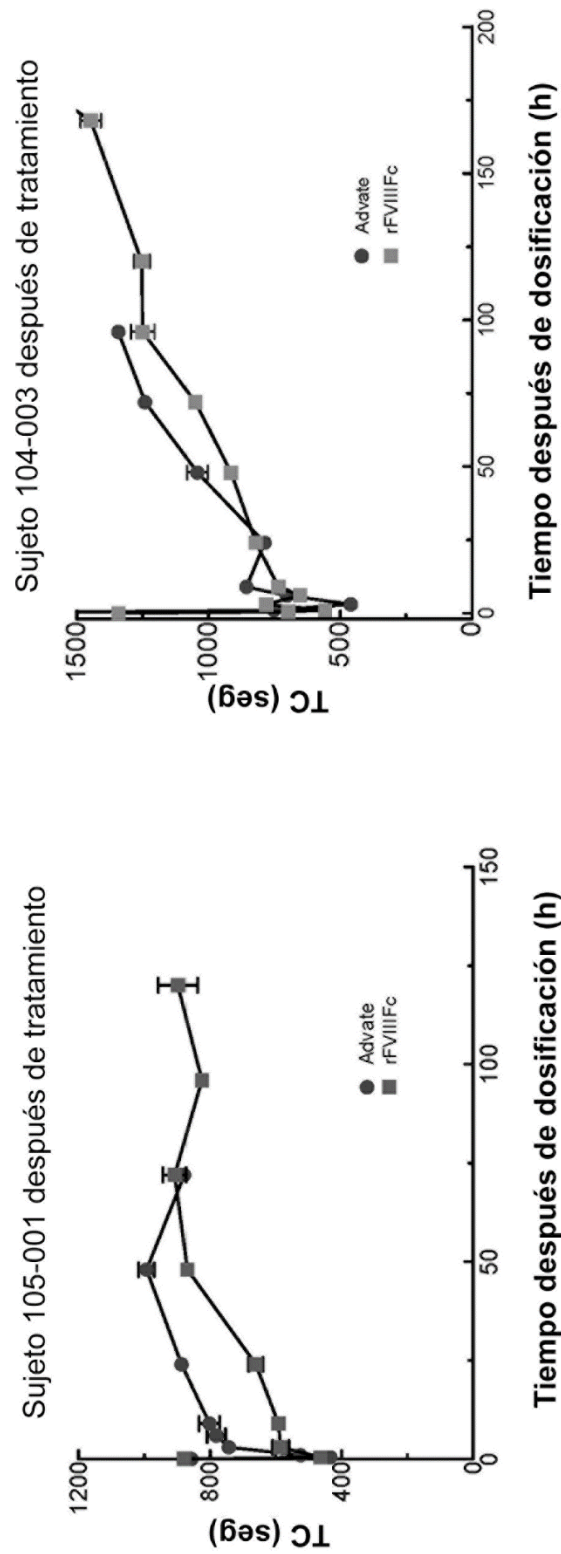


Figura 12A

Figura 12B

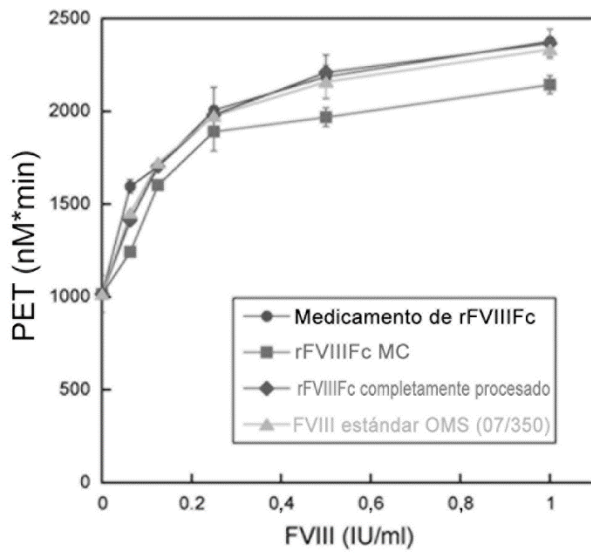


Figura 13A

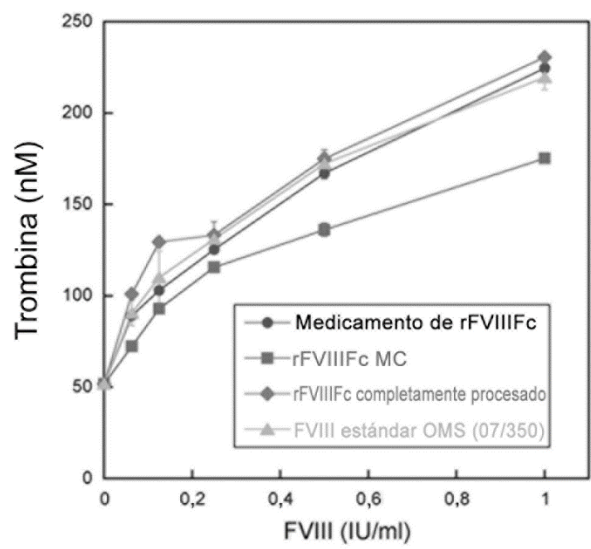


Figura 13B

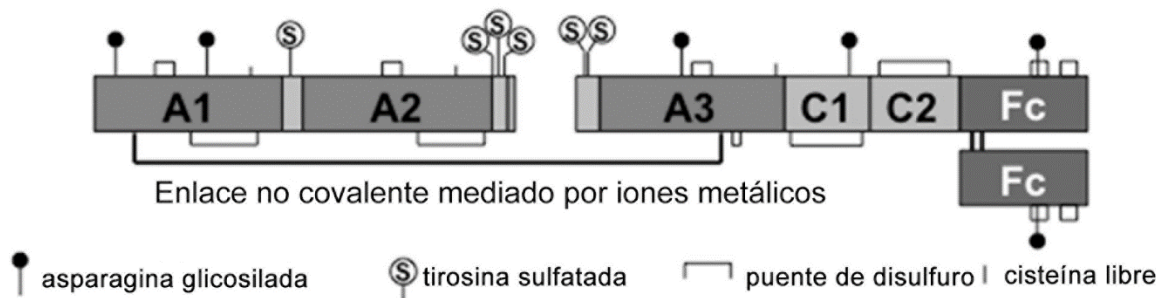


Figura 14

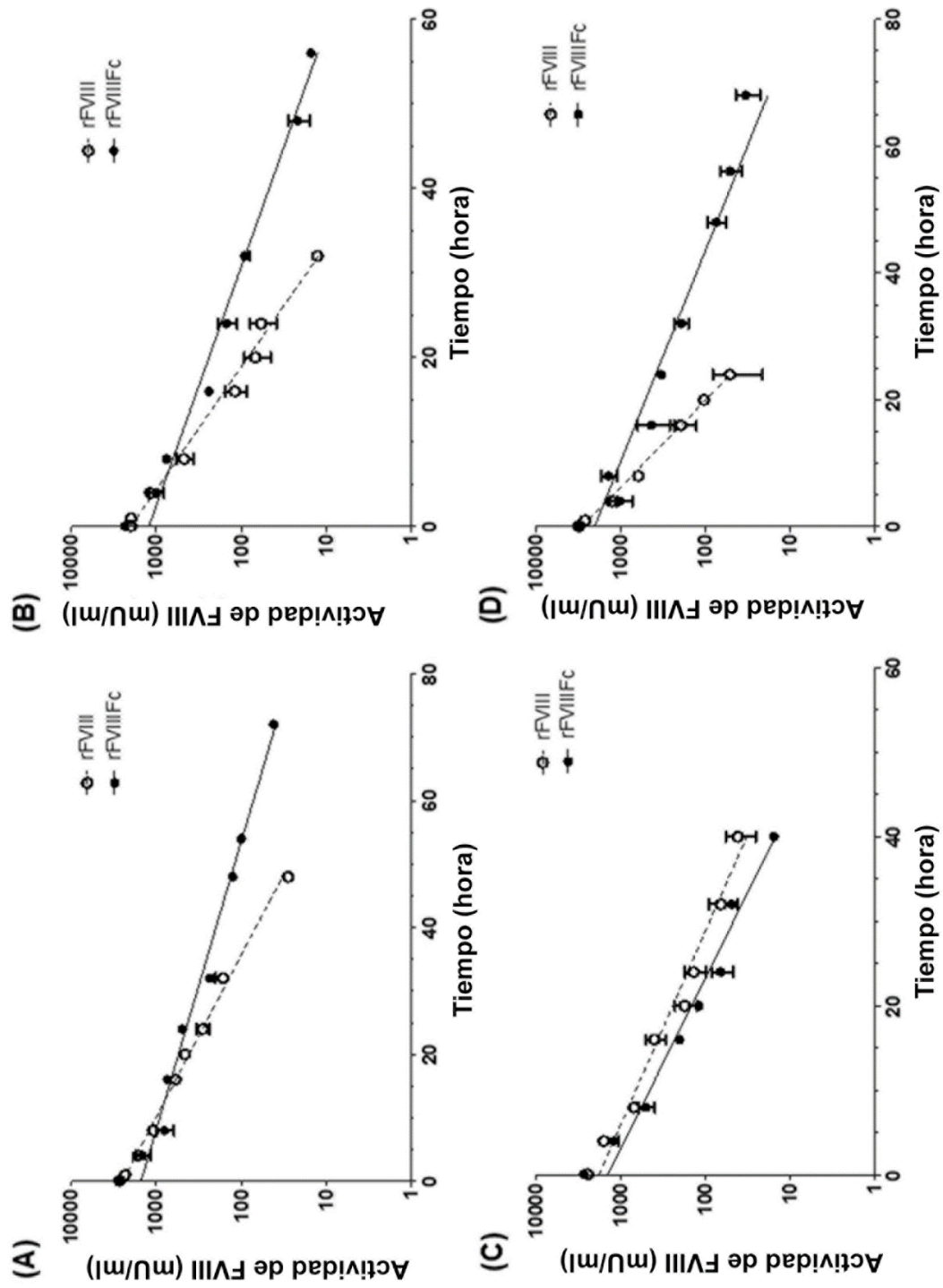


Figura 15A

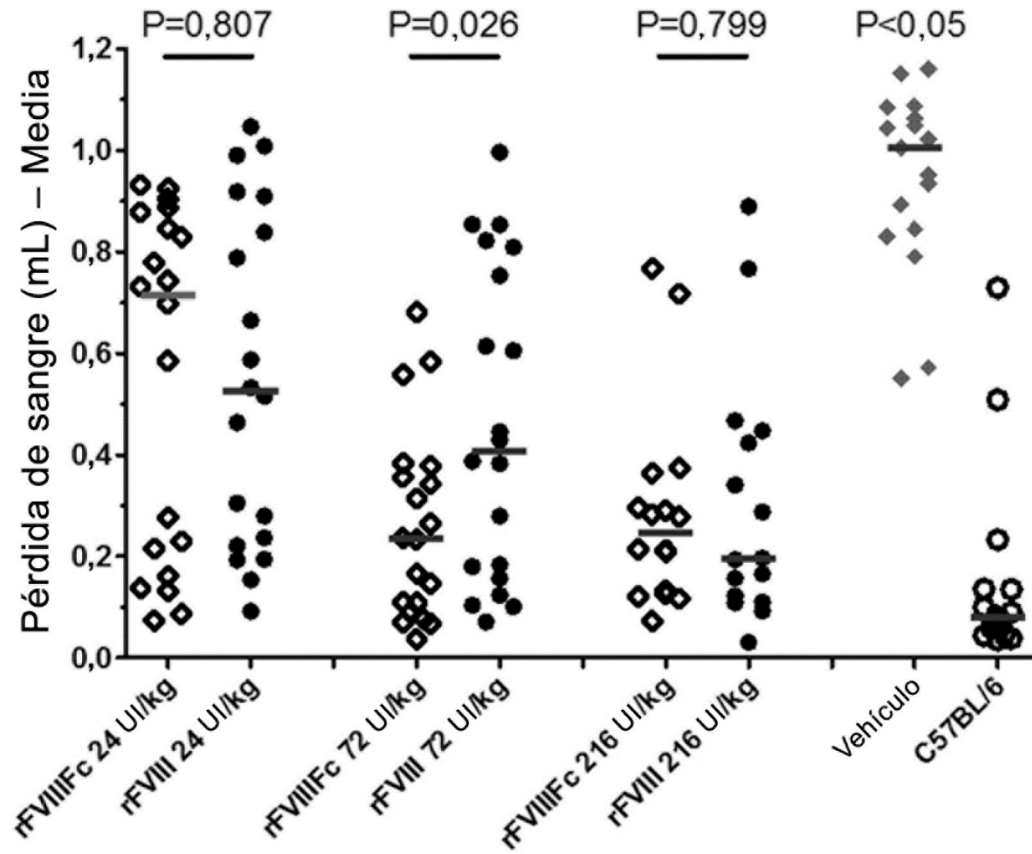


Figura 16A

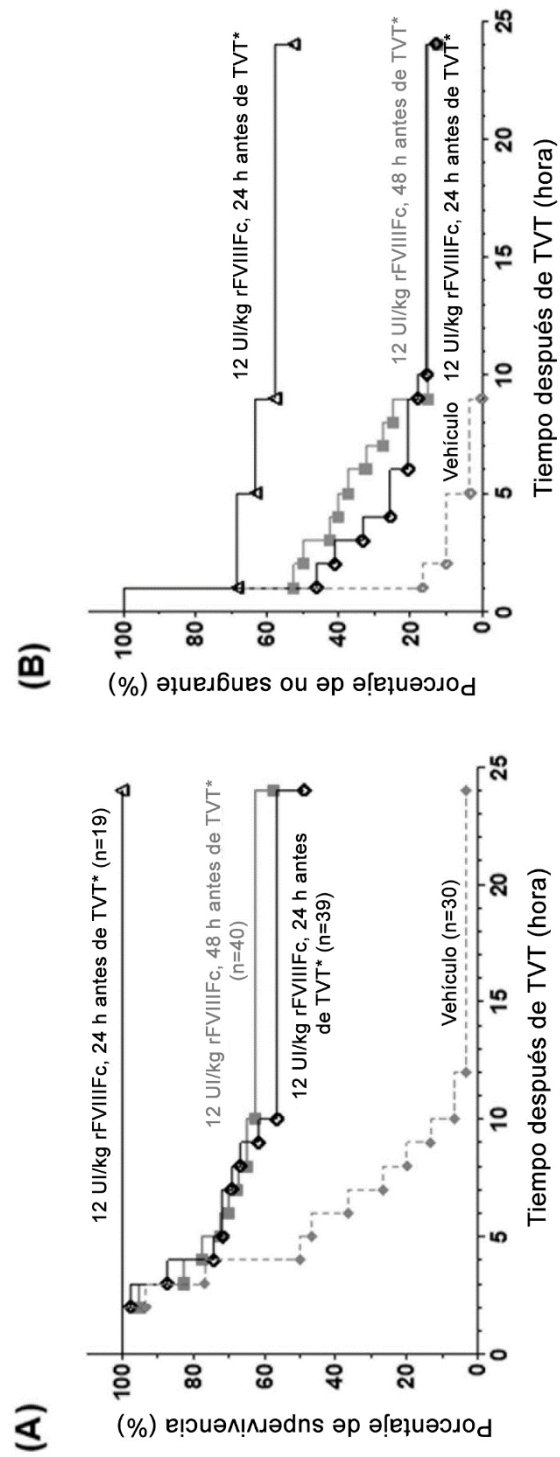
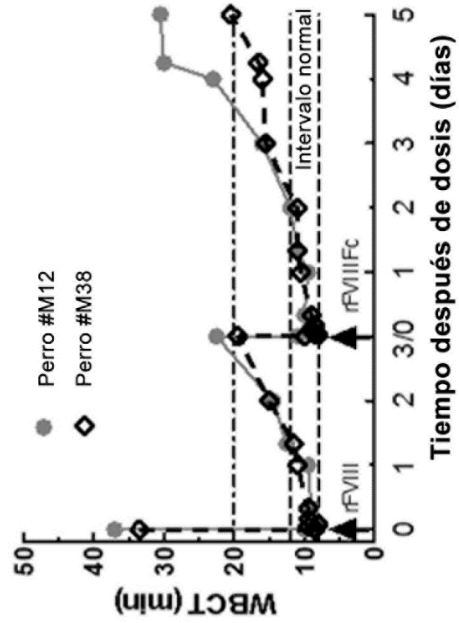


Figura 17

B. rFVIII seguido de rFVIII-Fc en estudio cruzado



A. rFVIII-Fc

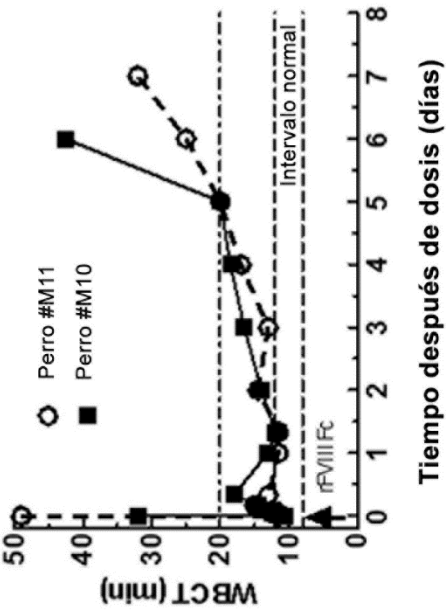
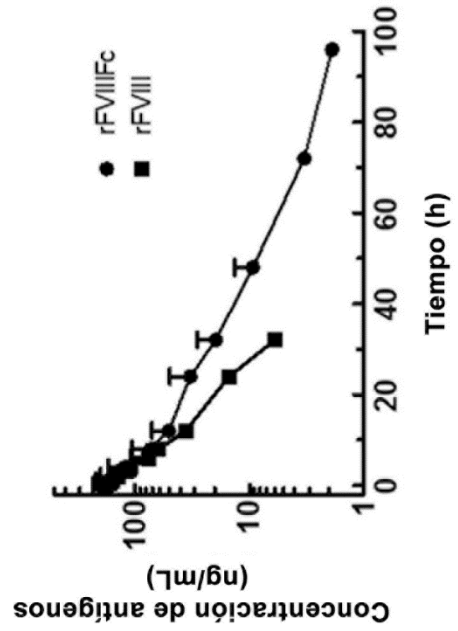


Figura 18

A.



B.

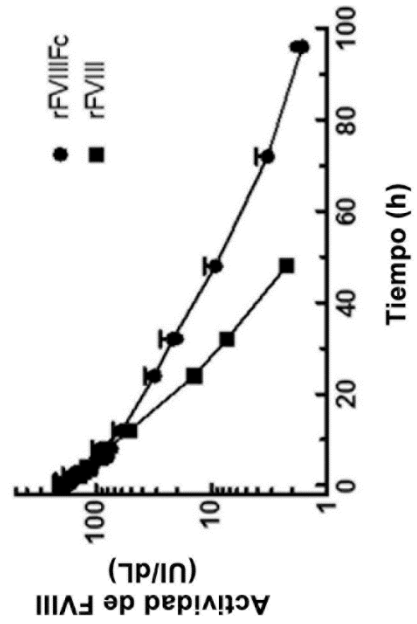


Figura 19

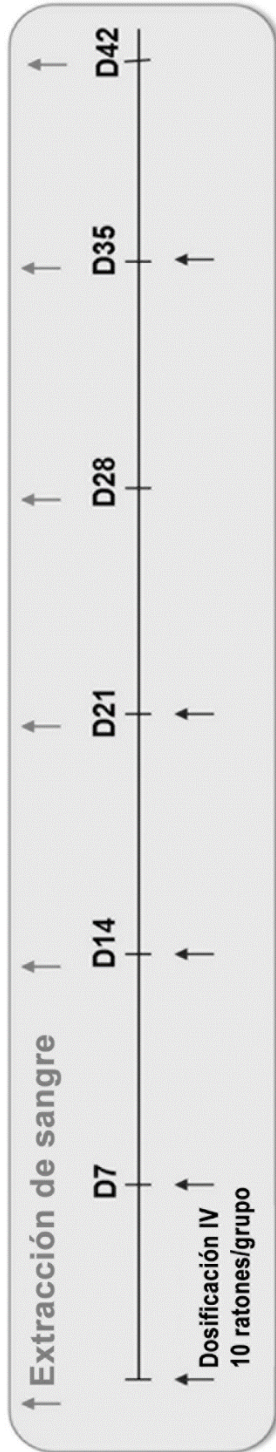


Figura 20

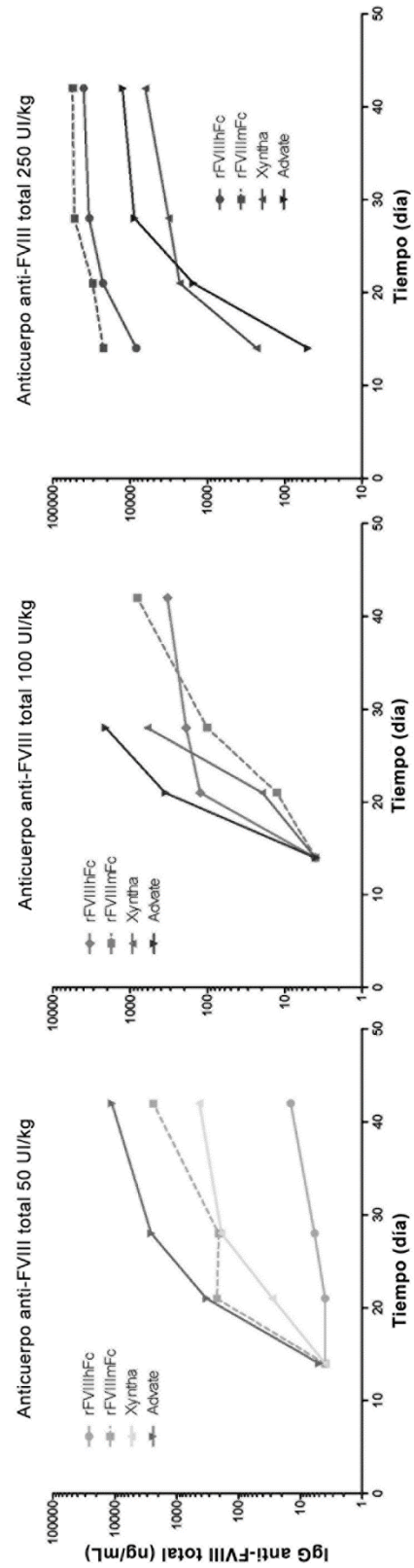


Figura 21C

Figura 21B

Figura 21A

Figura 22B

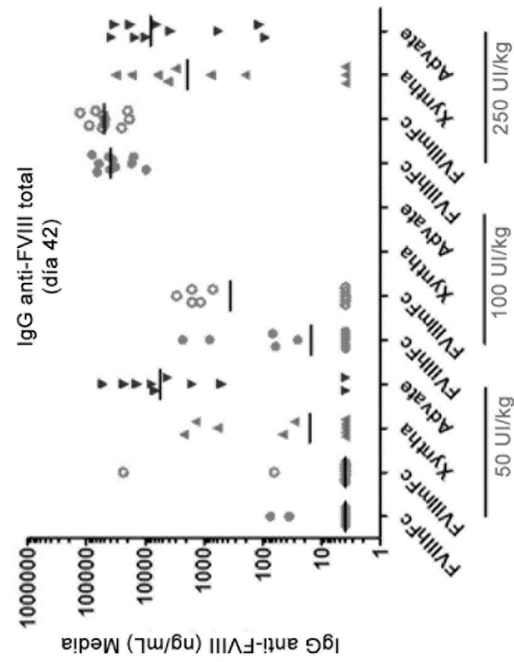
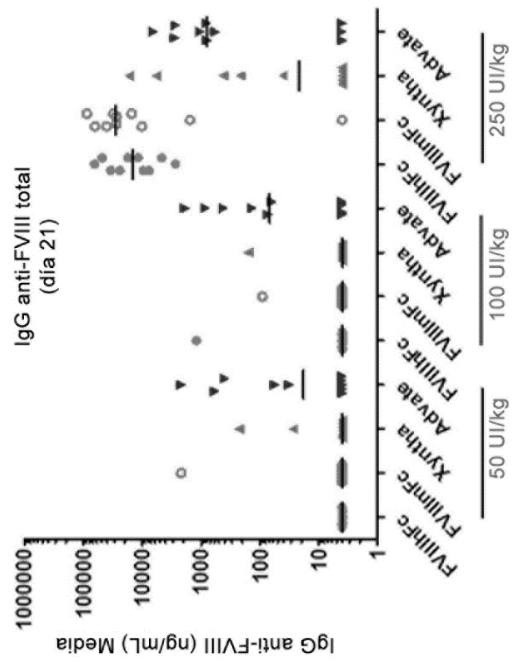


Figura 22D

Figura 22A

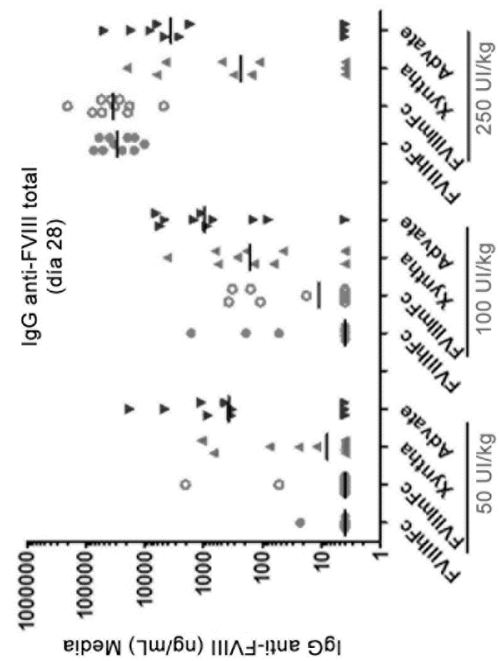
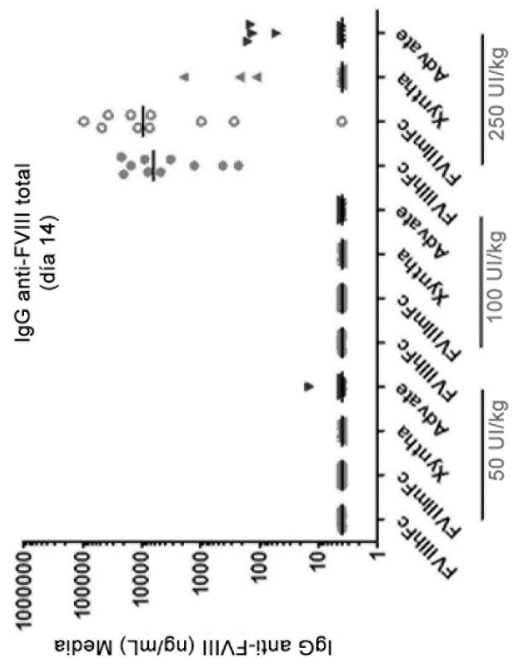
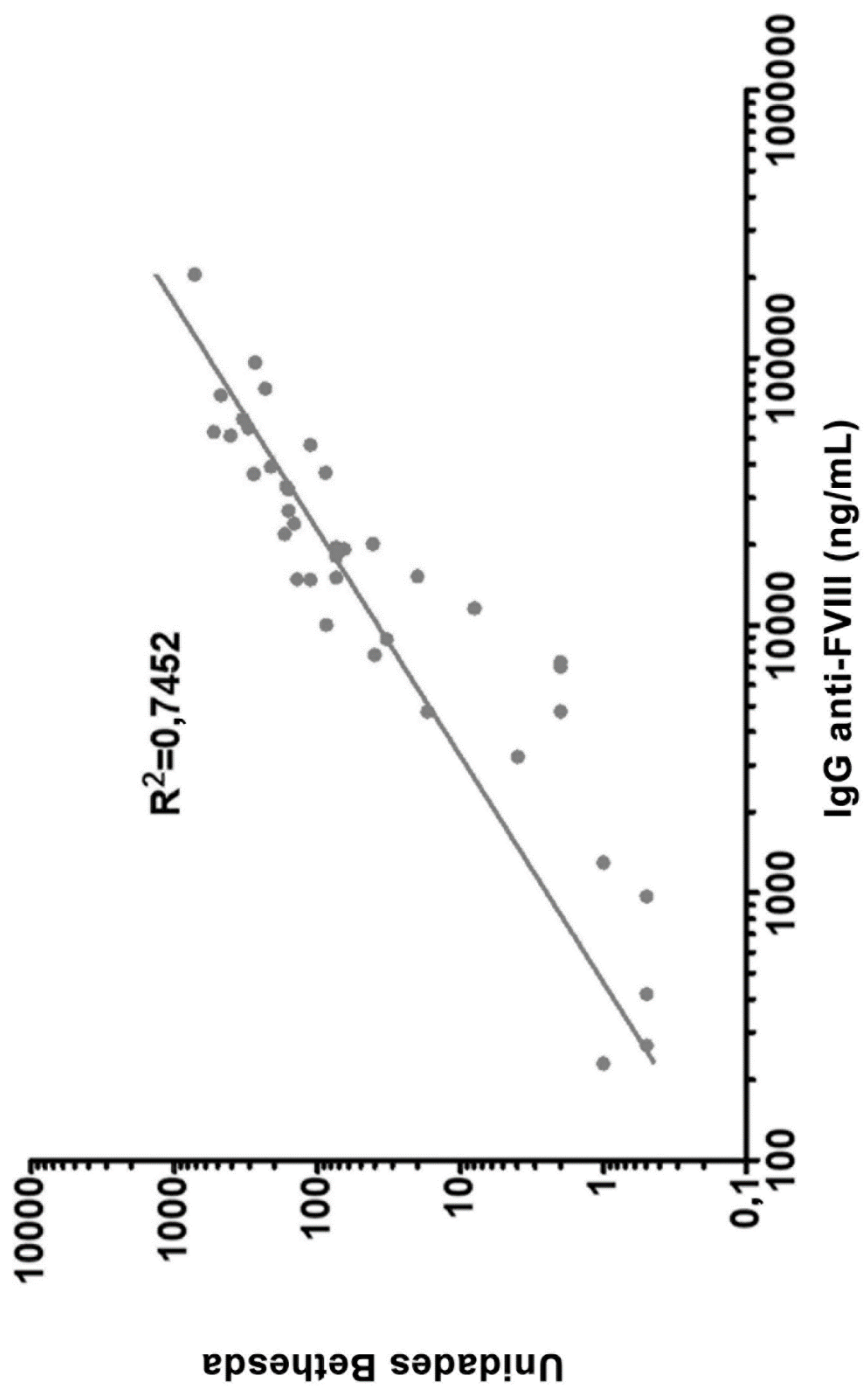


Figura 22C



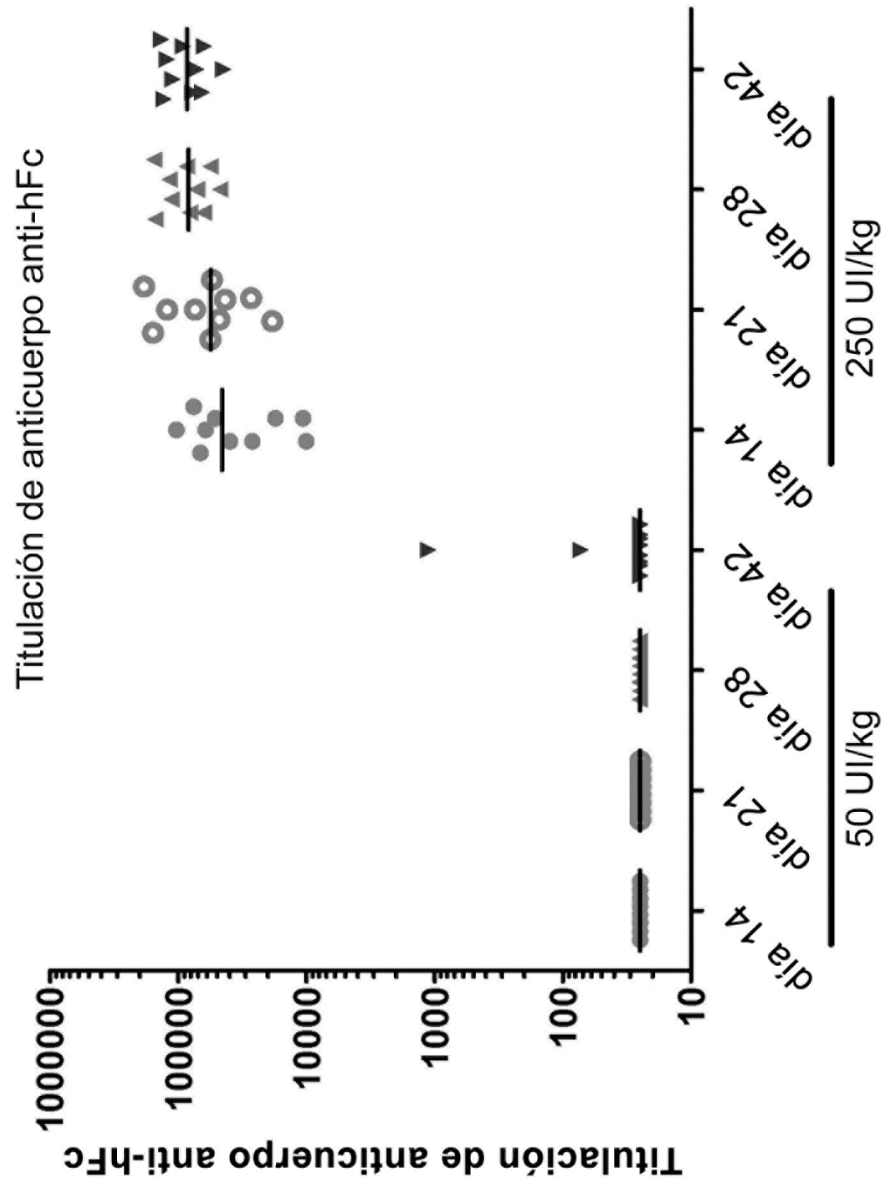


Figura 24

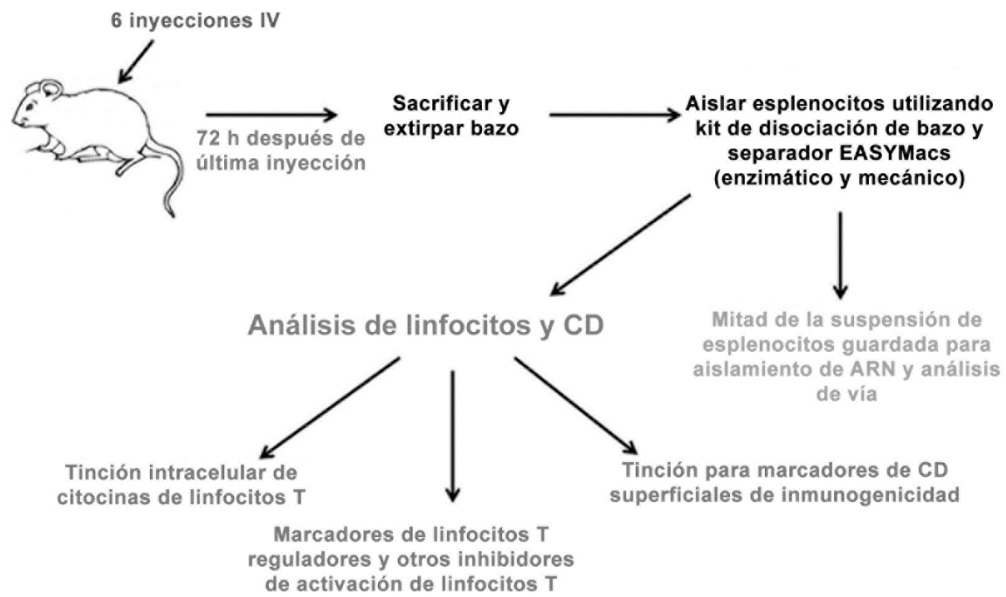


Figura 25

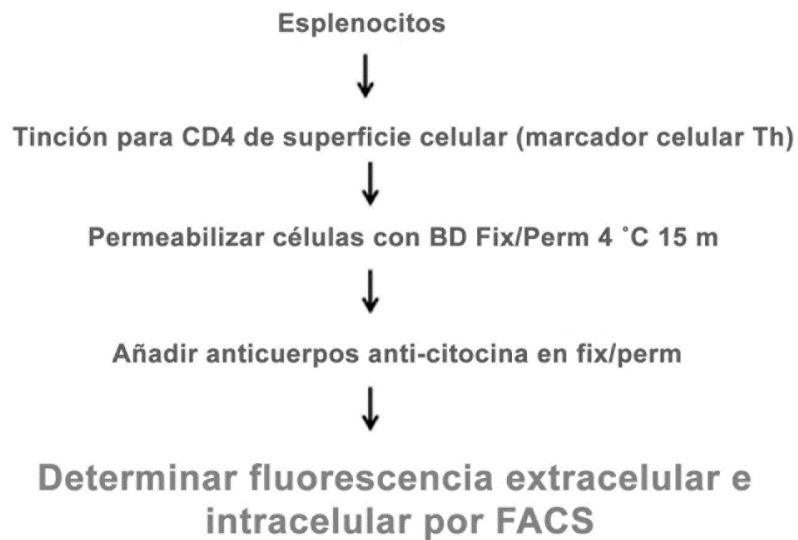


Figura 26

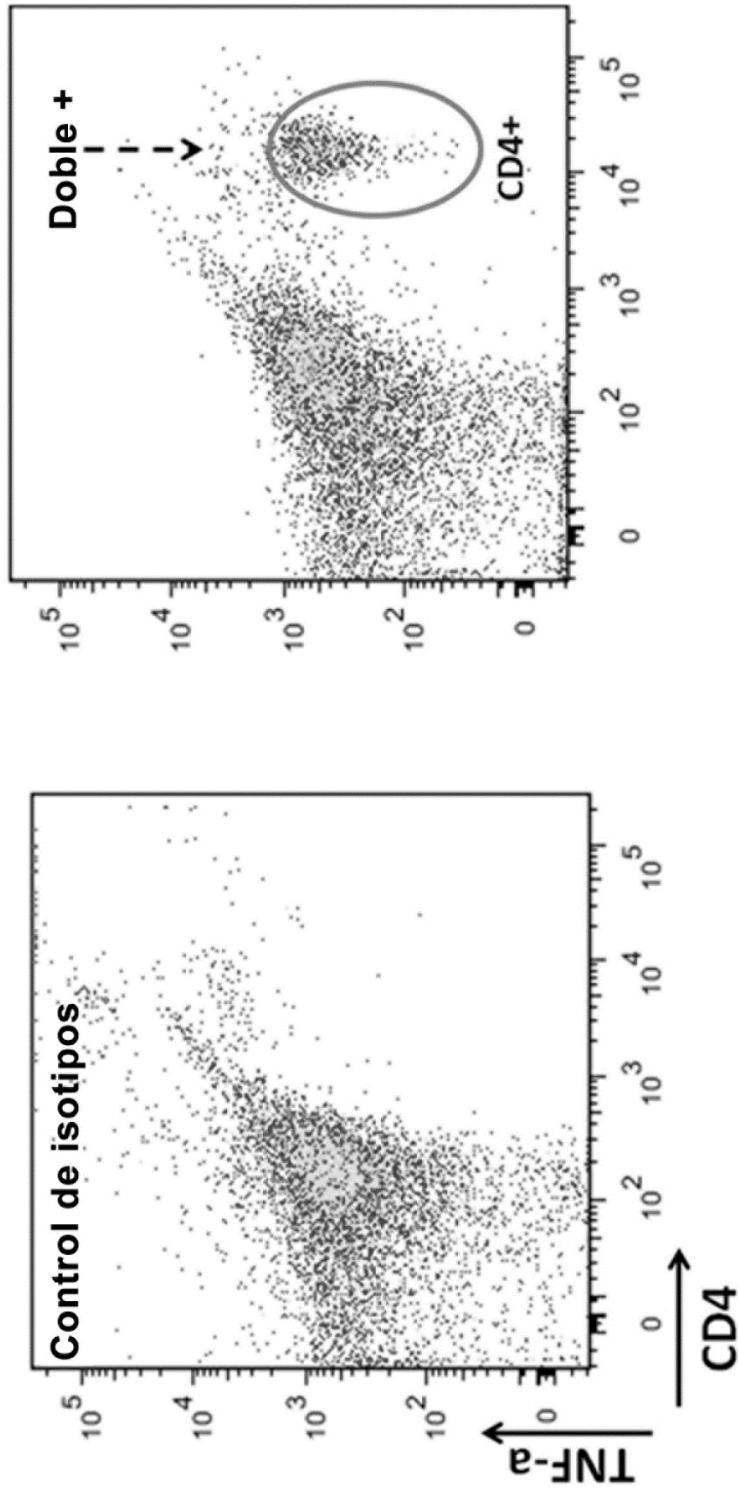


Figura 27B

Figura 27A

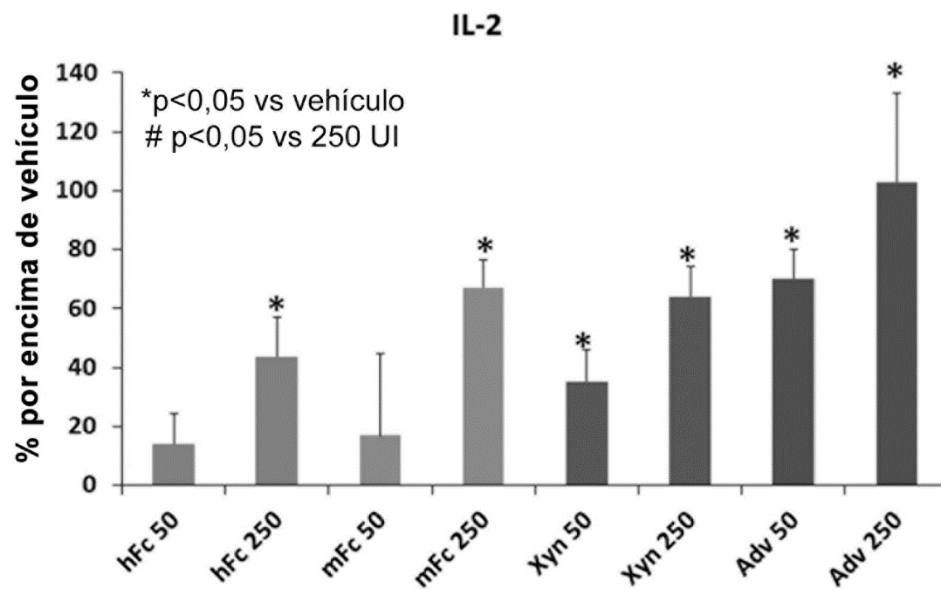


Figura 28

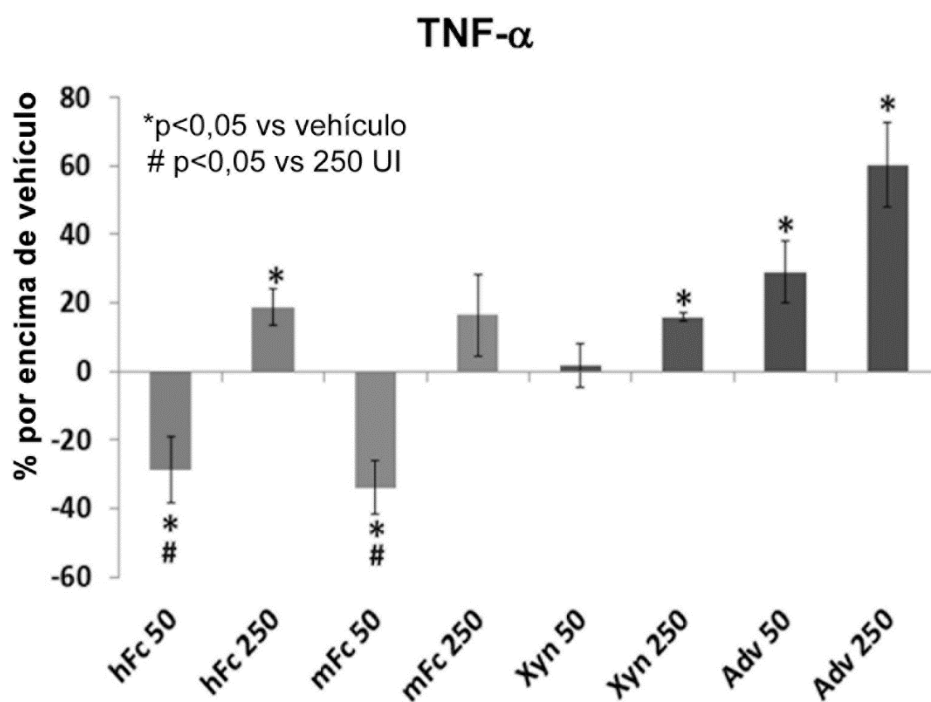


Figura 29

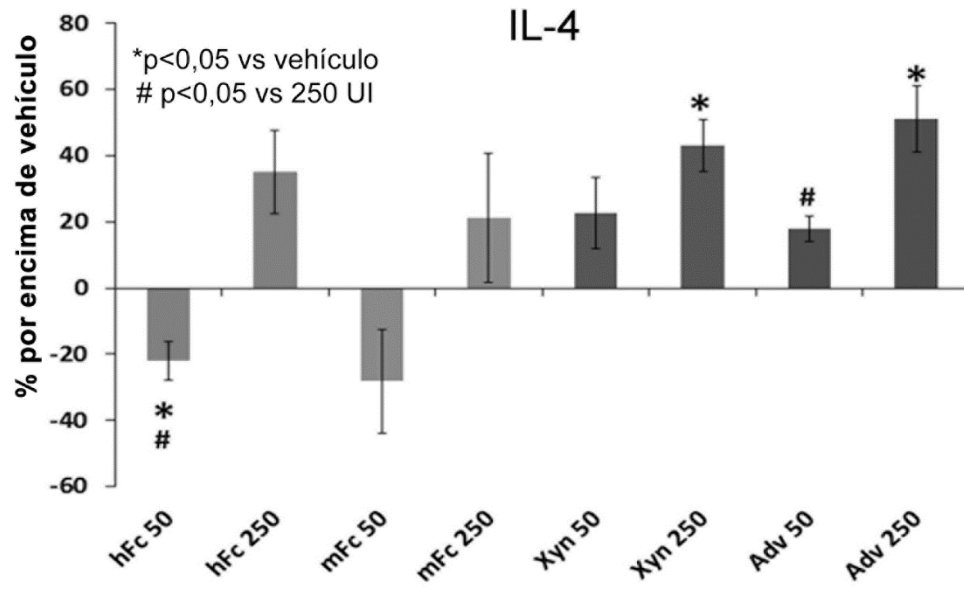


Figura 30

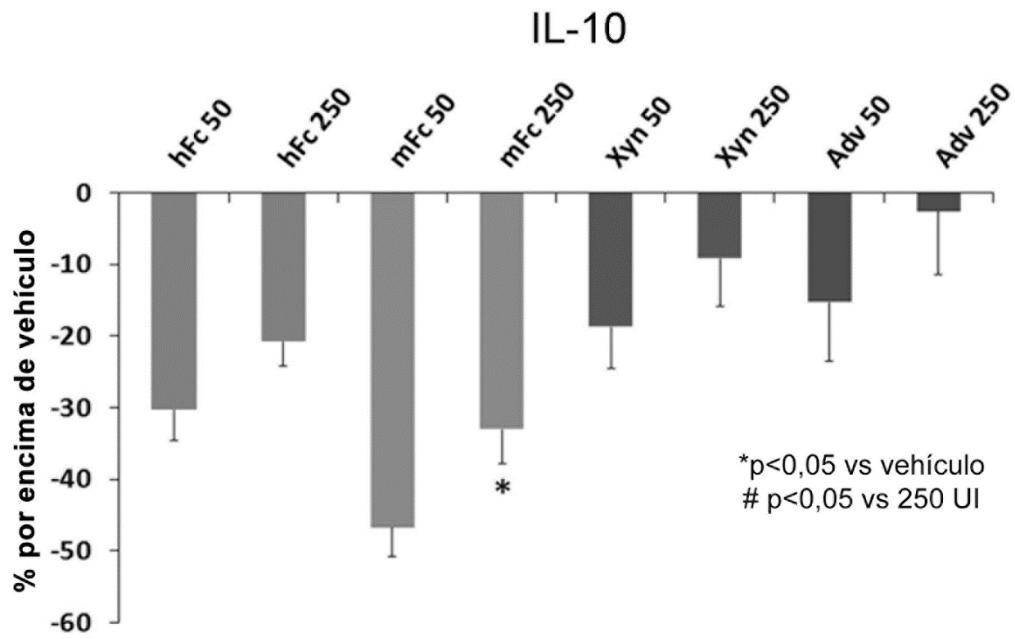


Figura 31

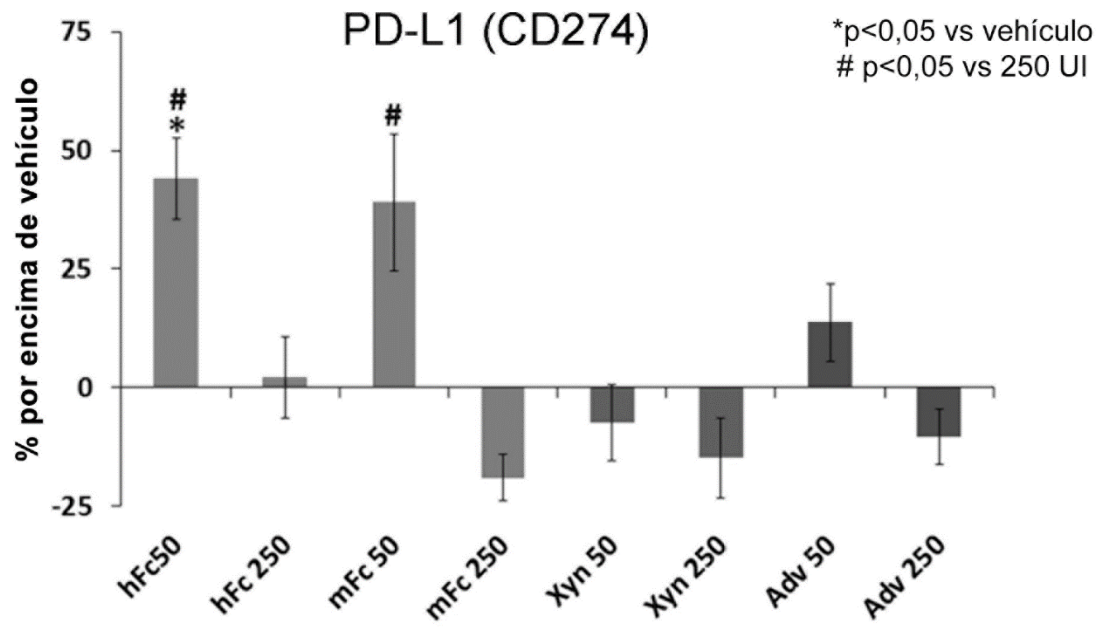


Figura 32

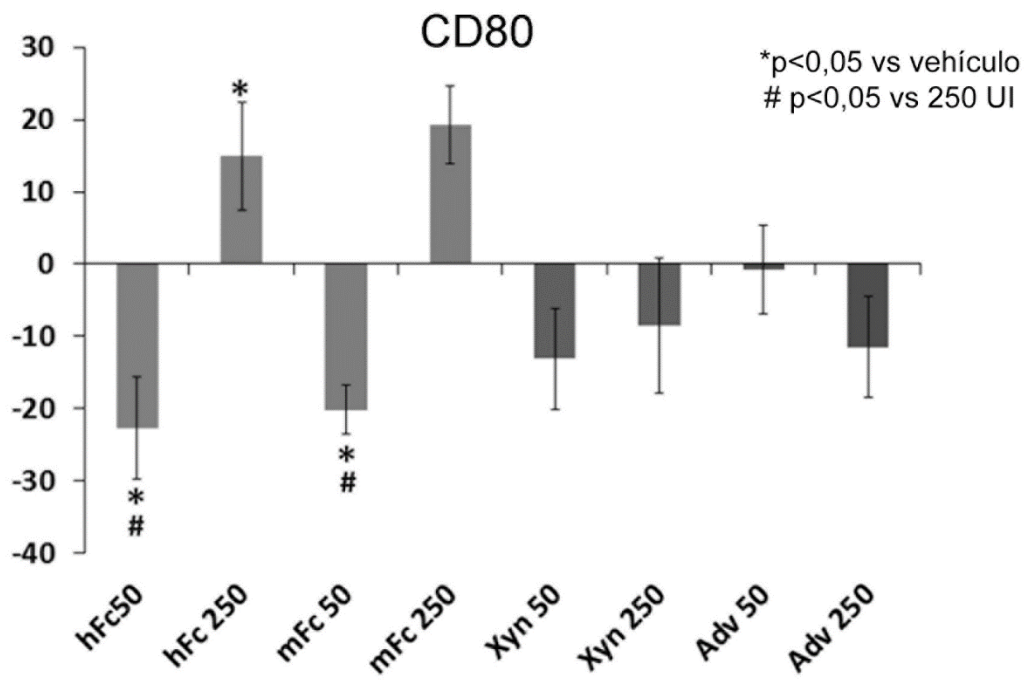


Figura 33

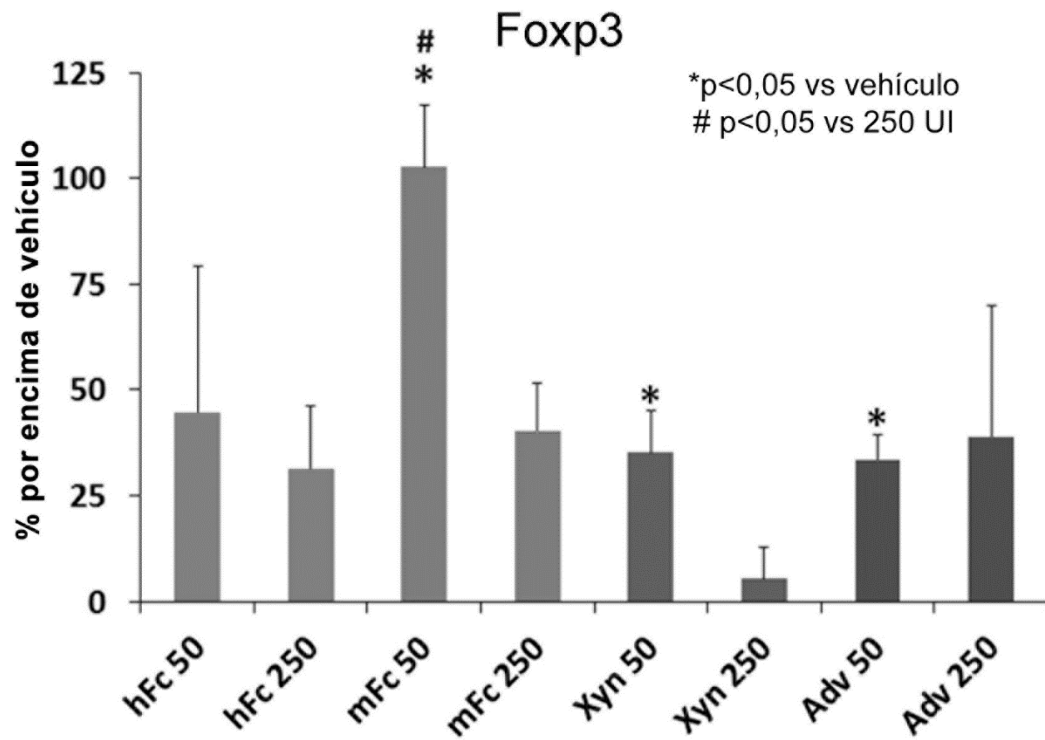


Figura 34

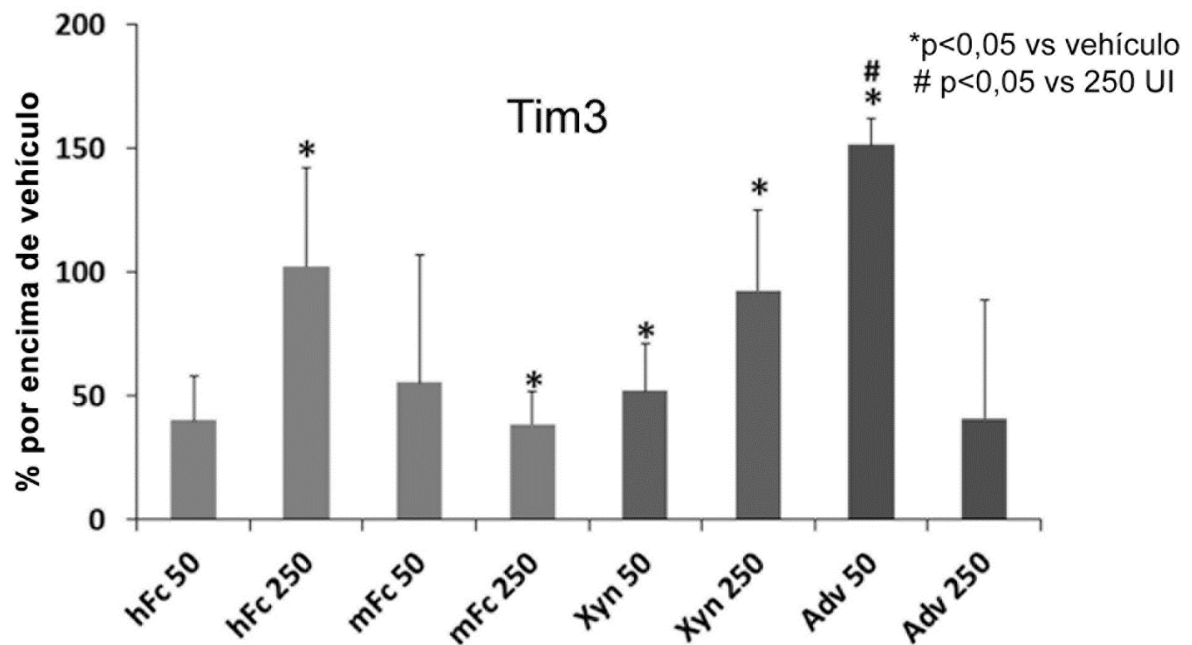


Figura 35

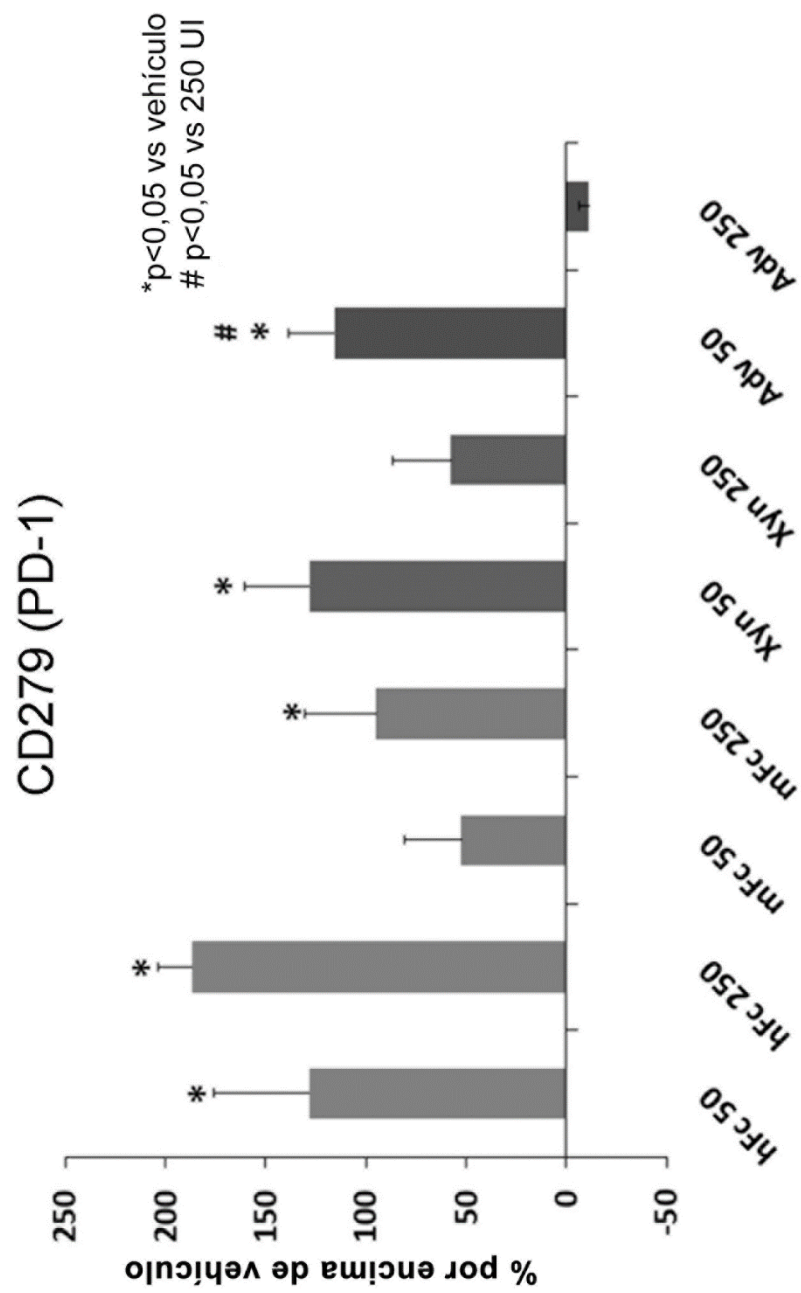


Figura 36

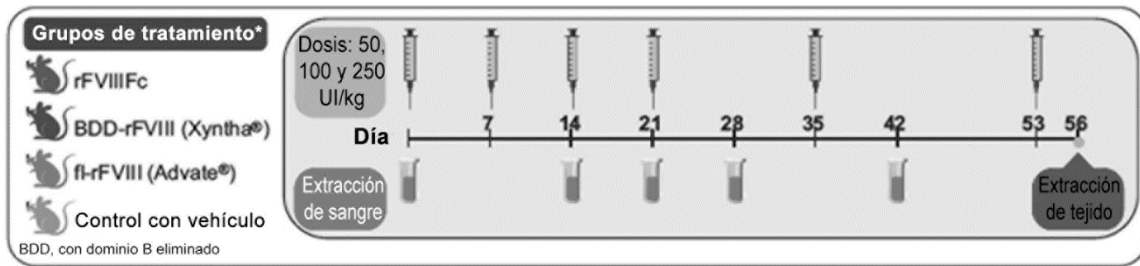


Figura 37



Figura 38

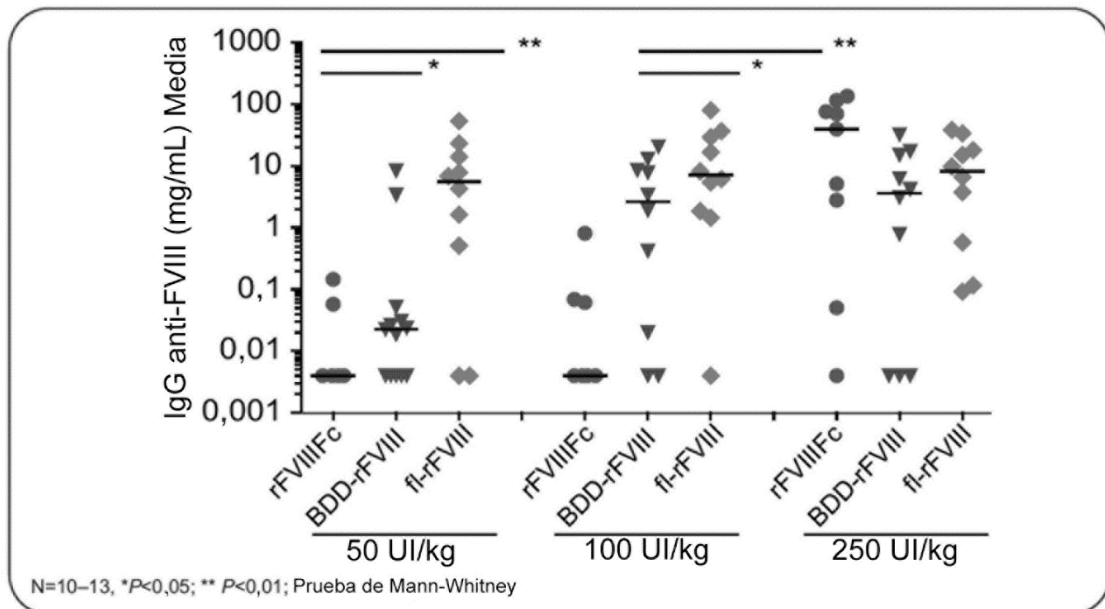
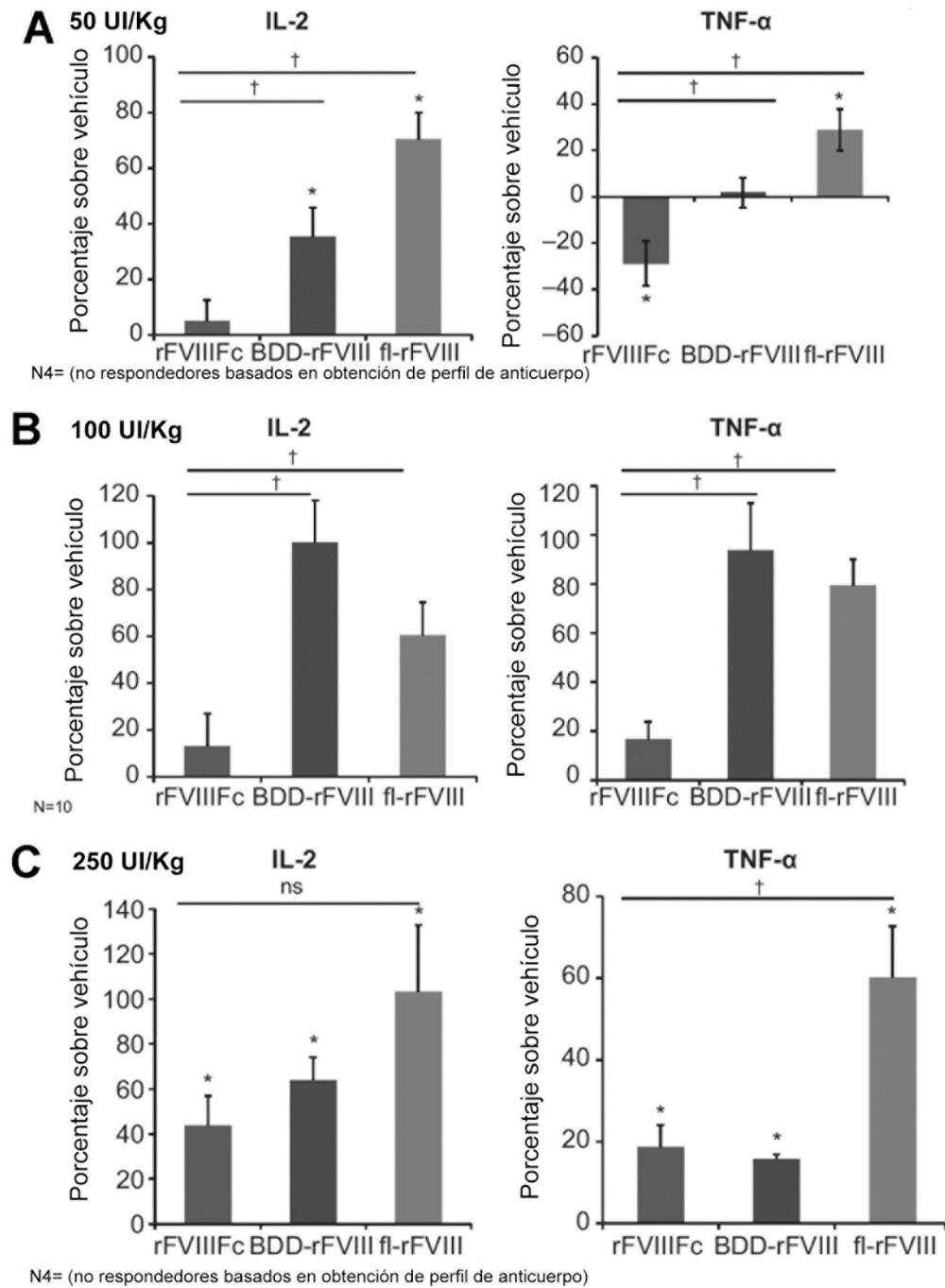


Figura 39



*p<0,05 versus vehículo; † p<0,05 entre tratamientos; prueba t

Las franjas representan porcentaje sobre vehículo $\pm$ error estándar de la media

BDD, con dominio B eliminado; IL, interleucina; TNF, factor de necrosis transformador

Figura 40

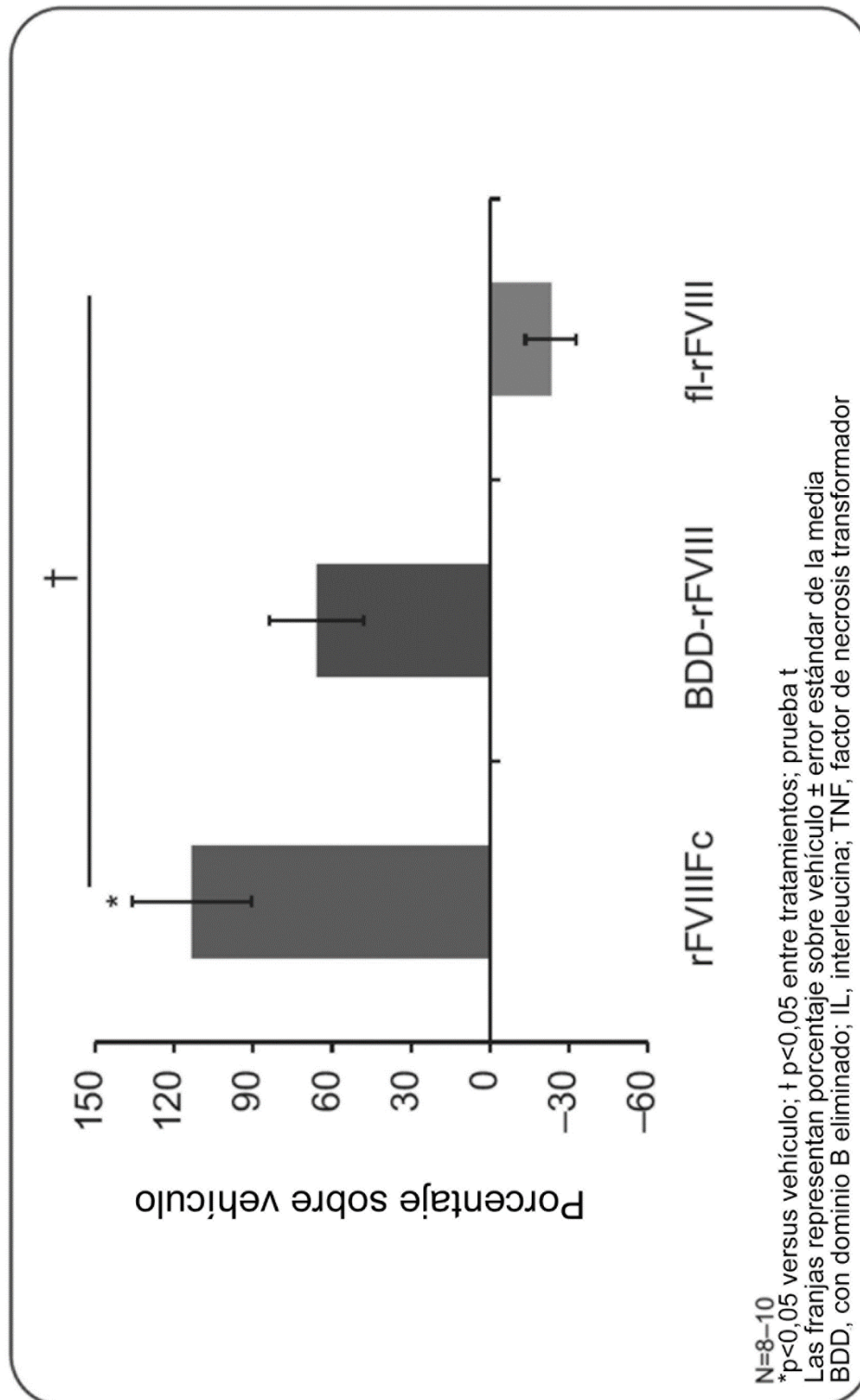
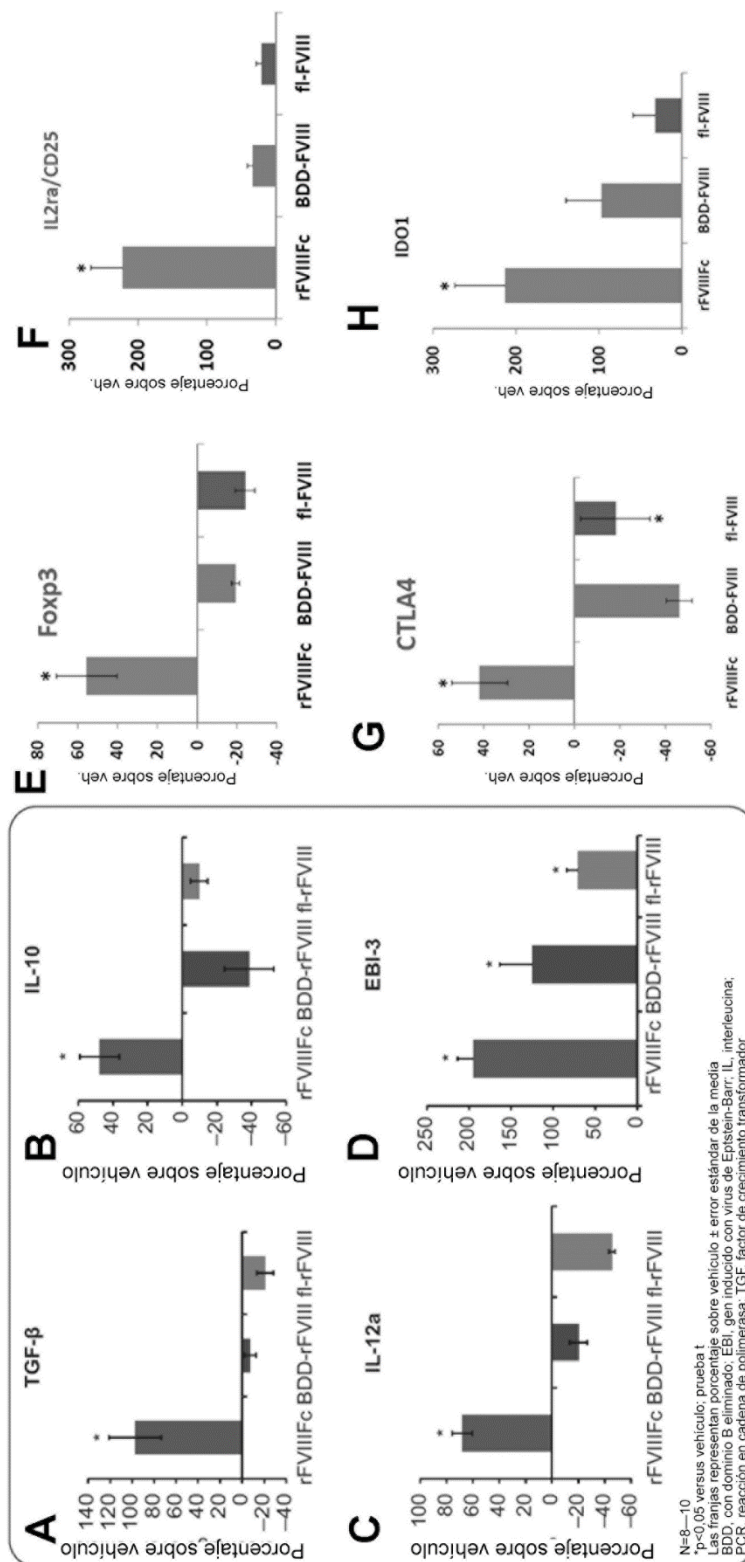


Figura 41



100 UI/kg
n= 8-10

Figura 42

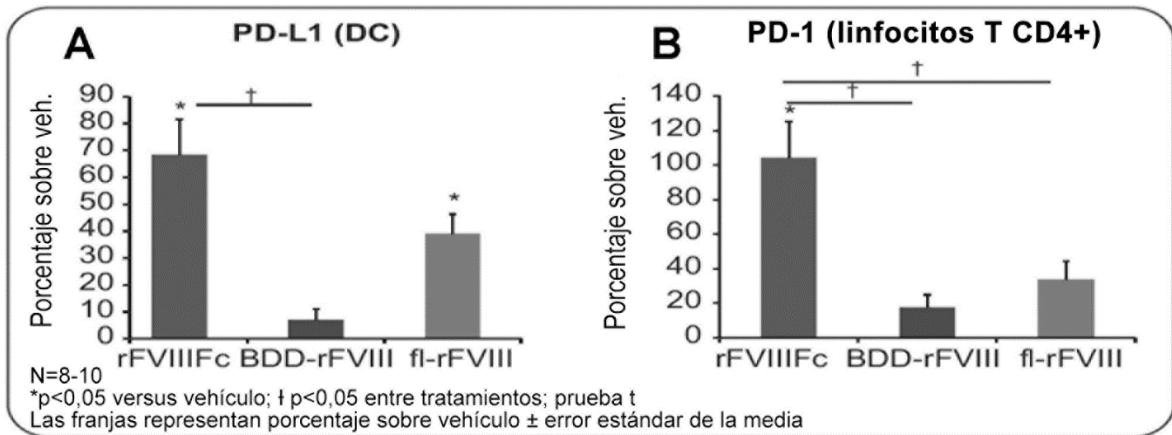


Figura 43

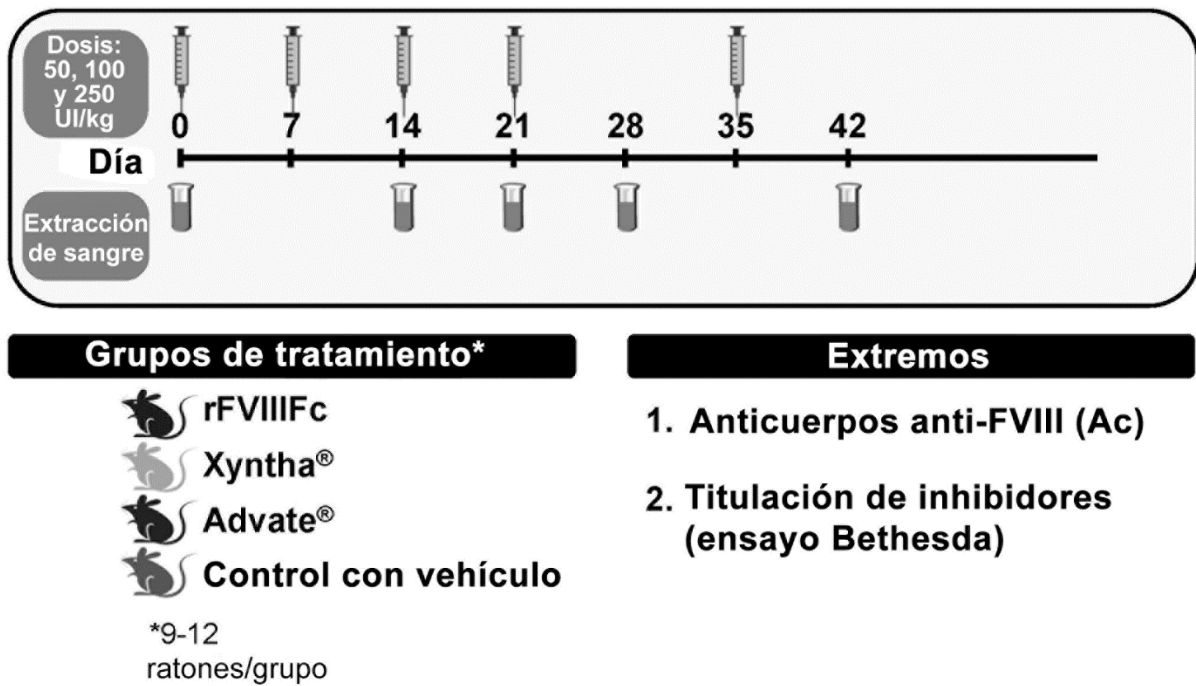


Figura 44

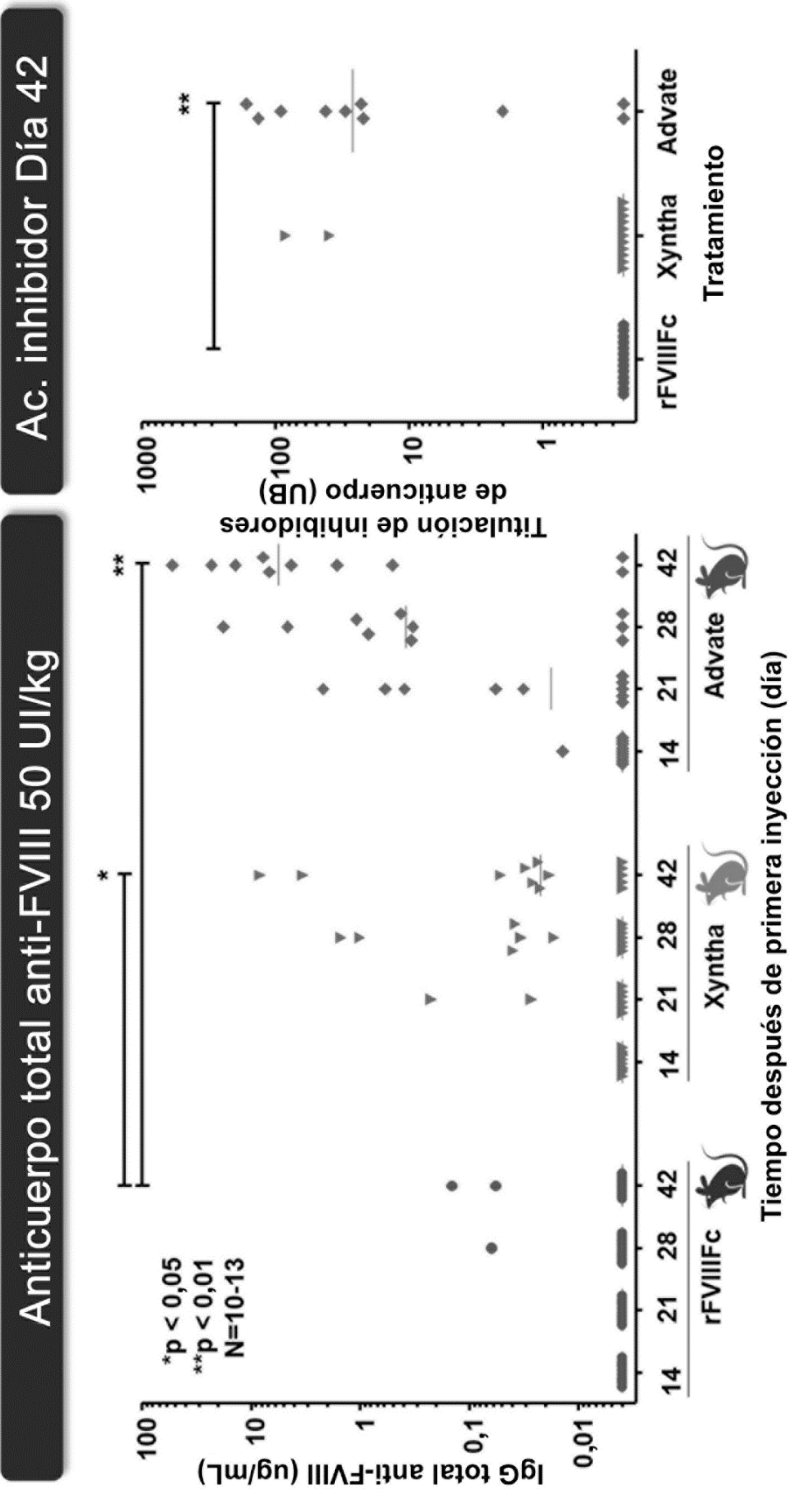


Figura 45

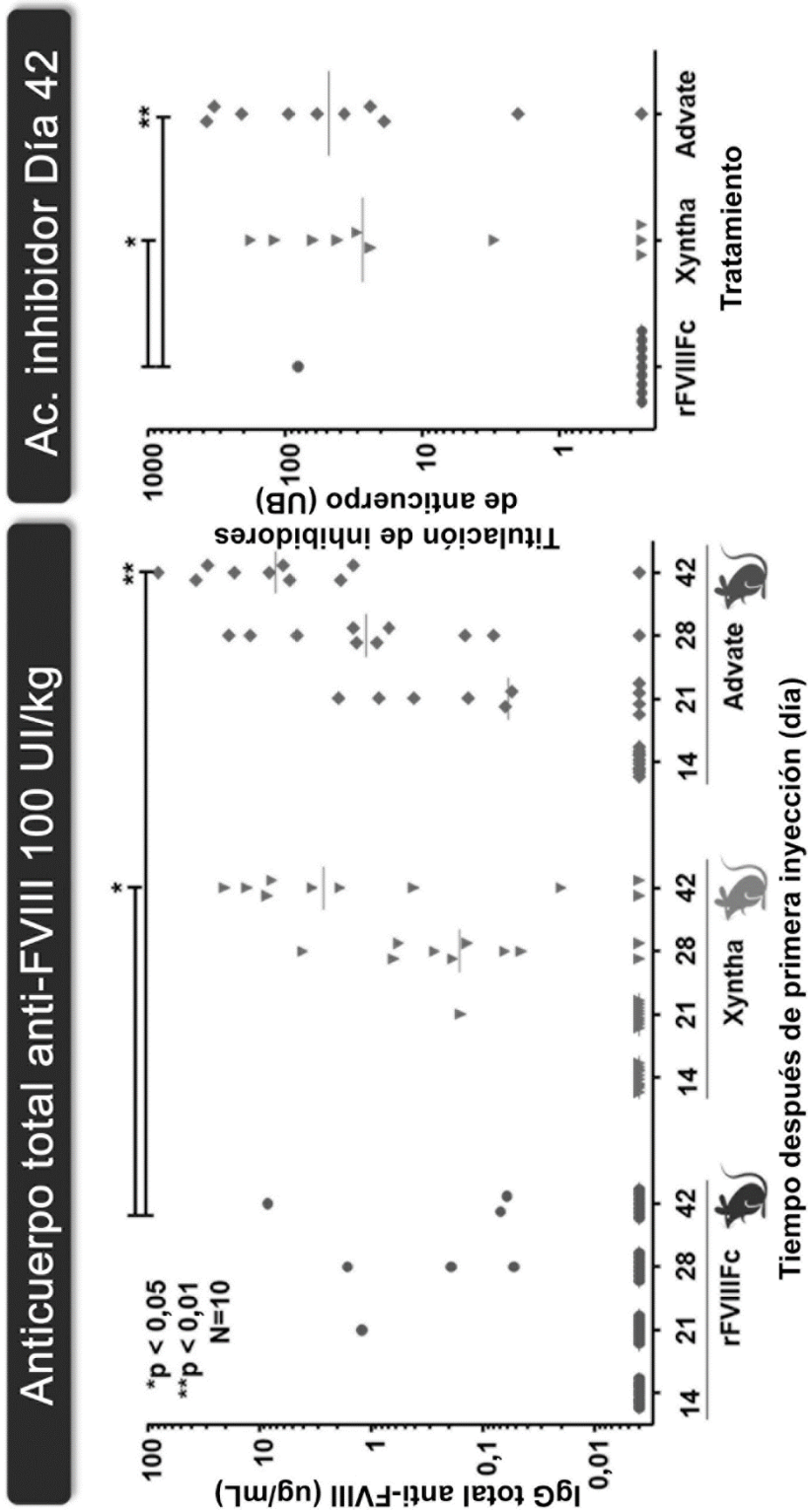


Figura 46

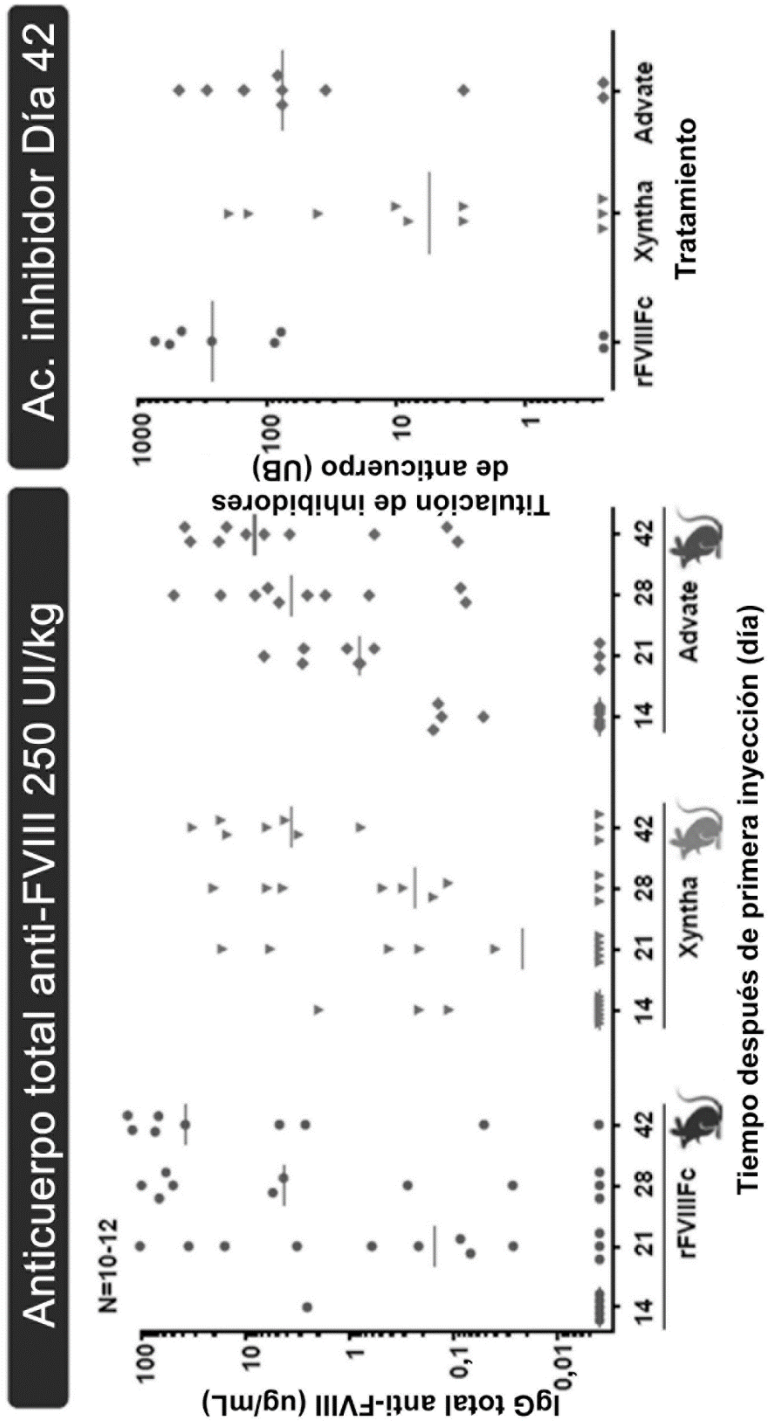


Figura 47

Figura 49

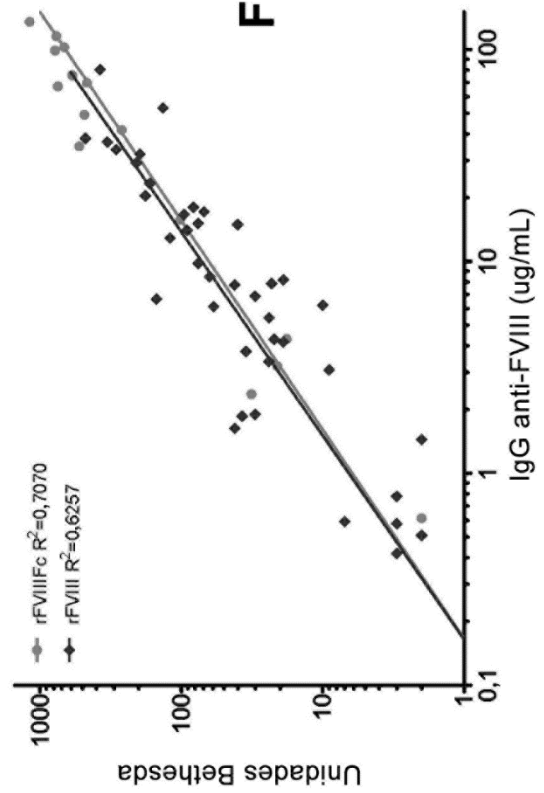
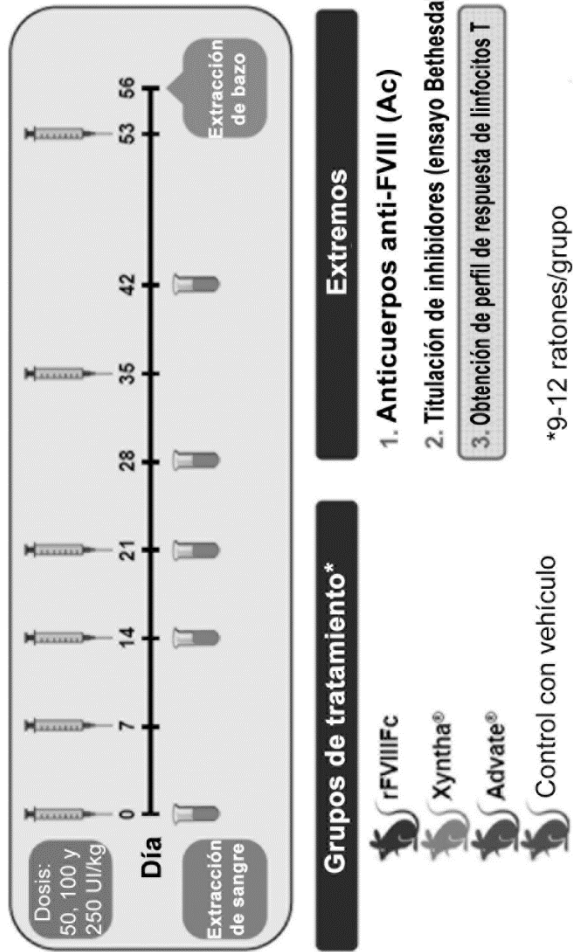


Figura 48

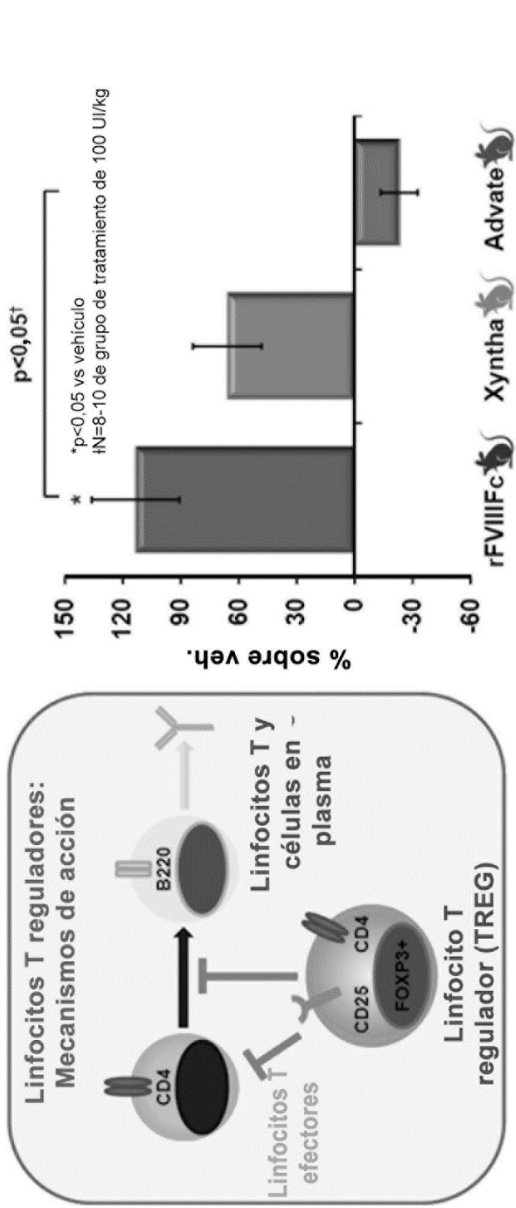


Figura 50

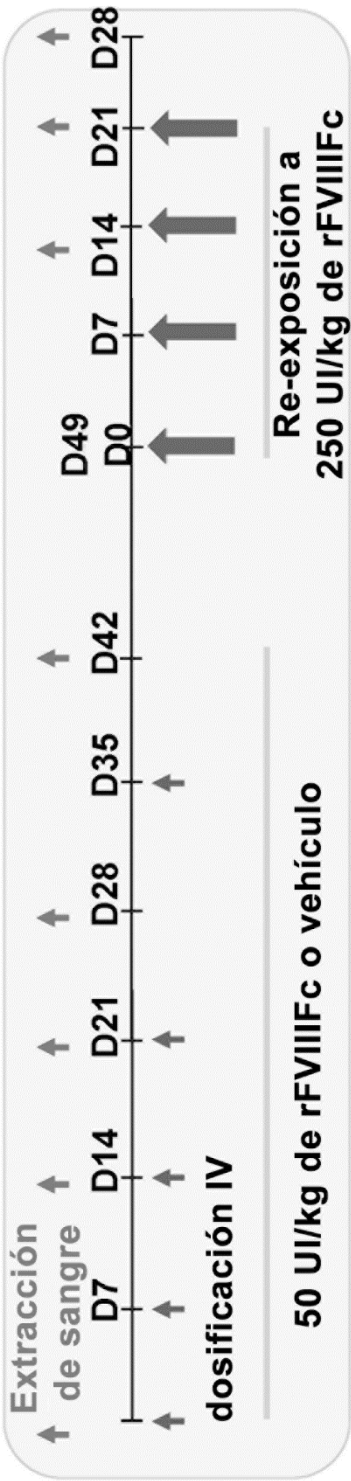


Figura 51

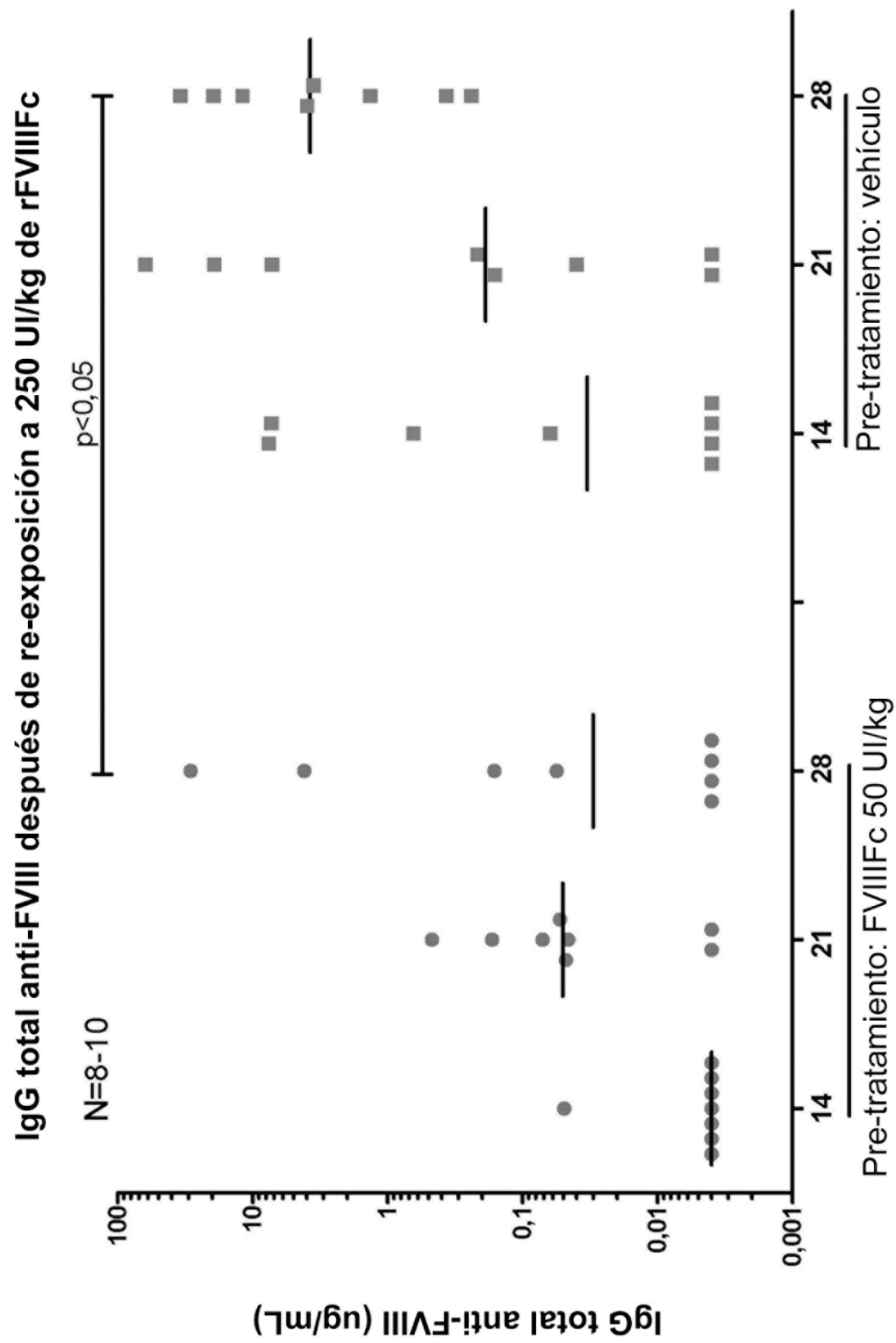


Figura 52

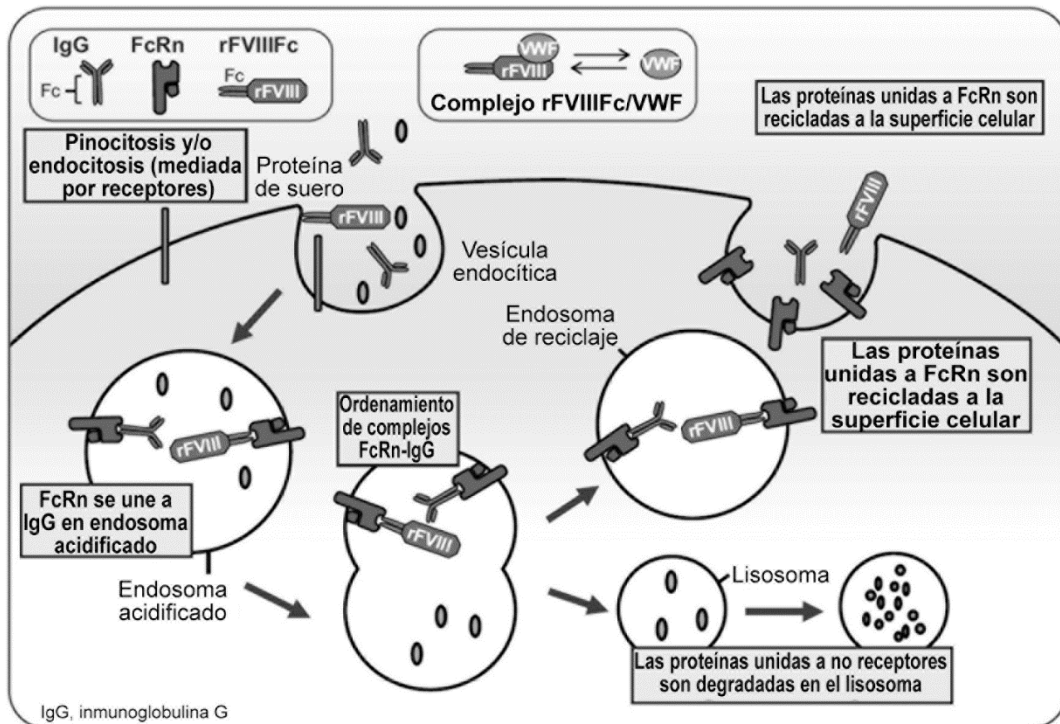


Figura 53

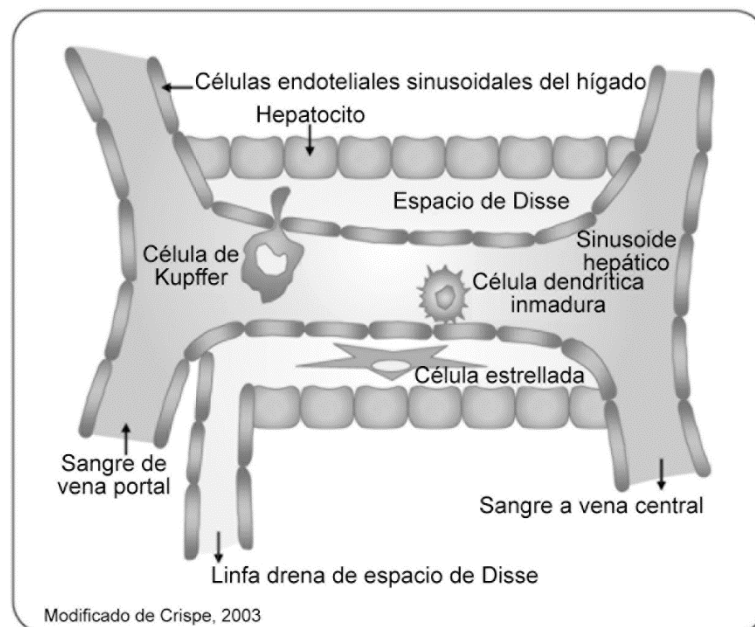


Figura 54

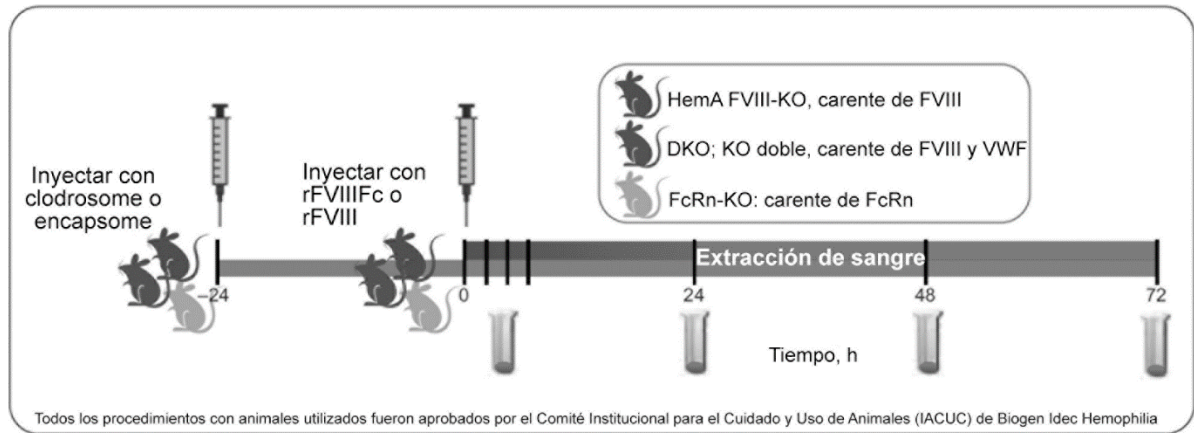


Figura 55

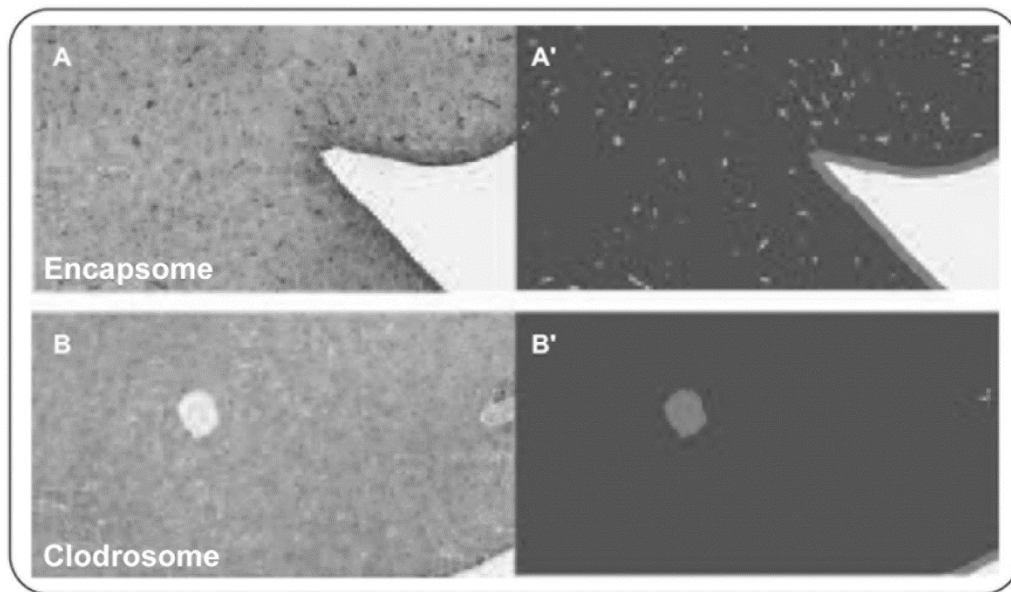


Figura 56

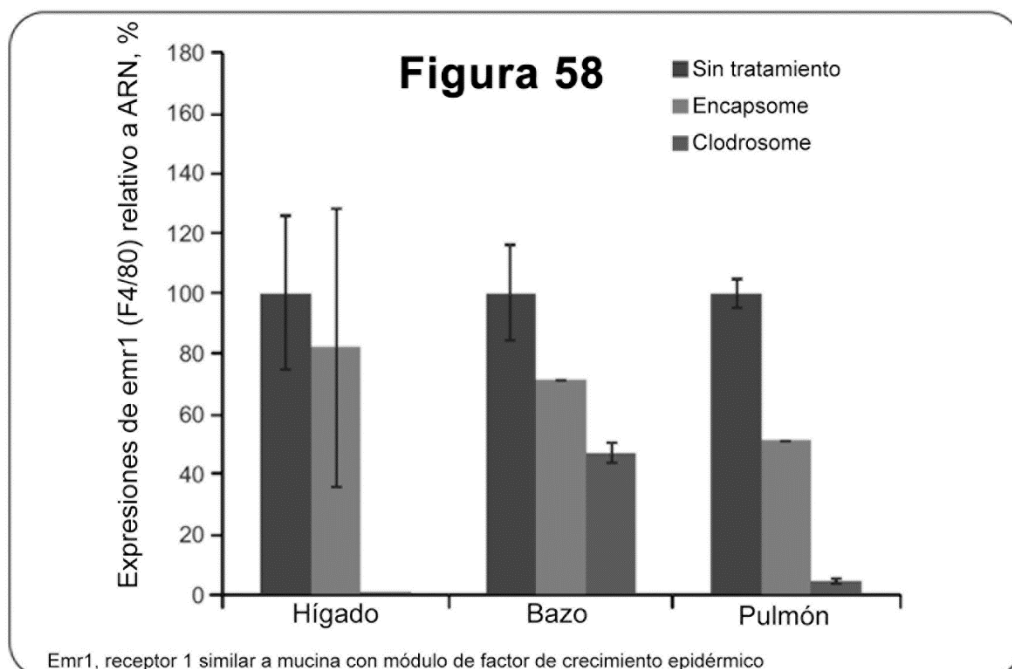
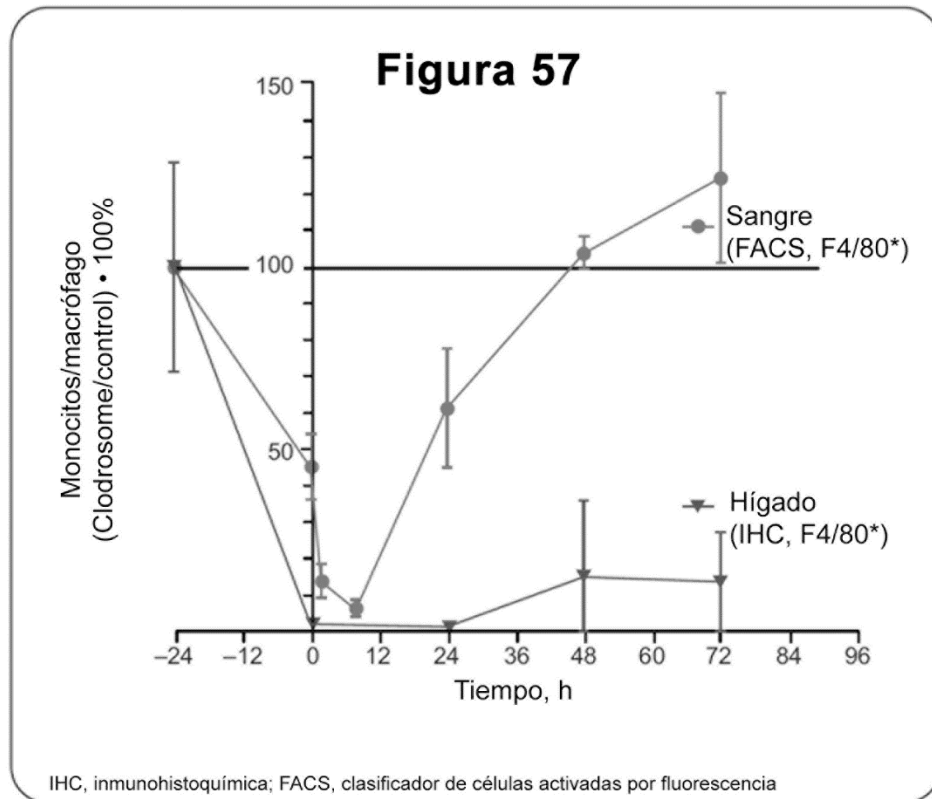


Figura 59

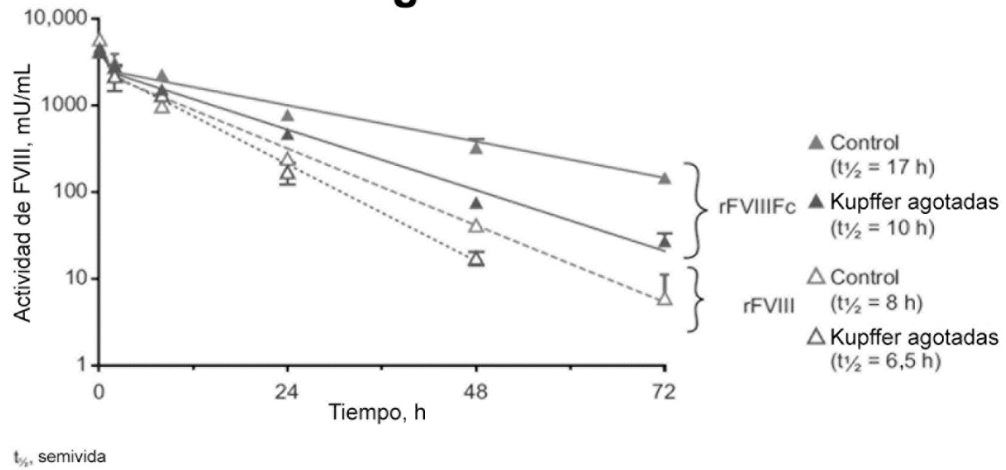


Figura 60

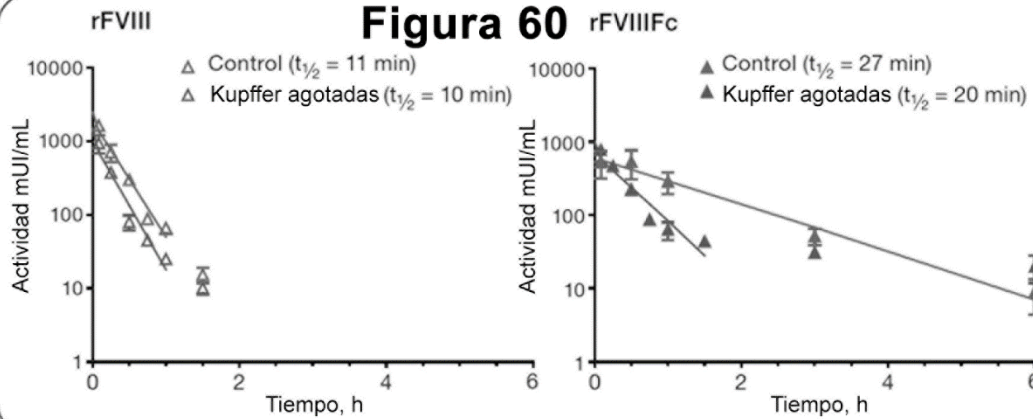
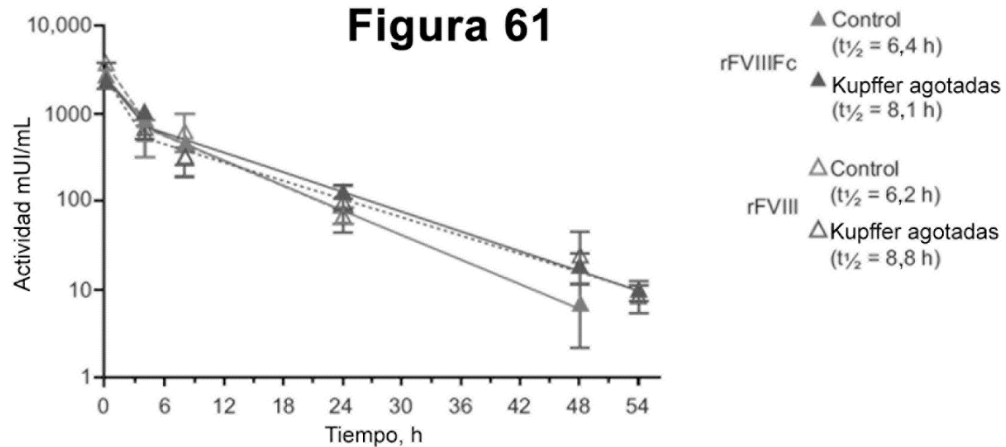


Figura 61



El tratamiento con FVIIIhFc de madres reduce las titulaciones de inhibidores en crías inmunizadas con FVIII – 1^{er} experimento

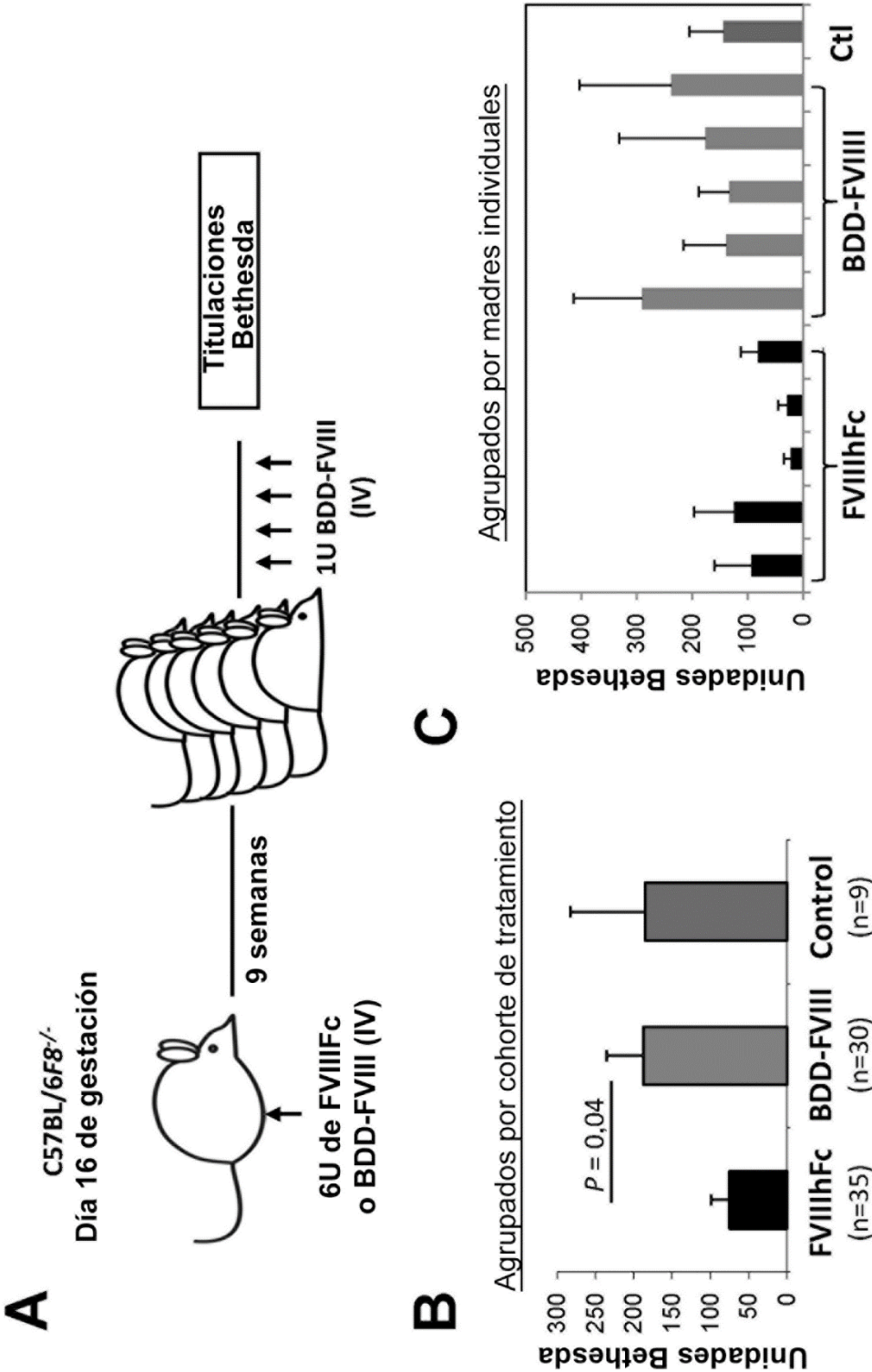


Figura 62

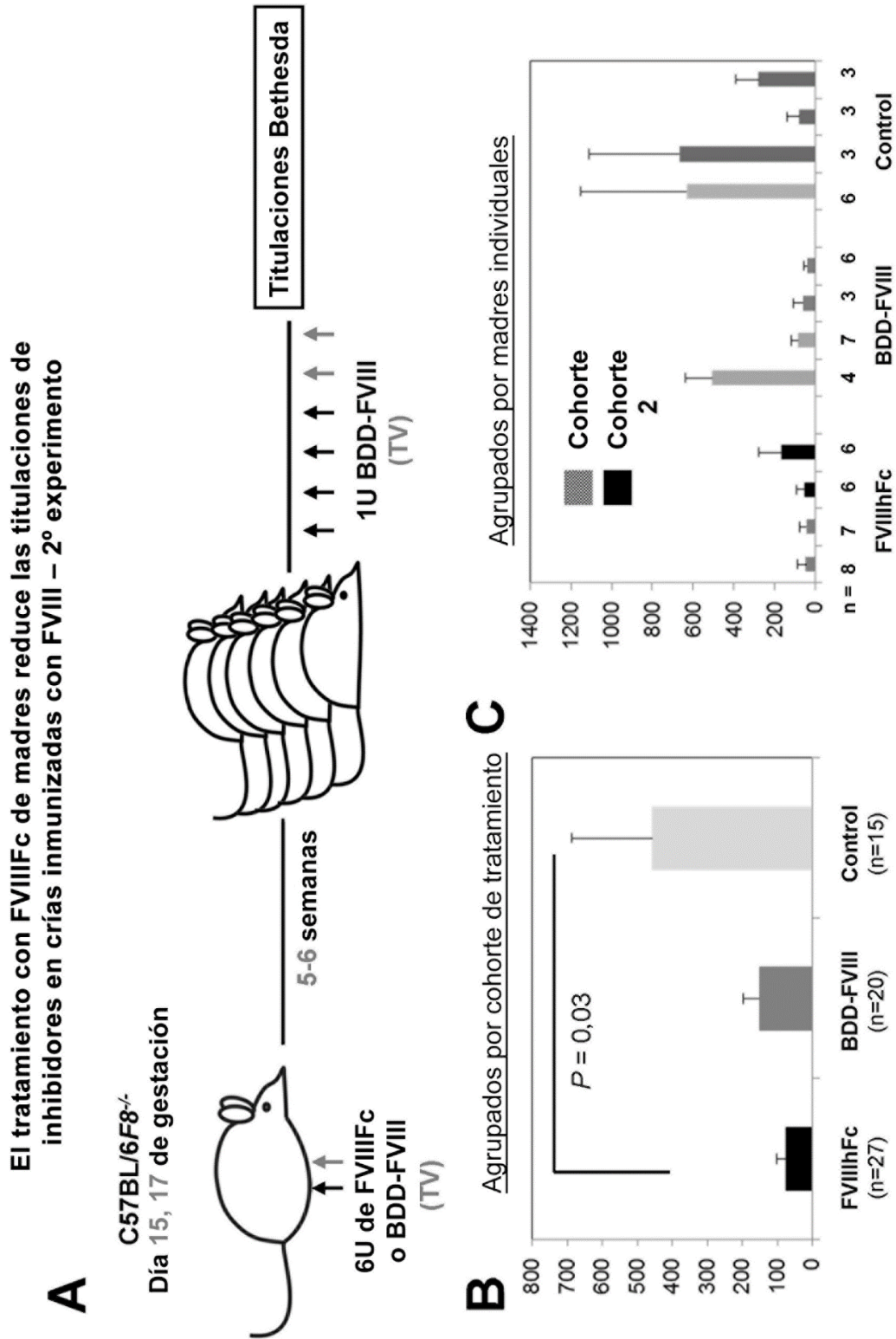


Figura 63

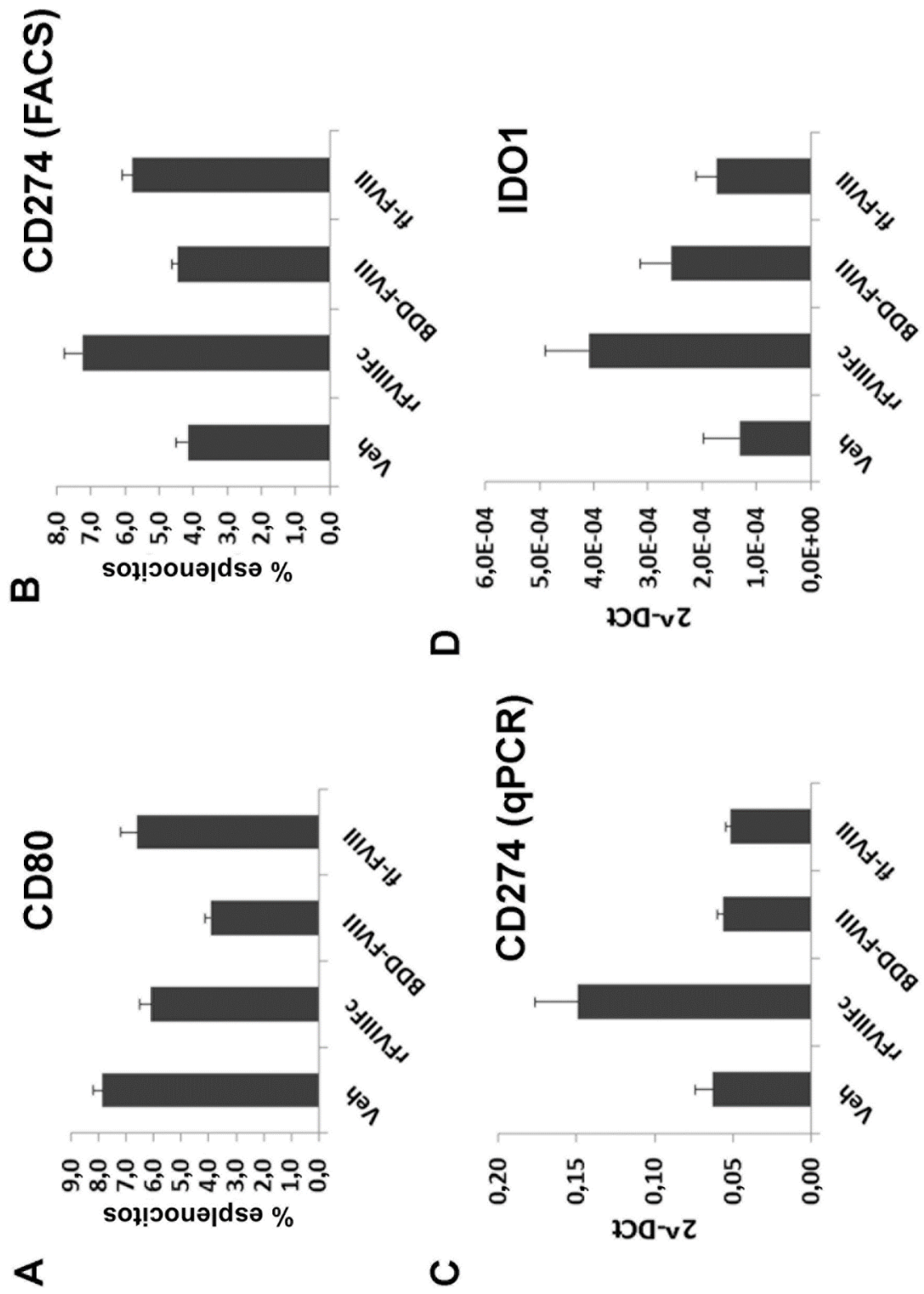
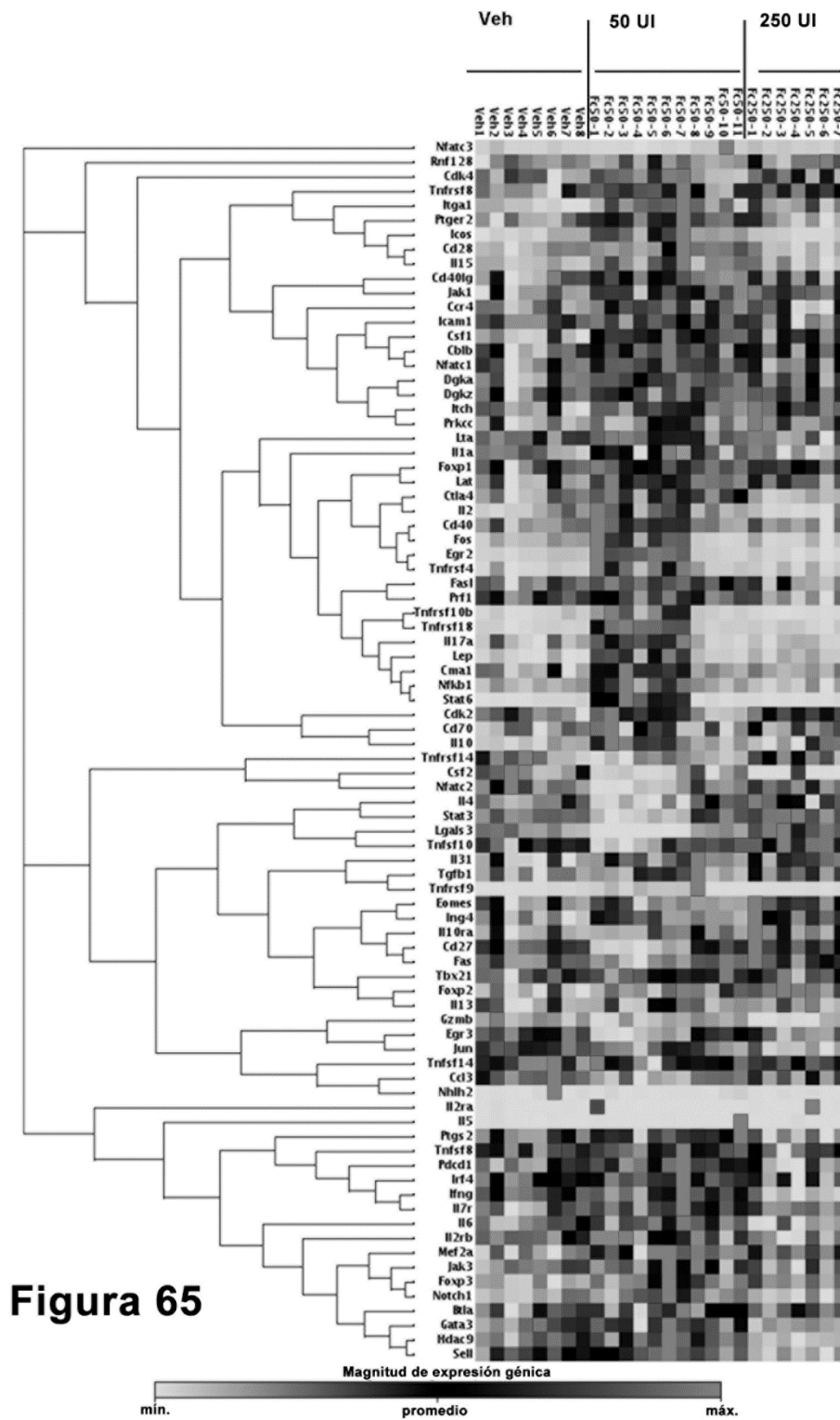


Figura 64



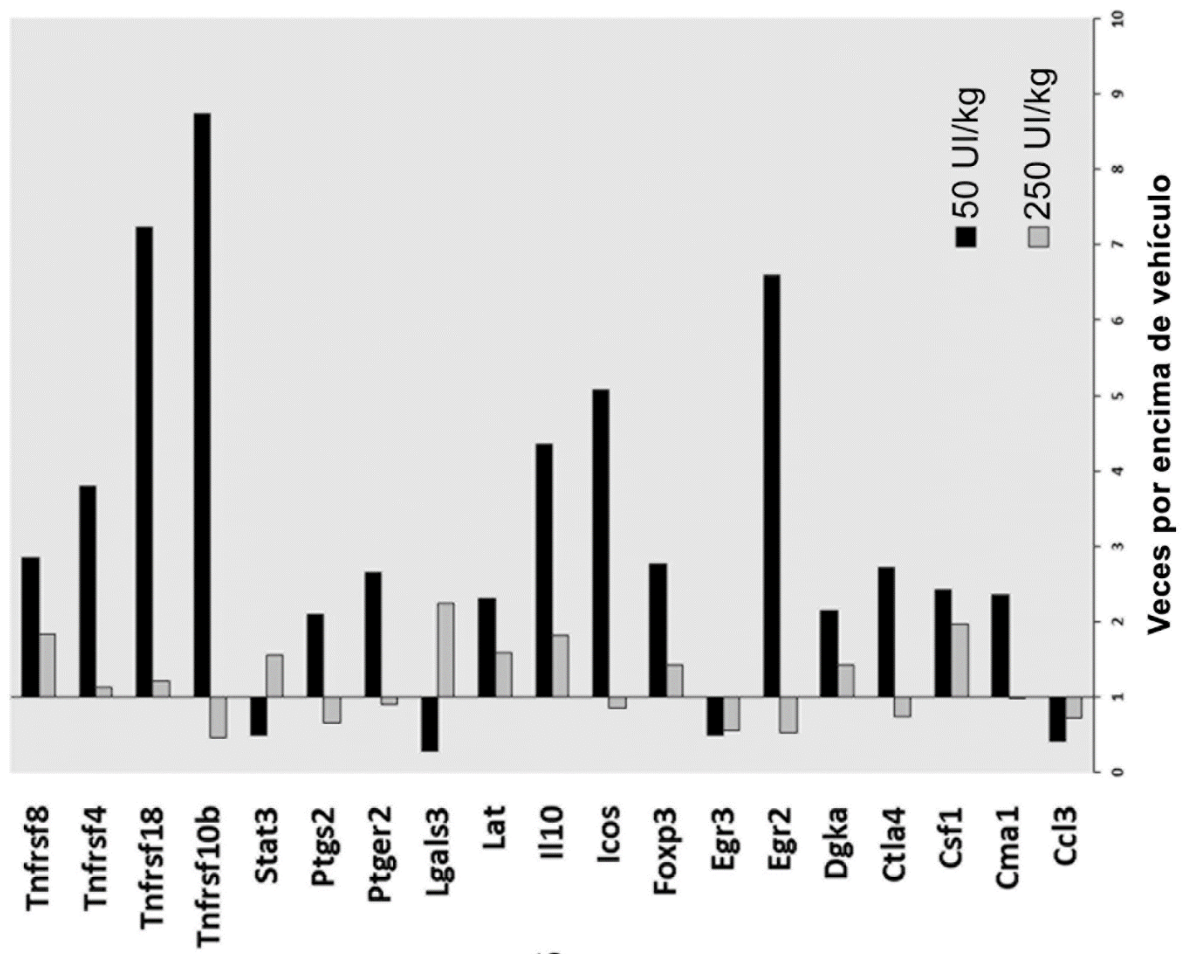


Figura 66

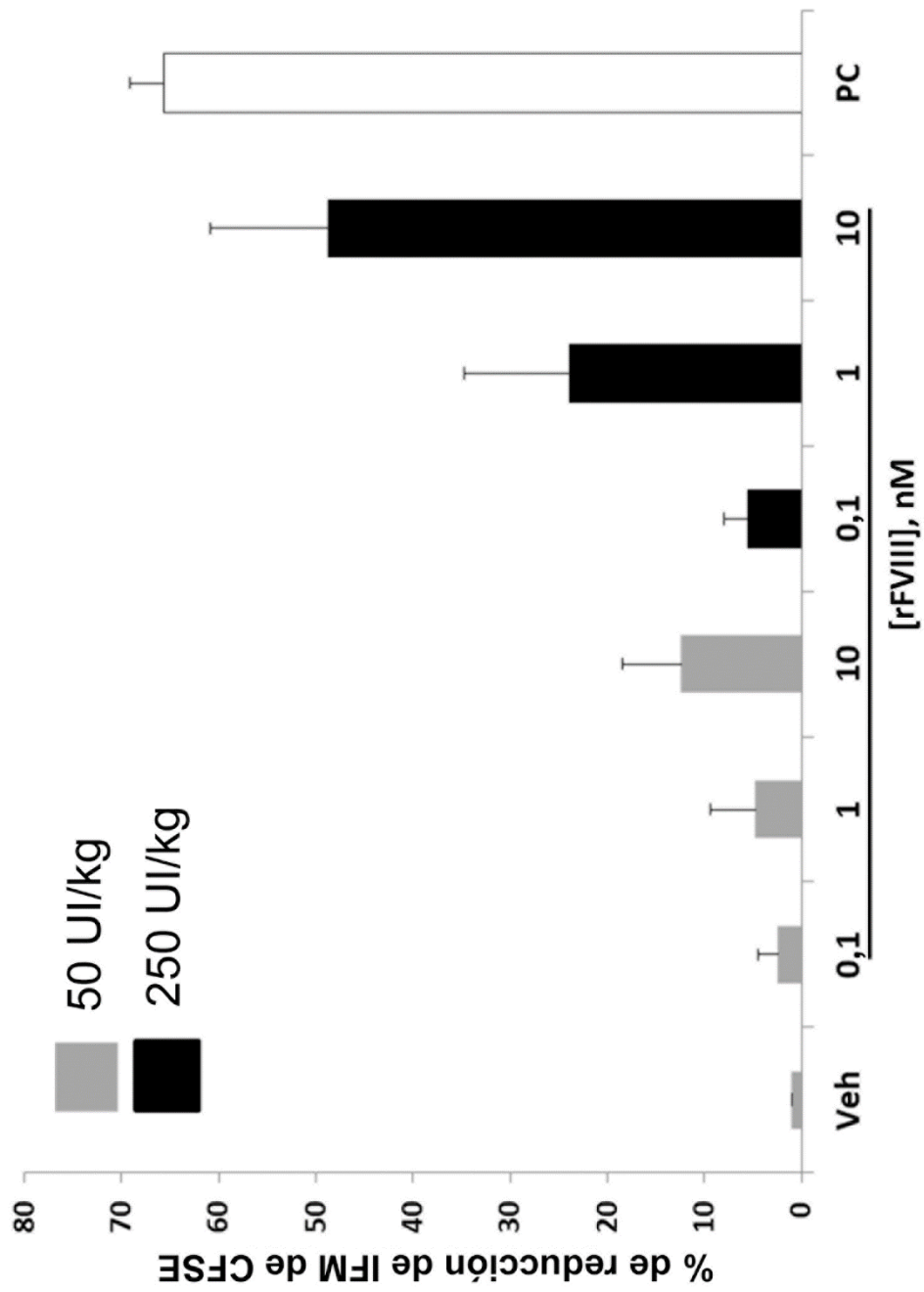


Figura 67

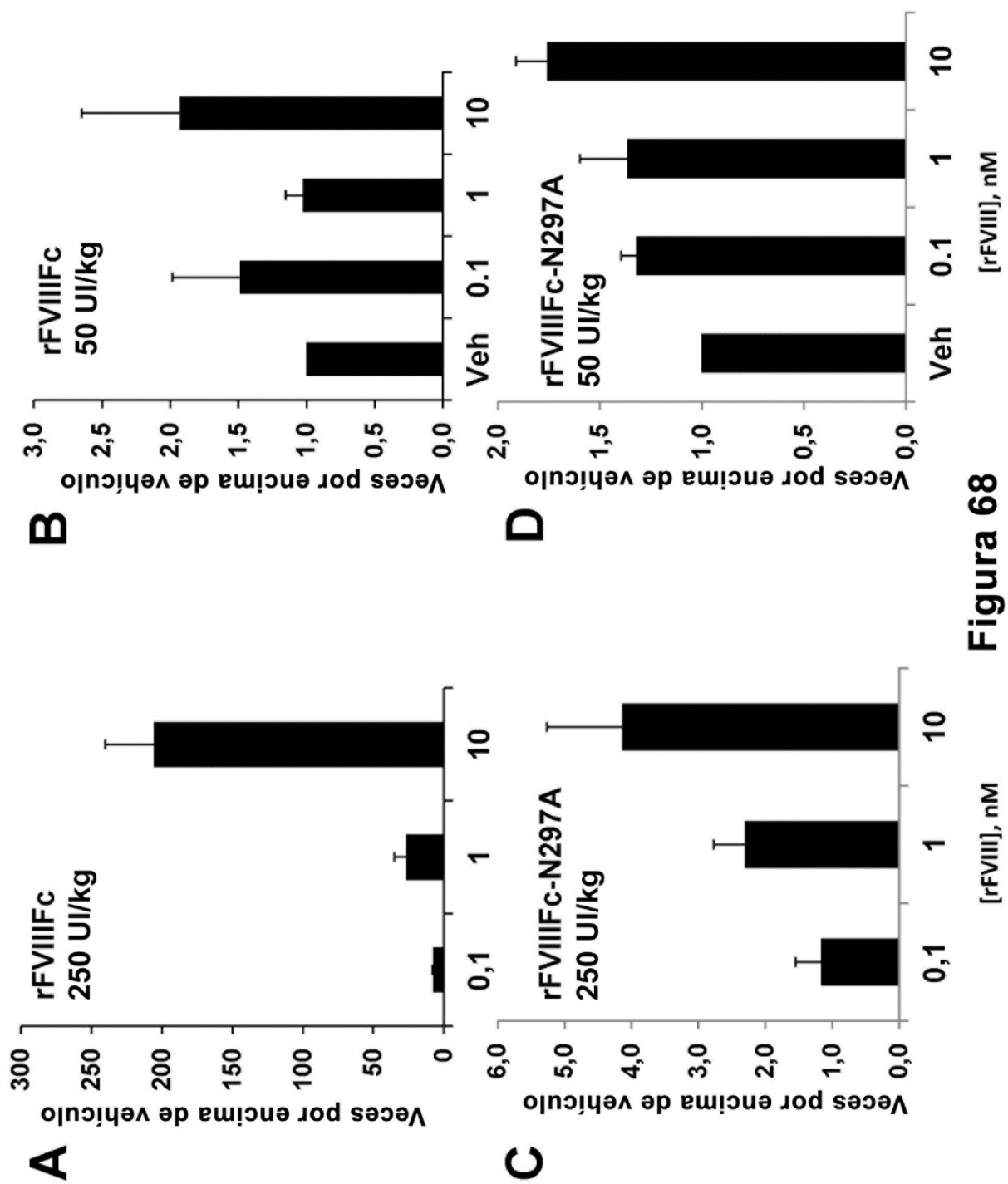


Figura 68