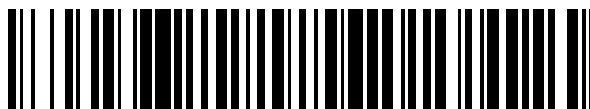


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 209**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/37** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**A61P 7/02** (2006.01)

**A61K 47/60** (2007.01)

**A61K 47/68** (2007.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.07.2012 PCT/US2012/045784**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.01.2013 WO13009627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.07.2012 E 12811808 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.12.2018 EP 2729161**

54 Título: **Polipéptidos quiméricos e híbridos del Factor VIII, y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

**08.07.2011 US 201161506015 P**

**11.08.2011 US 201161522647 P**

**30.09.2011 US 201161541561 P**

**09.12.2011 US 201161569158 P**

**13.01.2012 US 201261586443 P**

**11.04.2012 US 201261622789 P**

**08.06.2012 US 201261657641 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.08.2019**

73 Titular/es:

**BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (100.0%)**

**225 Second Avenue**

**Waltham MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**DUMONT, JENNIFER A.;**

**LOW, SUSAN;**

**BITONTI, ALAN J.;**

**PIERCE, GLENN;**

**LUK, ALVIN;**

**JIANG, HAIYAN;**

**MCKINNEY, BYRON;**

**OTTMER, MATT;**

**SOMMER, JURG;**

**NUGENT, KAREN;**

**LI, LIAN y**

**PETERS, ROBERT**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

ES 2 722 209 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos quiméricos e híbridos del Factor VIII, y métodos de uso de los mismos

Campo de la invención

La presente invención se refiere generalmente al campo de la terapéutica para trastornos hemostáticos.

#### 5 Antecedentes de la técnica

La hemofilia A es un trastorno de sangrado ligado a X causado por mutaciones y/o supresiones en el gen del Factor VIII (FVIII) que produce una deficiencia de la actividad de FVIII (Peyvandi, F. et al. Haemophilia 12:82-89 (2006)). La enfermedad se caracteriza por hemorragia espontánea y sangrado excesivo después de trauma. Con el tiempo, el sangrado repetido en los músculos y articulaciones, que a menudo comienza en la niñez temprana, produce la artropatía hemofílica y daño articular irreversible. Este daño es progresivo, y puede llevar a movilidad gravemente limitada de articulaciones, 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 factor VIII. Los estudios muestran que el factor VIII porcino tiene actividad procoagulante seis veces mayor que el factor VIII humano (Lollar, P., y E. T. Parker, J. Biol. Chem. 266:12481-12486 (1991)), y que la diferencia en la actividad coagulante entre el factor VIII humano y porcino parece estar basada en una diferencia en la secuencia de los aminoácidos entre uno o más restos de los dominios A2 humano y porcino (Lollar, P., et al., 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 del FVIII hasta 1 a 5% de los niveles normales, para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001)). Existen productos de FVIII derivado de plasma y recombinante disponibles para tratar episodios de sangrado a demanda, o para evitar la aparición de episodios de sangrado por tratamiento profiláctico. Sobre la base de la vida media corta de estos productos, por ejemplo 8-12 horas, sin embargo, los regímenes de tratamiento requieren la administración de inyecciones intravenosas frecuentes. Tal administración frecuente es dolorosa e inconveniente.

La reducción de la mortalidad, la prevención del daño articular y la mejora de calidad de vida han sido logros importantes debido al desarrollo del FVIII derivado de plasma y recombinante. La protección prolongada del sangrado podría representar otro avance clave en el tratamiento de pacientes de hemofilia A. Sin embargo, hasta la fecha, no se han desarrollado productos que permiten la protección hemostática prolongada. En consecuencia, aún se necesitan métodos mejorados para tratar la hemofilia debida a la deficiencia del factor VIII que sean más tolerables, de acción más prolongada y más efectivos que las terapias actuales.

Breve resumen de la invención

Basándose en la presente descripción, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) un polipéptido quimérico, que comprende una porción de Factor VIII (FVIII) y una segunda porción, y (ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que 15% a 25% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y 75% a 85% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado, en la que el FVIII monocatenario comprende una cadena pesada de FVIII y una cadena ligera de FVIII en una única cadena polipeptídica, y el FVIII procesado comprende una cadena pesada de FVIII y una cadena ligera de FVIII en dos cadenas polipeptídicas.

En un aspecto adicional, la invención proporciona la composición farmacéutica de la invención, para uso en la prevención, disminución, o tratamiento de un episodio de sangrado en un sujeto, en el tratamiento profiláctico de un episodio de sangrado en un sujeto, en el tratamiento a demanda de un episodio de sangrado en un sujeto, o en el mantenimiento de la homeostasis en un sujeto que necesita una cirugía.

La presente invención y sus realizaciones se exponen en las reivindicaciones anejas.

En un aspecto, el Factor VIII monocatenario puede contener un sitio de procesamiento intracelular intacto. En otro aspecto, el FVIII monocatenario no contiene un sitio de procesamiento intracelular. Por ejemplo, el SCFVIII comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1645, una sustitución o mutación en una posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1648, o una sustitución o mutación en posiciones de aminoácidos que corresponden a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa. El aminoácido sustituido en la posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1645 es un aminoácido diferente del aminoácido sustituido en la posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1648. En ciertas realizaciones, la sustitución o mutación es un aminoácido distinto de arginina, por ejemplo alanina.

En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario tiene actividad de Factor VIII en un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que está fusionado a una de las dos porciones de Fc, cuando la actividad del Factor VIII se mide in vitro

mediante ensayo cromogénico. En otras realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que está fusionado a una de las dos porciones de Fc. En todavía otras realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII monocatenario tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que está fusionado a una de las dos porciones de Fc. En ciertas realizaciones, el Factor VIII monocatenario en el polipéptido quimérico es inactivado por Proteína C activada, en un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado. En todavía otras realizaciones, el Factor VIII monocatenario en el polipéptido quimérico tiene una tasa de interacción del Factor IXa comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado. En realizaciones adicionales, el Factor VIII monocatenario en el polipéptido quimérico se une al Factor de von Willebrand en un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII.

En una realización, la segunda porción puede ser un Fc. En otra realización, el polipéptido está en forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido, en el que dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en un Fc. En otras realizaciones, el polipéptido tiene una semivida al menos una y media a seis veces más larga, una y media a cinco veces más larga, una y media a cuatro veces más larga, una y media a tres veces más larga, o una y media a dos veces más larga que un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII.

También se proporciona un método para tratar una afección de sangrado, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición. El tratamiento puede ser tratamiento profiláctico, o tratamiento a demanda, o perioperativo. El trastorno de coagulación con sangrado puede ser hemofilia. En un caso, el sujeto que se trata es un sujeto pediátrico.

La presente descripción también se refiere a un método para prevenir, disminuir o tratar un episodio de sangrado en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una cantidad eficaz de una proteína de Factor VIII (FVIII) de acción prolongada, en el que el sujeto expresa un nivel elevado de Factor de von Willebrand (VWF) en plasma. En un caso, se ha identificado que el sujeto expresa un nivel elevado de VWF en plasma. La presente descripción también se refiere a un método para prevenir, disminuir o tratar un episodio de sangrado en un sujeto, que comprende: (a) identificar un sujeto que tiene niveles elevados de VWF midiendo el nivel de VWF en el plasma de dicho sujeto, en el que un nivel de VWF de al menos alrededor de 100 UI/dl identifica al sujeto por tener un nivel elevado de VWF; y (b) administrar al sujeto una cantidad eficaz de una proteína FVIII de acción prolongada.

En un caso, el sujeto es un ser humano. En otro caso, el sujeto es un sujeto pediátrico. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia A.

En un caso, el nivel elevado de VWF es al menos alrededor de 100 UI/dl. En otro caso, el nivel elevado de VWF está entre alrededor de 100 UI/dl y alrededor de 200 UI/dl. En otro caso, el nivel elevado de VWF es alrededor de 110 UI/dl, alrededor de 120 UI/dl, alrededor de 130 UI/dl, alrededor de 140 UI/dl, alrededor de 150 UI/dl, alrededor de 160 UI/dl, alrededor de 170 UI/dl, alrededor de 180 UI/dl, alrededor de 190 UI/dl, o alrededor de 200 UI/dl.

En un caso, el sujeto tiene un serotipo sanguíneo A, B, o AB.

En un caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida en dicho sujeto de entre alrededor de 20 y alrededor de 40 horas. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida de alrededor de 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas, 35 horas, 36 horas, 37 horas, 38 horas, 39 horas, o 40 horas. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida de entre alrededor de 20 y 27 horas. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida que es al menos alrededor de 1,2 veces mayor que la semivida de dicha proteína FVIII de acción prolongada cuando se administra a un individuo que tiene niveles medios de VWF. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida que es al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la semivida de dicha proteína FVIII de acción prolongada cuando se administra a un individuo que tiene niveles medios de VWF.

En un caso, la cantidad eficaz de proteína FVIII de acción prolongada que se administra es al menos alrededor de 20 UI/kg, al menos alrededor de 25 UI/kg, al menos alrededor de 30 UI/kg, al menos alrededor de 35 UI/kg, al menos alrededor de 40 UI/kg, al menos alrededor de 45 UI/kg, al menos alrededor de 50 UI/kg, al menos alrededor de 55 UI/kg, al menos alrededor de 60 UI/kg, al menos alrededor de 65 UI/kg, al menos alrededor de 70 UI/kg, al menos alrededor de 75 UI/kg, al menos alrededor de 80 UI/kg, al menos alrededor de 85 UI/kg, o al menos alrededor de 90 UI/kg. En otro caso, la cantidad eficaz es al menos alrededor de 65 UI/kg a al menos alrededor de 90 UI/kg. En otro caso, la cantidad eficaz es 80 UI/kg.

En un caso, la proteína FVIII de acción prolongada se administra cada 72 horas o más. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada se administra alrededor de una vez a la semana o más. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada se administra alrededor de una vez cada 10 días, alrededor de una vez cada dos semanas,

alrededor de una vez cada 15 días, alrededor de una vez cada 20 días, alrededor de una vez cada tres semanas, alrededor de una vez cada 25 días, alrededor de una vez cada cuatro semanas, o alrededor de una vez cada mes.

En un caso, la FVIII de acción prolongada se administra a una dosis de 80 UI/kg una vez cada 72 horas. En un caso adicional, la FVIII de acción prolongada se administra a una dosis de 80 UI/kg una vez cada 72 horas a un sujeto pediátrico.

En un caso, la administración de la proteína FVIII de acción prolongada resuelve más de 5-20%, más de 5-15%, más de 5-10%, más de 10-20%, o más de 10-15% de los episodios de sangrado. En un caso, el nivel valle de Factor VIII:C plasmático en los sujetos se mantiene por encima de 1-3 o 3-5 UI/dl. En un caso, la administración evita un episodio de sangrado en el sujeto. En otro caso, el episodio de sangrado es espontáneo. En otro caso, la administración resuelve más de 80-100%, más de 80-90%, más de 85-90%, más de 90-100%, más de 90-95%, o más de 95-100% de los episodios de sangrado.

En un caso, la administración mantiene la homeostasis en la población de los sujetos que necesitan una cirugía. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada se administra antes de, durante, o después de la cirugía. En otro caso, la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, tonsilectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, sustitución total de la rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de sustitución de articulación. En otro caso, la cirugía es una cirugía de emergencia.

En un caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida mayor que un polipéptido que consiste en FVIII. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada está pegilada, hesilada, o polisialilada.

En un caso, la proteína FVIII de acción prolongada es una proteína quimérica que comprende una porción de FVIII y una segunda porción. En otro caso, la segunda porción es una región de Fc, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal de 28 aminoácidos (CTP) de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de los mismos. En otro caso, la segunda porción está fusionada al término amino o al término carboxi de la porción de FVIII. En otro caso, la segunda porción está insertada entre dos aminoácidos en la porción de FVIII. En otro caso, la proteína quimérica es un híbrido monómero-dímero de FVIII-Fc. En otro caso, la porción de FVIII es monocatenaria. En otro caso, la porción de FVIII comprende una cadena pesada y una cadena ligera. En otro caso, la porción de FVIII comprende factor VIII de longitud completa, factor VIII maduro, o factor VIII con una supresión total o parcial del dominio B. En otro caso, la porción de FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 2, o a los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 6. En otro caso, la porción de FVIII comprende los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 6. En otro caso, el polipéptido quimérico comprende una región de Fc que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a los aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO: 2, o a los aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO: 6. En otro caso, la segunda porción comprende los aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO: 6. En otro caso, el polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

La descripción también proporciona un método para tratar un sujeto diagnosticado con un trastorno de sangrado, que comprende medir la semivida de FVIII-Fc en dicho sujeto, en el que una semivida que es al menos alrededor de 1,2 veces mayor que la semivida de FVIII-Fc en un sujeto normal indica que el sujeto es un candidato para la dosificación a intervalo largo, y administrar un polipéptido de FVIII-Fc en una cantidad eficaz y a un intervalo de dosificación de al menos 3 días.

La descripción también proporciona un método para tratar un sujeto diagnosticado con un trastorno de sangrado, que comprende administrar un polipéptido de FVIII-Fc en una cantidad eficaz y a un intervalo de dosificación de al menos 3 días a un sujeto, en el que la semivida de FVIII-Fc en dicho sujeto es al menos alrededor de 1,2 veces mayor que la semivida de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles medios de VWF.

En un caso, la semivida de FVIII-Fc en plasma en dicho sujeto es al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la semivida de FVIII-Fc en plasma cuando se administra a un sujeto que tiene niveles medios de VWF. En otro caso, la semivida en plasma de FVIII-Fc está entre 20-40 horas. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada tiene una semivida de alrededor de 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas, 35 horas, 36 horas, 37 horas, 38 horas, 39 horas, o 40 horas. En otro caso, la proteína FVIII de acción prolongada has a semivida de entre alrededor de 20 y 27 horas.

El caso también proporciona un método para tratar un sujeto diagnosticado con un trastorno de sangrado, que comprende medir la semivida de una FVIII de acción corta administrada a dicho sujeto, en el que una semivida que es al menos alrededor de 1,2 veces mayor que la semivida de dicha FVIII de acción corta, en un sujeto que tiene niveles medios de VWF, indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo largo, y administrar un polipéptido de FVIII-Fc de acción prolongada en una cantidad eficaz y a un intervalo de dosificación de al menos 3

días. En un caso, la semivida de la FVIII de acción corta en dicho sujeto es al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la semivida de una FVIII de acción corta cuando se administra a un sujeto que tiene niveles medios de VWF.

5 En un caso, el sujeto es un ser humano. En otro caso, el sujeto es un sujeto pediátrico. En otro caso, el sujeto tiene hemofilia A. En otro caso, el sujeto tiene el serotipo sanguíneo A, B, o AB.

10 En un caso, la FVIII-Fc de acción prolongada se administra en una cantidad eficaz que es al menos alrededor de 20 UI/kg, al menos alrededor de 25 UI/kg, al menos alrededor de 30 UI/kg, al menos alrededor de 35 UI/kg, al menos alrededor de 40 UI/kg, al menos alrededor de 45 UI/kg, al menos alrededor de 50 UI/kg, al menos alrededor de 55 UI/kg, al menos alrededor de 60 UI/kg, al menos alrededor de 65 UI/kg, al menos alrededor de 70 UI/kg, al menos alrededor de 75 UI/kg, al menos alrededor de 80 UI/kg, al menos alrededor de 85 UI/kg, o al menos alrededor de 90 UI/kg. En otro caso, la cantidad eficaz es al menos alrededor de 65 UI/kg a al menos alrededor de 90 UI/kg.

15 En un caso, la cantidad eficaz de la proteína FVIII-Fc se administra alrededor de una vez cada semana, alrededor de una vez cada 10 días, alrededor de una vez cada dos semanas, alrededor de una vez cada 15 días, alrededor de una vez cada 20 días, alrededor de una vez cada tres semanas, alrededor de una vez cada 25 días, alrededor de una vez cada cuatro semanas, o alrededor de una vez cada mes.

En un caso, la administración resuelve más de 5-20%, más de 5-15%, más de 5-10%, más de 10-20%, o más de 10-15% de los episodios de sangrado. En un caso, el nivel valle de Factor VIII:C plasmático en los sujetos se mantiene por encima de 1-3 o 3-5 UI/dl.

20 En un caso, la administración evita un episodio de sangrado en el sujeto. En un caso, el episodio de sangrado es espontáneo. En un caso, la administración resuelve más de 80-100%, más de 80-90%, más de 85-90%, más de 90-100%, más de 90-95%, o más de 95-100% de los episodios de sangrado. En un caso, la administración mantiene la homeostasis en la población de los sujetos que necesitan una cirugía. En un caso, la proteína FVIII-Fc se administra antes de, durante, o después de la cirugía. En un caso, la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, tonsilectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, sustitución total de la rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de sustitución de articulación.

25 En un caso, la cirugía es una cirugía de emergencia.

30 En un caso, la proteína FVIII-Fc tiene una semivida mayor que un polipéptido que consiste en FVIII. En un caso, la proteína FVIII-Fc está pegilada, hesilada, o polisialilada. En un caso, la proteína FVIII-Fc es un híbrido monómero-dímero de FVIII-Fc. En un caso, la porción de FVIII es monocatenaria. En un caso, la porción de FVIII comprende una cadena pesada y una cadena ligera. En un caso, la porción de FVIII comprende factor VIII de longitud completa, factor VIII maduro, o factor VIII con una supresión total o parcial del dominio B. En un caso, la porción de FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 2, o a los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 6. En un caso, la porción de FVIII comprende los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO: 6.

35 En un caso, la segunda porción del polipéptido quimérico comprende una región de Fc que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a los aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO: 2, o a los aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO: 6. En un caso, la segunda porción comprende los aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO: 2, o los aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO: 6.

40 En un caso, el polipéptido de FVIII-Fc se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

45 La descripción también proporciona un método para determinar si un sujeto diagnosticado con un trastorno de sangrado, es candidato para la dosificación de intervalo largo con un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir los niveles de expresión de VWF plasmático, en el que un nivel de expresión de VWF de al menos 100 UI/dl indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo largo usando un polipéptido de FVIII de acción prolongada. En un caso, el nivel de expresión de VWF es al menos alrededor de 110 UI/dl, alrededor de 120 UI/dl, alrededor de 130 UI/dl, alrededor de 140 UI/dl, alrededor de 150 UI/dl, alrededor de 160 UI/dl, alrededor de 170 UI/dl, alrededor de 180 UI/dl, alrededor de 190 UI/dl, o alrededor de 200 UI/dl.

50 La descripción también proporciona un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para una dosificación de intervalo largo de un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir la semivida de FVIII-Fc en dicho sujeto, en el que una semivida que es al menos alrededor de 1,2 veces mayor que la semivida de FVIII-Fc, cuando se administra a un individuo que tiene niveles medios de VWF, indica que el sujeto es un candidato para una dosificación de intervalo largo. En un caso, la semivida de FVIII-Fc es al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la semivida de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles medios de VWF.

55 La descripción también proporciona un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la dosificación de intervalo largo de un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir la semivida de FVIII de acción corta en dicho sujeto, en el que una semivida que es al menos alrededor de 1,2 veces mayor que la semivida de FVIII de acción corta, cuando se administra a un sujeto que tiene

niveles medios de VWF, indica que el sujeto es un candidato para una dosificación de intervalo largo. En un caso, la semivida es al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la semivida de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles medios de VWF.

#### Breve descripción de los dibujos/figuras

- 5 FIG. 1. Representación esquemática del monómero de rFVIII-Fc.
- FIGS. 2A-E. A-B. Análisis de SDS-PAGE no reductor y reductor de rFVIII-Fc (procesado o cadena simple). C. Estructura de rFVIII-Fc analizada por LC/UV y LC/MS. D. Cromatograma de corriente iónica total (TIC) (mapa de LC/MS) de rFVIII-Fc después de la escisión con trombina. Se indican los productos de digestión principales. E. Espectro de masas deconvolucionados del dominio A2 de rFVIII-Fc y rBDDFVIII. Se indican los productos principales y sus masas relacionadas, correspondientes a un dominio A2 escindido por trombina (S373 a R740) y dos productos truncados, S373 a Y729 y S373 a E720.
- 10 FIGS. 3A-C. Caracterización bioquímica de rFVIII-Fc: A. Activación de Factor X como función de la concentración de vesícula de fosfolípido; B. Activación de Factor X como función de la concentración de FX. C. Activación del Factor X como función de la concentración del Factor IXa.
- 15 FIG 4. Activación del Factor X después de la escisión mediante la Proteína C activada.
- FIGS. 5A-D. Perfiles de actividad de FVIII media del grupo observada ( $\pm$ SE) frente al tiempo, clasificados por nivel de dosis, agrupados por compuesto (ensayo de una etapa, 25 UI/kg (A) o 65 UI/kg (B); y ensayo cromogénico, 25 UI/kg (C) o 65 UI/kg (D)) frente a tiempo.
- FIGS. 6A-B. Perfiles de actividad de FVIII media del grupo observada ( $\pm$ SE) frente al tiempo, agrupados por nivel de dosis y compuesto (ensayo de una etapa (A) o ensayo cromogénico (B)) frente al tiempo.
- 20 FIGS. 7(A)-(C). Eficacia *in vivo* de FVIII:Fc de cadena simple en modelo de transección de vena caudal de ratón HemA. (A) Las dosis de rFVIII:Fc de cadena simple se muestran como cuadrados, y las dosis de rFVIII:Fc procesado se muestran como círculos. (B) Porcentaje de supervivencia tras la transección de la vena caudal de 4,6  $\mu$ g/kg, 1,38  $\mu$ g/kg, y 0,46  $\mu$ g/kg de rFVIII-Fc o SC rFVIII-Fc. (C) Porcentaje de no sangrantes tras la transección de la vena caudal de 4,6  $\mu$ g/kg (círculo negro o triángulo invertido), 1,38  $\mu$ g/kg (triángulo o rombo), y 0,46  $\mu$ g/kg (cuadrado y círculo gris) de rFVIII-Fc o SC rFVIII-Fc, respectivamente.
- 25 FIG. 8. Diseño del estudio. La Fig. 8 representa el diseño del estudio de fase 1/2a, que fue un diseño secuencial de escalamiento de dosis para evaluar la seguridad y PK de rFVIII-Fc en comparación con ADVATE® tras una única dosis intravenosa de 25 UI/kg (Cohorte A de dosis baja) o 65 UI/kg (Cohorte B de dosis alta).
- 30 FIG. 9. Correlación de actividad de rFVIII en ensayos de una etapa (aPTT) y cromogénico. Correlación entre los resultados del ensayo de coagulación de una etapa (aPTT) y cromogénico que miden la actividad de FVIII (UI/ml) tras la inyección de ADVATE® (♦) y rFVIII-Fc (□).
- FIGS. 10(A)-(B). Perfiles farmacocinéticos de actividad de FVIII plasmático media del grupo para las cohortes de dosis baja y dosis alta. Las curvas de actividad de FVIII plasmático (ensayo de una etapa aPTT) frente al tiempo después de una única inyección intravenosa de rFVIII-Fc o ADVATE® se muestran para (A) 25 UI/kg (cohorte de dosis baja, n=6); y (B) 65 UI/kg (cohorte de dosis alta, n=10 [ADVATE®]; n=9 [rFVIII-Fc]). Los resultados presentados son media del grupo  $\pm$  error estándar de la media (SEM).
- 35 FIGS. 11(A)-(B). Efecto de los niveles de antígeno de VWF sobre  $Cl$  y  $t_{1/2}$  de la actividad de FVIII tras la inyección de ADVATE® o rFVIII-Fc. Correlación entre niveles de antígeno de VWF y (A) el  $Cl$  ajustado por peso de ADVATE® ( $R^2=0,5415$  y  $p=0,0012$ ) y rFVIII-Fc ( $R^2=0,5492$  y  $p=0,0016$ ); y (B) el  $t_{1/2}$  de ADVATE® ( $R^2 = 0,7923$  y  $p<0,0001$ ) y rFVIII-Fc ( $R^2 = 0,6403$  y  $p=0,0003$ ). Cada punto representa un sujeto individual.
- 40 FIGS. 12(A)-(B). Resultados de ROTEM® en sangre completa ex vivo para sujetos individuales tras la inyección de ADVATE® o rFVIII-Fc. La sangre se extrajo de los sujetos antes y después del tratamiento a dosis de (A) 25 UI/kg de ADVATE® y rFVIII-Fc; y (B) 65 UI/kg de ADVATE® y rFVIII-Fc en puntos de tiempo especificados. Se determinó el tiempo de coagulación por NATEM iniciado con  $Ca^{++}$  en un instrumento ROTEM®. Los resultados presentados son media  $\pm$  error estándar de la media (SEM) de lecturas del canal por triplicado para cada muestra individual.
- 45 FIGS. 13(A)-(B). Comparación de la actividad en el ensayo de generación de trombina (TGA). (A) SC rFVIII-Fc mostró un potencial de trombina endógena reducido (ETP), y (B) una trombina pico reducida, en comparación con rFVIII-Fc.
- 50 FIGS. 14(A)-(C). Datos de ROTEM in vitro. Los resultados de ROTEM (NATEM) (Media  $\pm$  SD) para diversas concentraciones de XYNTHA, ADVATE< y rFVIII-Fc adicionadas en sangre completa obtenida de ratones HemA

sin exposición previa. (A). Tiempo de coagulación promedio (CT) (FIG. 14A), (B). tiempo de formación del coágulo (CFT), y (C). ángulo alfa.

FIGS. 15(A)-(C). Datos de ROTEM ex vivo. Los resultados de ROTEM (NATEM) (Media  $\pm$  SD) de ratones HemA tras una única administración intravenosa de 50 UI/kg de XYNTHA, ADVATE, o rFVIII<sup>h</sup>FC, a 5 min, 24, 48, 72, y 96 horas después de la dosificación. (A). Tiempo de coagulación promedio (CT), (B). Tiempo de formación del coágulo (CFT), y (C). ángulo alfa.

FIGS. 16(A)-(E): Evaluación en tiempo real de la interacción de rFVIII<sup>h</sup>FC y rFVIII<sup>h</sup>FC monocatenario (SC) con vWF, y evaluación en tiempo real de la liberación mediada por trombina de rFVIII<sup>h</sup>FC y rFVIII<sup>h</sup>FC desde vWF. (A). Análisis de resonancia de plasmones superficiales (SPR) de rFVIII<sup>h</sup>FC y afinidad de SC rFVIII<sup>h</sup>FC por vWF. Se ilustra la curva de unión y el modelo de interacción de ajuste 1:1. El eje x muestra el tiempo en segundos, y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). (B). Sensorgramas, con referencia sustraída, de la liberación mediada por trombina de rFVIII<sup>h</sup>FC activada, SC rFVIII<sup>h</sup>FC, y restos de Fc que carecen de rFVIII con dominio B suprimido (rBDD FVIII) a 25°C (parte superior) y 37°C (parte inferior). El eje x muestra el tiempo en segundos, y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). Las líneas individuales indican la respuesta a diferentes concentraciones de  $\alpha$ -trombina. La línea más superior es la respuesta a 0 U/ml de  $\alpha$ -trombina, y cada línea subsiguiente corre en orden para concentraciones de  $\alpha$ -trombina de 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,3, 2,5, 5, 10, y 20 U/ml. (C). Sensorgramas, con doble referencia sustraída, de la fase de liberación mediada por trombina para rFVIII<sup>h</sup>FC, SC rFVIII<sup>h</sup>FC, y rBDD FVIII a 25°C (superior) y 37°C (inferior). El eje x muestra el tiempo en segundos, y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). Las líneas individuales indican la respuesta a diferentes concentraciones de  $\alpha$ -trombina. La línea más superior es la respuesta a 0 U/ml de  $\alpha$ -trombina, y cada línea subsiguiente corre en orden para concentraciones de  $\alpha$ -trombina de 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,3, 2,5, 5, 10, y 20 U/ml. (D). Tasa de liberación mediada por trombina como función del tiempo para rFVIII<sup>h</sup>FC, SC rFVIII<sup>h</sup>FC, y rBDD FVIII a 25°C (parte superior) y 37°C (parte inferior). El eje x muestra el tiempo en segundos, y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). Las líneas individuales indican la respuesta a diferentes concentraciones de  $\alpha$ -trombina. La línea más superior es la respuesta a 20 U/ml de  $\alpha$ -trombina, y cada línea subsiguiente corre en orden para concentraciones de  $\alpha$ -trombina de 10, 5, 2,5, 1,3, 0,63, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04, 0,02, 0,01, y 0,005 U/ml. (E). Tasa de liberación mediada por trombina pico como función de la concentración de trombina para rFVIII<sup>h</sup>FC, SC rFVIII<sup>h</sup>FC, y rBDD FVIII a 25°C (parte superior) y 37°C (parte inferior). La EC<sub>50</sub> es la concentración efectiva semimáxima. El eje x es la concentración de  $\alpha$ -trombina, en U/ml, y el eje y es la tasa de liberación máxima, en RU/segundos.

#### Descripción detallada de la invención

La presente descripción proporciona un método un método para tratar hemofilia A con Factor VIII (procesado, monocatenario, o una combinación de los mismos) usando un intervalo de dosificación más largo y/o una mayor AUC que la que es posible con los productos del Factor VIII actualmente conocidos. La presente descripción también proporciona polipéptidos quiméricos de Factor VIII mejorados, y métodos de producción.

El tratamiento de la hemofilia A es mediante terapia de sustitución dirigida a restaurar la actividad de FVIII hasta 1 a 5% de niveles normales, para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M. et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001)). Hay productos de FVIII derivados del plasma y recombinantes disponibles para tratar episodios de sangrado a demanda, o para evitar que ocurran episodios de sangrado mediante tratamiento profiláctico. En base a la semivida corta de estos productos (8-12 h) (White G.C., et al., Thromb. Haemost. 77:660-7 (1997); Morfini, M., Haemophilia 9 (supl 1):94-99; discussion 100 (2003)), los regímenes de tratamiento requieren administraciones intravenosas frecuentes, habitualmente dos a tres veces a la semana para la profilaxis, y una a tres veces al día para el tratamiento a demanda (Manco-Johnson, M.J., et al., N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007)). Tal administración frecuente es dolorosa e inconveniente.

La presente descripción proporciona un método para administrar Factor VIII a un sujeto humano que lo necesite (por ejemplo, paciente humano), que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de Factor VIII quimérico, por ejemplo un polipéptido quimérico de Factor VIII-Fc, o un híbrido de tal polipéptido, a un intervalo de dosificación al menos alrededor de una y media veces más grande que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción sin Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción de Factor VIII), por ejemplo sin la porción de Fc. La presente descripción también se refiere a un método para incrementar el intervalo de dosificación de la administración del Factor VIII en un sujeto humano que lo necesite, que comprende administrar el polipéptido quimérico del Factor VIII.

El intervalo de dosificación puede ser al menos alrededor de una y media a seis veces más grande, una y media a cinco veces más grande, una y media a cuatro veces más grande, una y media a tres veces más grande, o una y media a dos veces más grande, que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no de Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción de Factor VIII), por ejemplo sin la porción de Fc. 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 grande que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no de Factor VIII (un polipéptido

que consiste en dicha porción de Factor VIII), por ejemplo sin la porción de 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 una y media a 5, una y media, 2, 3, 4, o 5 días o más.

La presente descripción también proporciona un método para administrar Factor VIII a un sujeto humano que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido quimérico de Factor VIII, por ejemplo un polipéptido quimérico de Factor VIII-Fc, o un híbrido de tal polipéptido, para obtener un área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC) al menos alrededor de una y un cuarto de veces mayor que la AUC obtenida mediante una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no de Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción de Factor VIII), por ejemplo sin la porción de Fc. La presente descripción incluye así un método para incrementar o extender la AUC de la actividad del Factor VIII en un paciente humano que lo necesite, que comprende administrar el polipéptido quimérico de Factor VIII.

La presente descripción también proporciona un método para administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido que comprende un Factor VIII y un Fc, o un híbrido de tal polipéptido, a 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 métodos de la descripción se pueden poner en práctica en un sujeto que necesite tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

“Administrar”, como se usa aquí, significa dar un polipéptido de Factor VIII farmacéuticamente aceptable de la invención a un sujeto vía una ruta farmacéuticamente aceptable. Las vías de administración pueden ser intravenosa, por ejemplo inyección intravenosa e infusión intravenosa. Las vías adicionales de administración incluyen, por ejemplo, la administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal, y pulmonar. Los polipéptidos quiméricos y proteínas híbridas se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

“Área bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo (AUC)”, como se usa aquí, es lo mismo que el término de la técnica en farmacología, y se basa en la velocidad y grado de absorción de Factor VIII tras la administración. La AUC se determina a lo largo de un período de tiempo específico, tal como 12, 18, 24, 36, 48, o 72 horas, o para infinito usando extrapolación a base de la pendiente de la curva. Excepto que se especifique de otro modo aquí, la AUC se determina para el infinito. La determinación de la AUC se puede llevar a cabo en un único sujeto, o en una población de sujetos para la cual se calcula la media.

Un “dominio B” del Factor VIII, como se usa aquí, es el mismo que el dominio B conocido en la técnica, que se define mediante identidad de secuencia de aminoácidos interna y sitios de escisión proteolítica mediante trombina, por ejemplo los restos Ser741-Arg1648 del factor VIII humano de longitud completa. Los otros dominios del factor VIII humano se definen mediante los siguientes restos de aminoácidos: A1, restos Ala1-Arg372; A2, restos Ser373-Arg740; A3, restos Ser1690-Ile2032; C1, restos Arg2033-Asn2172; C2, restos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los restos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, restos Glu1649-Arg1689, se denomina habitualmente como el péptido de activación de cadena ligera del factor VIII. Las localizaciones de las fronteras para todos los dominios, incluyendo los dominios B, para factor VIII porcino, de ratón y canino, también son conocidas en la técnica. En una realización, el dominio B del Factor VIII está suprimido (“factor VIII con dominio B suprimido” o “BDD FVIII”). Un ejemplo de un BDD FVIII es REFACTO® (BDD FVIII recombinante), que tiene la misma secuencia que la porción de Factor VIII de la secuencia en la Tabla 2A(i) (aminoácidos 1 a 1457 o 20 a 1457 de SEQ ID NO: 2). En otra realización, el Factor VIII con dominio B suprimido contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto, que corresponde a Arginina en el resto 754 del Factor VIII con dominio B suprimido, que corresponde al resto 773 de Arginina SEQ ID NO:2, o al resto 1648 del Factor VIII de longitud completa, que corresponde al resto 1667 de Arginina de SEQ ID NO: 6. Los números de los restos de las secuencias usados aquí sin referirse a ningún número de SEQ ID corresponden a la secuencia del Factor VIII sin la secuencia del péptido señal (19 aminoácidos), excepto que se indique de otro modo. Por ejemplo, S743/Q1638 del Factor VIII de longitud completa corresponde a S762/Q1657 de SEQ ID NO: 6, debido a la secuencia del péptido señal de 19 aminoácidos. En otras realizaciones, el FVIII con dominio B suprimido comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1645, una sustitución o mutación en una posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1648, o una sustitución o mutación en las posiciones de aminoácidos que corresponden a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1645 es un aminoácido diferente del aminoácido sustituido en la posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1648. En ciertas realizaciones, la sustitución o mutación es un aminoácido distinto de arginina, por ejemplo alanina.

Un “factor VIII con dominio B suprimido” puede tener las supresiones totales o parciales descritas en las patentes U.S. n<sup>os</sup> 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. En algunas realizaciones, una secuencia del factor VIII con dominio B suprimido de la presente invención comprende una cualquiera de las supresiones descritas en la col. 4, línea 4 a col. 5, línea 28, y ejemplos 1-5, de la patente U.S. n<sup>o</sup> 6.316.226 (también en US 6.346.513). En

algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B suprimido de la presente invención tiene una supresión descrita en la col. 2, líneas 26-51 y en los Ejemplos 5-8 de la patente U.S. nº 5.789.203 (también US 6.060.447, US 5.595.886, y US 6.228.620). En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B suprimido tiene una supresión descrita en la col. 1, líneas 25 a col. 2, línea 40 de la patente US nº 5.972.885; col. 6, líneas 1-22 y en el ejemplo 1 de la patente U.S. nº 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente U.S. nº 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente U.S. nº 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2, y en el ejemplo 1 de la patente U.S. nº 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y en la tabla 2 de la patente U.S. nº 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 U.S. nº 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente U.S. nº 6.458.563. En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B suprimido tiene una supresión de la mayoría del dominio B, pero todavía contiene secuencias aminoterminales del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario en dos cadenas polipeptídicas (es decir, sitio de procesamiento intracelular), como se describe en el documento WO 91/09122. En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B suprimido está construido con una supresión de los aminoácidos 747-1638, es decir, virtualmente una supresión total del dominio B. Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un factor VIII con dominio B suprimido también puede contener una supresión de los aminoácidos 771-1666 o de los aminoácidos 868-1562 del factor VIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988). Las supresiones adicionales del dominio B que son parte de la invención incluyen, por ejemplo, la supresión de los aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:5939-5942 (1986)), 797 a 1562 (Eaton et al., Biochemistry 25:8343-8347 (1986)), 741 a 1646 (Kaufman (solicitud publicada PCT nº WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver et al., DNA 6:553-564 (1987)), 741 a 1648 (Pasek (solicitud PCT nº 88/00831)), 816 a 1598 o 741 a 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, documento EP 295597)). Cada una de las supresiones anteriores puede realizarse en cualquier secuencia del Factor VIII.

En una realización, la porción de Factor VIII con dominio B suprimido, 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-B parcial), y una segunda cadena que comprende una cadena ligera (A3-C1-C2). En otra realización, la porción de Factor VIII con dominio B suprimido es un Factor VIII monocatenario. El Factor VIII monocatenario puede comprender un sitio de procesamiento intracelular, que corresponde a Arginina en el resto 754 del Factor VIII con dominio B suprimido (resto 773 de SEQ ID NO: 2) o en el resto 1648 del Factor VIII de longitud completa (resto 1657 de SEQ ID NO: 6).

El enlace metálico entre la cadena pesada y la cadena ligera puede ser cualquier metal conocido en la técnica. Por ejemplo, los metales útiles para la invención pueden ser un ion de metal divalente. Los metales que se pueden usar para asociarse a la cadena pesada y a la cadena ligera incluyen, pero no se limitan a,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , o  $\text{Cu}^{2+}$ . Fatouros et al., Intern. J. Pharm. 155(1): 121-131 (1997); Wakabayashi et al., JBC. 279(13): 12677-12684 (2004).

“Polipéptido quimérico”, como se usa aquí, significa un polipéptido que incluye en él al menos dos polipéptidos (o subsecuencias o péptidos) procedentes de diferentes fuentes. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más polipéptidos procedentes de diferentes fuentes, tales como genes diferentes, ADNc diferentes, o diferentes especies animales u otras especies. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, uno o más enlazadores que unen las diferentes subsecuencias. De este modo, las subsecuencias se pueden unir directamente, o se pueden unir indirectamente, vía enlazadores, o de las dos maneras, dentro de un único polipéptido quimérico. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, péptidos adicionales tales como secuencias señal y secuencias tales como 6His y FLAG, que ayudan en la purificación o detección de la proteína. Además, los polipéptidos quiméricos pueden tener adiciones de aminoácidos o de péptidos a los términos N y/o C.

En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico comprende una porción de Factor VIII y una porción no de Factor VIII. Las porciones no de Factor VIII ejemplares incluyen, por ejemplo, Fc, XTEN, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal (CTP) de 28 aminoácidos de gonadotropina coriónica humana (hCG) con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, y moléculas pequeñas de unión a albúmina. Los polipéptidos quiméricos ejemplares de la invención incluyen, por ejemplo, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-Fc, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-XTEN, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-albúmina, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-PAS, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-transferrina, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-CTP, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-PEG, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-HES, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-polipéptido de unión a albúmina, y polipéptidos quiméricos de Factor VIII-molécula pequeña de unión a albúmina.

Los polipéptidos quiméricos de Factor VIII-Fc ejemplares incluyen, por ejemplo, SEQ ID NO:2 o 6 (Tabla 2), con o sin sus secuencias señal, y el polipéptido quimérico de Fc de SEQ ID NO:4 (Tabla 2).

El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y de Fc como se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO:2), o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y de Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de SEQ ID NO:2), en el que la secuencia tiene actividad de Factor VIII. La actividad de Factor VIII se puede medir mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPPT), ensayo cromogénico, u otros métodos conocidos. El polipéptido quimérico

puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y de Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO:2), o idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y de Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de SEQ ID NO:2).

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares incluyen Factor VIII fusionado a uno o más polipéptidos de XTEN. Schellenburger et al., Nat. Biotech. 27:1186-90 (2009). El polipéptido de XTEN puede estar fusionado al extremo N-terminal de FVIII, o al extremo C-terminal de FVIII. Un sitio de proteasa puede estar incluido entre la porción de XTEN y la porción de Factor VIII, para permitir tal procesamiento. Los polipéptidos de XTEN incluyen, por ejemplo, los descritos en los documentos WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682, y US 2009/0092582.

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen Factor VIII fusionado a uno o más polipéptidos de albúmina, polipéptidos de unión a albúmina, o moléculas pequeñas de unión a albúmina. En una realización, la albúmina es albúmina humana. La albúmina o la proteína de unión a albúmina puede estar fusionada al extremo N-terminal de FVIII, o al extremo C-terminal de FVIII, o insertada entre dos aminoácidos en FVIII. Los ejemplos de albúmina, por ejemplo fragmentos de la misma, que se pueden usar en la presente invención son conocidos, por ejemplo la patente U.S. nº 7.592.010; la patente U.S. nº 6.686.179 y Schulte, Thrombosis Res. 124 Supl. 2:S6-S8 (2009).

Los polipéptidos de unión a albúmina pueden comprender, sin limitación, dominios de unión a albúmina bacteriana, péptidos de unión a albúmina, o fragmentos de anticuerpo de unión a albúmina que se pueden unir a albúmina. El dominio 3 de la proteína G estreptocócica, como se describe por Kraulis et al., FEBS Lett. 378:190-194 (1996) y Linhult et al., Protein Sci. 11:206-213 (2002), es un ejemplo de un dominio de unión a albúmina bacteriana. Los ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen una serie de péptidos que tienen la secuencia central DICLPRWGCLW (SEQ ID NO: 7). Véase, por ejemplo, Dennis et al., J. Biol. Chem. 2002, 277: 35035-35043 (2002). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión a albúmina se describen en Muller y Kontermann, Curr. Opin. Mol. Ther. 9:319-326 (2007); Roovers et al., Cancer Immunol. Immunother. 56:303-317 (2007), y Holt et al., Prot. Eng. Design Sci., 21:283-288 (2008).

En ciertos aspectos, un polipéptido de FVIII recombinante de la invención comprende al menos un sitio de unión para una pequeña molécula no polipeptídica, variante, o derivado de la misma, que se puede unir a albúmina. Un ejemplo de tales restos de unión a albúmina es 2-(3-maleimidopropanamido)-6-(4-(4-yodofenil)butanamido)hexanoato (etiqueta de "Albu"), como se describe por Trusset et al., Bioconjugate Chem. 20:2286-2292 (2009).

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen Factor VIII fusionado a al menos una subunidad  $\beta$  del péptido C terminal (CTP) de gonadotropina coriónica humana, o fragmento, variante o derivado del mismo. El CTP puede estar fusionado a Factor VIII tanto en el extremo N-terminal de FVIII como al extremo C-terminal de FVIII, o puede estar insertado entre dos aminoácidos en FVIII. Se sabe que uno o más péptidos CTP, fusionados o insertados en una proteína recombinante, incrementan la semivida *in vivo* de esta proteína. Véase, por ejemplo, la patente U.S. nº 5.712.122. Los péptidos CTP ejemplares incluyen DPRFQDSSSSKAPPSRLPGSPDTPIL (SEQ ID NO: 8) o SSSSKAPPSRLPGSPDTPILPQ. (SEQ ID NO: 9). Véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente U.S. nº US 2009/0087411 A1.

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen Factor VIII fusionado a al menos una secuencia de PAS, o fragmento, variante o derivado de la misma. La secuencia de PAS puede estar fusionada tanto al extremo N-terminal de FVIII como al extremo C-terminal de FVIII, o puede estar insertada entre dos aminoácidos en FVIII. Un péptido de PAS o secuencia de PAS, como se usa aquí, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente restos de alanina y de serina, o que comprende principalmente restos de alanina, serina, y prolina, formando la secuencia de aminoácidos una conformación de espiral al azar en condiciones fisiológicas. En consecuencia, la secuencia de PAS es un bloque de construcción, un polímero de aminoácidos, o un casete de secuencia que comprende, consiste esencialmente en, o consiste en alanina, serina, y prolina, que se puede usar como parte del resto heterólogo en la proteína quimérica. Un polímero de aminoácidos también puede formar una conformación de espiral al azar cuando se añaden como constituyente minoritario en la secuencia de PAS restos distintos de alanina, serina y prolina. Por "constituyente minoritario" se quiere decir que esos aminoácidos distintos de alanina, serina y prolina se pueden añadir en la secuencia de PAS hasta cierto grado, por ejemplo hasta alrededor de 12%, es decir, alrededor de 12 de 100 aminoácidos de la secuencia de PAS, hasta alrededor de 10%, hasta alrededor de 9%, hasta alrededor de 8%, alrededor de 6%, alrededor de 5%, alrededor de 4%, alrededor de 3%, es decir, alrededor de 2%, o alrededor de 1%, de los aminoácidos. Los aminoácidos distintos de alanina, serina y prolina se pueden seleccionar del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr, y Val. En condiciones fisiológicas, un péptido de PAS forma una conformación de espiral al azar, y de ese modo puede mediar una mayor estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* para una proteína recombinante de la invención, y tiene actividad procoagulante.

Los ejemplos no limitantes de los péptidos de PAS incluyen ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 10), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 11), APSSPSAPSSPSASPSS (SEQ ID NO: 12),

APSSPSPAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 13), SSPSPSPSSPSPSPSSPA (SEQ ID NO: 14), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 15), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 16), o cualesquiera variantes, derivados, fragmentos o combinaciones de los mismos. Los ejemplos adicionales de secuencias de PAS son conocidos desde, por ejemplo, la Publ. de pat. US nº 2010/0292130 A1 y la Publ. de Sol. PCT nº WO 2008/155134 A1, patente europea emitida EP2173890.

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen Factor VIII fusionado a al menos un péptido de transferrina, o fragmento, variante o derivado del mismo. Al menos un péptido de transferrina puede estar fusionado ya sea al extremo N-terminal de FVIII o al extremo C-terminal de FVIII, o puede estar insertado entre dos aminoácidos en FVIII. Cualquier transferrina puede estar fusionada a o insertada en una proteína FVIII recombinante de la invención. Como un ejemplo, Tf (Tf) humana de tipo salvaje es una proteína de 679 aminoácidos, de aproximadamente 75 kDa (sin tener en cuenta la glicosilación), con dos dominios principales, N (alrededor de 330 aminoácidos) y C (alrededor de 340 aminoácidos), que parece que se origina a partir de una duplicación de genes. Véanse los números de acceso GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM039847 y S95936 ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)).

La transferrina transporta hierro a través de endocitosis mediada por el receptor de transferrina (TfR). Después de que el hierro es liberado en un compartimiento endosómico, y el complejo de Tf-TfR se recicla hacia la superficie celular, la Tf es liberada nuevamente en el espacio extracelular para el siguiente ciclo de transporte de hierro. Tf posee una semivida prolongada, que excede 14-17 días (Li et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002)). Las proteínas de fusión de transferrina se han estudiado para determinar la extensión de la semivida, el suministro dirigido para terapias contra el cáncer, el suministro oral, y la activación sostenida de proinsulina (Brandsma et al., *Biotechnol. Adv.*, 29: 230-238 (2011); Bai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:7292-7296 (2005); Kim et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 334:682-692 (2010); Wang et al., *J. Controlled Release* 155:386-392 (2011)).

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen Factor VIII fusionado a al menos un resto de polietilenglicol (PEG).

FVIII PEGilado se puede referir a un conjugado formado entre FVIII y al menos una molécula de polietilenglicol (PEG). PEG está comercialmente disponible en una gran variedad de pesos moleculares e intervalos de pesos moleculares medios. Los ejemplos típicos de intervalos de pesos moleculares medios de PEG incluyen, pero no se limitan a, alrededor de 200, alrededor de 300, alrededor de 400, alrededor de 600, alrededor de 1000, alrededor de 1300-1600, alrededor de 1450, alrededor de 2000, alrededor de 3000, alrededor de 3000-3750, alrededor de 3350, alrededor de 3000-7000, alrededor de 3500-4500, alrededor de 5000-7000, alrededor de 7000-9000, alrededor de 8000, alrededor de 10000, alrededor de 8500-11500, alrededor de 16000-24000, alrededor de 35000, alrededor de 40000, alrededor de 60000, y alrededor de 80000 daltons. Estos pesos moleculares medios se proporcionan meramente como ejemplos, y no pretenden ser limitantes de ninguna manera.

Una proteína FVIII recombinante de la invención se puede PEGilar para incluir restos de mono- o poli-(por ejemplo, 2-4) PEG. La PEGilación se puede llevar a cabo mediante cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Los métodos para preparar un producto de proteína PEGilada incluirán generalmente (i) hacer reaccionar un polipéptido con polietilenglicol (tal como un derivado reactivo de éster o de aldehído de PEG) en condiciones mediante las cuales el péptido de la invención se une a uno o más grupos PEG; y (ii) obtener el producto o productos de reacción. En general, las condiciones óptimas de reacción para las reacciones estarán determinadas caso a caso en base a parámetros conocidos y el resultado deseado.

Existe un número de métodos de unión de PEG disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo Malik F et al., *Exp. Hematol.* 20:1028-35 (1992); Francis, *Focus on Growth Factors* 3(2):4-10 (1992); Pub. de Pat. Europea nº EP0401384, EP0154316, y EP0401384; y Pub. de Sol. de Pat. Internacional nº WO92/16221 y WO95/34326. Como ejemplo no limitante, las variantes de FVIII pueden contener sustituciones de cisteína en uno o más sitios de inserción en FVIII, y las cisteínas pueden estar conjugadas adicionalmente al polímero de PEG. Véanse Mei et al., *Blood* 116:270-279 (2010) y la patente U.S. nº 7.632.921.

Como se explica anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen Factor VIII fusionado a al menos un polímero de hidroxietil almidón (HES). HES es un derivado de amilopectina de origen natural, y es degradado por alfa-amilasa en el cuerpo. HES exhibe propiedades biológicas ventajosas, y se usa como un agente de sustitución de volumen de sangre y en terapia de hemodilución en los hospitales. Véanse, por ejemplo, Sommermeyer et al., *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987); y Weidler et al., *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991).

HES se caracteriza principalmente por la distribución de pesos moleculares y el grado de sustitución. HES tiene un peso molecular medio (medio ponderal) de 1 a 300 kD, de 2 a 200 kD, de 3 a 100 kD, o de 4 a 70 kD. El hidroxietil almidón puede exhibir además un grado molar de sustitución de 0,1 a 3, de 0,1 a 2, de 0,1 a 0,9, o de 0,1 a 0,8, y una relación entre sustitución C2:C6 en el intervalo de 2 a 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. HES con un peso molecular medio de alrededor de 130 kD es Voluven® de Fresenius. Voluven® es un coloide artificial, empleado, por ejemplo, para la sustitución de volumen usada en la indicación terapéutica para la terapia y profilaxis

de hipovolemia. Existe un número de métodos de unión de HES disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo los mismos métodos de unión de PEG descritos anteriormente.

En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico que comprende una porción de Factor VIII tiene una mayor semivida ( $t_{1/2}$ ) con respecto a un polipéptido que consiste en la misma porción de Factor VIII sin la porción no de Factor VIII. Un polipéptido quimérico de Factor VIII con una mayor  $t_{1/2}$  se puede denominar aquí como un Factor VIII de acción prolongada. Los polipéptidos quiméricos de Factor VIII de acción prolongada incluyen, por ejemplo, Factor VIII fusionado a Fc (incluyendo, por ejemplo, polipéptidos quiméricos de Factor VIII en forma de un híbrido, tal como un híbrido monómero-dímero de FVIII<sub>2</sub>Fc; véase el Ejemplo 1, Fig. 1, y la Tabla 2A; y las patentes US n<sup>os</sup> 7.404.956 y 7.348.004), Factor VIII fusionado a XTEN, y Factor VIII fusionado a albúmina.

"Cultivo", "cultivar" y "cultivando", como se usan aquí, significa incubar células en condiciones in vitro que permiten el crecimiento o división celular, o para mantener a las células en un estado vivo. "Células cultivadas", como se usa aquí, significa células que se propagan in vitro.

"Factor VIII", como se usa aquí, significa polipéptido de factor VIII funcional en su papel normal en la coagulación, excepto que se especifique de otro modo. De este modo, el término Factor VIII incluye polipéptidos variantes que son funcionales. Las proteínas de Factor VIII pueden ser las proteínas de factor VIII humanas, porcinas, caninas, y murinas. Como se describe en la sección de "Antecedentes de la técnica", se conocen las secuencias polipeptídicas y polinucleotídicas de longitud completa, como lo son muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Los ejemplos de secuencias de factor VIII humano se muestran como subsecuencias en las SEQ ID NOs: 2 o 6 (Tabla 2). Los polipéptidos de Factor VIII incluyen, por ejemplo, factor VIII de longitud completa, factor VIII de longitud completa menos Met en el término N, factor VIII maduro (menos la secuencia señal), factor VIII maduro con una Met adicional en el término N, y/o factor VIII con una supresión total o parcial del dominio B. Las variantes del Factor VIII incluyen supresiones del dominio B, ya sean supresiones parciales o totales.

Se conocen muchas variantes del factor VIII funcional, como se explica anteriormente y más abajo. Además, se han identificado centenares de mutaciones no funcionales en el factor VIII en pacientes con hemofilia, y se ha determinado que el efecto de estas mutaciones sobre la función del factor VIII es debido más a si se encuentran en la estructura tridimensional del factor VIII que en la naturaleza de la sustitución (Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002)). Además, comparaciones entre factor VIII procedentes de seres humanos y de otras especies han identificado restos conservados que es probable que sean necesarios para la función (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); documento US 6.251.632).

El gen del factor VIII humano se aisló y expresó en células de mamífero (Toole, J. J., et al., Nature 312:342-347 (1984); Gitschier, J., et al., Nature 312:326-330 (1984); Wood, W. I., et al., Nature 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., et al., Nature 312:337-342 (1984); documento WO 87/04187; documento WO 88/08035; documento WO 88/03558; Pat. U.S. n<sup>o</sup> 4.757.006), y la secuencia de aminoácidos se dedujo a partir de ADNc. Capon et al., Pat. U.S. n<sup>o</sup> 4.965.199, describen un método de ADN recombinante para producir factor VIII en células hospedantes de mamífero y la purificación de factor VIII humano. Se ha dado a conocer la expresión de factor VIII humano en células CHO (de ovario de hámster chino) y BHKC (células de riñón de hámster recién nacido). El factor VIII humano se ha modificado para suprimir parte o todo el dominio B (Pat. U.S. n<sup>os</sup> 4.994.371 y 4.868.112), y se ha llevado a cabo la sustitución del dominio B del factor VIII humano por el dominio B del factor V humano (Pat. U.S. n<sup>o</sup> 5.004.803). La secuencia de ADNc que codifica el factor VIII humano, y la secuencia de aminoácidos predicha, se muestran en SEQ ID NOs:1 y 2, respectivamente, de la Publ. de Solicitud US n<sup>o</sup> 2005/0100990.

La Pat. U.S. n<sup>o</sup> 5.859.204, Lollar, J. S., da a conocer mutantes funcionales del factor VIII que tienen antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La Pat. U.S. n<sup>o</sup> 6.376.463, Lollar, J. S., también da a conocer mutantes del factor VIII que tienen inmunorreactividad reducida. La Publ. de Solicitud US n<sup>o</sup> 2005/0100990, Saenko et al., da a conocer mutaciones funcionales en el dominio A2 del factor VIII.

En las siguientes patentes US 6.316.226 y US 6.346.513, ambas cedidas a Baxter; US 7.041.635 cedida a In2Gen; US 5.789.203, US 6.060.447, US 5.595.886, y US 6.228.620 cedidas a Chiron; US 5.972.885 y US 6.048.720 cedidas a Biovitrum, US 5.543.502 y US 5.610.278 cedidas a Novo Nordisk; US 5.171.844 cedida a Immuno Ag; US 5.112.950 cedida a Transgene S.A.; US 4.868.112 cedida a Genetics Institute, se describe un número de moléculas del factor VIII funcionales, que incluyen supresiones del dominio B.

La secuencia del factor VIII porcino está publicada (Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986)), y se ha dado a conocer la secuencia de ADNc porcino completa obtenida a partir de la amplificación mediante PCR de secuencias del factor VIII procedentes de una biblioteca de ADNc de bazo de cerdo (Healey, J. F. et al., Blood 88:4209-4214 (1996)). En la Pat. U.S. n<sup>o</sup> 5.364.771 de Lollar y Runge, y en el documento WO 93/20093, se describe factor VIII híbrido humano/porcino que tiene sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades, y todas las secuencias de aminoácidos específicas. Más recientemente, en WO 94/11503 se dieron a conocer las secuencias nucleotídicas y de aminoácidos correspondientes de los dominios A1 y A2 de factor VIII porcino y un factor VIII quimérico con dominios A1 y/o A2 porcinos sustituidos por los dominios humanos correspondientes. La Pat. U.S. n<sup>o</sup> 5.859.204, Lollar, J. S., también describe las secuencias de ADNc porcino y de aminoácidos deducidas. La Pat. U.S. n<sup>o</sup> 6.458.563, cedida a Emory, describe Factor VIII porcino con dominio B suprimido.

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

secuencia de aminoácidos del Factor VIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de SEQ ID NO:2, y aminoácidos 1 a 2351 de SEQ ID NO:6), en el que dicha porción de Factor VIII tiene actividad de Factor VIII. El Factor VIII (o porción de Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de SEQ ID NO:2, y aminoácidos 1 a 2351 de SEQ ID NO:6).

“Dosis equivalente”, como se usa aquí, significa la misma dosis de actividad de Factor VIII según se expresa en Unidades Internacionales, que es independiente del peso molecular del polipéptido en cuestión. Una Unidad Internacional (UI) de actividad de factor VIII corresponde aproximadamente a la cantidad de factor VIII en un mililitro de plasma humano normal. Existen varios ensayos para medir la actividad de Factor VIII, incluyendo el ensayo de sustrato cromogénico de la Farmacopea Europea, y un ensayo de coagulación de una etapa.

“Fc”, como se usa aquí, significa parejas de unión al receptor de Fc neonatal funcional (FcRn), excepto que se especifique de otro modo. Una pareja de unión a FcRn es cualquier molécula que se puede unir específicamente mediante el receptor de FcRn con transporte activo consiguiendo mediante el receptor de FcRn de la pareja de unión a FcRn. De este modo, el término Fc incluye cualesquiera variantes de Fc de IgG que sean funcionales. La región de la porción de Fc de IgG que se une al receptor de FcRn se ha descrito en base a la cristalografía de rayos X (Burmeister et al., *Nature* 372:379 (1994)). El área de contacto principal del Fc con el FcRn es cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una única cadena pesada de Ig. Las parejas de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, IgG completa, el fragmento de Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los sitios de contacto principales incluyen los restos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2, y los restos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, se basan todas ellas en Kabat et al. 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD. (El receptor FcRn se ha aislado de varias especies de mamíferos, incluyendo seres humanos. Se conocen las secuencias del FcRn humano, FcRn de rata, y FcRn de ratón (Story et al., *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. En los documentos WO 2004/101740 y WO 2006/074199 se proporcionan variantes de Fc ejemplares.

Fc (o porción de Fc de un polipéptido quimérico) puede contener una o más mutaciones, y combinaciones de mutaciones.

Fc (o porción de Fc de un polipéptido quimérico) puede contener mutaciones que confieren una mayor semivida, tal como M252Y, S254T, T256E, y combinaciones de las mismas, como se describen en Oganessian et al., *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009); H433K, N434F, y combinaciones de las mismas, como se describen en Vaccaro et al., *Nat. Biotechnol.* 23:1283 (2005); los mutantes descritos en las páginas 1-2, párrafo [0012], y Ejemplos 9 y 10 del documento US 2009/0264627 A1; y los mutantes descritos en la página 2, párrafos [0014] a [0021] del documento US 20090163699 A1.

Fc (o porción de Fc de un polipéptido quimérico) también puede incluir, por ejemplo, las siguientes mutaciones: la región de Fc de IgG se puede modificar según procedimientos bien reconocidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio, y similares, para producir fragmentos de IgG o de Fc modificados, o porciones de los mismos, que se unirán mediante FcRn. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones remotas de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones en los sitios de contacto, que preservan o incluso potencian la unión al FcRn. Por ejemplo, los siguientes restos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humana (Fcγ1) se pueden sustituir sin pérdida significativa de la afinidad de unión de Fc por 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, 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, en los que, por ejemplo, P238A representa prolina de tipo salvaje sustituida por alanina en la posición número 238. Además de alanina, otros aminoácidos se pueden sustituir por los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones especificadas anteriormente. Las mutaciones se pueden introducir individualmente en Fc, dando lugar a más de cien parejas de unión a FcRn distintas de Fc nativo. Adicionalmente, se pueden introducir juntas combinaciones de dos, tres, o más de estas mutaciones individuales, dando lugar a centenares de más parejas de unión a FcRn. Algunas de estas

mutaciones pueden conferir nueva funcionalidad a la pareja de unión a FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación reduce la inmunogenicidad, potenciando de ese modo la semivida circulante de la pareja de unión a FcRn, y hace a la pareja de unión a FcRn incapaz de unirse a FcγRI, FcγRIIA, FcγRIIB, y FcγRIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge et al. 1995, Transplantation 60:847; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Adicionalmente, parece que al menos tres receptores gamma de Fc humanos reconocen un sitio de unión en IgG dentro de la región bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, otro ejemplo de nueva funcionalidad y menor inmunogenicidad potencial puede surgir a partir de mutaciones de esta región, como por ejemplo sustituyendo los aminoácidos 233-236 de "ELLG" de IgG1 humana por la secuencia correspondiente de "PVA" de IgG2 (con una supresión de aminoácido). Se ha mostrado que FcγRI, FcγRII, y FcγRIII, que median diversas funciones efectoras, no se unirán a IgG1 cuando se han introducido tales mutaciones (Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77 (1995); y Armour et al., Eur. J. Immunol. 29:2613 (1999)). Como ejemplo adicional de nueva funcionalidad que surge a partir de mutaciones descritas anteriormente, en algunos casos se puede incrementar la afinidad por FcRn más allá de la del tipo salvaje. Esta afinidad incrementada se puede reflejar en una mayor velocidad "on", una menor velocidad "off", o tanto una mayor velocidad "on" como una menor velocidad "off". Las mutaciones que se cree que imparten una mayor afinidad por FcRn incluyen, por ejemplo, T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591 (2001)).

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

Péptidos y proteínas "híbridos", como se usa aquí, significa 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 vía interacciones proteína-proteína, tales como interacciones carga-carga o hidrófobas. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido, en un híbrido, se pueden asociar entre sí vía enlace o enlaces covalentes de disulfuro, u otros enlaces covalentes. Los híbridos se describen en los documentos WO 2004/101740 y WO 2006/074199. Véanse también las patentes U.S. n<sup>os</sup> 7.404.956 y 7.348.004, como referencia aquí en su totalidad. El segundo polipéptido puede ser una segunda copia del mismo polipéptido quimérico, o puede ser un polipéptido quimérico no idéntico. Véanse, por ejemplo, la Figura 1, el Ejemplo 1, y la Tabla 2. En otra realización, el segundo polipéptido es un polipéptido que comprende un Fc. En otra realización, el polipéptido quimérico es un polipéptido quimérico de Factor VIII-Fc, y el segundo polipéptido consiste esencialmente en Fc, por ejemplo el polipéptido híbrido del Ejemplo 1, que es una proteína de fusión recombinante rFVIII-Fc que consiste en una única molécula de FVIII humano recombinante B con dominio suprimido (BDD-rFVIII), fusionado al dominio de Fc dimérico de la IgG1 humana, sin ninguna secuencia enlazadora que intervenga. Este polipéptido híbrido se denomina aquí como proteína de fusión de Fc monomérica FVIII-Fc, híbrido de monómero de FVIII-Fc, híbrido de FVIII-Fc monomérico, y dímero de monómero de FVIII-Fc. Véanse el Ejemplo 1, la 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 consistir esencialmente en una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO:4), o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de SEQ ID NO:4). El segundo polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de 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 SEQ ID NO:4).

La Figura 1 es un esquema que muestra la estructura de un polipéptido quimérico de factor VIII-Fc con dominio B suprimido, y su asociación con un segundo polipéptido, que es un polipéptido de Fc. Para obtener este híbrido, la secuencia codificante de FVIII recombinante humano con dominio B suprimido se obtuvo mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) a partir de ARN poli A de hígado humano (Clontech) usando cebadores específicos para FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia señal nativa para FVIII. La supresión del dominio B fue desde la serina 743 (S743; 2287 pb) a glutamina 1638 (Q1638; 4969 pb), para una supresión total de 2682 pb. Después, la secuencia codificante para Fc recombinante humano se obtuvo mediante RT-PCR a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos humanos (Clontech) usando cebadores específicos para Fc. Los cebadores se diseñaron de manera que la secuencia de FVIII con dominio B suprimido se fusionó directamente al término N de la secuencia de Fc, sin ningún enlazador que intervenga. La secuencia de ADN de FVIII-Fc se clonó en el vector de expresión dual de mamífero pBUDCE4.1 (Invitrogen) bajo el control del promotor de CMV. Una segunda secuencia de Fc idéntica, que incluye la secuencia señal de Igk de ratón, se obtuvo mediante RT-PCR, y se clonó en dirección 3' del segundo promotor, EF1α, en el vector de expresión pBUDCE4.1.

El vector de expresión de rFVIII-Fc se transfectó en células de riñón embrionario humano 293 (HEK293H; Invitrogen), usando reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Estirpes celulares clonales estables se generaron mediante selección con Zeocina (Invitrogen). Una estirpe celular clonal, 3C4-22, se usó para generar FVIII-Fc para la caracterización in vivo. Se produjo y purificó FVIII-Fc recombinante (McCue et al. 2009) en Biogen Idec (Cambridge,

MA). Se esperaba que la estrategia de transfección descrita anteriormente produjese tres productos, es decir, híbridos de rFVIII<sub>h</sub> monoméricos, híbridos de rFVIII<sub>h</sub> diméricos, y Fc dimérico. Sin embargo, no hubo esencialmente ningún rFVIII<sub>h</sub> dimérico detectado en el medio acondicionado procedente de estas células. Más bien, el medio acondicionado contenía Fc y rFVIII<sub>h</sub> monomérico. Es posible que el tamaño de rFVIII<sub>h</sub> dimérico fuese demasiado grande, y evitó la secreción eficiente a partir de la célula. Este resultado fue beneficioso, puesto que hizo la purificación del monómero menos complicada que si hubieran estado presentes las tres proteínas. El material usado en estos estudios tuvo una actividad específica de aproximadamente 9000 UI/mg.

En un caso, los polipéptidos de la invención se administran a un paciente que expresa un nivel elevado de factor de von Willebrand (VWF). "Sujeto" o "paciente", como se usa aquí, significa un individuo humano. Un sujeto puede ser un paciente que sufre actualmente un trastorno de sangrado, o que se espera que esté en necesidad de tal tratamiento. "Sujeto" puede incluir un sujeto adulto o un sujeto pediátrico. El sujeto pediátrico puede ser un paciente pediátrico menor de 12 años. El término "pediatría", como se usa aquí, es la rama de la medicina que trata del cuidado de lactantes y niños, y el tratamiento de sus enfermedades. En un caso, el sujeto es un paciente pediátrico que tiene un diagnóstico de hemofilia A grave. En ciertos casos, los sujetos pediátricos se tratan con un polipéptido de Factor VIII de acción prolongada de la invención.

VWF es una proteína plasmática que tiene una estructura multimérica en la que el peso molecular de las diversas formas varía entre aproximadamente 230 kDa para cada subunidad monomérica, y hasta más de 20 millones Da en las formas multiméricas de mayor peso molecular, formando así la proteína soluble conocida más grande. Su concentración plasmática es aproximadamente alrededor de 5-10 µg/ml (Siedlecki et al., Blood, vol 88: 2939-2950 (1996)), y la forma plasmática de tamaño más pequeño es aquella que corresponde al dímero, con un tamaño aproximado de 500 kDa.

VWF tiene un papel esencial a desarrollar en la hemostasis primaria, siendo responsable de la adhesión de plaquetas a superficies vasculares dañadas, y por lo tanto de la formación del tapón plaquetario sobre el cual se desarrollan los mecanismos para la formación del coágulo de fibrina. Se sugiere que los multímeros de mayor peso molecular apoyan mecanismos de adhesión plaquetaria al subendotelio con mayor eficiencia, y la eficacia clínica de concentrados de VWF se ha relacionado con la concentración de estos multímeros de mayor peso molecular (Metzner et al., Haemophilia 4:25-32 (1998)).

Por lo tanto, los sujetos que expresan niveles elevados de VWF requerirían una dosificación menos frecuente de FVIII en comparación con un sujeto que expresa menores niveles o niveles normales de VWF. El intervalo medio de VWF en el plasma está entre alrededor de 50 UI/dl y alrededor de 200 UI/dl. En un caso, el nivel medio de VWF en plasma es alrededor de 50 UI/dl. En otro caso, un nivel de VWF en plasma de al menos alrededor de 100 UI/dl es considerado un nivel elevado de VWF. En otro caso, un nivel elevado de VWF en plasma está entre alrededor de 100 UI/dl y alrededor de 200 UI/dl. En otro caso, un nivel elevado de VWF en plasma es al menos alrededor de 110 UI/dl, alrededor de 120 UI/dl, alrededor de 130 UI/dl, alrededor de 140 UI/dl, alrededor de 150 UI/dl, alrededor de 160 UI/dl, alrededor de 170 UI/dl, alrededor de 180 UI/dl, alrededor de 190 UI/dl, o alrededor de 200 UI/dl.

Por lo tanto, en un caso, a los sujetos que expresan al menos alrededor de 100 UI/dl de VWF plasmático se les administra un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención en un régimen de dosificación de intervalo prolongado. En un caso, el polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra a un intervalo de dosificación de al menos alrededor de 3 días. En otro caso, el polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra a un intervalo de dosificación de al menos alrededor de una vez cada semana, alrededor de una vez cada dos semanas, alrededor de una vez cada 15 días, alrededor de una vez cada 20 días, alrededor de una vez cada tres semanas, alrededor de una vez cada 25 días, alrededor de una vez cada cuatro semanas, o alrededor de una vez cada mes.

En un caso, los sujetos son identificados previamente por tener niveles elevados de VWF. En ciertos casos, los sujetos que tienen un serotipo sanguíneo distinto de O (es decir, A, B, o AB) requieren una dosificación menos frecuente de FVIII de acción prolongada, debido a que el FVIII de acción prolongada tiene una semivida más prolongada en estos sujetos. En estos sujetos, la mayor semivida es debida a sus niveles elevados de VWF.

Además, los datos farmacocinéticos, definidos como el estudio del curso de tiempo de la absorción, distribución, metabolismo y excreción del fármaco, se pueden usar como un identificador de sujetos idóneos para intervalos de dosificación más largos o más cortos usando un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención. La farmacocinética clínica es la aplicación de los principios farmacocinéticos al manejo terapéutico seguro y eficaz de fármacos en un paciente individual. Las metas principales de la farmacocinética clínica incluyen potenciar la eficacia y disminuir la toxicidad de una terapia farmacéutica del paciente. El desarrollo de correlaciones fuertes entre concentraciones de fármaco y sus respuestas farmacológicas ha permitido a los médicos aplicar principios farmacéuticos a situaciones reales de pacientes.

De este modo, en un caso, la semivida de un polipéptido de FVIII-Fc de la invención se usa para identificar pacientes que expresan niveles elevados de VWF. El intervalo de semivida de FVIII-Fc está entre alrededor de 10 y alrededor de 40 horas, dependiendo, al menos en parte, de los niveles de VWF también presentes. De media, sin embargo, la semivida de FVIII-Fc es alrededor de 18 horas. En general, FVIII-Fc exhibe una mayor semivida, de al menos alrededor de 1,2 veces, en pacientes que tienen niveles elevados de VWF, en comparación con la semivida de FVIII-

Fc cuando se administra a individuos que tienen niveles medios de VWF. En un caso, FVIII-Fc exhibe una mayor semivida, de al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces, en comparación con la semivida de FVIII-Fc cuando se administra a individuos que tienen niveles medios de VWF. En un caso, en sujetos que expresan niveles elevados de VWF, la semivida de FVIII-Fc está entre al menos alrededor de 20 horas y alrededor de 40 horas. En otro caso, la semivida de FVIII-Fc es al menos alrededor de 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas, 35 horas, 36 horas, 37 horas, 38 horas, 39 horas, o 40 horas. En un caso, la semivida de FVIII-Fc está entre alrededor de 20 y alrededor de 27 horas en sujetos que tienen niveles elevados de VWF. De este modo, en un caso, una mayor semivida de FVIII-Fc, en comparación con valores medios, es indicativa de un sujeto que es idóneo para un intervalo de dosificación más grande con un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención.

En otro caso, la semivida de un polipéptido de FVIII de acción corta se usa para identificar pacientes que expresan niveles elevados de VWF. Como se usa aquí, la expresión "FVIII de acción corta" se refiere a un polipéptido de FVIII en el que no se han añadido prolongadores de la semivida. En un caso, los polipéptidos de FVIII de acción corta consisten en FVIII de longitud completa o con dominio B suprimido. Los ejemplos de polipéptidos de FVIII de acción corta son Advate® y ReFacto®.

Puesto que la semivida de FVIII de acción corta también varía dependiendo, al menos en parte, de los niveles de VWF, los polipéptidos de FVIII de acción corta también se pueden usar para identificar pacientes que son idóneos para un intervalo de dosificación más grande de un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención. En un caso, el FVIII de acción corta exhibe una mayor semivida de al menos alrededor de 1,2 veces en individuos que expresan niveles elevados de VWF, en comparación con la semivida del FVIII de acción corta cuando se administra a individuos que tienen niveles medios de VWF. En otro caso, el FVIII de acción corta exhibe una mayor semivida, al menos alrededor de 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces, en individuos que expresan niveles elevados de VWF, en comparación con la semivida del FVIII de acción corta cuando se administra a individuos que tienen niveles medios de VWF. De este modo, los individuos que demuestran una mayor semivida de al menos alrededor de 1,2 veces cuando se les administra un FVIII de acción corta son idóneos para un intervalo de dosificación más grande con un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención.

"Intervalo de dosificación", como se usa aquí, significa la dosis de tiempo que transcurre entre múltiples dosis que se administran a un sujeto. La comparación del intervalo de dosificación se puede llevar a cabo en un único sujeto, o en una población de sujetos, y entonces se puede calcular la media obtenida en la población.

El intervalo de dosificación cuando se administra un polipéptido quimérico de Factor VIII, por ejemplo un polipéptido quimérico de Factor VIII-Fc (un polipéptido que comprende un Factor VIII o un híbrido) de la invención puede ser al menos alrededor de una y media veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no de Factor VIII, por ejemplo sin la porción de Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosificación puede ser al menos 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 Factor VIII sin la porción no de Factor VIII, por ejemplo sin la porción de Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). 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 Factor VIII sin la porción no de Factor VIII, por ejemplo sin la porción de Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). 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 largo. El intervalo de dosificación puede ser al menos alrededor de una y media a 5, una y media, 2, 3, 4, o 5 días, o más largo. Para un 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 largo.

En un caso, la dosis eficaz es 25-80 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, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 UI/kg), y el intervalo de dosificación es una vez cada 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 o más días, o tres veces por semana, o no más de tres veces por semana. En un caso, la dosis eficaz es 80 UI/kg, y el intervalo de dosificación es una vez cada 3 días. En un caso adicional, la dosis eficaz de 80 UI/kg, administrada a un intervalo de dosificación de cada 3 días, se administra a un sujeto pediátrico. En otro caso, la dosis eficaz es 65 UI/kg, y el intervalo de dosificación es una vez a la semana, o una vez cada 6-7 días. Las dosis se pueden administrar de forma repetida en tanto que sean necesarias (por ejemplo, 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 ciertos casos, la dosis eficaz 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 tener una dosificación de una sola 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.

“Factor VIII de acción prolongada” es un Factor VIII que tiene una mayor semivida (también denominada aquí como t<sub>1/2</sub>, t<sub>1/2</sub> beta, semivida de eliminación, y HL) con respecto a un Factor VIII de referencia. La mayor semivida de un Factor VIII de acción prolongada puede ser debida a la fusión a uno o más polipéptidos no de Factor VIII, tales como, por ejemplo, Fc, XTEN, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal (CTP) de 28 aminoácidos de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de los mismos. La mayor semivida puede ser debida a una o más modificaciones, tal como, por ejemplo, pegilación. Los polipéptidos de Factor VIII de acción prolongada ejemplares incluyen, por ejemplo, polipéptidos quiméricos de Factor VIII que comprenden Fc, polipéptidos quiméricos de Factor VIII que comprenden XTEN, y polipéptidos quiméricos de Factor VIII que comprenden albúmina. Polipéptidos de Factor VIII de acción prolongada ejemplares adicionales incluyen, por ejemplo, Factor VIII pegilado.

El polipéptido “de referencia”, en el caso de un polipéptido quimérico de Factor VIII de acción prolongada, es un polipéptido que comprende esencialmente la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico, por ejemplo la misma porción de Factor VIII sin la porción de Fc, sin la porción de XTEN, o sin la porción de albúmina. Igualmente, el polipéptido de referencia, en el caso de un Factor VIII modificado, es el mismo Factor VIII sin la modificación, por ejemplo un Factor VIII sin la pegilación.

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

- un tiempo de residencia medio (MRT) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 14-41,3 horas;
- un aclaramiento (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,22-5,19 ml/hora/kg o menos;
- un t<sub>1/2</sub> beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 11-26,4 horas;
- una recuperación incremental (valor K) (actividad; observada) en dicho sujeto de alrededor de 1,38-2,88 UI/dl por UI/kg;
- un Vss (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 37,7-79,4 ml/kg; y
- una AUC/dosis en dicho sujeto de alrededor de 19,2-81,7 UI\*h/dl por UI/kg.

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

- una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) mayor que 1,38 UI/dl por UI/kg;
- una recuperación incremental 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.
- un aclaramiento medio (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 2,33 ± 1,08 ml/hora/kg o menos;
- un aclaramiento medio (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 1,8-2,69 ml/hora/kg;
- un aclaramiento medio (CL) (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 65% del aclaramiento de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;
- un tiempo de residencia medio (MRT) (actividad) en dicha población de pacientes de al menos alrededor de 26,3 ± 8,33 horas;
- un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 25,9-26,5 horas;
- un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 1,5 veces más prolongado que el MRT medio de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;
- un t<sub>1/2</sub> beta medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de 18,3 ± 5,79 horas;
- un t<sub>1/2</sub> beta medio (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 18-18,4 horas;
- un t<sub>1/2</sub> beta medio (actividad) en dicha población de pacientes que es alrededor de 1,5 veces más prolongado que el t<sub>1/2</sub> beta medio de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;
- una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de alrededor de 2,01 ± 0,44 UI/dl por UI/kg;
- una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de alrededor de 1,85-2,46 UI/dl por UI/kg;

una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes que es alrededor de 90% de la recuperación incremental media de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;

un Vss medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de  $55,1 \pm 12,3$  ml/kg;

5 un Vss medio (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de  $45,3 \pm 56,1$  ml/kg;

una AUC/dosis media (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de  $49,9 \pm 18,2$  UI\*h/dl por UI/kg;

una AUC/dosis media (actividad) en dicha población de pacientes de alrededor de  $44,8-57,6$  UI\*h/dl por UI/kg.

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

10 una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto administrado con el polipéptido quimérico es comparable a la  $C_{max\_OBS}$  en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas;

15 una  $C_{max\_OBS}$  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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto de alrededor de 53,1 - 69 UI/dl, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

20 una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto de alrededor de 119 UI/dl, alrededor de  $119 \pm 1$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 2$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 3$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 4$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 5$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 6$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 7$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 8$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 9$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 10$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 11$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 12$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 13$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 14$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 15$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 16$  UI/dl, alrededor de  $119 \pm 17$  UI/dl, o alrededor de  $119 \pm 18$  UI/dl, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;

25 una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto de alrededor de 103 - 136 UI/dl, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;

30 una  $C_{max\_OBS}$  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  $76,5 \pm 14$  UI/dl, o alrededor de  $76,5 \pm 15$  UI/dl, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

35 una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto de alrededor de 64,9 - 90,1, UI/dl según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

40 una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto de alrededor de 182 UI/dl, alrededor de  $182 \pm 2$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 4$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 6$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 8$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 10$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 12$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 14$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 16$  UI/dl, alrededor de  $182 \pm 18$  UI/dl, o alrededor de  $182 \pm 20$  UI/dl, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o

una  $C_{max\_OBS}$  en dicho sujeto de alrededor de 146 - 227 UI/dl, alrededor de  $146 \pm 5$  UI/dl, alrededor de  $146 \pm 10$  UI/dl, alrededor de  $227 \pm 5$  UI/dl, o alrededor de  $146 \pm 10$  UI/dl, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

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

50 una  $t_{1/2\beta}$  (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, or 1,90 veces mayor que la  $t_{1/2\beta}$  (actividad) en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas;

una t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 18,8 horas,  $18,8 \pm 1$  horas,  $18,8 \pm 1$  horas,  $18,8 \pm 2$  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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa;

5 una t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 14,3 - 24,5 horas, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa;

una t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 16,7 horas,  $16,7 \pm 1$  horas,  $16,7 \pm 2$  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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas;

10 una t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 13,8 - 20,1 horas, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas;

una t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 19,8 horas,  $19,8 \pm 1$  horas,  $19,8 \pm 2$  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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas; o

15 una t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 14,3 - 27,5 horas según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas.

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

20 un aclaramiento (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 menor que el aclaramiento en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas;

25 un aclaramiento (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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

un aclaramiento (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,31 - 2,15 ml/hora/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

30 un aclaramiento (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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;

un aclaramiento (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,64 - 3,29 ml/hora/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;

35 un aclaramiento (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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

un aclaramiento (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,16 - 1,92 ml/hora/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

40 un aclaramiento (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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o

45 un aclaramiento (CL) (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 1,05-2,20 ml/hora/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

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

50 un MRT 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 mayor que el MRT en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de

- longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas;
- 5 un MRT (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 27 horas,  $27 \pm 1$  horas,  $27 \pm 2$  horas,  $27 \pm 3$  horas,  $27 \pm 4$  horas,  $27 \pm 5$  horas,  $27 \pm 6$  horas,  $27 \pm 7$  horas,  $27 \pm 8$  horas,  $27 \pm 9$  horas, o  $27 \pm 10$  horas, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa;
- un MRT (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 20,6 - 35,3 horas, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa;
- un MRT (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 23,9 - 28,5 horas, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas;
- 10 un MRT (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 19,8 - 28,9 horas, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas; o
- un MRT (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 20,5 - 39,6 horas, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas.
- 15 En otras realizaciones, el Factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:
- una recuperación incremental en dicho sujeto que es comparable a la recuperación incremental en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas;
- 20 una recuperación incremental 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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 25 una recuperación incremental en dicho sujeto de alrededor de 2,12 - 2,81 UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 30 una recuperación incremental 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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 35 una recuperación incremental en dicho sujeto de alrededor de 1,59 - 2,10 UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 40 una recuperación incremental 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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 45 una recuperación incremental 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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- una recuperación incremental en dicho sujeto de alrededor de 2,61-3,66 UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico; o
- 50 una recuperación incremental en dicho sujeto de alrededor de 2,24-3,50 UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.
- En todavía otras realizaciones, el Factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:

- un Vss (actividad) en dicho sujeto que es comparable al Vss (actividad) en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas;
- 5 un Vss (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, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un Vss (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 39,3 - 52,5 ml/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 10 un Vss (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 según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 15 un Vss (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 55,2 - 71,5 ml/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un Vss (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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 20 un Vss (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 30,4-42,3 ml/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un Vss (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, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o
- 25 un Vss (actividad) en dicho sujeto de alrededor de 38,2-49,2 ml/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.
- 30 En todavía otras realizaciones, el Factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de pacientes:
- un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto que 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, 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 mayor que la AUC<sub>INF</sub> en un sujeto administrado con la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor VIII maduro, de longitud completa, cuando se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa o un ensayo (cromogénico) de dos etapas
- 35 un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto de alrededor de  $1440 \pm 316$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto de alrededor de 1160 - 1880 h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 40 un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto de alrededor de 1480 h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 100$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 200$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 300$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 400$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 500$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 600$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 700$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 800$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1480 \pm 900$  h\*UI/dl por UI/kg, o  $1480 \pm 1000$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 45 un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto de alrededor de  $2910 \pm 1320$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto de alrededor de 1980 - 3970 h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;
- 50 un AUC<sub>INF</sub> en dicho sujeto de alrededor de 2800 h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 100$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 200$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 300$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 400$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 500$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 600$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 700$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 800$  h\*UI/dl por UI/kg,  $2800 \pm 900$  h\*UI/dl por UI/kg,

o  $2800 \pm 1000$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (aPPT) de una etapa cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico;

un  $AUC_{INF}$  en dicho sujeto de alrededor de  $1660$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 100$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 200$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 300$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 400$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 500$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 600$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 700$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 800$  h\*UI/dl por UI/kg,  $1660 \pm 900$  h\*UI/dl por UI/kg, or  $1660 \pm 1000$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

un  $AUC_{INF}$  en dicho sujeto de alrededor de  $1300 - 2120$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 25 UI/kg del polipéptido quimérico;

un  $AUC_{INF}$  en dicho sujeto de alrededor de  $4280$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 100$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 200$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 300$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 400$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 500$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 600$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 700$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 800$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 900$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 1000$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 1100$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 1200$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 1300$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 1400$  h\*UI/dl por UI/kg,  $4280 \pm 1500$  h\*UI/dl por UI/kg, o  $4280 \pm 1600$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico; o

un  $AUC_{INF}$  en dicho sujeto de alrededor de  $2960 - 6190$  h\*UI/dl por UI/kg, según se mide mediante un ensayo (cromogénico) de dos etapas cuando se administran alrededor de 65 UI/kg del polipéptido quimérico.

“Tratamiento a demanda”, como se usa aquí, significa tratamiento que se pretende que tenga lugar a lo largo de un período corto de tiempo, y que es en respuesta a una afección existente, tal como un episodio de sangrado, o una necesidad percibida, tal como cirugía planificada. Las afecciones que pueden requerir el tratamiento a demanda incluyen, por ejemplo, un episodio de sangrado, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma de cabeza, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, 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. Tales cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, tonsilectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, sustitución total de la rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía por trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de sustitución de la articulación.

En una realización, el tratamiento a demanda 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%, más del 98%, más del 99%, o 100%) o 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95%, o 95-100% de de los sangrados (por ejemplo, sangrados espontáneos) en una única dosis. En otra 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 100%) o 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95%, o 95-100% de los episodios de sangrado son catalogados como excelentes o buenos por los médicos tras el tratamiento a demanda. 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 de sangrado son catalogados como favorables por los médicos tras el tratamiento a demanda.

“Polipéptido”, “péptido” y “proteína” se usan de forma intercambiable, y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por restos de aminoácidos enlazados covalentemente.

“Polinucleótido” y “ácido nucleico” se usan de forma intercambiable, y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por restos nucleotídicos enlazados covalentemente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, monocatenarios, o bicatenarios, vectores, plásmidos, fagos, o virus. Los polinucleótidos incluyen, por ejemplo, aquellos en la Tabla 1, que codifican los polipéptidos de la Tabla 2 (véase la Tabla 1). Los polinucleótidos también incluyen, por ejemplo, fragmentos de los polinucleótidos de la Tabla 1, por ejemplo aquellos que codifican fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 2, tales como el Factor VIII, Fc, secuencia señal, 6His, y otros fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 2.

“Tratamiento profiláctico”, como se usa aquí, significa administrar un polipéptido de Factor VIII en múltiples dosis a un sujeto durante un período de tiempo para incrementar el nivel de actividad de Factor VIII en un plasma del sujeto. El nivel incrementado puede ser suficiente para disminuir la incidencia de sangrado espontáneo, o para prevenir el sangrado, por ejemplo en el caso de una lesión inesperada. Durante el tratamiento profiláctico, el nivel plasmático de proteína en el sujeto puede no caer por debajo del nivel de referencia para ese sujeto, o por debajo del nivel de Factor VIII que caracteriza a la hemofilia grave ( $<1$  UI/dl [1%]).

En una realización, el régimen profiláctico se “personaliza” al paciente individual, por ejemplo determinando los datos de PK para cada paciente y administrando Factor VIII de la invención a un intervalo de dosificación que mantenga un nivel valle de actividad de FVIII de 1-3%. Se pueden hacer ajustes cuando un sujeto experimente episodios inaceptables de sangrado, definidos como  $\geq 2$  episodios de sangrado espontáneo a lo largo de un período de dos meses cambiante. En este caso, el ajuste seleccionará como objetivo niveles valle de 3-5%. En otra realización, el tratamiento profiláctico da como resultado la prevención y control del sangrado, el control sostenido del sangrado, la protección sostenida frente al sangrado, y/o un beneficio sostenido. La profilaxis, por ejemplo la protección sostenida, se puede demostrar mediante una mayor AUC hasta el último punto de tiempo medido (AUC-LAST), y un menor aclaramiento, dando como resultado una mayor  $t_{1/2}$  terminal en comparación con FVIII de acción corta. La profilaxis se puede mostrar por una mejor  $C_{max}$ , un mejor  $T_{max}$ , y/o un mayor tiempo de residencia medio frente a FVIII de acción corta. En algunas realizaciones, la profilaxis no da como resultado episodios de sangrado espontáneo en alrededor de 24, 36, 48, 72, o 96 horas (por ejemplo, 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, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 96 horas), tras la inyección (por ejemplo, la última inyección). En ciertas realizaciones, la profilaxis da como resultado más de 30% (por ejemplo, más de 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, 86, 87, 88, 89, o 90%, por ejemplo más de 50%) de reducción media en episodios de sangrado anualizados con una dosificación de una vez a la semana (por ejemplo, a 65 UI/kg). “Dosis terapéutica”, como se usa aquí, significa una dosis que logra una meta terapéutica, como se describe aquí. El cálculo de la dosificación requerida de factor VIII se basa en el hallazgo empírico de que, de media, 1 UI de factor VIII por kg de peso corporal eleva la actividad del factor VIII en plasma en aproximadamente 2 UI/dl. La dosis requerida se determina usando la siguiente fórmula:

Unidades requeridas = peso corporal (kg) x elevación deseada del factor VIII (UI/dl o % de normal) x 0,5 (UI/kg por UI/dl)

Las dosis terapéuticas que se pueden usar en los métodos de la descripción son 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.

Las dosis terapéuticas adicionales que se pueden usar en los métodos de la descripción son alrededor de 10 a alrededor de 150 UI/kg, más específicamente, alrededor de 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 UI/kg, y más específicamente, alrededor de 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 UI/kg.

“Variante”, como se usa aquí, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido original, pero que retiene sus propiedades esenciales, por ejemplo actividad coagulante del factor VIII, o actividad de Fc (unión a FcRn). En general, las variantes son globalmente muy similares y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido original. Las variantes incluyen, por ejemplo, fragmentos polipeptídicos y polinucleótidos, supresiones, inserciones, y versiones modificadas de los polipéptidos originales.

Los polinucleótidos variantes pueden comprender, o como alternativa consistir en, una secuencia nucleotídica que es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia codificante nucleotídica en SEQ ID NO:1, 3, o 5 (la porción de factor VIII, la porción de Fc, individualmente o juntas) o la hebra complementaria de ella, la secuencia codificante nucleotídica de factor VIII mutante y recombinante conocido o Fc, tal como las descritas en las publicaciones y patentes citadas aquí, o la hebra complementaria a ella, una secuencia nucleotídica que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2, 4, o 6 (la porción de factor VIII, la porción de Fc, individualmente o juntas) y/o fragmentos polinucleotídicos de cualquiera de estas moléculas de ácidos nucleicos (por ejemplo, aquellos fragmentos descritos aquí). Los polinucleótidos que se hibridan a estas moléculas de ácidos nucleicos en condiciones de hibridación restrictivas, o en condiciones de menor restricción, también están incluidos como variantes, como lo están los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos, en tanto que sean funcionales.

Los polipéptidos variantes pueden comprender, o como alternativa consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NOS:2, 4, o 6 (la porción de factor VIII, la porción de Fc, individualmente o juntas) y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, aquellos fragmentos descritos aquí).

Por un ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica al menos, por ejemplo, 95% “idéntica” a una secuencia nucleotídica de referencia, se quiere decir que la secuencia nucleotídica del ácido nucleico es idéntica a la secuencia de referencia, excepto que la secuencia nucleotídica puede incluir hasta cinco mutaciones de punto por cada 100 nucleótidos de la secuencia nucleotídica de referencia. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tiene una secuencia nucleotídica al menos 95% idéntica a una secuencia nucleotídica de referencia, se pueden suprimir o sustituir con otro nucleótido hasta 5% de los nucleótidos en la secuencia de referencia, o se puede insertar en la secuencia de referencia un número de nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referencia. La secuencia de consulta puede ser, por ejemplo, toda la secuencia mostrada en SEQ ID NO:1 o 3, el ORF (marco de lectura abierto), o cualquier fragmento especificado como se describe aquí.

Como materia práctica, el hecho de que cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular sea al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a una secuencia nucleotídica o polipéptido de la presente invención se puede determinar convencionalmente usando programas de ordenador conocidos. En una realización, un método para determinar la mejor coincidencia total entre una secuencia de consulta (secuencia de referencia o secuencia original) y una secuencia objeto, también denominada como un alineamiento global de secuencias, se puede determinar usando el programa de ordenador FASTDB, basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En un alineamiento de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo U en T. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias es la identidad en porcentaje. En otra realización, los parámetros usados en un alineamiento de FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz = Unitaria, k-tuple = 4, Penalización por Falta de Coincidencia = 1, Penalización de Unión = 30, Longitud del Grupo de Aleatorización = 0, Puntuación de Corte = 1, Penalización de Salto = 5, Penalización de Tamaño de Salto 0,05, Tamaño de la Ventana = 500 o la longitud de la secuencia nucleotídica objeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de búsqueda debido a supresiones de 5' o 3', no debido a supresiones internas, se debe hacer una corrección manual a los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos de 5' o 3' de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de consulta que son 5' y 3' de la secuencia objeto, que no estén emparejadas/alineadas, como porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Tanto si un nucleótido está emparejado/alineado o no, se determina mediante los resultados del alineamiento de secuencias mediante FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación final de porcentaje de identidad. Esta puntuación corregida es la que se usa para los fines de la presente invención. Solamente las bases fuera de las bases de 5' y 3' de la secuencia objeto, como se presentan mediante el alineamiento de FASTDB, que no están emparejadas/alineadas con la secuencia de consulta, se calculan con el fin de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia de consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las supresiones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto, y por lo tanto, el alineamiento de FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases desapareadas representan 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejadas/número total de bases en la secuencia de consulta), de manera que el 10% se resta de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes se emparejasen perfectamente, el porcentaje final de identidad sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se compara con una secuencia de consulta de 100 bases. Esta vez, las supresiones son supresiones internas, de manera que no hay bases en los extremos 5' o 3' de la secuencia objeto que no estén emparejadas/alineadas con la consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente se corrigen manualmente las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no estén emparejadas/alineadas con la secuencia de consulta. Para los fines de la presente invención, no se realiza ninguna otra corrección manual.

Mediante un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, se quiere decir que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto es idéntica a la secuencia de consulta, excepto que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, en la secuencia objeto se puede insertar, suprimir, (indels) o sustituir por otro aminoácido, hasta 5% de los restos de aminoácidos. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden suceder en las posiciones terminales amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia, o en cualquier parte entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre restos en la secuencia de referencia, o en uno o más grupos contiguos en la secuencia de referencia.

Como materia práctica, el hecho de si un polipéptido particular es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO:2 (la porción de factor VIII, la porción de Fc, individualmente o juntas) o 4, o a una secuencia polipeptídica conocida del factor VIII o de Fc, se puede determinar convencionalmente usando programas de ordenador conocidos. En una realización, un método para determinar el mejor emparejamiento total entre una secuencia de consulta (secuencia de referencia u original) y una secuencia objeto, también denominado como alineamiento global de secuencias, se puede determinar usando el programa de ordenador FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245(1990). En un alineamiento de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias nucleotídicas, o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias es el porcentaje de identidad. En otra realización, los parámetros usados en un alineamiento de aminoácidos de FASTDB son: Matriz = PAM 0, k-tuple = 2, Penalización por Falta de Coincidencia = 1, Penalización de Unión = 20, Longitud del Grupo de Aleatorización = 0, Puntuación de Corte = 1, Tamaño de la Ventana = longitud de la secuencia, Penalización de Salto = 5, Penalización de Tamaño de Salto = 0,05, Tamaño de la Ventana = 500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos objeto, lo que sea más corto.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a supresiones N- o C-terminales, no debido a supresiones internas, se debe hacer una corrección manual a los resultados. Esto es debido a que el programa de FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia objeto cuando calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los términos N y C, con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de restos de la secuencia de consulta que son N- y C-terminales de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con un resto objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. El hecho de si un resto está emparejado/alineado se determina mediante los resultados del alineamiento de secuencias de FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado mediante el programa de FASTDB anterior usando los parámetros específicos, 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 invención. Solamente se consideran, con el fin de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad, los restos con respecto a los términos N y C de la secuencia objeto, que no están emparejados/alineados con la secuencia de consulta. Esto es, solamente las posiciones de los restos de consulta fuera de los restos N- y C-terminales más alejados de la secuencia objeto.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 restos de aminoácidos se alinea con una secuencia de consulta de 100 restos, para determinar el porcentaje de identidad. Las supresiones ocurren en el extremo N de la secuencia objeto, y por lo tanto, el alineamiento de FASTDB no muestra un emparejamiento/alineamiento de los primeros 10 restos en el término N. Los 10 restos desapareados representan 10% de la secuencia (número de restos en los términos N y C no emparejados/número total de restos en la secuencia de consulta), de manera que el 10% se resta de la puntuación del porcentaje de identidad calculado mediante el programa de FASTDB. Si los 90 restos restantes se emparejasen perfectamente, el porcentaje de identidad final sería 90%. En otro ejemplo, una secuencia objeto de 90 restos se compara con una secuencia de consulta de 100 restos. Esta vez, las supresiones son supresiones internas, de manera que no hay restos en los términos N o C de la secuencia objeto que no estén emparejados/alineados con la secuencia de consulta. En este caso, el porcentaje de identidad, calculado mediante FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solamente se corrigen manualmente las posiciones de restos fuera de los extremos N- y C-terminales de la secuencia objeto, como se presentan en el alineamiento de FASTDB, que no están emparejadas/alineadas con la secuencia de consulta. Para los fines de la presente invención, no se realiza ninguna otra corrección manual.

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

Las variantes de origen natural se denominan "variantes alélicas", y se refieren a una de varias formas alternativas de un gen para ocupar un locus dado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, Nueva York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar a nivel polinucleotídico y/o polipeptídico, y se incluyen en la presente invención. Como alternativa, las variantes de origen no natural se pueden producir mediante técnicas de mutagénesis, o mediante síntesis directa.

Usando métodos conocidos de ingeniería proteica y tecnología de ADN recombinante, las variantes se pueden generar para mejorar o alterar las características de los polipéptidos. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden suprimir del término N o del término C de la proteína segregada, sin pérdida sustancial de la función biológica. Ron et al., *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), dieron a conocer proteínas variantes de KGF que tienen actividad de unión a heparina incluso después de suprimir 3, 8, o 27 restos de aminoácidos aminoterminales. De forma similar, el interferón gamma mostró hasta diez veces mayor actividad tras suprimir 8-10 restos de aminoácidos del término carboxi de esta proteína. (Dobeli et al., *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988)).

Además, muchas pruebas demuestran que las variantes retienen a menudo 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 análisis mutacional amplio de la citocina humana IL-1a. Usaron mutagénesis al azar para generar alrededor de 3.500 mutantes de IL-1a individuales, que dieron como media 2,5 cambios de aminoácidos por variante a lo largo de toda la longitud de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posible posición de aminoácido. Los investigadores encontraron que "la mayoría de la molécula se pudo alterar con muy poco efecto sobre [la actividad de unión o la actividad biológica]". (Véase el Resumen). De hecho, solamente 23 secuencias de aminoácidos únicas, de las más de 3.500 secuencias nucleotídicas examinadas, produjeron una proteína que difirió significativamente en actividad con respecto al tipo salvaje.

Como se señala anteriormente, las variantes polipeptídicas incluyen, por ejemplo, polipéptidos modificados. Las modificaciones incluyen, por ejemplo, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado nucleotídico, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace de

disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje de GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación (Mei et al., Blood 116:270-79 (2010)), procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas, tales como arginilación, y ubiquitinación. En algunas realizaciones, el Factor VIII se modifica, por ejemplo se pegila, en cualquier localización conveniente. En algunas realizaciones, el Factor VIII se pegila en un aminoácido del Factor VIII expuesto en la superficie, por ejemplo una cisteína expuesta en la superficie, que puede ser una cisteína manipulada mediante ingeniería. En algunas realizaciones, el Factor VIII modificado, por ejemplo Factor VIII pegilado, es un Factor VIII de acción prolongada.

“Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)”, como se usa aquí, tiene el mismo significado que la expresión usada en farmacología, que es el espacio aparente (volumen) en el que se distribuye un fármaco. Vss = la cantidad de fármaco en el cuerpo dividida entre la concentración plasmática en estado estacionario.

El polipéptido quimérico usado aquí puede comprender Factor VIII procesado, o Factor VIII monocatenario, o una combinación de los mismos. “Factor VIII procesado”, como se usa aquí, significa Factor VIII que se ha escindido en Arginina 1648 (para Factor VIII de longitud completa) o Arginina 754 (para Factor VIII con dominio B suprimido), es decir, sitio de procesamiento intracelular. Debido a la escisión en el sitio de procesamiento intracelular, el Factor VIII procesado comprende dos cadenas polipeptídicas, siendo la primera cadena una cadena pesada, y siendo la segunda cadena una cadena ligera. Por ejemplo, la proteína de fusión de Factor VIII procesado-Fc (es decir, cadena pesada y cadena ligera fusionadas a Fc) corren a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa en un SDS-PAGE no reductor, respectivamente, y 90 kDa y 105 kDa en un SDS-PAGE reductor, respectivamente. Por lo tanto, en un caso, 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 Factor VIII en el polipéptido quimérico es Factor VIII procesado. En otra realización, alrededor de 75%, alrededor de 80%, alrededor de 85% de la porción de Factor VIII en el polipéptido quimérico es Factor VIII procesado. En un caso particular, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado se purifica (o aísla) del polipéptido quimérico que comprende Factor VIII 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 Factor VIII en el polipéptido quimérico es Factor VIII procesado.

“Factor VIII monocatenario”, “Factor VIII SC”, o “SCFVIII”, como se usa aquí, significa Factor VIII que no se ha escindido en el sitio de Arginina (resto 1648 para Factor VIII de longitud completa (es decir, resto 1667 de SEQ ID NO: 6) o resto 754 para Factor VIII con dominio B suprimido (es decir, resto 773 de SEQ ID NO: 2). Por lo tanto, el Factor VIII monocatenario, en el polipéptido quimérico usado aquí, comprende una sola cadena. En una realización, el Factor VIII monocatenario contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto. En otra realización, el Factor VIII monocatenario de la invención comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1645, una sustitución o mutación en una posición de aminoácido que corresponde a Arginina 1648, o una sustitución o mutación en posiciones de aminoácidos que corresponden a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa. En otras realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 es un aminoácido diferente del aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648. En ciertas realizaciones, la sustitución o mutación es un aminoácido distinto de arginina, por ejemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina, o taurina. La proteína de fusión de Factor VIII monocatenario-Fc puede correr a aproximadamente 220 kDa en un SDS-PAGE no reductor, y a aproximadamente 195 kDa en un SDS-PAGE reductor.

En un caso, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario se purifica (o aísla) del polipéptido quimérico que comprende Factor VIII 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 Factor VIII del polipéptido quimérico usado aquí es Factor VIII monocatenario. En otro caso, al menos alrededor de 1%, alrededor de 5%, alrededor de 10%, alrededor de 15%, alrededor de 20%, alrededor de 25%, alrededor de 30%, o alrededor de 35% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario. En otras realizaciones, alrededor de 15%-alrededor de 25% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico usado aquí es Factor VIII monocatenario. En una realización particular, alrededor de alrededor de 15%, alrededor de 20%, alrededor de 25%, de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico usado aquí es Factor VIII monocatenario. En otros casos, 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 Factor VIII del polipéptido quimérico usado aquí es Factor VIII monocatenario. En algunas realizaciones, la relación del Factor VIII monocatenario al Factor VIII procesado del polipéptido quimérico es (a) alrededor de 25% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 75% de Factor VIII procesado; (b) alrededor de 20% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 80% de Factor VIII procesado; (c) alrededor de 15% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 85% de Factor VIII procesado. En otros casos, la relación del Factor VIII monocatenario al Factor VIII procesado del polipéptido quimérico es (a) alrededor de 30% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 70% de Factor VIII procesado; (b) alrededor de 40% de Factor VIII monocatenario y

alrededor de 60% de Factor VIII procesado; (c) alrededor de 50% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 50% de Factor VIII procesado; (d) alrededor de 60% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 40% de Factor VIII procesado; (e) alrededor de 70% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 30% de Factor VIII procesado; (f) alrededor de 80% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 20% de Factor VIII procesado; (g) alrededor de 90% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 10% de Factor VIII procesado; (h) alrededor de 95% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 5% de Factor VIII procesado; (i) alrededor de 99% de Factor VIII monocatenario y alrededor de 1% de Factor VIII procesado; o (j) alrededor de 100% de Factor VIII monocatenario.

La porción de Factor VIII en el polipéptido quimérico usado aquí tiene actividad de Factor VIII. La actividad de Factor VIII se puede medir mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, uno de estos métodos puede ser un ensayo cromogénico. El mecanismo del ensayo cromogénico se basa en los principios de la cascada de coagulación de la sangre, en la que Factor VIII activado acelera la conversión de Factor X en Factor Xa en presencia de Factor IX activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad de Factor Xa se evalúa mediante hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilida (pNA) específico para Factor Xa. La velocidad inicial de liberación de p-nitroanilina, medida a 405 nm, es directamente proporcional a la actividad del Factor Xa, y de este modo a la actividad de Factor VIII en la muestra. El ensayo cromogénico se recomienda por el Factor VIII and Factor IX Subcommittee of the Scientific and Standardization Committee (SSC) de la International Society on Thrombosis and Hemostasis (ISTH). Desde 1994, el ensayo cromogénico también ha sido el método de referencia de la Farmacopea Europea para la asignación de la potencia del concentrado de FVIII. De este modo, en una realización, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario tiene actividad de Factor VIII comparable a un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que dicho Factor VIII procesado está fusionado a una de las dos porciones de Fc), cuando la actividad de Factor VIII se mide in vitro mediante un ensayo cromogénico.

En otra realización, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario de esta invención tiene una velocidad de generación de Factor Xa comparable a un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc).

A fin de activar Factor X en Factor Xa, el Factor IX activado (Factor IXa) hidroliza un enlace de arginina-isoleucina en el Factor X para formar Factor Xa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , fosfolípidos de membrana, y un cofactor del Factor VIII. Por lo tanto, la interacción del Factor VIII con el Factor IX es crítica en la ruta de coagulación. En ciertas realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende factor VIII monocatenario puede interaccionar con Factor IXa a una velocidad comparable a un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc).

Además, el Factor VIII está unido al Factor de von Willebrand mientras está inactivo en circulación. El Factor VIII se degrada rápidamente cuando no se une a vWF, y es liberado de vWF por la acción de trombina. En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario se une a Factor de von Willebrand en un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc).

El Factor VIII puede ser inactivado por proteína C activada, en presencia de calcio y fosfolípidos. La proteína C activada escinde la cadena pesada de Factor VIII tras Arginina 336 en el dominio A1, que interrumpe un sitio de interacción del sustrato de Factor X, y escinde tras Arginina 562 en el dominio A2, lo que potencia la disociación del dominio A2 así como interrumpe 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). De este modo, la proteína C activada puede catalizar múltiples sitios de escisión en la cadena pesada. En una realización, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario es inactivado por Proteína C activada, en un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc).

En otras realizaciones, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc). En una realización particular, el polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario es capaz de proteger un ratón HemA en un nivel comparable al polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que dicho Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc) en un modelo de transección de vena de la cola de ratón HemA.

El término “comparable”, como se usa aquí, significa una velocidad comparada o nivel que resulta de usar el polipéptido quimérico que es igual, sustancialmente igual, o similar a la velocidad o nivel de referencia. El término “similar”, como se usa aquí, significa una velocidad comparada o nivel que tiene una diferencia de no más de 10%, o no más de 15%, de la velocidad o nivel de referencia (por ejemplo, velocidad de generación de FXa mediante un polipéptido que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que dicho Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc). La expresión “sustancialmente igual” significa una velocidad comparada o nivel que tiene una diferencia de no más de 0,01%, 0,5% o 1% de la velocidad o nivel de referencia.

La presente descripción incluye además una composición que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, en el que 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 Factor VIII, que es Factor VIII monocatenario, y una segunda porción. En otro caso, 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%, alrededor de 96%, alrededor de 97%, alrededor de 98%, o alrededor de 99% del polipéptido quimérico en la composición es Factor VIII monocatenario. En otras realizaciones, la segunda porción es un Fc, XTEN, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal (CTP) de 28 aminoácidos de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de los mismos. En todavía otros casos, la composición de la presente invención comprende una combinación de un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII procesado, y un polipéptido quimérico que comprende Factor VIII monocatenario, (a) en el que alrededor de 30% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario, y alrededor de 70% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (b) en el que alrededor de 40% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario, y alrededor de 60% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (c) en el que alrededor de 50% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario, y alrededor de 50% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (d) en el que alrededor de 60% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario y alrededor de 40% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (e) en el que alrededor de 70% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario y alrededor de 30% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (f) en el que alrededor de 80% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario y alrededor de 20% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (g) en el que alrededor de 90% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario y alrededor de 10% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (h) en el que alrededor de 95% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario y alrededor de 5% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; (i) en el que alrededor de 99% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario y alrededor de 1% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII procesado; o (j) en el que alrededor de 100% de la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico es Factor VIII monocatenario.

En ciertas realizaciones, la composición de la presente invención tiene actividad de Factor VIII comparable a la composición que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que dicho Factor VIII procesado está fusionado a una de las dos porciones de Fc), cuando la actividad de Factor VIII se mide in vitro mediante un ensayo cromogénico.

En otras realizaciones, la composición de la invención tiene una velocidad de generación de Factor Xa comparable a una composición que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc). En todavía otras realizaciones, la composición que comprende factor VIII monocatenario puede interaccionar con Factor IXa a una velocidad comparable a una composición que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc). En otras realizaciones, el Factor VIII monocatenario en el polipéptido quimérico de la presente composición es inactivado por Proteína C activada, en un nivel comparable a Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico de una composición (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que el Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc). En una realización particular, la composición que comprende Factor VIII monocatenario tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a la composición que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, en el que dicho Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc). En algunas realizaciones, la composición que comprende Factor VIII monocatenario de la invención es capaz de proteger a ratones HemA, en un nivel comparable a la composición que comprende Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que consiste esencialmente en, o que consiste en, dos porciones de

Fc y el Factor VIII procesado, en el que dicho Factor VIII procesado está fusionado a un Fc de las dos porciones de Fc) en un modelo de transección de vena de la cola de ratón HemA.

La presente descripción proporciona además un método para tratar una afección de sangrado en un sujeto humano usando la composición de la invención. Un método ejemplar comprende administrar al sujeto que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición/formulación farmacéutica que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, en el que 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 Factor VIII, que es Factor VIII monocatenario, y una segunda porción.

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

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

En otras realizaciones, el sujeto que sufre una afección de sangrado necesita tratamiento para cirugía, incluyendo, por ejemplo, profilaxis quirúrgica y manejo perioperatorio. En un ejemplo, la cirugía se selecciona de cirugía menor y cirugía mayor. Los procedimientos quirúrgicos ejemplares incluyen extracción dental, tonsilectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, craneotomía, osteosíntesis, cirugía por trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, cirugía de sustitución de articulación (por ejemplo, sustitución total de rodilla, sustitución de cadera, y similar), cirugía cardíaca, y sección de cesárea.

En otro ejemplo, el sujeto se trata concomitantemente con FIX. Debido a que los compuestos de la invención son capaces de activar FIXa, se podrían usar para activar previamente el polipéptido de FIXa antes de la administración del FIXa al sujeto.

Los métodos de la descripción se pueden poner en práctica en un sujeto que necesite tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

Las composiciones farmacéuticas que comprenden al menos 30% de Factor VIII monocatenario se pueden formular para cualquier manera apropiada de administración, incluyendo, por ejemplo, la administración tópica (por ejemplo, transdérmica u ocular), oral, bucal, nasal, vaginal, rectal o parenteral.

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

En un ejemplo, la formulación farmacéutica es una formulación líquida, por ejemplo una disolución amortiguada, isotónica, acuosa. En otro ejemplo, la composición farmacéutica tiene un pH que es fisiológico, o próximo al fisiológico. En otros ejemplos, la formulación acuosa tiene una osmolaridad y salinidad fisiológicas, o próximas a las fisiológicas. Puede contener cloruro de sodio y/o acetato de sodio. En algunos ejemplos, la composición de la presente invención está liofilizada.

Habiendo descrito ahora con detalle la presente invención, ésta se entenderá más claramente mediante referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen aquí con fines solamente ilustrativos, y no están destinados a ser limitantes de la invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Clonación, expresión y purificación de rFVIII<sub>Fc</sub>

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 mediante reacciones en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) a partir de ARN políA de hígado humano. Debido al gran tamaño de FVIII, la secuencia codificante se obtuvo en varias secciones a partir

de distintas reacciones de RT-PCR, y se ensambló a través de una serie de reacciones de PCR, digestiones de restricción y ligaciones en un vector de clonación intermedio que contiene una región codificante de FVIII con dominio B suprimido (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 (por ejemplo, número de acceso de GenBank Y14735) se obtuvo mediante PCR a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos, y el casete de expresión final se obtuvo de tal manera que la secuencia de BDD FVIII se fusionó directamente al término N de la secuencia de Fc (bisagra, dominios CH2 y CH3, comenzando en D221 de la secuencia de IgG1, numeración de EU), sin que intervenga ningún enlazador. Para la expresión de la cadena de Fc sola, la secuencia señal de la cadena ligera de Ig $\kappa$  (kappa) se creó con oligonucleótidos sintéticos, y se añadió a la secuencia codificante de Fc usando PCR, para permitir la secreción de este producto proteico. Las secuencias codificantes de FVIII $\kappa$  y de la cadena de Fc se clonaron en un vector de expresión dual, pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Se transfectaron células HEK 293H (Invitrogen, Carlsbad, CA) con el plásmido pSYN-FVIII-013 usando reactivo de transfección Lipofectamine (Invitrogen, Carlsbad, CA), y se seleccionó una estirpe celular estable con zeocina. Las células se hicieron crecer en cultivo en suspensión libre de suero, y la proteína rFVIII $\kappa$  se purificó a partir de medios de recolección aclarados, usando un procedimiento de purificación de cuatro columnas, que incluye una etapa de purificación por afinidad específica de FVIII (McCue J. et al., J. Chromatogr. A., 1216(45): 7824-30 (2009)), seguido de una combinación de columnas de intercambio aniónico y una columna de interacción hidrófoba.

## Ejemplo 2

### Caracterización bioquímica

FVIII recombinante procesado-Fc (rFVIII $\kappa$ ) se sintetiza como dos cadenas polipeptídicas, consistiendo una cadena en BDD-FVIII (fusión de S743-Q1638, 1438 aminoácidos) fusionado al dominio de Fc (bisagra, dominios CH2 y CH3) de IgG1 (226 aminoácidos, que se extienden desde D221 a G456, numeración de EU), para una longitud de cadena total de 1664 aminoácidos, consistiendo la otra cadena en la misma región de Fc sola (226 aminoácidos). Aunque se esperaba que las células transfectadas con el plásmido de expresión dual FVIII $\kappa$ /Fc segregasen tres productos (dímero de FVIII $\kappa$ , monómero de FVIII $\kappa$ , y dímero Fc), solamente se detectaron el monómero de FVIII $\kappa$  y el dímero de Fc en los medios acondicionados. FVIII $\kappa$  purificada se analizó mediante análisis de SDS-PAGE no reductor y reductor (Figura 2A y B). Para SDS-PAGE no reductor, se encontraron bandas que migran a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa, consistente con los pesos moleculares predichos de la cadena pesada (HC) de FVIII $\kappa$  y la fusión de Fc dímérico con cadena ligera (LCFc2) (Figura 2A, línea 3). También se detectó una tercera banda en aproximadamente 220 kDa, consistente con el peso molecular predicho para FVIII $\kappa$  monocatenario (SC FVIII $\kappa$ ; HC+LCFc2), en el que el resto de arginina en la posición 754 (1648 con respecto a la secuencia de longitud completa) no se escinde durante la secreción. Para el análisis de SDS-PAGE reducido, se observaron bandas principales que migran a aproximadamente 25 kDa, 90 kDa, 105 kDa, y 195 kDa, consistente con los pesos moleculares predichos para el Fc monocatenario, HC, LCFc, y SC FVIII $\kappa$  (Figura 2B, línea 3). La cotransfección con PC5 humana, un miembro de las proteasas de tipo proproteína convertasa subtilisina/kexina (PCSK), dio como resultado el procesamiento completo del producto de rFVIII $\kappa$  (Figura 2A, B, línea 2).

El análisis densitométrico de varios lotes de rFVIII $\kappa$  tras SDS-PAGE indicó más de 98% de pureza de las bandas esperadas. La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) también se usó para evaluar el grado de agregación presente, y se encontró que todos los lotes tienen niveles de agregados a 0,5% o menos.

La estructura de rFVIII $\kappa$  se analizó adicionalmente mediante escisión por trombina, reducción, y análisis mediante LC/UV y LC/MS. Los cuatro fragmentos del Factor VIII generados por trombina (mediante escisiones en tres restos de arginina, posiciones 372, 740 y 795 (795 corresponde a 1689 con respecto a la secuencia de FVIII de longitud completa), se pueden detectar mediante absorbancia de UV (Figura 2C), que corresponden 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 del dominio B de 14 aminoácidos, y los péptidos relacionados con a3 de ~ 6 kDa, no se detectan mediante absorbancia de UV debido a su pequeño tamaño.

El análisis de la digestión de rFVIII $\kappa$  por trombina mediante HPLC/MS proporcionó una información más detallada de los cuatro dominios principales, así como de las especies relacionadas con a3 de ~ 6 kDa, y se comparó con REFACTO®, una proteína recombinante de BDD-FVIII (rBDD FVIII) derivada de CHO, usando los mismos métodos. Las muestras de FVIII se hicieron pasar a través de columnas Detergent-OUTDTG-100X (GBioscience, Maryland Heights, MO), para la eliminación de Tween, se digirieron totalmente con trombina, se redujeron y se analizaron mediante RP-HPLC-UV (POROS R1/10, Applied Biosystems) o RP-HPLC-MS (Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6210TOF), usando gradientes de acetonitrilo en agua + 0,1% de ácido fórmico. La secuencia peptídica también se confirmó con cartografiado peptídico de LysC, analizado mediante RP-HPLC/MS (Thermo Finnigan LTQ-XL-ETD).

Como se esperaba, el cromatograma de corriente iónica total (TIC) de rFVIII $\kappa$  (Figura 2D) parece similar al cromatograma de UV (Figura 2C). Cinco de los seis productos esperados se pueden detectar mediante LC/MS, incluyendo dos formas de la región ácida a3 generadas a partir de las isoformas procesada y monocatenaria, así como la trombina usada para la digestión. También se observó una forma truncada adicional de la región ácida a3, y

se describe de forma más completa más abajo. rBDD FVIII produjo un cromatograma de TIC similar, pero sin la cadena de Fc libre, y que tiene una masa diferente para la LC en comparación con rFVIII:Fc LC-Fc, consistente con la falta de una región de Fc (dato no mostrado).

Debido a la heterogeneidad de la glicosilación a lo largo de gran parte de la proteína, los espectros de masas deconvolucionados para las regiones A1, LC-Fc, y Fc son complejos, y por lo tanto no se ha establecido la identidad de todos los iones moleculares. Sin embargo, se encontró que la masa observada para los tres picos principales de la región de Fc coinciden con las isoformas G0, G1 y G2 encontradas en moléculas de IgG, que corresponden a oligosacáridos biantenarios que terminan en 0, 1 o 2 restos de galactosa. Los espectros de masas deconvolucionados de los péptidos relacionados con a3 y del dominio A2 proporcionaron los datos más definitivos, ya que no hay heterogeneidad en las modificaciones post-traduccionales en estas regiones, permitiendo que se identificaran sin ambigüedad las masas esperadas.

Se predice que el péptido N-terminal de 6 kDa, liberado de la LC tras la escisión de R1689, comprende la región ácida a3 (aminoácidos E1649 a R1689) si deriva de la isoforma procesada, y el dominio B truncado de 14 aminoácidos fusionado a la región ácida a3 si deriva de la isoforma monocatenaria. Se encontró que tanto rFVIII:Fc como rBDD FVIII contienen ambas formas de la región a3, proporcional a los niveles esperados en base al análisis de SDS-PAGE. Además, ambas proteínas contenían una forma truncada de la región a3, que corresponde a los aminoácidos D1658-R1689, como se ha dado a conocer para otros productos de FVIII, aunque ésta se encontró en mayor abundancia en rBDD FVIII que en rFVIII:Fc.

El dominio A2 contiene tres sitios de sulfatación de tirosina potenciales, pero ningún sitio de glicosilación que pudiese dar como resultado heterogeneidad compleja, y por lo tanto se pueden calcular las masas exactas de esta región. Además del pico esperado principal en el espectro de masas deconvolucionado de rFVIII:Fc, que se correlaciona con la masa de la secuencia S373 a R740 (Figura 2E), se identificaron dos formas adicionales que corresponden a truncamientos conocidos de la HC de FVIII, que se correlacionan con un dominio A2 truncado en E720 e Y729. Estas formas truncadas dadas a conocer también se observaron directamente en el espectro deconvolucionado de A2 de rBDD FVIII (Figura 2E). Tanto rFVIII:Fc como A2 de rBDD FVIII contenían cantidades relativas similares de la forma truncada en Y729, aunque el dominio A2 de rBDD FVIII contenía un nivel notablemente mayor de la forma truncada en E720, en comparación con la misma forma en rFVIII:Fc (Figura 2E).

La secuencia principal de rFVIII:Fc se confirmó mediante cartografiado peptídico con digestión con lisil endopeptidasa (Lys-C), seguido de detección espectrométrica de UV y de masas. De los 99 péptidos teóricos producidos a partir de rFVIII:Fc, se detectaron 81, que corresponden a 98% de la secuencia total. También se caracterizaron mediante este método las modificaciones post-traduccionales de rFVIII:Fc. FVIII contiene 6 sitios de sulfatación de tirosina potenciales, que corresponden a las posiciones 346, 718, 719, 723, 1664, y 1680. Se encontraron péptidos completamente sulfatados que corresponden a estos seis sitios, con cantidades en trazas de péptido no sulfatado, que corresponde a la posición 1680, según se evalúa mediante integración del cromatograma de iones totales en los espectros de masas, y ningún péptido no sulfatado detectable que corresponde a las otras posiciones. BDD FVIII también contiene 6 sitios de N-glicosilación potenciales, cuatro de los cuales se ha dado a conocer que están glicosilados en productos de FVIII recombinante. Consistente con esto, se encontró que rFVIII:Fc tiene los mismos 4 sitios glicosilados; Se encontró que N239 y N2118 contienen estructuras ricas en manosa, mientras que se encontró que N41 y N1810 contienen hidratos de carbono más complejos, similares a los encontrados en rBDD FVIII. Se encontró que la glicosilación enlazada mediante N de la región de Fc coincide con las isoformas G0, G1 y G2 encontradas con el mapa de trombina mediante LC/MS. Se ha dado a conocer que FVIII tiene sitios de O-glicosilación en Ser 741 y 743 que están parcialmente ocupados, y se encontró que este es el caso igualmente con rFVIII:Fc.

El polipéptido de rFVIII:Fc producido sin enzimas de procesamiento cotransfectadas exhibió 15-25% de FVIII:Fc monocatenario (SC FVIII:Fc), que difiere de rFVIII:Fc procesado en un único enlace peptídico entre R754 y E755 (R1648/E1649 con respecto al FVIII de longitud completa). Esta isoforma se purificó y caracterizó en todos los ensayos bioquímicos descritos anteriormente, y se encontró que era comparable a rFVIII:Fc como se muestra más abajo. Se encontró que la actividad de FVIII:Fc monocatenario purificado es similar a rFVIII:Fc en un ensayo cromogénico, así como mediante los diversos ensayos funcionales descritos más abajo.

Medida de la actividad de FVIII mediante los ensayos cromogénico y aPTT de una etapa

La actividad de FVIII se midió mediante un ensayo cromogénico de FVIII. Se encontró que la actividad específica media de cuatro lotes distintos de rFVIII:Fc es  $9762 \pm 449$  UI/mg mediante el ensayo cromogénico, que corresponde a  $2148 \pm 99$  UI/nmol. Se encontró que la actividad específica media de catorce lotes distintos de rFVIII:Fc es  $8460 \pm 699$  UI/mg mediante el ensayo de aPTT, y  $9348 \pm 1353$  UI/mg mediante el ensayo cromogénico, que corresponde a  $1861 \pm 154$  y  $2057 \pm 298$  UI/nmol, respectivamente. La actividad de FVIII de FVIII monocatenario:Fc también se midió mediante el ensayo cromogénico, y se comparó con el rFVIII procesado:Fc o rFVIII:Fc DS (que contiene alrededor de 25% de rFVIII:Fc). Como muestra la Tabla 3A, rFVIII:Fc monocatenario no mostró diferencia significativa en la actividad de FVIII en comparación con la actividad de Factor VIII de FVIII:Fc completamente procesado o rFVIII:Fc DS mediante el ensayo cromogénico, tanto en presencia como en ausencia del Factor von

Willebrand (VWF). La Tabla 3B muestra que en ausencia de VWF se observó actividad completa de SCrFVIIIc, según se mide mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) de una etapa.

TABLA 3A. Actividad de FVIII mediante ensayo cromogénico

| Matriz                                           | Muestra                                                                                                     | Actividad específica cromogénica (UI/mg) | %CV* |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------|
| Plasma sin FVIII                                 | rFVIIIcDS (25% NP) (RECD-19189-09-013)                                                                      | 9066                                     | 2,49 |
|                                                  | rFVIIIc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)                                            | 8194                                     | 2,72 |
|                                                  | rFVIIIc completamente procesado (purificado a partir de una estirpe celular manipulada mediante ingeniería) | 9577                                     | 8,34 |
| Plasma sin FVIII ni vWF                          | rFVIIIcDS (25% NP) (RECD-19189-09-013)                                                                      | 10801                                    | 8,92 |
|                                                  | rFVIIIc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)                                            | 9498                                     | 4,70 |
|                                                  | rFVIIIc completamente procesado (purificado a partir de una estirpe celular manipulada mediante ingeniería) | 9569                                     | 4,54 |
| Plasma sin FVIII/VWF suplementado con VWF humano | rFVIIIc                                                                                                     | 9982                                     | 4,3  |
|                                                  | SC rFVIIIc                                                                                                  | 8984                                     | 4,6  |
|                                                  | rFVIIIc completamente procesado                                                                             | 8275                                     | 8,2  |
| *CV=coeficiente de variación                     |                                                                                                             |                                          |      |

5

TABLA 3B. Actividad de FVIII mediante ensayo de aPTT

| Matriz                                           | Muestra                                                                                                     | Actividad específica de coagulación (aPTT) (UI/mg) | %CV   |
|--------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------|
| Plasma sin FVIII                                 | rFVIIIcDS (25% NP) (RECD-19189-09-013)                                                                      | 8210                                               | 5,88  |
|                                                  | rFVIIIc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)                                            | 3108                                               | 6,57  |
|                                                  | rFVIIIc completamente procesado (purificado a partir de una estirpe celular manipulada mediante ingeniería) | 8683                                               | 3,57  |
| Plasma sin FVIII ni vWF                          | rFVIIIcDS (25% NP) (RECD-19189-09-013)                                                                      | 15621                                              | 6,47  |
|                                                  | rFVIIIc monocatenario (purificado a partir de RECD 19189-09-013)                                            | 13572                                              | 2,41  |
|                                                  | rFVIIIc completamente procesado (purificado a partir de una estirpe celular manipulada mediante ingeniería) | 15170                                              | 10,42 |
| Plasma sin FVIII/VWF suplementado con VWF humano | rFVIIIc                                                                                                     | 7742                                               | 7,4   |
|                                                  | SC rFVIIIc                                                                                                  | 3133                                               | 4,9   |
|                                                  | rFVIIIc completamente procesado                                                                             | 8495                                               | 4,0   |

En el ensayo de coagulación de una etapa (APTT), SC rFVIIIc demostró una disminución del 60% en la actividad cuando el plasma tiene un nivel normal de VWF, sugiriendo el papel potencial de VWF en la activación de SC rFVIIIc. Esta observación se confirmó posteriormente por adición de VWF humano nuevamente al plasma con FVIII/VWF agotado (Tabla 3), en el que la actividad coagulante de SC rFVIIIc se redujo al mismo nivel que en plasma deficiente en FVIII congénito.

#### Actividad en el complejo de Xasa

La actividad de FVIII también se midió en el contexto del complejo de Xasa, incubando FIX activado y REFACTO® activado por trombina o proteína rFVIIIc en una superficie de fosfolípido en presencia de calcio, y monitorizando la conversión de Fx en FXa, según se mide mediante escisión de un sustrato cromogénico o fluorogénico, a partir de la cual se pueden determinar las velocidades de generación de FXa. Este ensayo se modificó entonces variando un componente del ensayo a la vez que se mantienen constantes los otros a fin de examinar las interacciones con cada componente individual.

La velocidad de generación de FXa se determinó como una función de las concentraciones variables de fosfolípido para rFVIIIc DS, rBDD FVIII, y rFVIIIc monocatenario (Figura 3A), usando vesículas fosfolípídicas sintéticas (25% de fosfatidil serina/75% de fosfatidil colina). Se encontró que ambas proteínas tienen un perfil de actividad similar, con actividad pico a aproximadamente 156  $\mu$ M de fosfolípidos.

Entonces, la velocidad de generación de FXa se determinó como una función de las concentraciones variables de FX, y se calcularon los valores Km y Vmax (Figura 3B). Se encontró que los perfiles de actividad de rFVIIIc DS, rBDD FVIII, y rFVIIIc monocatenario son similares, con Km y Vmax similares (Tabla 4). Finalmente, la velocidad de generación de FXa se determinó como una función de las concentraciones variables de FIX (Figura 3C). Los perfiles de actividad parecieron similares, con Kd y Vmax similares (Tabla 4). Se obtuvieron resultados similares usando plaquetas como fuente de fosfolípidos (datos sin publicar, junio 2009).

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

| Fuente de lípido | Molécula   | Km (nM)        | Vmax (nM/min)   |
|------------------|------------|----------------|-----------------|
| 25%PS-75%PC      | rFVIIIc DS | 55,0 $\pm$ 5,9 | 65,6 $\pm$ 8,6  |
|                  | rBDD FVIII | 51,0 $\pm$ 8,7 | 73,5 $\pm$ 10,1 |
|                  | NP rFVIIIc | 53,2 $\pm$ 7,5 | 56,0 $\pm$ 13,8 |

TABLA 5. Interacciones de FIXa con proteínas FVIII

| Fuente de lípido | Molécula   | Km (nM)       | Vmax (nM/min) |
|------------------|------------|---------------|---------------|
| 25%PS-75%PC      | rFVIIIc DS | 2.8 $\pm$ 0.4 | 4.5 $\pm$ 0.3 |
|                  | rBDD FVIII | 2.5 $\pm$ 0.3 | 4.0 $\pm$ 1.0 |
|                  | NP rFVIIIc | 2.3 $\pm$ 0.2 | 3.8 $\pm$ 0.4 |

#### Inactivación mediante APC

Una vez activo, FVIII es inactivado por escisión mediante proteína C activada (APC), así como mediante disociación del dominio A2. rFVIIIc y rBDD FVIII fueron ambos activados por trombina, después se incubaron con APC durante tiempos diferentes, y se determinó la actividad en un ensayo de generación de FXa (Figura 4). En ausencia de la activación por trombina, se detectó poca generación de FXa, y ésta aumentó significativamente con la digestión mediante trombina. El tratamiento con APC durante 90 min. condujo a una disminución significativa en las velocidades de generación de FXa, similar a las muestras no activadas, y estos resultados fueron similares para rFVIIIc DS, rBDD FVIII, y rFVIIIc monocatenario.

#### Afinidad por vWF

Las interacciones de FVIII con el factor de von Willebrand (vWF) se midieron mediante análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIAcore), basado en la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR), para determinar la cinética de la unión de rFVIIIc y rBDD FVIII con respecto a vWF (Tabla 6). Los parámetros de velocidad cinéticos de Ka (velocidad on) y Kd (velocidad off), y la KD de afinidad (Kd/Ka), se determinaron para cada interacción de FVIII en condiciones idénticas. Se encontró que tanto rFVIIIc como rBDD FVIII tienen una afinidad

de unión de pocos nM (KD) por vWF, de  $1,64 \pm 0,37$  y  $0,846 \pm 0,181$  nM, respectivamente. Las proteínas tuvieron velocidades off similares, con una diferencia de dos veces en la velocidad on, dando como resultado una diferencia de dos veces en la afinidad.

TABLA 6. Análisis de unión de Biacore de las proteínas FVIII a vWF

| Analito      | Ligando | N | Parámetros de velocidad cinéticos |                                | Velocidad Off/velocidad On       |
|--------------|---------|---|-----------------------------------|--------------------------------|----------------------------------|
|              |         |   | Velocidad On (M-1s-1)             | Velocidad Off (s-1)            | KD(M)                            |
| rFVIII Fc DS | hvWf    | 5 | $7,92 \pm 1,51 \times 10^5$       | $1,25 \pm 1,12 \times 10^{-3}$ | $1,64 \pm 0,37 \times 10^{-9}$   |
| NP rFVIII Fc | hvWf    | 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   | hvWf    | 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 encontró que la afinidad de rFVIII:Fc DS o rFVIII Fc monocatenario por vWF está en el intervalo bajo de nM, aproximadamente dos veces mayor que la de BDD FVIII solo. A concentraciones fisiológicas, esto daría como resultado una ligera disminución en el porcentaje de rFVIII Fc (procesado o monocatenario) complejoado con vWF, en comparación con FVIII libre; sin embargo, estudios in vivo han indicado que la semivida de rFVIII Fc está significativamente prolongada con respecto de longitud completa o BDD FVIII, a pesar de esta afinidad ligeramente menor, y por lo tanto esto no parece comprometer la semivida de la molécula. Puede ser posible que el rFVIII Fc libre se recicle más eficientemente a través de la ruta de FcRn, y por lo tanto esto puede contribuir a una mayor prolongación de la semivida.

Afinidad por vWF y liberación de vWF mediada por trombina

El Factor VIII con dominio B suprimido recombinante VIII Fc (rFVIII Fc) se expresó en células HEK293. Durante la biosíntesis en células HEK293, la mayoría del rFVIII Fc es procesado mediante proteólisis limitada para generar una cadena pesada (HC) de FVIII y una cadena ligera (LC) de FVIII, a la que está unido el resto de Fc. Se piensa que la disociación espontánea de la HC y LC en plasma, y durante el almacenamiento de productos farmacéuticos de FVIII, contribuye a una pérdida de la actividad de FVIII. Esta porción restante del rFVIII Fc biosintetizado, que no es procesada, forma una isoforma monocatenaria de rFVIII Fc (SC rFVIII Fc), lo que puede proporcionar una mejor capacidad de fabricación y estabilidad en comparación con el rFVIII Fc procesado.

Este ejemplo describe un ensayo que compara la interacción de SC rFVIII Fc con el factor de von Willebrand (vWF) en relación con la interacción de rFVIII Fc con vWF. Las interacciones con vWF se midieron mediante análisis de interacción biomolecular en tiempo real (Biacore), basado en la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR), para determinar la cinética de la unión de rFVIII Fc y SC rFVIII Fc con respecto a vWF (Tabla 11 y 16A). Se inmovilizó vWF derivado de plasma humano libre de FVIII mediante acoplamiento amínico sobre la superficie de un biosensor en niveles suficientemente bajos para evitar la limitación del transporte de masas. Subsiguientemente, se inyectaron rFVIII Fc y SC rFVIII Fc en un modo cinético de un solo ciclo, a concentraciones que oscilan de 0,13 a 5,0 nM. Los datos del sensograma se ajustaron a un modelo de interacción 1:1.

Se determinaron los parámetros de velocidad cinéticos de Ka (velocidad on) y Kd (velocidad off), y la KD de afinidad (Kd/Ka), para cada interacción de FVIII en condiciones idénticas. Se encontró que tanto rFVIII Fc como SC rFVIII Fc tienen una afinidad de unión (KD) en el intervalo bajo de nM para vWF, de  $0,34 \pm 0,1$  y  $0,31 \pm 0,1$  nM, respectivamente. Ambas isoformas también tuvieron velocidades on y velocidades off similares.

TABLA 11. Análisis de unión de Biacore de proteínas FVIII a vWF

| Analito      | Ligando | N | Parámetros de velocidad cinéticos |                              | Velocidad Off/velocidad On    |
|--------------|---------|---|-----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|              |         |   | Velocidad On (M-1s-1)             | Velocidad Off (s-1)          | KD(M)                         |
| rFVIII Fc    | hvWf    | 6 | $2,6 \pm 0,4 \times 10^5$         | $8,9 \pm 1,3 \times 10^{-4}$ | $3,4 \pm 0,1 \times 10^{-10}$ |
| SC rFVIII Fc | hvWf    | 6 | $2,7 \pm 0,1 \times 10^5$         | $8,4 \pm 0,4 \times 10^{-4}$ | $3,1 \pm 0,1 \times 10^{-10}$ |

Entonces, se midió la liberación mediada por trombina de rFVIII Fc, SC rFVIII Fc, y de FVIII con dominio B eliminado que carece de restos Fc (rBDD FVIII), tanto a 25°C como a 37°C. El vWF humano se inmovilizó por acoplamiento de amina en niveles similares sobre tres celdas de flujo sobre la superficie del biosensor. La celda de flujo restante actuó como un blanco, con los propósitos de referencia. Las proteínas rFVIII Fc y SC rFVIII Fc se capturaron mediante vWF y se dejaron disociar lentamente, y las concentraciones de rFVIII Fc y SC rFVIII Fc se ajustaron para

obtener niveles de captura equimolares hacia el final de la fase de disociación. Se prepararon diluciones de  $\alpha$ -trombina humana por la dilución en serie de 2 veces, y se aplicaron a concentraciones que oscilaban de 0,005 a 20 U/ml, lo que da lugar a la liberación proteolítica de las especies de FVIIIa a partir de vWF. La liberación mediada por trombina de rFVIIIc activado, SC rFVIIIc, y rBDD FVIII, a partir de vWF, se monitorizó en tiempo real usando un biosensor óptico basado en SPR (Figura 16B). Tras restar la referencia del blanco (Figura 16C), se determinó la velocidad de liberación como una función de la concentración de  $\alpha$ -trombina (Figura 16D). La concentración efectiva semimáxima de trombina ( $EC_{50}$ ) para SC rFVIIIc fue  $12 \pm 1$  U/ml, en comparación con  $3,9 \pm 0,3$  U/ml para rFVIIIc a  $25^\circ\text{C}$ , y fue  $15 \pm 1$  U/ml para SC rFVIIIc en comparación con  $4,8 \pm 0,2$  U/ml para rFVIIIc a  $37^\circ\text{C}$  (Figura 16E). rFVIIIc tuvo un valor de  $EC_{50}$  de trombina similar en comparación con rBDD FVIII, con valores de  $3,9 \pm 0,3$  U/ml y  $3,3 \pm 0,3$  U/ml, respectivamente, a  $25^\circ\text{C}$ , y valores de  $4,8 \pm 0,2$  U/ml y  $4,0 \pm 0,2$  U/ml, respectivamente, a  $37^\circ\text{C}$ . SC rFVIIIc tenía un valor de  $EC_{50}$  de trombina que fue aproximadamente 3 veces mayor que el de rFVIIIc. Bajo este empeoramiento de la liberación de vWF mediada por trombina puede subyacer la reducción de la actividad específica para SC rFVIIIc observada en el ensayo de aPTT en el que está presente vWF (Tabla 3B).

### Ejemplo 3

Se diseñó un estudio de fase I/IIa, de etiqueta abierta, cruzado, con escala de dosis, de múltiples centros, y primero en seres humanos, para evaluar la seguridad, tolerabilidad, y farmacocinética de una dosis única de rFVIIIc en sujetos con hemofilia A severa (definida como factor VIII [FVIII] endógeno  $<1$  UI/dl [1%]). Se enroló un total de aproximadamente 12 pacientes previamente tratados, y se les dosificó rFVIIIc a 25 o 65 UI/kg. Tras el cribado (programado en los 28 días anteriores a la primera dosis de [rFVIII] ADVATE®, el agente de comparación de referencia) y un mínimo de 4 días (96 horas) transcurridas sin tratamiento de FVIII antes de la primera inyección, aproximadamente 6 sujetos recibieron una única dosis de 25 UI/kg de ADVATE®, seguido de un perfil farmacocinético (PK) de 3 días (72 horas), luego se cruzan y reciben una única dosis, de etiqueta abierta, de 25 UI/kg de rFVIIIc durante un perfil de PK de 7 días (168 horas). Los primeros 3 sujetos se dosificaron de forma secuencial. Para los primeros tres (3) sujetos dosificados con 25 UI/kg de rFVIIIc, cada sujeto se sometió a una evaluación de inhibidores a 14 días (336 horas) después de la inyección de rFVIIIc. La dosificación del próximo sujeto (para los primeros tres sujetos únicamente) se llevó a cabo una vez que se completó el ensayo de inhibidores. Después de que el tercer sujeto completó la evaluación de inhibidores de 14 días, los tres sujetos restantes en 25 UI/kg y los seis sujetos en 65 UI/kg comenzaron el enrolamiento de forma secuencial, separados al menos 1 día dentro de cada grupo de dosis.

Una semana después de que último sujeto recibiera la dosis de 25 UI/kg de rFVIIIc, aproximadamente se reclutaron 6 únicos sujetos para la cohorte de 65 UI/kg. Cada sujeto en el cohorte de 65 UI/kg recibió una única dosis de 65 UI/kg de ADVATE®, seguido de un perfil de PK de 4 días (96 horas), después se cruzó y recibió una dosis única, de etiqueta abierta, de 65 UI/kg de rFVIIIc durante un perfil de 10 días (240 horas). Si ocurriera un episodio de sangrado antes de la primera inyección de rFVIIIc en cualquier cohorte, el producto de FVIII del pre-estudio del sujeto se utilizó para el tratamiento, y debió transcurrir un intervalo de al menos 4 días antes de recibir la primera inyección de rFVIIIc para el perfil de PK.

Todos los sujetos se controlaron durante un período de evaluación de seguridad de 14 días (336 horas) y 28 días tras la administración de rFVIIIc 25 UI/kg o 65 UI/kg, para determinar la seguridad. Todos los sujetos se sometieron a una toma de muestras de farmacocinética antes y después de la dosificación, junto con 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 FVIIIc. FVIIIc tenía alrededor de un aumento del 50% en la exposición sistémica ( $AUC_{INF}$ ), alrededor de una reducción del 50% en el aclaramiento (Cl), y alrededor de un aumento del 50-70% en la semivida de eliminación y en el MRT, en comparación con ADVATE® (rFVIII de longitud completa). Además, FVIIIc mostró valores aumentados de C168, TBLP1, TBLP3, y TBLP5 en comparación con ADVATE®.

$AUC_{INF}$  Área bajo la curva de concentración frente al tiempo de cero a infinito

Beta HL Semivida de fase de eliminación; también denominada  $t_{1/2\beta}$

C168 Actividad estimada de FVIIIc por encima del nivel de referencia a aproximadamente 168 h después de la dosis

Cl Depuración

MRT Tiempo medio de residencia

TBLP1 Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIIIc ha declinado hasta aproximadamente 1 UI/dl por encima del nivel de referencia

TBLP3 Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIIIc ha declinado hasta aproximadamente 3 UI/dl por encima del nivel de referencia

TBLP5      Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII<sup>h</sup> ha declinado hasta aproximadamente 5 UI/dl por encima del nivel de referencia

#### Ejemplo 4

Se ha creado una proteína de fusión de factor VIII recombinante con dominio B suprimido-Fc (rFVIII<sup>h</sup>) como un enfoque para prolongar la semivida de FVIII. Las farmacocinéticas (PK) de rFVIII<sup>h</sup> se compararon con rFVIII en ratones con hemofilia A. Encontramos que la semivida terminal fue el doble de larga para rFVIII<sup>h</sup> en comparación con rFVIII. A fin de confirmar que el mecanismo subyacente para la prolongación de la semivida fue debido a la protección de rFVIII<sup>h</sup> mediante FcRn, las PK se evaluaron en ratones transgénicos sin FcRn y ratones transgénicos con FcRn humano. Se administró una única dosis intravenosa (125 UI/kg), y la concentración plasmática se midió usando un ensayo de actividad cromogénico. La C<sub>max</sub> fue similar entre rFVIII<sup>h</sup> y rFVIII (XYNTHA®) en ambas razas de ratón. Sin embargo, mientras que la semivida para rFVIII<sup>h</sup> fue comparable a la de rFVIII en los ratones sin FcRn, la semivida para rFVIII<sup>h</sup> se prolongó hasta aproximadamente el doble que aquella para rFVIII en ratones transgénicos con hFcRn. Estos resultados confirman que FcRn media, o es responsable de, la semivida prolongada de rFVIII<sup>h</sup> en comparación con rFVIII. Puesto que se ha mostrado que la hemostasis en sangre completa medida mediante tromboelastometría de rotación (ROTEM®) se correlaciona con la eficacia de los factores de coagulación en modelos de sangrado de ratones con hemofilia así como en aplicaciones clínicas, se buscó evaluar la eficacia ex vivo de rFVIII<sup>h</sup> en ratones con hemofilia A usando ROTEM®. A los ratones con hemofilia A se les administró una única dosis intravenosa de 50 UI/kg de rFVIII<sup>h</sup>, XYNTHA® (FVIII) o ADVATE® (FVIII). A 5 minutos después de la dosis, la formación de coágulo fue similar con respecto al tiempo de coagulación (CT), tiempo de formación de coágulo (CFT), y ángulo  $\alpha$ . Sin embargo, rFVIII<sup>h</sup> mostró un CT significativamente mejorado a 72 y 96 h después de la dosis, y también mejoraron CFT y el ángulo  $\alpha$  a las 96 h en comparación con tanto XYNTHA® (FVIII) como ADVATE® (FVIII), consistente con la PK prolongada de rFVIII<sup>h</sup>. Por lo tanto, la construcción de una fusión de FVIII con Fc produce una molécula con un mecanismo de acción definido que tiene una mayor semivida y el potencial para proporcionar una protección prolongada frente al sangrado.

#### Ejemplo 5

Este Ejemplo presenta los resultados finales del análisis para la actividad de FVIII de 16 pacientes tratados con productos de FVIII a 25 y 65 UI/kg. Véase el Ejemplo 3.

En este Ejemplo, rFVIII<sup>h</sup> es una proteína de fusión recombinante que comprende una única molécula de FVIII humano recombinante con dominio B suprimido (BDD-rFVIII) fusionado al dominio de Fc dimérico de la IgG1 humana, sin ninguna secuencia enlazadora que intervenga. Este constructo proteico también se denomina aquí como proteína híbrida heterodimérica de rFVIII<sup>h</sup>, proteína de fusión de Fc monomérica FVIII<sup>h</sup>, híbrido de monómero de FVIII<sup>h</sup>, híbrido de FVIII<sup>h</sup> monomérico, y dímero de monómero de FVIII<sup>h</sup>. Véase el Ejemplo 1, Fig. 1, y Tabla 2A.

Los estudios preclínicos con rFVIII<sup>h</sup> han mostrado una prolongación de aproximadamente 2 veces de la semivida de la actividad de rFVIII en comparación con productos de rFVIII comercialmente disponibles. La razón para este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de una única dosis de rFVIII<sup>h</sup> en formulación líquida congelada, y proporcionar datos sobre la PK en sujetos con hemofilia A severa. Para este estudio, estaban disponibles para la evaluación de PK 16 sujetos evaluables. Se infundió intravenosamente durante aproximadamente 10 minutos una única administración de dos dosis de tanto rFVIII<sup>h</sup> como ADVATE®, a una dosis nominal de 25 (n = 6) y 65 UI/kg de peso corporal (n = 10). Antes de la infusión, se obtuvieron muestras de sangre para las evaluaciones de PK plasmáticas, así como hasta 10 días tras la dosificación. Las PK de la actividad de FVIII tanto para ADVATE® como rFVIII<sup>h</sup> se caracterizaron en este estudio usando un método dependiente del modelo.

#### Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de una única administración de dos dosis de rFVIII<sup>h</sup> (25 y 65 UI/kg) en pacientes tratados previamente (PTP) de edades de 12 y mayores con hemofilia A severa.

Los objetivos secundarios fueron determinar los parámetros farmacocinéticos (PK) determinados mediante la actividad farmacodinámica (PD) de FVIII a lo largo del tiempo tras una única administración de 25 o 65 UI/kg de rFVIII<sup>h</sup> en comparación con ADVATE® en ensayos de coagulación de una etapa y cromogénicos.

#### Diseño del estudio (véase el Ejemplo 3)

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

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

Modelo farmacocinético y cálculos

Abreviaturas

- 10 TBLP1 = Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII ha declinado hasta aproximadamente 1 UI/dl por encima del nivel de referencia.
- TBLP3 = Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII ha declinado hasta aproximadamente 3 UI/dl por encima del nivel de referencia.
- KV\_M =  $C_{max\_M} / \text{Dosis real (UI/kg)}$
- KV\_OB =  $C_{max\_OB} / \text{Dosis real (UI/kg)}$
- 15  $IVR\_M = 100 \times C_{max\_M} \times \text{Volumen plasmático (dl)} / \text{Dosis total en UI}$ ; en el que el volumen plasmático en ml =  $(23,7 \times \text{altura en cm}) + (9,0 \times \text{peso en kg}) - 1709$ .
- $IVR\_OB = 100 \times C_{max\_OB} \times \text{Volumen plasmático (dl)} / \text{Dosis total en UI}$ ; en el que el volumen plasmático en ml =  $(23,7 \times \text{altura en cm}) + (9,0 \times \text{peso en kg}) - 1709$ .

Resultados

#### 20 Farmacocinética de dosis única (ensayo de una etapa)

La actividad observada de FVIII aumentó bruscamente tras la infusión IV corta de ADVATE® o rFVIII Fc, con valores de  $C_{max}$  medios ( $\pm$ SD) 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 rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Todos los pacientes tratados con ADVATE® y con rFVIII Fc tuvieron incrementos en la actividad de FVIII relacionados con la dosis. El incremento observado tanto en  $C_{max}$  como en  $AUC_{INF}$  fue ligeramente menor que proporcional a la dosis con respecto al intervalo de dosis evaluado.

Tras el final de la infusión, la declinación de la actividad observada de FVIII exhibió características de decaimiento monoexponencial hasta que se alcanzó el nivel de referencia. La velocidad de declinación en la actividad de FVIII fue menor para rFVIII Fc que para ADVATE®, con valores de semivida de eliminación medios ( $\pm$ SD) predichos por el modelo 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 la semivida de eliminación parecen ser independientes de la dosis a lo largo del intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

La exposición de FVIII sistémica total (evaluada mediante  $AUC_{INF}$ ) fue ~48% y 61% mayor tras la administración de rFVIII Fc que ADVATE® a niveles de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores medios ( $\pm$ SD) de  $AUC_{INF}$  predichos por el modelo fueron  $974 \pm 259$  y  $1810 \pm 606$  h\*UI/dl para ADVATE® y  $1440 \pm 316$  y  $2910 \pm 1320$  h\*UI/dl para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

De forma similar a la semivida de eliminación, el MRT se prolongó para rFVIII Fc con respecto a ADVATE®. Los valores medios ( $\pm$ SD) de MRT predichos por el modelo 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 MRT parecieron ser independientes de la dosis a lo largo del intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

Además, se determinaron los valores de los parámetros de PK primarios para CL y V. Los valores de CL para rFVIII Fc solamente dieron cuenta de ~ 66% de los observados para ADVATE® a dosis equivalentes. Los valores medios ( $\pm$ SD) de CL predichos por el modelo 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 valores medios ( $\pm$ SD) de V predichos por el modelo 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 incrementos en los valores medios de CL y V con la dosis creciente de ADVATE® y rFVIII Fc; sin embargo, el incremento en las desviaciones estándar a la dosis de 65 UI/kg, acoplado con niveles de dosis limitados, frustraron una evaluación de la dependencia de estos parámetros con la dosis. Por ejemplo, el valor de CL de la media geométrica de CV% para el grupo de tratamiento de rFVIII Fc aumentó de 23,0% (25 UI/kg) a 48,6% (65 UI/kg).

Además de los parámetros de PK primarios, se determinaron los parámetros de PK secundarios (por ejemplo valores de K, IVR, etc.) para evaluar la duración del efecto de FVIII. También se observaron pruebas de la diferencia

de PK con rFVIIIc, que demuestran mayores valores de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® a dosis equivalentes. IVR y los valores de K para ADVATE® y rFVIIIc parecieron ser comparables. Se observó un ligero incremento en los valores de TBLP1 y TBLP3 al aumentar la dosis de ADVATE® y rFVIIIc. Por el contrario, se observaron ligeras disminuciones en los valores medios de IVR y de K al incrementar la dosis de ADVATE® y rFVIIIc. Como se indicó previamente, una evaluación de la dependencia de estos parámetros con la dosis está frustrada por niveles de dosis limitados.

Los TBLP1 observados medios ( $\pm$ SD) fueron  $2,88 \pm 0,733$  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 rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los TBLP3 observados medios ( $\pm$ SD) fueron  $2,06 \pm 0,527$  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 rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

Los valores medios de IVR y de K calculados usando valores observados de Cmax (restados del valor de referencia y del fármaco residual en el modelo) fueron generalmente mayores que los valores determinados usando los valores de Cmax predichos por el modelo; consistente con una ligera subestimación de la actividad pico observada usando el modelo de un compartimiento. Los valores observados medios ( $\pm$ SD) de K 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 rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores observados medios ( $\pm$ SD) de IVR 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 rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

Farmacocinética de una sola dosis (ensayo cromogénico)

La actividad observada de FVIII aumentó bruscamente tras la infusión IV corta de ADVATE® o rFVIIIc, con valores medios ( $\pm$ SD) de Cmax 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 rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

Todos los pacientes tratados con ADVATE® y con rFVIIIc tuvieron incrementos en la actividad de FVIII relacionados con la dosis. El incremento observado tanto en Cmax como en AUC<sub>INF</sub> fue ligeramente menor que proporcional a la dosis a lo largo del intervalo de dosis evaluado.

Tras el final de la infusión, la declinación de la actividad observada de FVIII exhibió características de decaimiento monoexponencial hasta que se alcanzó el nivel de referencia. La velocidad de declinación en la actividad de FVIII fue más lenta para rFVIIIc que para ADVATE®, con valores medios ( $\pm$ SD) de la semivida de eliminación predichos por el modelo 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 la semivida de eliminación parecieron ser independientes de la dosis a lo largo del intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

La exposición sistémica total de FVIII (evaluada mediante AUC<sub>INF</sub>) fue ~ 53% y 84% mayor tras la administración de rFVIIIc que ADVATE® a niveles de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores medios ( $\pm$ SD) de AUC<sub>INF</sub> predichos por el modelo fueron  $1080 \pm 236$  y  $2320 \pm 784$  h\*UI/dl para ADVATE® y  $1650 \pm 408$  y  $4280 \pm 1860$  h\*UI/dl para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

Similar a la semivida de eliminación, el MRT se prolongó para rFVIIIc con respecto a ADVATE®. Los valores medios ( $\pm$ SD) de MRT predichos por el modelo 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 MRT parecieron ser independientes de la dosis a lo largo del intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

Además, se determinaron los valores de los parámetros de PK primarios para CL y V. Los valores de CL para rFVIIIc solo dieron cuenta de ~ 58-66% de los observados para ADVATE® a dosis equivalentes. Los valores medios ( $\pm$ SD) de CL predichos por el modelo fueron  $2,39 \pm 0,527$  y  $3,21 \pm 1,40$  ml/h/kg para ADVATE® y  $1,57 \pm 0,349$  y  $1,86 \pm 0,970$  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 valores medios ( $\pm$ SD) de V predichos por el modelo 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 incrementos en los valores medios de CL y V al incrementar la dosis de ADVATE® y rFVIIIc; sin embargo, el incremento en las desviaciones estándar a 65 UI/kg, acoplado con niveles de dosis limitados, frustraron una evaluación de la dependencia de estos parámetros con la dosis.

Además de los parámetros de PK primarios, se determinaron los parámetros de PK secundarios (por ejemplo valores de K, IVR, etc.) para evaluar la duración del efecto de FVIII. También se observaron pruebas de la diferencia de PK con rFVIIIc, que demuestran mayores valores de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® a dosis equivalentes. Los valores de IVR y de K para ADVATE® y rFVIIIc parecieron ser comparables.

Se observó un ligero incremento en los valores de TBLP1 y TBLP3 al incrementar la dosis de ADVATE® y rFVIIIc. Por el contrario, se observaron ligeras disminuciones en los valores medios de IVR y de K al aumentar la dosis de ADVATE® y rFVIIIc. Como se indicó previamente, una evaluación de la dependencia de estos parámetros con la dosis está frustrada por niveles de dosis limitados.

Los TBLP1 observados medios ( $\pm$ SD) fueron  $2,70 \pm 0,511$  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. Los TBLP3 observados medios ( $\pm$ SD) fueron  $1,98 \pm 0,377$  y  $2,39 \pm 0,718$  UI/dl por UI/kg para ADVATE® y  $3,04 \pm 0,598$  y  $4,44 \pm 1,84$  UI/dl por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

- 5 Los valores medios de IVR y de K calculados usando valores observados de Cmax (restados del valor de referencia y del fármaco residual en el modelo) fueron generalmente mayores que los valores determinados usando los valores de Cmax predichos por el modelo; consistente con una ligera subestimación de la actividad pico observada usando el modelo de un compartimiento. Los valores observados medios ( $\pm$ SD) de K 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 observados medios ( $\pm$ SD) de IVR 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.

#### Conclusiones

- 15 Todos los pacientes tratados con ADVATE® y con rFVIIIc tuvieron incrementos comparables relacionados con la dosis en Cmax y AUCINF a lo largo del intervalo de dosis evaluado. Generalmente se observaron niveles plasmáticos pico de la actividad de ADVATE® y rFVIIIc en la primera hora tras el final de la infusión, y permanecieron detectables durante varios días tras la dosificación. Tras el final de la infusión, la declinación en la actividad de FVIII corregida con respecto al valor de referencia exhibió un decaimiento monoexponencial hasta que se alcanzó el valor de referencia para ambos productos. Los valores de los parámetros para la semivida de eliminación y MRT parecieron ser independientes de la dosis a lo largo del intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII. Se observaron ligeros incrementos en los valores medios de CL y V al incrementar la dosis de ADVATE® y de rFVIIIc; sin embargo, la mayor variabilidad entre sujetos a 65 UI/kg, acoplado con niveles limitados de dosis, frustraron una evaluación de la dependencia de estos parámetros con la dosis.

- 20 La comparación de la PK de la actividad de rFVIIIc y ADVATE® reveló un incremento aproximado de 48-61% (ensayo de una etapa) o de 53-84% (ensayo cromogénico) en la exposición sistémica, una reducción aproximada de 30-40% en el aclaramiento, y un incremento aproximado de 50-80% tanto en la semivida de eliminación como en MRT para rFVIIIc con respecto a ADVATE® a dosis comparables. También se observaron pruebas de la diferencia de PK con rFVIIIc que demuestran mayores valores de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® a dosis equivalentes. Los valores de IVR y de K para ADVATE® y rFVIIIc parecieron ser comparables.

- 25 Los parámetros de PK obtenidos a partir de los resultados del ensayo cromogénico coincidieron generalmente con los del ensayo de una etapa, excepto que el ensayo cromogénico produjo una mayor estimación de los parámetros de la exposición (por ejemplo, Cmax, AUCINF, etc.).

Con las mejoras observadas en PK, rFVIIIc puede proporcionar una protección prolongada frente al sangrado, que permite inyecciones menos frecuentes para individuos con hemofilia A.

#### Ejemplo 6

- 35 En base al análisis intermedio de PK a partir del primer estudio en seres humanos de rFVIII:Fc (Ejemplo 3), se diseñó el estudio A-LONG. A-LONG es una evaluación de etiqueta abierta, multicéntrica, de la seguridad, farmacocinética, y eficacia de la fusión de Factor VIII recombinante con Fc (FVIII:Fc) en la prevención y tratamiento de sangrado en sujetos tratados previamente con hemofilia A severa (definida como  $<1$  UI/dl [ $<1\%$ ] de FVIII endógeno).

- 40 Se enrolarán aproximadamente 106 sujetos en uno de tres regímenes: un régimen de profilaxis personalizado (brazo 1), un régimen de dosificación semanal (brazo 2) y un régimen a demanda (brazo 3).

#### Brazo 1: Régimen de profilaxis personalizado

- 45 El brazo 1 incluirá un grupo global y un subgrupo de PK. Se enrolarán aproximadamente 66 sujetos. El régimen inicial será dos veces a la semana a 25 UI/kg en el primer día, seguido de 50 UI/kg en el cuarto día de la semana. A los sujetos se les administrará rFVIIIc en este régimen de profilaxis semanal hasta que estén disponibles los resultados de PK para rFVIIIc. En base a estos resultados, se establecerá para cada individuo un régimen de profilaxis personalizado, en el que se determinará la dosis y el intervalo para mantener un nivel valle de 1-3% de actividad de FVIII. A cada sujeto se le administrará entonces a lo largo del estudio su régimen de profilaxis personalizado.

- 50 Los sujetos se monitorizarán a lo largo del estudio, y se realizarán ajustes continuados de la dosis y de los intervalos. Los ajustes se harán solamente cuando un sujeto experimente episodios inaceptables de sangrado, definidos como  $\geq 2$  episodios de sangrado espontáneos a lo largo de un período de dos meses cambiante. En este caso, el ajuste seleccionará niveles valle de 3-5%.

## Brazo 2: Régimen de dosificación semanal

- Se enrolarán/aleatorizarán aproximadamente 20 sujetos, y se someterán a un perfilado de PK de rFVIII Fc abreviado, como sigue: período de reposo farmacológico de al menos 96 horas; una única dosis de rFVIII Fc 65 UI/kg; una toma de muestras abreviada que comienza en el Día 0 de rFVIII Fc, que incluye 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. Tras el perfilado de PK abreviado, a los sujetos se les administrará entonces una dosis fija de 65 UI/kg rFVIII Fc cada 7 días al menos durante 28 semanas y hasta 52 semanas.

## Brazo 3: Régimen a demanda

- En el estudio se evaluará un mínimo de 10 cirugías mayores en al menos 5 sujetos. La cirugía mayor se define como cualquier procedimiento quirúrgico (opcional o emergente) que implique anestesia general y/o asistencia respiratoria, en el que una cavidad principal del cuerpo es penetrada y expuesta, o para el que se produce una alteración sustancial de las funciones físicas o fisiológicas (por ejemplo, laparotomía, toracotomía, craneotomía, sustitución de articulación, y amputación de extremidad).

- Para la profilaxis durante la cirugía, los sujetos se tratarán con 20 a 50 UI/kg rFVIII Fc cada 12 a 24 horas. Antes de la cirugía, el médico repasará el perfil de PK de rFVIII Fc del sujeto, y evaluará el régimen de dosis de sustitución de Factor VIII requerido generalmente para el tipo de cirugía planificada, y el estado clínico del sujeto. La recomendación para la dosificación apropiada de rFVIII Fc en el período de tratamiento quirúrgico, que incluye cualquier tiempo de rehabilitación, tendrá en cuenta estos factores.

- Los objetivos primarios de este estudio son (a) evaluar la seguridad y tolerabilidad de rFVIII Fc administrado como regímenes de tratamiento profiláctico, a demanda, y quirúrgico; y (b) evaluar la eficacia de rFVIII Fc administrado como regímenes de tratamiento profiláctico, a demanda, y quirúrgico. Los objetivos secundarios de este estudio son (a) caracterizar el perfil de PK de rFVIII Fc y comparar la PK de FVIII Fc con el producto actualmente comercializado, ADVATE®; (b) evaluar las respuestas individuales con FVIII Fc; y (c) evaluar el consumo de FVIII Fc.

### Objetivos primarios

- Evaluar la seguridad y tolerabilidad de rFVIII Fc administrado como regímenes de tratamiento profiláctico, semanal, a demanda, y quirúrgico
- Evaluar la eficacia de rFVIII Fc administrado como regímenes de tratamiento profiláctico personalizado, a demanda, y quirúrgico

### Objetivos secundarios

- Caracterizar el perfil de PK de rFVIII Fc, y comparar la PK de rFVIII Fc con el producto actualmente comercializado, ADVATE®
- Evaluar las respuestas individuales con rFVIII Fc
- Caracterizar el intervalo de dosis y calendarios requeridos para prevenir adecuadamente el sangrado en un régimen profiláctico; mantener la homeostasis en un marco quirúrgico; o tratar episodios de sangrado en un marco a demanda, de tratamiento semanal, o de profilaxis
- Evaluar el consumo de rFVIII Fc (por ejemplo, consumo de rFVIII Fc anualizado total por sujeto)

## Ejemplo 7

### Evaluación clínica de ROTEM®

- En el estudio en el Ejemplo 7, además de la medida de la actividad de FVIII plasmática mediante el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) de una etapa, también se ha explorado la tromboelastometría rotacional de sangre completa (ROTEM®) para evaluar la mejora en la homeostasis global por rFVIII Fc y ADVATE® en 2 sujetos, específicamente, 1 en la cohorte de dosis baja y 1 en la cohorte de dosis elevada.

- rFVIII Fc y ADVATE® parecen ser comparablemente activos en la formación de coágulos cuando se aplican a la sangre de los sujetos antes del tratamiento de rFVIII Fc. El tiempo de coagulación (CT) fue lineal con respecto a la dosis de rFVIII Fc y ADVATE® en el intervalo de aproximadamente 1% de 100% de normal, y la respuesta a la dosis fue comparable entre rFVIII Fc y ADVATE® en el mismo sujeto.

- Tras la dosificación con ADVATE® y subsiguientemente rFVIII Fc, se tomaron muestras de sangre completa citrada en diversos puntos de tiempo, y se monitorizó mediante ROTEM® la formación de coágulos tras la recalcificación. A pesar del CT de valor de referencia variable debido a niveles residuales de FVIII antes de la dosificación de ADVATE® o de rFVIII Fc, ambos productos corrigieron eficazmente el CT hasta niveles comparables 30 minutos tras la inyección. Además, la mejora en CT se sostuvo mejor a y después de 3 horas tras la inyección de 25 UI/kg de

rFVIII<sup>h</sup> con respecto a ADVATE® en el sujeto dosificado a esta dosis baja. Sin embargo, la mejora diferencial de rFVIII<sup>h</sup> frente a ADVATE® fue mucho menos apreciable a la dosis de 65 UI/kg.

### Ejemplo 8

Se usaron ratones HemA para estudios de corte de la cola. Los ratones se anestesiaron primeramente, y después se inyectaron con 4,6 µg/kg, 1,38 µg/kg, o 0,46 µg/kg de rFVIII<sup>h</sup> procesado (sustancia farmacéutica, que contiene alrededor de 75%-85% de rFVIII<sup>h</sup> procesado) y de rFVIII<sup>h</sup> monocatenario purificado. Tras la inyección, la cola se cortó desde la punta, y se colocó inmediatamente en un tubo para recoger sangre. El porcentaje de protección en la supervivencia se midió para rFVIII<sup>h</sup> procesado (sustancia farmacéutica) y FVIII<sup>h</sup> monocatenario, como se muestra en la Tabla 7 y Figura 7.

TABLA 7. Eficacia in vivo de rFVIII:Fc DS y rFVIII<sup>h</sup> monocatenario

| Dosis (µg/kg)                       |                                   | 4,6 | 1,38 | 0,46 |
|-------------------------------------|-----------------------------------|-----|------|------|
| % de protección en la supervivencia | FVIII <sup>h</sup> DS             | 93  | 52   | 19   |
|                                     | rFVIII <sup>h</sup> monocatenario | 93  | 64   | 14   |

Como se muestra en la Tabla 7 y en la Figura 7, la protección en la supervivencia por rFVIII<sup>h</sup> monocatenario es comparable a rFVIII<sup>h</sup> (DS) procesado.

### Actividad de coagulación mediante ROTEM in vitro

La potencia de coagulación de rFVIII<sup>h</sup> se exploró adicionalmente en tromboelastometría rotacional (ROTEM) de sangre completa a lo largo de un intervalo de concentraciones, y se comparó tanto con rBDD FVIII (Xyntha) como con FVIII de longitud completa recombinante (rFVIII; Advate). Para ROTEM in vitro, las proteínas rFVIII se aplicaron por triplicado en sangre reunida citrada recogida de la vena cava de 5-6 ratones HemA machos hasta la concentración final de 0, 0,1, 1, 10, y 100% del nivel de FVIII plasmático normal. La coagulación se inició mediante la adición de CaCl<sub>2</sub> (NATEM), y el tiempo de coagulación (CT), tiempo de formación del coágulo (CFT), ángulo alfa, y firmeza máxima del coágulo (MCF) se registraron en el sistema de ROTEM (Pentapharm GmbH, Munich, Alemania). El tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación del coágulo (CFT), y el ángulo alfa para las tres proteínas aplicadas en sangre de ratón HemA a dosis que aumentan de escala desde 0,1-100% de los niveles de FVIII normales se muestran en la Figura 14. En el intervalo amplio de 0,1 a 100% de normal, el CT y CFT son comparables entre rFVIII<sup>h</sup>, rBDD FVIII y rFVIII. El ángulo alfa es solo significativamente diferente (p<0,05) entre rFVIII<sup>h</sup> y rBDD FVIII a 10%.

### Actividad de coagulación mediante ROTEM ex vivo

La farmacodinámica de rFVIII<sup>h</sup>, según se mide mediante ROTEM, se comparó con rBDD FVIII y rFVIII tras una única inyección intravenosa en ratones con hemofilia A. Para ROTEM ex vivo, los ratones HemA machos se inyectaron intravenosamente con una única dosis de 50 UI/kg de rFVIII<sup>h</sup>, ADVATE®, o XYNTHA®, y 5 ratones se sacrificaron en cada punto de tiempo (5 minutos, 24, 48, 72 y 96 horas tras la dosificación). La sangre completa citrada individual, recogida de la vena cava, se analizó inmediatamente mediante NATEM en el sistema de ROTEM, y los parámetros se midieron como antes. El CT, CFT, y el ángulo alfa se determinaron para las muestras tomadas desde 5 min. hasta 96 horas tras la dosificación, y se muestran en la Figura 15. A 5 min., todos son comparablemente eficaces, dando como resultado CT, CFT y ángulo alfa similares (Figura 15A-C). Sin embargo, rFVIII<sup>h</sup> demostró un CT significativamente mejorado (p<0,05) a 72 y 96 h, CFT y ángulo alfa a 96 h (Figuras 15A-C), con respecto a rBDD FVIII y rFVIII.

### Ejemplo 9

El factor VIII recombinante-Fc (rFVIII<sup>h</sup>) comprende una proteína rFVIII con dominio B suprimido (BDD), fusionada genéticamente al dominio de Fc de inmunoglobulina G1 humana (IgG1). Antes de la secreción desde las células HEK 293, la mayoría del rFVIII<sup>h</sup> es procesado en una cadena pesada (HC) de FVIII y una cadena ligera (LC + Fc). En circulación, rFVIII<sup>h</sup> está complejoado con el factor de von Willebrand (VWF), y se libera con la activación de una manera que es indistinguible de FVIII nativo. Se piensa que la disociación espontánea de la HC y LC contribuye a la pérdida de actividad de FVIII en el plasma y durante el almacenamiento de los productos farmacéuticos de FVIII. Se describe aquí una isoforma no procesada monocatenaria de rFVIII<sup>h</sup> (SC rFVIII<sup>h</sup>), que puede proporcionar una capacidad de fabricación y una mejor estabilidad en comparación con FVIII nativa.

SC rFVIII<sup>h</sup> se purificó a partir de rFVIII<sup>h</sup>, que contiene una fracción de la isoforma no procesada. En comparación con rFVIII<sup>h</sup>, SC rFVIII<sup>h</sup> mostró actividad cromogénica equivalente, pero actividad aproximadamente 60% reducida mediante el ensayo (aPTT) de una etapa, (Tabla 3A-B). El ensayo de generación de trombina (TGA) se llevó a cabo usando un trombograma automatizado calibrado (de Thrombinoscope®). En un ensayo de generación de trombina (TGA), SC rFVIII<sup>h</sup> también mostró un potencial reducido de trombina (Figura 13A), y trombina pico (Figura 13B) en comparación con rFVIII<sup>h</sup>. Sin embargo, como se muestra en la Tabla 3B, se observó actividad total de SC rFVIII<sup>h</sup> mediante aPTT en ausencia de VWF, sugiriendo que la liberación de VWF se puede retrasar debido a un enlace

covalente de la región ácida de a3 a la HC tras la escisión de Arg 1680 en SC rFVIII<sub>IFc</sub>, en contraste con la liberación de a3 y disociación a partir de FVIII totalmente procesado.

La disociación retrasada desde vWF puede explicar la actividad reducida observada en el ensayo de aPTT y en el TGA, mientras que se observó actividad total en el ensayo cromogénico de dos etapas. Se confirmó una velocidad de activación reducida en presencia de vWF en un ensayo de sustrato cromogénico modificado con trombina limitante como activador de FVIII.

Se evaluó la función in vivo de SC rFVIII<sub>IFc</sub> en el modelo de transección de la vena de la cola (TVT) del ratón HemA. Ratones machos HemA se trataron con las dosis indicadas de producto farmacéutico de rFVIII<sub>IFc</sub> o SC rFVIII<sub>IFc</sub> 48 horas antes de la TVT. El resangrado de la cola y la supervivencia se monitorizaron por horas hasta 12 horas tras TVT, llevándose a cabo la observación final a 24 horas tras TVT. SC rFVIII<sub>IFc</sub> y rFVIII<sub>IFc</sub> demostraron eficacia in vivo equivalente en este modelo, con una ED<sub>50</sub> de 1,17 µg/kg y 1,23 µg/kg, respectivamente, cuando TVT se llevó a cabo a 48 horas después de la infusión (Figura 7(A)). Se observaron curvas de supervivencia 24 horas tras TVT ( $p \geq 0,65$ ) (Figura 7(B)) y velocidades de resangrado (Figura 7(C)) comparables en ratones HemA para SC rFVIII<sub>IFc</sub> y rFVIII<sub>IFc</sub> a cada nivel de dosis ensayado, indicando que SC rFVIII<sub>IFc</sub> fue igualmente eficaz como rFVIII<sub>IFc</sub>, a pesar de su menor actividad aparente de aPTT. La activación in vitro retrasada de SC rFVIII<sub>IFc</sub> en presencia de vWF no parece tener por lo tanto un impacto significativo sobre su eficacia in vivo. De este modo, SC rFVIII<sub>IFc</sub> representa una isoforma nueva y eficaz de rFVIII<sub>IFc</sub> con aplicaciones clínicas potenciales. Se requerirán estudios adicionales para demostrar la estabilidad mejorada del producto en el contexto de esta proteína de fusión de Fc.

### Ejemplo 10

Los productos del factor VIII (FVIII) actuales presentan una semivida ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 8-12 horas, requiriendo inyecciones intravenosas frecuentes para la profilaxis y tratamiento de pacientes con hemofilia A. rFVIII<sub>IFc</sub> es una proteína de fusión recombinante compuesta de una sola molécula de FVIII enlazada covalentemente al dominio de Fc de IgG<sub>1</sub> humana, para prolongar la semivida de rFVIII circulante. Este estudio primero en humanos en sujetos masculinos tratados previamente con hemofilia A severa investigó la seguridad y la farmacocinética de rFVIII<sub>IFc</sub>. Dieciséis sujetos recibieron una única dosis de ADVATE® a 25 o 65 UI/kg, seguido de una dosis igual de rFVIII<sub>IFc</sub>. Los efectos más adversos no estaban relacionados con el fármaco del estudio. Ninguno de los sujetos del estudio desarrolló inhibidores o anticuerpos anti-FVIII<sub>IFc</sub>. A lo largo de los niveles de dosis, en comparación con ADVATE®, rFVIII<sub>IFc</sub> mostró una  $t_{1/2}$  de eliminación y un tiempo de residencia medio 1,54 a 1,71 veces más largos, un aclaramiento 1,49 a 1,56 veces menor, y una exposición sistémica total 1,48 a 1,52 veces mayor. ADVATE® y rFVIII<sub>IFc</sub> tuvieron concentraciones plasmáticas pico dependientes de la dosis y recuperaciones comparables. El tiempo hasta la actividad de FVIII del 1% por encima del valor de referencia fue aproximadamente 1,53 a 1,68 veces más largo que ADVATE® a lo largo de los niveles de dosis. De este modo, rFVIII<sub>IFc</sub> puede ofrecer un enfoque terapéutico viable para lograr una protección hemostática prolongada y una dosificación más frecuente y una dosificación menos frecuente en pacientes con hemofilia A.

La hemofilia A es un trastorno de sangrado heredado que da como resultado un sangrado espontáneo y traumático frecuente en las articulaciones y tejidos blandos. Mannucci PM, Tuddenham EGD, N Engl J Med, 344:1773-1779 (2001). Cuando se trata inadecuadamente, este sangrado conduce a artropatía crónica, discapacidad, y mayor riesgo de muerte. Soucie JM et al., Blood. 96(2):437-442 (2000).

Los productos de FVIII derivados del plasma (pdFVIII) y de FVIII humano recombinante (rFVIII) se utilizan para el tratamiento (terapia a demanda) y prevención (terapia de profilaxis) de episodios de sangrado. rFVIII se desarrolló para reducir el riesgo de transmisión de patógenos portados por la sangre tras la contaminación generalizada de productos plasmáticos con los virus del VIH y de la hepatitis, y para asegurar un suministro adecuado de producto de FVIII. Sin embargo, la protección hemostática con productos actuales de FVIII está temporalmente limitada debido a la corta semivida ( $t_{1/2}$ ) de aproximadamente 8-12 horas, requiriendo inyecciones profilácticas tres veces por semana o cada dos días para la mayoría de los pacientes a fin de mantener los niveles de FVIII por encima del 1%, un nivel que se ha aceptado como protector frente a la mayoría de los episodios de sangrado espontáneo. Manco-Johnson et al., New Engl J Med. 357(6):535-44 (2007).

Muchos estudios han mostrado que, incluso a dosis elevadas, la terapia a demanda no es eficaz previniendo la artropatía. Aledort L. et al., J Intern Med. 236:391-399 (1994); Petrini P. et al., Am J Pediatr Hematol Oncol. 13:280-287 (1991). Los beneficios de la terapia profiláctica se han demostrado en numerosos estudios clínicos<sup>4, 6-15</sup>, y Manco-Johnson et al., más arriba, establecieron que los niños que comenzaron con profilaxis primaria tras su primer sangrado de las articulaciones tuvieron significativamente menos sangrados y menos daño a las articulaciones que los niños tratados a demanda.

En comparación con el tratamiento a demanda, la terapia profiláctica también disminuye la discapacidad, la tasa de hospitalizaciones, y el tiempo perdido de escuela o de trabajo<sup>6,16</sup>, y mejora la calidad de vida de los pacientes y sus familias<sup>17</sup>. Sin embargo, la terapia profiláctica requiere a menudo el uso de dispositivos de acceso venoso central en niños, y sus riesgos concomitantes de infección, septicemia, y trombosis. Además, a pesar de los beneficios, la aceptación y el cumplimiento de la profilaxis disminuye con la edad, en parte debido a la inconveniencia e

invasividad<sup>18,19</sup>. De este modo, un producto de rFVIII con una  $t_{1/2}$  plasmática prolongada sería potencialmente beneficioso. Lillicrap D., *Current Opinion in Hematology* 17:393-397 (2010).

rFVIII-Fc es una proteína de fusión recombinante compuesta de una única molécula de rFVIII con dominio B suprimido enlazada covalentemente al dominio de Fc de IgG<sub>1</sub> humana. Las ventajas potenciales de las proteínas de fusión de Fc incluyen una mejor tolerabilidad y una protección hemostática prolongada, y el dominio de Fc representa una molécula natural sin toxicidad inherente conocida<sup>21,22</sup>. La unión al dominio de Fc de IgG<sub>1</sub> permite la unión al receptor de Fc neonatal (FcRn), que se expresa en muchos tipos celulares, incluyendo células endoteliales. La expresión de FcRn permanece estable a lo largo de la vida, y es responsable de la protección de IgG<sub>1</sub> y de las proteínas de fusión de Fc frente a la degradación lisosómica, prolongando así la  $t_{1/2}$  de la proteína<sup>21,23</sup>. Numerosas proteínas en la circulación son internalizadas en las células que forran la vasculatura vía pinocitosis no específica, y se transportan a rutas de degradación endosómica y lisosómica.

Las proteínas de Fc interactúan con FcRn, residente en los endosomas. Los endosomas que contienen FcRn dirigen a las proteínas de fusión de Fc nuevamente a la membrana plasmática, liberándolas en la circulación de una manera dependiente del pH<sup>24</sup>, evitando de ese modo la degradación lisosómica. Este enfoque de recirculación se ha usado con éxito para prolongar la  $t_{1/2}$  de sustancias biológicas terapéuticas; se ha aprobado para uso clínico un número de fármacos a base de la fusión de Fc (por ejemplo etanercept, romiplostim), y otros están en desarrollo<sup>25,26</sup>.

Los datos preclínicos para rFVIII-Fc indican que FVIII se puede salvar de la degradación mediante una ruta protectora natural mediada por FcRn, prolongando así  $t_{1/2}$ . En ratones y perros con hemofilia A,  $t_{1/2}$  plasmática terminal para rFVIII-Fc fue aproximadamente 2 veces más prolongada que con rFVIII<sup>27,28</sup>. En base a estos datos, se llevó a cabo un estudio clínico primero en humanos para investigar la seguridad y PK de una proteína de fusión de rFVIII-Fc de acción prolongada en sujetos con hemofilia A.

Diseño del estudio: Este estudio de fase 1/2a multicéntrico, de aumento de escala de la dosis, de etiqueta abierta, en pacientes previamente tratados con hemofilia A severa investigó la seguridad de rFVIII-Fc y su farmacocinética (PK) en comparación con ADVATE® (factor antihemofílico [recombinante], método libre de plasma/albumina, octocog alfa, Baxter Healthcare). Este estudio se llevó a cabo según las normas de US CFR e ICH sobre Buenas Prácticas Clínicas. Antes de cualquier ensayo, se obtuvo la aprobación de los Institutional Review Boards que participan, y la autorización por escrito de todos los sujetos. El diseño del estudio fue secuencial; se administró una única dosis de ADVATE® a 25 o 65 UI/kg, seguido de una dosis igual de rFVIII-Fc (FIG. 8). Ambos fármacos se inyectaron intravenosamente durante aproximadamente 10 minutos. Se esperaba que los dos niveles de dosis pusiesen entre paréntesis los intervalos típicos de dosis terapéuticos. A los sujetos se les siguió durante 28 días tras recibir rFVIII-Fc para análisis de seguridad, incluyendo ensayo en busca de inhibidores y anticuerpos anti-FVIII a 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) tras la inyección de rFVIII-Fc, con muestras adicionales a 192, 216, y 240 horas (10 días) para sujetos dosificados a 65 UI/kg de rFVIII-Fc. La actividad de FVIII en plasma se midió en los mismos puntos de tiempo tras el tratamiento con ADVATE®, a lo largo de 72 horas para el grupo de 25 UI/kg y 96 horas para el grupo de 65 UI/kg.

Sujetos: Los sujetos masculinos tuvieron al menos 12 años de edad con hemofilia A severa (definida como nivel de actividad de FVIII < 1%), y tuvieron al menos 100 días de exposición previa documentados a concentrados de FVIII (pdFVIII o rFVIII). Se excluyeron los sujetos con hipersensibilidad conocida a proteína de ratón o de hámster, historial de inhibidor o título detectable de inhibidor en el cribado, o quienes estaban tomando cualesquiera medicaciones que pudiesen afectar la homeostasis o fármacos inmunosupresores sistémicos, o quienes experimentasen cualquier infección bacteriana o vírica activa (distinta de hepatitis o VIH) en los 30 días del cribado. El genotipo de los sujetos se registró en la entrada al estudio, cuando era conocido.

Producto de tratamiento: Los transgenes de rFVIII-Fc y Fc humanos se transfectaron de forma estable en células HEK293, y la estirpe celular se estudió ampliamente para determinar la estabilidad, esterilidad y contaminación vírica para asegurar la seguridad. El producto farmacéutico purificado está compuesto de FVIII con dominio B suprimido monomérico enlazado covalentemente a través de su término carboxi al término N de un monómero de Fc, que forma un enlace de disulfuro con un segundo monómero de Fc durante la síntesis y secreción de las células. rFVIII-Fc se purificó mediante cromatografía y nanofiltración, y era completamente activo en los ensayos de coagulación de una etapa y cromogénico con respecto a preparaciones de rFVIII comercialmente disponibles. Se suministró como un líquido congelado que contiene 1000 UI por 2 ml de disolución, y formulado con L-histidina (pH 7), cloruro de sodio, cloruro de calcio, sacarosa, manitol, y Polisorbato 20. Para inyección, el producto se diluyó con disolución salina (0,9% de NaCl).

Medidas del resultado: El objetivo primario del estudio fue la seguridad, evaluada a través del examen físico, dando a conocer sucesos adversos (AE) emergentes por el tratamiento, desarrollo de anticuerpos, y monitorización de laboratorio a lo largo del tiempo. Los objetivos secundarios incluyeron parámetros derivados de los análisis de PK. Las evaluaciones de laboratorio incluyeron tiempo de protrombina, tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), relación normalizada internacional, niveles de dímero D, antígeno del factor de von Willebrand (vWF), pruebas estándar de hematología y análisis bioquímico de la sangre, y análisis de la orina.

La actividad de FVIII se midió mediante el ensayo de coagulación de una etapa (aPTT) en un analizador Siemens BCS-XP usando reactivos comerciales (Dade Actin FSL) con calibración frente a plasma de referencia normal (Precision Biologics CRYOcheck™) trazable a la Organización Mundial de la Salud (OMS) 5º Estándar Internacional (IS) para plasma humano. Además del ensayo de aPTT, la actividad de FVIII se midió mediante un ensayo de sustrato cromogénico<sup>29</sup> usando un kit comercialmente disponible (Aniara BIOPHEN FVIII:C), que cumple con las recomendaciones de la Farmacopea Europea. El ensayo cromogénico se calibró frente a plasma de referencia humano normal (Instrumentation Laboratories ORKE45), que también tuvo una potencia asignada frente al patrón de plasma humano de OMS 5ª IS.

El límite inferior de cuantificación (LLOQ) para los ensayos de una etapa y cromogénico fue 0,5 UI/dl y 0,4 UI/dl, respectivamente. Los inhibidores de FVIII se midieron mediante el ensayo de Bethesda modificado por Nijmegen, y se consideró negativo menos de 0,6 UB/ml. Los anticuerpos anti-rFVIIIc se evaluaron usando un inmunoensayo electroquimioluminiscente formador de puentes específico, que usa rFVIIIc etiquetado con biotina y sulfoetiquetado. La sensibilidad del ensayo se determinó que era 89 ng/ml usando como control sustituto un anticuerpo monoclonal anti-FVIII humano. Se llevó a cabo la tromboelastometría de rotación de sangre completa exploratoria (ROTEM®) en dos sujetos, uno de cada nivel de dosis, en diversos puntos de tiempo, para evaluar la mejora en la hemostasis global tras la inyección con ADVATE® y rFVIIIc.

Análisis farmacocinéticos: Para el análisis de los datos de actividad de FVIII en plasma de sujetos individuales frente al tiempo tras una única administración de ADVATE® o rFVIIIc, se utilizó en WinNonLin un modelo de disposición de un compartimiento definido por el usuario, que estima automáticamente el nivel de FVIII endógeno y el decaimiento residual subsiguiente. Para los cálculos de los parámetros que incluyen actividad máxima (C<sub>max</sub>), t<sub>1/2</sub>, aclaramiento (CL), volumen de distribución en estado estacionario (V<sub>ss</sub>), área bajo la curva (tiempo cero extrapolado a infinito [AUC<sub>INF</sub>]), tiempo medio de residencia (MRT), y recuperación incremental, se usaron tiempos de muestreo reales, dosis, y duración de la inyección.

Simulación de Monte Carlo del perfil de actividad de rFVIIIc frente al tiempo – Para construir perfiles de actividad de FVIII frente al tiempo tras regímenes de dosificación de 25 UI/kg o 65 UI/kg, se llevó a cabo una simulación de Monte Carlo usando el modelo de PK de población de ADVATE® y rFVIIIc. Las estimaciones medias de los parámetros del modelo (CL, volumen de distribución) en la población ensayada, la varianza entre individuos, y la variabilidad residual, se estimaron en base a los datos de actividad del ensayo de coagulación (aPTT) de una etapa de ADVATE® y rFVIIIc de 16 sujetos en este estudio de fase 1/2a. Se simuló 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 a 1% y 3% a diferentes tiempos tras diferentes regímenes de dosificación de ADVATE® o rFVIIIc.

Análisis estadísticos – Se compararon los parámetros de PK seleccionados para rFVIIIc y ADVATE® usando un análisis de modelo de varianza. Los parámetros de PK se transformaron logarítmicamente para estos análisis, y las medias estimadas, las diferencias de las medias y los intervalos de confianza en la escala logarítmica se transformaron para obtener estimaciones para medias geométricas, relaciones de medias geométricas (GMR), e intervalos de confianza, respectivamente, en la escala original. La GMR es la media geométrica de la relación intrasujetos del valor del parámetro de PK de rFVIIIc al valor del parámetro de PK de ADVATE®.

## Resultados

Disposición de los sujetos – Se enrolaron diecinueve sujetos en el estudio; 16 se sometieron a evaluación de PK tanto para ADVATE® como rFVIIIc. Un sujeto se autoadministró su producto previo antes de completar el período de reposo farmacológico tras la dosis con ADVATE®, y de este modo fue excluido del análisis de PK, pero se le incluyó en el análisis de seguridad. Tres sujetos descontinuaron el estudio antes de recibir cualquier fármaco del estudio: uno se retiró voluntariamente; un segundo fue retirado por el investigador por falta de cumplimiento; y uno se retiró a petición del patrocinador debido a la terminación del enrolamiento del estudio. De los sujetos dosificados, seis sujetos recibieron 25 UI/kg, y 10 sujetos recibieron 65 UI/kg tanto de ADVATE® como de rFVIIIc. La edad media fue 40,3 años (23 a 61 años). La identificación genotípica se recogió para siete sujetos; en seis sujetos se dio a conocer inversión del intrón 22; y en un sujeto se dio a conocer un defecto de desplazamiento del marco. El genotipo fue desconocido para nueve sujetos. Trece sujetos tuvieron anticuerpos anti-hepatitis C, cuatro de los cuales también fueron positivos para VIH.

Seguridad – 11 (69%) de los sujetos dieron a conocer cuarenta y cuatro AE emergentes por el tratamiento durante el tratamiento y los períodos de seguimiento. Esto incluyó el día de dosificación con Advate o rFVIIIc al período de observación de 28 días tras la dosificación. La mayoría de los sucesos fue considerado leve, y ninguno condujo a la retirada del estudio. Un suceso, disgeusia, se produjo transitoriamente en un sujeto mientras recibía una dosis de 65 UI/kg de rFVIIIc, y se consideró que estaba relacionado con rFVIIIc.

Un sujeto experimentó un ataque de ansiedad tras recibir 65 UI/kg de rFVIIIc, lo que dio como resultado 21 AE, 19 de los cuales se clasificaron como leves, y dos de los cuales (cefalea y fotofobia) se clasificaron como moderados. Ninguno se consideró relacionado con rFVIIIc por el investigador.

No se dieron a conocer episodios graves de sangrado. No se detectaron pruebas de reacciones alérgicas a la inyección. Todas las muestras plasmáticas resultaron negativas para inhibidores de FVIII y anticuerpos anti-rFVIIIc. No se observaron signos de reacciones en el sitio de inyección. No se dieron a conocer cambios clínicamente significativos en valores anormales del laboratorio.

- 5 Farmacocinética: Correlación entre la actividad de aPTT y cromogénica para rFVIIIc en plasma – las actividades de ADVATE® y rFVIIIc se determinaron en los mismos ensayos usando reactivos comercialmente disponibles y calibración frente a patrones de plasma humano normales. Hubo una fuerte correlación entre los resultados obtenidos por el ensayo de coagulación de una etapa y el ensayo cromogénico en muestras que tuvieron una actividad por encima del LLOQ. Se observaron coeficientes de correlación ( $R^2$  de Pearson) de 0,94 y 0,95 entre los resultados de los dos ensayos para 151 muestras tras la dosificación de ADVATE® y 185 muestras tras la dosificación de rFVIIIc, respectivamente. En comparación con los resultados de aPTT, las actividades cromogénicas de FVIII fueron, de media, 21% mayores para ADVATE® y 32% mayores para rFVIIIc, no estadísticamente significativas (Figura 9). Esta observación condujo a una estimación ligeramente mayor de los parámetros de exposición mediante la evaluación cromogénica para ambos fármacos. Las mayores recuperaciones aparentes de FVIII mediante el ensayo cromogénico son típicas para productos de FVIII recombinante ensayados en ensayos clínicos, y están de acuerdo con la mayoría de los productos de FVIII comercializados<sup>30-32</sup>.

20 Farmacocinética mejorada para rFVIIIc – Las estimaciones de PK primarias se obtuvieron a partir de datos de actividad del ensayo de coagulación (aPTT) de una etapa. En sujetos que recibieron 25 o 65 UI/kg de ADVATE® seguido de una dosis igual de rFVIIIc, la actividad de FVIII en plasma aumentó bruscamente y alcanzó  $C_{max}$  en la primera hora tras la dosificación. La declinación subsiguiente de la actividad observada de FVIII exhibió características de decaimiento monoexponencial hasta que se alcanzó la actividad de FVIII del valor de referencia (Figura 10). La  $C_{max}$  aumentó proporcionalmente la dosis, pero fue comparable entre dosis iguales de ADVATE® y rFVIIIc (Tabla 8). La exposición total ( $AUC_{INF}$ ) también aumentó proporcionalmente a la dosis. Sin embargo, el  $AUC_{INF}$  de rFVIIIc fue 1,48 y 1,56 veces mayor que el de ADVATE® a 25 UI/kg ( $p = 0,002$ ) y 65 UI/kg ( $p < 0,001$ ), respectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Parámetros de PK mediante el ensayo (aPTT) de una etapa para rFVIIIc y ADVATE® por grupo de dosis

| Parámetro                                  | Dosis: 25 UI/kg (N=6)                 |                                       |                                                         | Dosis: 65 UI/kg (N=9)                 |                                    |                                                         |
|--------------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------------------------|
|                                            | ADVATE®<br>Media<br>Geom. [95%<br>CI] | rFVIIIc<br>Media<br>Geom. [95%<br>CI] | Relación de<br>Medias Geom.<br>[95% CI] (valor<br>de p) | ADVATE®<br>Media<br>Geom. [95%<br>CI] | rFVIIIc<br>Media Geom.<br>[95% CI] | Relación de<br>Medias Geom.<br>[95% CI] (valor<br>de p) |
| $C_{max\_OBS}$ (UI/dl)                     | 63,6 [59,1,<br>68,3]                  | 60,5 [53,1,<br>69,0]                  | 0,952 [0,819,<br>1,11] ( $p =$<br>0,440)                | 133<br>[105,168]                      | 119 [103,136]                      | 0,895 [0,795,<br>1,01] ( $p =$<br>0,061)                |
| $AUC_{INF}$ (h*UI/dl)                      | 994 [723,<br>1370]                    | 1480 [1160,<br>1880]                  | 1,48 [1,26,1,76]<br>( $p = 0,002$ )                     | 1800 [1350,<br>2400]                  | 2800 [1980,3970]                   | 1,56 [1,33,<br>1,83] ( $p <$<br>0,001)                  |
| $t_{1/2}$ (h)                              | 12,2 [9,14,<br>16,3]                  | 18,8 [14,8,<br>23,8]                  | 1,54 [1,40,1,69]<br>( $p < 0,001$ )                     | 11,0 [8,76,<br>13,9]                  | 18,8 [14,3,<br>24,5]               | 1,70 [1,54,<br>1,89] ( $p <$<br>0,001)                  |
| MRT (h)                                    | 17,5 [13,1,<br>23,4]                  | 27,0 [21,3,<br>34,2]                  | 1,54 [1,40,1,69]<br>( $p < 0,001$ )                     | 15,8 [12,6,<br>19,9]                  | 27,0 [20,6,<br>35,3]               | 1,71 [1,54,<br>1,89] ( $p <$<br>0,001)                  |
| CL (ml/hora/kg)                            | 2,49 [1,80,<br>3,45]                  | 1,68 [1,31,<br>2,15]                  | 0,673 [0,569,<br>0,796] ( $p =$<br>0,002)               | 3,61 [2,71,<br>4,83]                  | 2,32 [1,64,<br>3,29]               | 0,642 [0,547,<br>0,753] ( $p <$<br>0,001)               |
| $V_{ss}$ (ml/kg)                           | 43,9 [39,3,<br>49,0]                  | 45,4 [39,3,<br>52,5]                  | 1,04 [0,947,1,13] ( $p =$<br>0,357)                     | 57,4 [48,3,<br>68,3]                  | 62,8 [55,2,<br>71,5]               | 1,09 [0,976,1,22] ( $p =$<br>0,107)                     |
| Recuperación incremental (UI/dl por UI/kg) | 2,56 [2,36,<br>2,78]                  | 2,44 [2,12,<br>2,81]                  | 0,952 [0,819,1,11] ( $p =$<br>0,444)                    | 2,04 [1,61,<br>2,59]                  | 1,83 [1,59,<br>2,10]               | 0,894 [0,795,1,01] ( $p =$<br>0,060)                    |

CI = Intervalo de confianza; media geom. = media geométrica; OBS = observada. Las medias estimadas, 95% CI para las medias, y las diferencias de las medias se transformaron para obtener medias geométricas estimadas, 95%

| Parámetro                                                                        | Dosis: 25 UI/kg (N=6)           |                                   |                                                | Dosis: 65 UI/kg (N=9)           |                                   |                                                |
|----------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------------|
|                                                                                  | ADVATE®<br>Media Geom. [95% CI] | rFVIII Fc<br>Media Geom. [95% CI] | Relación de Medias Geom. [95% CI] (valor de p) | ADVATE®<br>Media Geom. [95% CI] | rFVIII Fc<br>Media Geom. [95% CI] | Relación de Medias Geom. [95% CI] (valor de p) |
| CI para medias geométricas, y relaciones de medias geométricas, respectivamente. |                                 |                                   |                                                |                                 |                                   |                                                |

La  $t_{1/2}$ , el MRT, el CL, y el  $V_{ss}$  parecieron ser independientes de la dosis (Tabla 8). La  $t_{1/2}$  de la media geométrica de rFVIII Fc fue 18,8 horas tanto para el grupo de dosis de 25 UI/kg como el de 65 UI/kg. Esto representa una mejora de 1,54 y 1,70 veces con respecto a la de ADVATE® (12,2 horas y 11,0 horas) a dosis equivalentes ( $p < 0,001$ ), respectivamente (Tabla 8). Se observó la misma mejora intrasujetos en el MRT 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) ( $p < 0,001$ ). Consistente con la mejora en la  $t_{1/2}$  y en el MRT hubo una reducción correspondiente de 1,49 y 1,56 veces en el CL intrasujetos a dosis de 25 UI/kg ( $p = 0,002$ ) y 65 UI/kg ( $p < 0,001$ ), respectivamente. No hubo diferencias significativas en  $V_{ss}$  y en la recuperación incremental entre ADVATE® y rFVIII Fc. Por lo tanto, en cada sujeto, rFVIII Fc demostró un perfil de PK mejorado en comparación con ADVATE®. También se observó que los pacientes con una semivida más corta en ADVATE® tuvieron una semivida más corta en rFVIII Fc, y los pacientes con una semivida más larga en ADVATE® tuvieron una semivida más larga en rFVIII Fc.

El perfil de PK mejorado de rFVIII Fc dio como resultado un mayor tiempo post-dosificación para la actividad de FVIII de 1%, que fue 1,53 y 1,68 veces más largo, respectivamente, que con ADVATE® a 25 UI/kg ( $p < 0,001$ ) y 65 UI/kg ( $p < 0,001$ ) (datos no mostrados), sugiriendo una duración terapéutica potencialmente más larga para rFVIII Fc.

El perfil de PK favorable de rFVIII Fc con respecto a ADVATE® también se demostró mediante la actividad de FVIII medida en el ensayo cromogénico (Tabla 9), que fue comparable a los datos derivados a partir de los ensayos de aPTT. La estimación de la exposición, es decir,  $C_{max}$  y  $AUC_{INF}$ , fue ligeramente mayor, sin embargo, en base al ensayo cromogénico que en base al ensayo de coagulación (aPTT) de una etapa tanto para ADVATE® como para rFVIII Fc.

Tabla 9. Parámetros de PK mediante el ensayo (cromogénico) de 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®<br>Media Geom. [95% CI] | rFVIII Fc<br>Media Geom. [95% CI] | Relación de Medias Geom. [95% CI] (valor de p) | ADVATE®<br>Media Geom. [95% CI] | rFVIII Fc<br>Media Geom. [95% CI] | Relación de Medias Geom. [95% CI] (valor de p) |
| $C_{max\_OBS}$ (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] ( $p = 0,571$ )             |
| $AUC_{INF}$ (h*UI/dl)  | 1060 [822, 1360]                | 1660 [1300, 2120]                 | 1,57 [1,38, 1,80] ( $p < 0,001$ )              | 2270 [1670, 3070]               | 4280 [2960, 6190]                 | 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, 27,5]                 | 1,84 [1,60, 2,12] ( $p < 0,001$ )              |
| MRT (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] ( $p < 0,001$ )           |
| $V_{ss}$ (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] ( $p = 0,653$ )            |

| Parámetro                                  | Dosis: 25 UI/kg (N=6)              |                                    |                                                | Dosis: 65 UI/kg (N=9)              |                                    |                                                |
|--------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------------------|
|                                            | ADVATE®<br>Media Geom.<br>[95% CI] | rFVIIIc<br>Media Geom.<br>[95% CI] | Relación de Medias Geom. [95% CI] (valor de p) | ADVATE®<br>Media Geom.<br>[95% CI] | rFVIIIc<br>Media Geom.<br>[95% CI] | Relación de Medias Geom. [95% CI] (valor de p) |
| 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)                 |

CI = Intervalo de confianza; media geom. = media geométrica; OBS = observada. Las medias estimadas, 95% CI para las medias, y las diferencias de las medias se transformaron para obtener medias geométricas estimadas, 95% CI para medias geométricas, y relaciones de medias geométricas, respectivamente.

Correlación entre Factor de von Willebrand y disposición de rFVIIIc – Debido a que la mayoría de FVIII en circulación está complejada con VWF<sup>33</sup>, y debido a que el estudio de asociación del genoma completo ha identificado que los determinantes genéticos de los niveles de FVIII dependen principalmente de los niveles de VWF<sup>34</sup>, se examinó la asociación entre VWF y rFVIIIc. Se observó una fuerte correlación entre los niveles de VWF y CL y  $t_{1/2}$  tanto para rFVIIIc como para ADVATE®. Como se muestra en la Figura 10, a medida que aumenta el nivel de VWF, disminuye el CL de rFVIIIc (p = 0,0016) y de ADVATE® (p = 0,0012).

Se observó la relación opuesta entre el nivel de VWF y  $t_{1/2}$ . A medida que aumentó el nivel de VWF, aumentó la  $t_{1/2}$  de rFVIIIc (p = 0,0003) y de ADVATE® (p < 0,0001). Esta correlación sugiere que el resto de Fc de rFVIIIc no altera el papel de VWF en la protección de FVIII frente al aclaramiento.

Efectos de PK prolongada de rFVIIIc en ROTEM® de sangre completa – Antes de la administración del fármaco del estudio, se aplicó a sangre procedente de un sujeto en cada grupo de dosis una dosis igual de rFVIIIc o de ADVATE®, y se analizó mediante ROTEM® de sangre completa. El tiempo de coagulación (CT) fue lineal con respecto a la dosis en el intervalo de aproximadamente 1% a 100% de normal, y la respuesta a la dosis fue comparable entre rFVIIIc y ADVATE® en el mismo sujeto (datos no mostrados), indicando una potencia comparable de rFVIIIc y de ADVATE® en la formación del coágulo.

A pesar del CT del valor de referencia variable debido a niveles residuales de FVIII antes de la administración de ADVATE® o de rFVIIIc, ambos productos corrigieron efectivamente el CT a niveles comparables 30 minutos después de la dosificación (Figura 12). La mejora en CT se sostuvo mejor por rFVIIIc que ADVATE® tras 3 horas después de una dosis de 25 UI/kg (Figura 12A), y tras 24 horas después de una dosis de 65 UI/kg (Figura 12B).

rFVIIIc fue bien tolerado por los sujetos a ambas dosis. No hubo cambios clínicamente significativos observados en los parámetros de hematología, análisis bioquímico de la sangre, o análisis de la orina. La mayoría de los AE fueron leves, no relacionados con rFVIIIc, y se resolvieron sin secuelas. No se produjeron AE graves o muertes durante el estudio, y ninguno de los sujetos a ninguna dosis desarrolló anticuerpos neutralizantes o de unión frente a rFVIIIc.

rFVIIIc demostró un perfil de PK de actividad de FVIII significativamente mejorado con respecto a ADVATE®, siendo  $t_{1/2}$  y MRT a lo largo de los niveles de dosis 1,54 a 1,71 veces más largos, según se mide mediante el ensayo de coagulación (aPTT) de una etapa, y 1,59 a 1,84 veces más largos mediante el ensayo cromogénico de 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 de Monte Carlo predice que un mayor porcentaje de pacientes que reciben rFVIIIc sostendrán los niveles de FVIII por encima de 1% o de 3% en comparación con pacientes que reciben dosis iguales de ADVATE® (Tabla 10). Por ejemplo, a una dosis de 25 UI/kg, se predice que 12,2% de pacientes con ADVATE® frente a 71,2% de pacientes con rFVIIIc tendrán niveles valle de FVIII por encima de 1% en el Día 4; a una dosis de 65 UI/kg, se predice que 11,0% de pacientes con ADVATE® frente a 66,4% de pacientes con rFVIIIc tendrán niveles de FVIII por encima de 3% en el Día 4. Se planean ensayos clínicos en grandes números de pacientes para confirmar los resultados de este estudio de fase 1/2a y de las predicciones de la simulación de Monte Carlo.

Tabla 10. Porcentaje predicho de sujetos que lograrán niveles valle de FVIII por encima de 1% y 3% del normal a un régimen de dosis especificado de ADVATE® o rFVIIIc

| Punto de tiempo tras la dosificación (Día) | ADVATE®                                                           |          | rFVIIIc  |          |
|--------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------|----------|----------|----------|
|                                            | 25 UI/kg                                                          | 65 UI/kg | 25 UI/kg | 65 UI/kg |
|                                            | Porcentaje de sujetos con niveles valle 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 valle 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     |

A pesar del éxito de la tecnología de fusión de Fc a la hora de prolongar  $t_{1/2}$  circulante para una variedad de sustancias terapéuticas proteicas, se consideró que rFVIII es demasiado grande para producir con éxito fusiones diméricas de Fc. De este modo, se creó una proteína de fusión de Fc monomérica, mediante la cual una única molécula efectora se enlazó covalentemente a un Fc dimérico, que permite la unión a FcRn intracelular y el reciclado subsiguiente<sup>21,22</sup>. Los ensayos de coagulación *in vitro* demuestran que no hay pérdida de actividad específica para rFVIIIc, en comparación con FVIII nativo o con dominio B suprimido, mediante los ensayos de coagulación o cromogénico, usando reactivos comercialmente disponibles y patrones de referencia de FVIII usados habitualmente (JAD, TL, SCL, et al., manuscrito presentado en agosto de 2011). Además, estos resultados indican que rFVIIIc se puede ensayar de forma fiable en un marco clínico mediante el ensayo de una etapa o mediante el método cromogénico.

En resumen, este ensayo clínico de fase 1/2a es el primer ensayo para demostrar la seguridad y  $t_{1/2}$  prolongada de rFVIIIc en pacientes con hemofilia A severa. Se está llevando a cabo un estudio de fase 3 pivotal con rFVIIIc para establecer regímenes de dosificación profilácticos eficaces para individuos con hemofilia A.

### Ejemplo 11

Una nueva isoforma monocaténaria (SC) de factor VIII (FVIII), que resulta de una proteólisis incompleta en el resto R1648 durante la biosíntesis, puede proporcionar una capacidad de fabricación y estabilidad superiores con respecto a FVIII nativa. Una única molécula de factor VIII con dominio B suprimido recombinante, fusionada a un dominio de Fc de inmunoglobulina (rFVIIIc) y su contraparte SC purificada (SC-rFVIIIc), exhibió actividad específica similar en ensayos de coagulación de una etapa usando plasma sin factor de von Willebrand (VWF), pero SC-rFVIIIc exhibió una menor actividad específica en presencia de VWF. Este estudio se llevó a cabo para determinar si rFVIIIc unido a VWF, SC-rFVIIIc y rBDD-FVIII (XYNTHA®, REFACTO AF®) difieren con respecto a la liberación proteolítica mediada por trombina desde VWF.

Se capturaron cantidades equimolares de rFVIIIc, SC-rFVIIIc, y rBDD-FVIII en un chip de biosensor óptico en el que se había inmovilizado mediante acoplamiento amínico VWF humano. Se infundió sobre la superficie del chip  $\alpha$ -trombina humana en un intervalo de concentraciones, y las velocidades de liberación de FVIII a partir de VWF inmovilizado se monitorizaron en tiempo real. La concentración eficaz semimáxima ( $EC_{50}$ ) de  $\alpha$ -trombina se determinó para cada especie de FVIII.

Los valores de  $EC_{50}$  de  $\alpha$ -trombina para rFVIIIc y rBDD-FVIII fueron comparables ( $3,7 \pm 0,2$  U/ml y  $3,2 \pm 0,3$  U/ml, respectivamente, mientras que el valor de  $EC_{50}$  para SC-rFVIIIc fue mayor que 3 veces mayor ( $11,7 \pm 0,9$  U/ml). Este hallazgo de que SC-rFVIIIc es liberado más lentamente de VWF que lo que lo son rFVIIIc o rBDD-FVIII es consistente con un hallazgo observado previamente con respecto a las actividades de rFVIIIc y SC-rFVIIIc en un ensayo de coagulación de una etapa (aPTT), en el que SC-rFVIIIc tuvo una actividad aparente menor solamente cuando VWF estaba presente en la muestra plasmática del ensayo. Sin embargo, todas las muestras poseyeron

actividades equivalentes en el modelo de sangrado de ratón, indicando que la sensibilidad de las preparaciones de FVIII a trombina en la liberación de FVIII a partir de VWF no se correlaciona con la eficacia *in vivo*.

Tabla 1: Secuencias polinucleotídicas

A. FVIII-Fc con dominio B suprimido

- 5 (i) Secuencia de ADN de cadena de FVIII-Fc con dominio B suprimido (péptido señal de FVIII subrayado. Región de Fc en negrita) (SEQ ID NO:1. que codifica SEQ ID NO:2)

```

661      A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC
721  TGTGCCTTTT GCGATTCTGC TTTAGTGCCA CCAGAAGATA CTACCTGGGT GCAGTGGAAC
781  TGTCATGGGA CTATATGCAA AGTGATCTCG GTGAGCTGCC TGTGGACGCA AGATTTCTCTC
841  CTAGAGTGGC AAAATCTTTT CCATTCAACA CCTCAGTCGT GTACAAAAAG ACTCTGTTTG
901  TAGAATTCAC GGATCACCTT TTCAACATCG CTAAGCCAAG GCCACCCTGG ATGGGTCTGC
961  TAGGTCCTAC CATCCAGGCT GAGGTTTATG ATACAGTGGT CATTACACTT AAGAACATGG
1021 CTTCCCATCC TGTCAGTCTT CATGCTGTTG GTGTATCCTA CTGGAAAGCT TCTGAGGGAG
1081 CTGAATATGA TGATCAGACC AGTCAAAGGG AGAAAGAAGA TGATAAAGTC TTCCCTGGTG
1141 GAAGCCATAC ATATGCTCTG CAGGTCTCTGA AAGAGAATGG TCCAATGGCC TCTGACCCAC
1201 TGTGCCTTAC CTACTCATAT CTTTCTCATG TGGACCTGGT AAAAGACTTG AATTCAGGCC
1261 TCATTGGAGC CCTACTAGTA TGTAGAGAAG GGAGTCTGGC CAAGGAAAAG ACACAGACCT
1321 TGCACAAATT TATACTACTT TTTGCTGTAT TTGATGAAGG GAAAAGTTGG CACTCAGAAA
1381 CAAAGAACTC CTTGATGCAG GATAGGGATG CTGCATCTGC TCGGGCCTGG CCTAAAATGC
1441 ACACAGTCAA TGTTTATGTA AACAGGTCTC TGCCAGGTCT GATTGGATGC CACAGGAAAT
1501 CAGTCTATTG GCATGTGATT GGAATGGGCA CCACTCCTGA AGTGCCTCA ATATTCTCTG
1561 AAGGTCACAC ATTTCTTGTG AGGAACCATC GCCAGGCGTC CTTGGAAATC TCGCCAATAA
1621 CTTTCTTTAC TGCTCAAACA CTCTTGATGG ACCTTGGACA GTTTCTACTG TTTTGTCTATA
1681 TCTCTTCCCA CCAACATGAT GGCATGGAAG CTTATGTCAA AGTAGACAGC TGTCCAGAGG
1741 AACCCCAACT ACGAATGAAA AATAATGAAG AAGCGGAAGA CTATGATGAT GATCTTACTG
1801 ATTCTGAAAT GGATGTGGTC AGGTTTGATG ATGACAACCTC TCCTTCTTTT ATCCAAATTC
1861 GCTCAGTTGC CAAGAAGCAT CCTAAAACCTT GGGTACATTA CATTGCTGCT GAAGAGGAGG
1921 ACTGGGACTA TGCTCCCTTA GTCTCGCCC CCGATGACAG AAGTTATAAA AGTCAATATT
1981 TGAACAATGG CCCTCAGCGG ATTGGTAGGA AGTACAAAAA AGTCCGATTT ATGGCATACA
2041 CAGATGAAAC CTTTAAGACT CGTGAAGCTA TTCAGCATGA ATCAGGAATC TTGGGACCTT
2101 TACTTTATGG GGAAGTTGGA GACACACTGT TGATTATATT TAAGAATCAA GCAAGCAGAC
2161 CATATAACAT CTACCCCTCAC GGAATCACTG ATGTCCGTCC TTTGTATTCA AGGAGATTAC
2221 CAAAAGGTGT AAAACATTTG AAGGATTTTC CAATTCTGCC AGGAGAAATA TTCAAATATA
2281 AATGGACAGT GACTGTAGAA GATGGGCCAA CTAATCAGA TCCTCGGTGC CTGACCCGCT
2341 ATTACTCTAG TTTCTTAAT ATGGAGAGAG ATCTAGCTTC AGGACTCATT GGCCCTCTCC
2401 TCATCTGCTA CAAAGAATCT GTAGATCAAA GAGGAAACCA GATAATGTCA GACAAGAGGA
2461 ATGTCATCCT GTTTCTGTA TTTGATGAGA ACCGAAGCTG GTACCTCACA GAGAATATAC
2521 AACGCTTTCT CCCCATCCA GCTGGAGTGC AGCTTGAGGA TCCAGAGTTC CAAGCCTCCA
2581 ACATCATGCA CAGCATCAAT GGCTATGTTT TTGATAGTTT GCAGTTGTCA GTTTGTTTGC
2641 ATGAGGTGGC ATACTGGTAC ATTCTAAGCA TTGGAGCACA GACTGACTTC CTTTCTGTCT
2701 TCTTCTCTGG ATATACCTTC AAACACAAAA TGGTCTATGA AGACACACTC ACCCTATTCC
2761 CATTCTCAGG AGAACTGTC TTCATGTCGA TGGAAAACCC AGGTCTATGG ATTCTGGGGT
2821 GCCACAACCT AGACTTTCGG AACAGAGGCA TGACCGCCTT ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG
2881 ACAAGAACAC TGGTGATTAT TACGAGGACA GTTATGAAGA TATTTAGCA TACTTGCTGA
2941 GTAAAAACAA TGCCATTGAA CCAAGAAGCT TCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC
3001 ATCAACGGGA AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATT GACTATGATG
3061 ATACCATAATC AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC
3121 AGAGCCCCCG CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC
3181 TCTGGGATTA TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA
3241 GTGTCCCTCA GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC
3301 CCTTATACCG TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG
3361 AAGTTGAAGA TAATATCATG GTAACTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT
3421 ATTCTAGCCT TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT
3481 TTGTCAAGCC TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA
3541 CTAAAGATGA GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601 ATGTGCACTC AGGCTTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCTG

```

```

3661 CTCATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA
3721 CCAAAAAGCTG GACTTTCAC TAAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC
3781 AGATGGAAGA TCCCACCTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA
3841 TGGATACACT ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTTCGATGG TATCTGCTCA
3901 GCATGGGCAG CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTTCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC
3961 GAAAAAAGA GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GCGGAGCATC
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG GTTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCTTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTTCATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTAC GGCATCAAGA
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTAACCCCT CCAATTATTG
4501 TCTGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTTC CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741 CAAAAGAGTG GGTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACACTC
4801 AAGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTACACACT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTACTG ACTCGCTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC GACAAAAC ACACATGCCC ACCGTGCCCA GCTCCAGAAC
5101 TCTTGGGCGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCTC CCCCAAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GGCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT GCCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

```

(ii) Secuencia de ADN de Fc (péptido señal de Ipk de ratón subrayado) (SEQ ID NO:3, que codifica SEQ ID NO:4)

```

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCCCACCGT GCCCAGCACC TGAACTCCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCCT CTTCCCCCCA
8161 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCCGC GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
8341 CTACCCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAA
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
8521 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCACGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGAGGA ACAACACAA GACCAAGCCT CCCGTGTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
8641 CTCTACAGCA AGCTACCCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCA TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTAAA

```

5

## B. FVIII<sub>h</sub> de longitud completa

(i) Secuencia de ADN de FVIII<sub>h</sub> de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado, región de Fc en negrita) (SEQ ID NO:5, que codifica SEQ ID NO:6)

```

661                                     ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
721 CTTCTTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTGGGTGC
781 AGTGGAACTG TCATGGGACT ATATGCCAAAG TGATCTCGGT GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
841 ATTTCTCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCGTGT ACAAAAAGAC
901 TCTGTTTGTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
961 GGGTCTGCTA GGTCCCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021 GAACATGGCT TCCCATCTCT TCAGTCTTCA TGCTGTGGT GTATCCTACT GGAAAGCTTC
1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCCAG TCAAAGGGAG AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
1141 CCCTGGTGGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCTGAAA GAGAATGGTC CAATGGCCTC
1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG GACCTGGTAA AAGACTTGAA
1261 TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441 TAAATGCAAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCACCTCAAT
1561 ATTCTCTGAA GGTACACAT TTCTTGTGAG GAACCATCGC CAGGCGTCTT TGGAAATCTC-
1621 GCCAATAACT TTCTTTACTG CTCAAACACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681 TTGTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACTCTC CTTCCTTTAT
1861 CCAAAATTCG TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACTTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAG
1981 TCAATATTTG AACCAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTATT CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCTTT TGTATTCAAG
2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATATAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTTCAG GACTCATTGG
2401 CCCTCTCCTC ATCTGCTACA AAGAATCTGT AGATCAAGA GGAACCAGA TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCCT
2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGAT ATACCTTCAA ACACAAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC
2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AAAGTGTCTT CATGTGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT
2821 TCTGGGGTGC CACAACCTAG ACTTTGCGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC
2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA
2941 CTTGTGTAGT AAAAAACAAT CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC
3061 TGACCTTTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTTGTTGATG CTCTTGCGAC AGAGTCCTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT
3301 TACCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AAATGAGAAA CTGGGGACAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTTGAAG AAAGTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAGTAT
3481 GCCAGTTCAT TATGATAGTC AATTAGATAC CACTCTATTT GGCAAAAAGT CATCTCCCT
3541 TACTGAGTCT GGTGGACCTC TGAGCTTGAG TGAAGAAAAT AATGATTCAG AGTTGTTAGA
3601 ATCAGGTTTA ATGAATAGCC AAGAAAGTTC ATGGGGAAAA AATGTATCGT CAACAGAGAG
3661 TGGTAGGTTA TTTAAAGGGA AAAGAGCTCA TGGACCTGCT TTGTTGACTA AAGATAATGC
3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAA GACAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG
3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACACTGAGTT TAAAAAAGTG ACACCTTTGA TTCATGACAG
3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAACTAC
3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAACA GAAAAAGAG GGGCCCATTC CACCAGATGC
4021 ACAAATCCA GATATGTCTG TCTTTAAGAT GCTATCTTTC CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
4081 ACAAAGGACT CATGGAAAAG ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGGCCAGTC CAAAGCAATT
4141 AGTATCCTTA GGACCAAGAA AATCTGTGGA AGGTCAGAA TTTCTGTCTG AGAAAAACAA
4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC

```

4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TTAATAACTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA  
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAAATGT  
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGG CACTAAGAAT TCCATGAAGA ACCTTTTCTT  
 4441 ACTGAGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTC ATATGACGGG GCATATGCTC CAGTACTTCA  
 4501 AGATTTTAGG TCATTAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AACACACAG CTCATTTCTC  
 4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGAGGG CTTGGGAAAT CAACCAAGC AAATTGTAGA  
 4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATAACAAGC CAGCAGAATT TTGTACGCA  
 4681 ACGTAGTAAG AGAGCTTTGA AACAAATCAG ACTCCCACTA GAAGAAACAG AACTTGAAAA  
 4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CCTCAACCCA GTGGTCCAAA AACATGAAAC ATTTGACCCC  
 4801 GAGCACCCCTC ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC  
 4861 CTTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAATAGAT CTCCATTACC  
 4921 CATTGCAAGG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTTATT  
 4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATT CTGGGGTCCA  
 5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAAC CTTTCTTTAG CCATICTAAC  
 5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTC CCACAAATTC  
 5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC  
 5221 TGGCAAGTTT GAAATGCTTC CAAAAGTTCA CATTTATCAG AAGGACCTAT TCCCCACGGA  
 5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC  
 5341 AGAGGGGAGCG ATTAAGTGGA ATGAAGCAAA CAGACCTGGA AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT  
 5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTG GATCCTCTTG CTTGGGATAA  
 5461 CCACTATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAAATCC CAAGAGAAGT CACCAGAAAA  
 5521 AACAGCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTIT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC  
 5581 AATAGCACCA ATAAATCAGG CACAAAATAA CCCCAGAAATA GAAGTCACCT GGGCAAGCA  
 5641 AGGTAGGACT GAAAGGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA  
 5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAAT TACTATGATG ATACCATATC  
 5761 ACTTGAAATC AAGCAAGCAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATCAAAATC AGAGCCCCCG  
 5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC CACACTATTT TATTGCTGCA GTGCACAGCC TCTCCGATTA  
 5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA  
 5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTTC AGGAATTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG  
 6001 TGGAGAACTA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA  
 6061 TAATATCATG GTAATTTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT ATTCIAGCCT  
 6121 TATTTCTTAT GAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCAGAACCT AGAAAAAACT TTGTCAAGCC  
 6181 TAATGAACAC AAAACTTACT TTTGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAAGATGA  
 6241 GTTTGACTGC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG ATGTGCACTC  
 6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCCTG CTCATGGGAG  
 6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG  
 6421 GTACTTCACT GAAATATATG AAAGAACTG CAGGGCTCCC TGCATATATC AGATGGAAGA  
 6481 TCCCACITTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCAATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT  
 6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAGG GATTGATGAG TATCTGCTCA GCATGGGCAG  
 6601 CAATGAAACAT ATCCATTCTA TTCAATTTTCA TGGACATGTG TTTACTGTAC GAAAAAAGA  
 6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT  
 6721 ACCATCCAAA GCTGGAATTT GGCGGGTGGG ATGCCCTTAT TGGCAGCATC TACAIGCTGG  
 6781 GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCTTGG GAATGGCTTC  
 6841 TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT GGGCCCCAAA  
 6901 GCTGGCCAGA CTTCAATTAT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG AGCCCTTTTC  
 6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTACG GGCATCAAGA CCCAGGGTGC  
 7021 CCGTCAGAAG TTCCTCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTIGATGG  
 7081 GAAGAACTGG CAGACTTTAT GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA  
 7141 TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAACCCCT CCAATTATTG CTCGATACAT  
 7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT CGCATGGAGT TGATGGGCTG  
 7261 TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT CAGATGCACA  
 7321 GATTACTGCT TCACTCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG  
 7381 ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC CAAAAGAGTG  
 7441 GCTGCAAGTG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTAACTACTC AGGGAGTAAA  
 7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCTCTATC TCCAGCAGTC AAGAIGGCCA  
 7561 TCAGTGGACT CTCCTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAAGGAA ATCAAGACTC  
 7621 CTCACACCTT GTGGTGAACCT CTCAGACCC ACCGTACTG ACTCGCTACC TTTCGAATTCA  
 7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA  
 7741 GGACCTCTAC GACAAAACTC ACACATGCCC ACCGTGCCCC GCTCCAGAAC TCTTGGGCGG  
 7801 ACCGTGAGTC TTCCTCTTCC CCCCCAAACC CAAGGACACC CTCATGATCT CCCGGACCCC  
 7861 TGAGGTCACT TGGCTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CTTGAGGTCA AGTTCAACTG  
 7921 GTACGTGGAG GCGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGCGGAGG AGCAGTACAA  
 7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCTTCAC CGTCTGTCAC CAGGACTGGC TGAATGGCAA  
 8041 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCAGGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC  
 8101 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC CTGCCCCATC CCCGGGATGA  
 8161 GCTGACCAAG AACCAAGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA GGTCTTCTAT CCAGCGACAT  
 8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA CGCCTCCCGT  
  
 8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA AGAGCAGGTG  
 8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA ACCACTACAC  
 8401 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

Tabla 2: Secuencias polipeptídicas

A. Híbrido de FVIII con dominio B suprimido-monómero de Fc (monómero-dímero de BDD FVIII<sub>1</sub>Fc): creado coexpresando cadenas de BDD FVIII<sub>1</sub>Fc y Fc.

- 5 Constructo = fusión de HC-LC-Fc. Se cotransfecta un casete de expresión de Fc con BDDFVIII-Fc para generar el BDD FVIII<sub>1</sub>Fc monomérico. Para la cadena de BDD FVIII<sub>1</sub>Fc, la secuencia de Fc se muestra en **negrita**; la secuencia de HC se muestra doblemente subrayada; la secuencia del dominio B que queda se muestra en *cursiva*. Los péptidos señal están subrayados.

i) cadena de FVIII con dominio B suprimido-Fc (secuencia señal de 19 aminoácidos subrayada) (SEQ ID NO:2)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS  
ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSPFPNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIAKPRPPWML  
LGPTIQAEVYDVTVITLKNMASHPVSLHAGVGSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK  
ENGPMSADPLCLTYSYLSHVLDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFDGKSWHSETK  
NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQA  
SLEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEM  
DVVRFDNDDNSPSFIQIRSVAKKIIPKTVIIYIAAEEDWDYAPLVLPAPDDRSYKSYLNNGPQIRIGRKYKVV  
RFMAYTDETFKTREAIQHESCILGPLYGEVCDTLIFKNQASRPYNYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKH  
LKDFEPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLGPLLICIKESVDQGRNQIMS  
DKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLEPNPAGVQLEDPEFQASNMHNSNGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYI  
LSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMVYEDTLTLPFSGETVFMSENPGWLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVVSS  
CDKNTGDDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONPPVLKRHQRETRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKE  
DFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVFPQKKVVFQEFDTGDSFTQP  
LYRGEELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLSISYEDQDQGAEPKRNFKPNETKTYFW  
KVQHHMPTKDEFDCWAYFSDVDLEKDVHSGLGPLLVCHTNTLNPAGHRQVTVQEFALFFITFDETS  
WYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYMDTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSNENIHSIHFS  
GHVFTVRKKEEYKMAVLYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASG  
HIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQF  
IIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGKHNIENPPIIARYIRLHPTHYSIRSLRMELMGCDLN  
SCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFWATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGV  
TTQGVKSLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLTRYLRHQPQSWV  
HQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
**KRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP**  
**KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR**  
**EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKKS**  
**RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK**

- 10 ii) cadena de Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos procedente de cadena de IgG de ratón subrayado) (SEQ ID NO:4)

METDTLLLVVLLLVWVPGSTG  
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI  
**KRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP**  
**REEQYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ**  
**VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH**  
**NHYTQKSLSLSPGK**

- 15 B. Híbrido de FVIII de longitud completa-monómero de Fc (dímero de FVIII de longitud completa-monómero de Fc): creado coexpresando cadenas de FVIII<sub>1</sub>Fc y Fc.

- 20 Constructo = fusión de HC-B-LC-Fc. Se cotransfecta un casete de expresión de Fc con FVIII de longitud completa-Fc para generar el FVIII de longitud completa-Fc monomérico. Para la cadena de FVIII<sub>1</sub>Fc, la secuencia de Fc se muestra en **negrita**; la secuencia de HC se muestra doblemente subrayada; la secuencia del dominio B se muestra en *cursiva*. Los péptidos señal están subrayados.

i) cadena de FVIII de longitud completa-Fc (péptido señal de FVIII subrayado) (SEQ ID NO:6)

MQIELSTCFCLLLRFCFS  
 ATRRYLGAVELSWDYMOSDLGELPVDAREFPPRVKSPFNTSVVYKKTLEVEFTDHLFNIAPRPPWML  
 LGPTIQAEVYDITVITLKNMASHPVSLHAGVSVYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLK  
 ENGPMAODPLCLTYSYLSHVDLVKDLNGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKFILLFAVFEDEGKSWHSETK  
 NSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVMYWHVIGMGTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQA  
 SLEISPIITFLTAQTLMLDLGQFLLEFCHLSSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEM  
 DVVRFDNNSPFSFIQIRSVAKKHPTVWHYIAAEEEDWDYAPLVLPAPDDRSYKSOYLNNGPQRIGRKYKKV  
 RFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDITLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKH  
 LKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQGRNQIMS  
 DKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFPLPNFAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYI  
 LSIGAOTDFLSVFFESGYTEFKHKMVYEDTLTFPFSGETVFMSMENPGIWLGCNNSDFRNRGMTALLKVSS  
 CDKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTDPFWAHRTMPMK  
 IQNVSSSDDLMLLRQSPPTHGLSLSDLEAKYETFSDDPSPGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHSMDMVFTPE  
 SGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDITTLFG  
 KKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSEGLMNSQESSWGKNVSTESGRLFKGKRAHGPAALLTKDNALFKVS  
 ISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILESDETFKKVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMS  
 NKTTSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSSFFKMLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSKQLVSLGPEK  
 SVEGQNFLESEKNKVVGKEFTKDVGLKEMVFPSSRNFLTNLDNLHENNTNHNQEKIOEEIEKKETLQIE  
 NVVLPIQIHTVGTGNFMKNLFLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNRKTKHTAHFSKKGEEENLE  
 GLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQNFVTQRSKRALQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTP  
 STLTIQIDYNEKEKGAITQSPSLDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIYLRVLFQDNSSHLPAAS  
 YRKKDSGVQESSHFLQGAKKNNLSLAILTLEMTGDQREVGSLGTSATNSVTYKKVENIVLPKPDLPKTSKG  
 VELLPKVHIYQKDLFPETETSNGPSGHLDLVEGSLQGTGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLL  
 DPLAWNHYGTQIPKEEWSQEKSPKTAFFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTE  
 RLCSQNPVPLKRHRQREITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIYDEENQSPRSFQKKTRHYFIAAVE  
 RLWDYGMSSSPHVLNRNAQSGSVPOFKKVVFQEFDTGSGFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTF  
 RNQASRPYSFYSSLSIYEEDQQRGAEPKRFVKNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKD  
 VHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYR  
 FHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQIRRWYLLSMGNSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEM  
 LPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFCITASGQYQWAPKLARLHYSGSI  
 NAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHGKTKQARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNV  
 DSSGIKHNIENPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMGCNLSNCSMPLCMESKAISDAQITASSYFTNMFA  
 TWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTVGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWT  
 LFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPLTRYLRHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPA  
 PELLGGPVSFLFPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
 VSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY  
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLS  
 PGK

ii) cadena de Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos procedente de cadena de Igκ de ratón subrayado) (SEQ ID NO:4)

METDTLLLWVLLLWVPGSTG  
 DKTHTCPPCPAPELLGGPVSFLFPKPKDTLMIISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
 REEQYNSTYRVVSVITVHLQDWLNGKEYCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ  
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALH  
 NYHTQKSLSLSPGK

#### Referencias citadas

4. Aledort L. et al., J Intern Med.:236:391-399 (1994)
5. Petrini P. et al., Am J Pediatr Hematol Oncol. 13:280-287 (1991).
- 10 6. Aznar J. et al., Haemophilia 6(3):170-176 (2000).
7. Feldman B. et al., J Thromb Haemost. 4:1228-1236 (2006).
8. Kreuz W. et al., Haemophilia 4:413-417 (1998).
9. Liesner R. et al., B J Haem. 92:973-978 (1996).
10. Ljung R., Haemophilia. 4(4):409-412 (1998).
- 15 11. Löfquist T, et al., J Intern Med 241:395-400 (1997).

12. Nilsson I, et al., B. J Int Med 232:25-32 (1992).
13. Risebrough N. et al., Haemophilia 14:743-752 (2008).
14. Van Den Berg H. et al., Haemophilia 9 (Suppl. 1):27-31 (2003).
15. Van Den Berg H. et al., Haematologica 89(6):645-650 (2004).
- 5 16. Molho P. et al., Haemophilia 6(1):23-32 (2000).
17. Coppola A. et al., Blood Transfus. 6(2): 4-11 (2008).
18. Geraghty S. et al., Haemophilia 12:75-81 (2006).
19. Hacker M. et al., Haemophilia 7(4):392-396 (2001).
20. Lillicrap D., Current Opinion in Hematology 17:393-397 (2010).
- 10 21. Dumont J.A. et al., BioDrugs 20(3): 151-60 (2006).
22. Dumont J.A. et al., "Monomeric Fc fusion technology: an approach to create long lasting clotting factors", en: Kontermann R., ed., Therapeutic Proteins - Strategies to Modulate Half-Life, Capítulo 11, Wiley VCH publisher; en prensa.
23. Roopenian D.C. et al., Nat Rev Immunol. 7(9):715-25 (Epub 2007 Aug 17).
- 15 24. Lencer W.I. y Blumberg R.S., Trends Cell Biol. 15(1):5-9 (2005).
25. Huang C., Curr Opin Biotechnol. 20(6):692-9. (Epub 2009 Nov 4).
26. Schmidt S.R., Curr Opin Drug Discov Devel. 12(2):284-295 (2009).
27. Dumont J. et al., Blood. 116(21) Abstract 545 (2009).
28. Liu T. et al., J Thromb Haemost. 9(S2):561 (2011).
- 20 29. Rosen S., Scand JHaematol Suppl. 33(Suppl 40):139-45 (1984).
30. Lee C.A. et al., Thromb Haemost. 82(6):1644-7 (Dec. 1999).
31. Mikaelsson M. y Oswaldsson U., Semin Thromb Hemost. 28(3):257-64 (June 2002).
32. Stroobants A.K. et al., J Thromb Haemost. 9 (Suppl 2) (2011).
33. Lenting P.J. et al., J Thromb Haemost. 5: 1353-60 (2007).
- 25 34. Smith N.L. et al., Circulation 121:1382-1392 (2010).

#### Listado de secuencias

- <110> Biogen Idec MA Inc. DUMONT, Jennifer A. LOW, Susan BITONTI, Alan J. PIERCE, Glenn LUK, Alvin JIANG, Haiyan MCKINNEY, Byron OTTMER, Matt SOMMER, Jurg NUGENT, Karen LI, Lian PETERS, Robert
- <120> Polipéptidos quiméricos e híbridos del Factor VIII, y métodos de uso de los mismos
- 30 <130> 2159.354PC07/EKS/C-K/CMG
- <140> A asignar
- <141> Con la presente
- <150> US 61/657,641
- <151> 2012-06-08
- 35 <150> US 61/622,789
- <151> 2012-04-11
- <150> US 61/586,443
- <151> 2012-01-13

<150> US 61/569,158  
 <151> 2011-12-09  
 <150> US 61/541,561  
 <151> 2011-09-30  
 5 <150> US 61/522,647  
 <151> 2011-08-11  
 <150> US 61/506,015  
 <151> 2011-07-08  
 <160> 16  
 10 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 5052  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial  
 15 <220>  
 <223> Cadena de FVIII con dominio B suprimido-Fc  
 <220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (1)..(57)  
 20 <223> Señal de FVIII  
 <220>  
 <221> característica diversa  
 <222> (4372)..(5052)  
 <223> Región de Fc  
 25 <400> 1

# ES 2 722 209 T3

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc  | 60   |
| accagaagat actacctggg tgcagtgga ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc   | 120  |
| gggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac | 180  |
| acctcagtcg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc   | 240  |
| gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat  | 300  |
| gatacagtg tcatcact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtc tcatgtgtt       | 360  |
| gggtgatcct actggaaagc ttctgagga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg   | 420  |
| gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg  | 480  |
| aaagagaatg gtccaatggc ctctgacca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat   | 540  |
| gtggacctg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa    | 600  |
| gggagtctg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta   | 660  |
| tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat  | 720  |
| gctgcatctg ctggggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct  | 780  |
| ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc  | 840  |
| accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat  | 900  |
| cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg    | 960  |
| gaccttgga agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa  | 1020 |
| gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa   | 1080 |
| gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat  | 1140 |
| gatgacaact ctccctcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact  | 1200 |
| tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc  | 1260 |
| cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg  | 1320 |
| aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct  | 1380 |
| attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg  | 1440 |
| ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact  | 1500 |
| gatgtcogtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt  | 1560 |
| ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca  | 1620 |
| actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga  | 1680 |
| gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa  | 1740 |
| agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag  | 1800 |
| aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tcccgaatcc agctggagtg  | 1860 |

# ES 2 722 209 T3

|            |             |            |             |             |            |      |
|------------|-------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| cagcttgagg | atccagagtt  | ccaagcctcc | aacatcatgc  | acagcatcaa  | tggctatgtt | 1920 |
| tttgatagtt | tgcagttgtc  | agtttgtttg | catgaggtgg  | catactggta  | cattctaagc | 1980 |
| attggagcac | agactgactt  | cctttctgtc | ttcttctctg  | gatatacctt  | caaacacaaa | 2040 |
| atggtctatg | aagacacact  | caccctattc | ccattctcag  | gagaaaactgt | cttcatgtcg | 2100 |
| atggaaaacc | caggtctatg  | gatttctggg | tgcacaaact  | cagactttcg  | gaacagaggc | 2160 |
| atgaccgcct | tactgaaggt  | ttctagtgtg | gacaagaaca  | ctggtgatta  | ttacgaggac | 2220 |
| agttatgaag | atatttcagc  | atacttgctg | agtaaaaaaca | atgccattga  | accaagaagc | 2280 |
| ttctctcaaa | accaccagt   | cttgaaaagc | catcaacggg  | aaataactcg  | tactactctt | 2340 |
| cagtcagatc | aagaggaaat  | tgactatgat | gataccatat  | cagttgaaat  | gaagaaggaa | 2400 |
| gattttgaca | tttatgatga  | ggatgaaaat | cagagccccc  | gcagctttca  | aaagaaaaca | 2460 |
| cgacactatt | ttattgctgc  | agtggagagg | ctctgggatt  | atgggatgag  | tagctcccca | 2520 |
| catgttctaa | gaaacagggc  | tcagagtggc | agtgtccctc  | agttcaagaa  | agttgttttc | 2580 |
| caggaattta | ctgatggctc  | ctttactcag | cccttatacc  | gtggagaact  | aatgaacat  | 2640 |
| ttgggactcc | tggggccata  | tataagagca | gaagttgaag  | ataatatcat  | ggtaactttc | 2700 |
| agaaatcagc | cctctcgtcc  | ctattccttc | tattctagcc  | ttattttctta | tgaggaagat | 2760 |
| cagaggcaag | gagcagaacc  | tagaaaaaac | tttgtcaagc  | ctaataaac   | caaaacttac | 2820 |
| ttttggaaag | tgaacatca   | tatggcacc  | actaaagatg  | agtttgactg  | caaagcctgg | 2880 |
| gcttattttc | ctgatgttga  | cctggaaaaa | gatgtgcact  | caggcctgat  | tggacccctt | 2940 |
| ctggtctgcc | acactaacac  | actgaacct  | gctcatggga  | gacaagtgc   | agtacaggaa | 3000 |
| tttgctctgt | ttttcaccat  | ctttgatgag | acccaaaagc  | ggtacttcac  | tgaaaatatg | 3060 |
| gaaagaaact | gcagggtcc   | ctgcaatata | cagatggaag  | atccactttt  | taaagagaat | 3120 |
| tatcgcttcc | atgcaatcaa  | tggctacata | atggatacac  | tacctggctt  | agtaatggct | 3180 |
| caggatcaaa | ggattcgtatg | gtatctgtc  | agcatgggca  | gcaatgaaaa  | catccattct | 3240 |
| attcatttca | gtggacatgt  | gttactgtga | cgaaaaaaag  | aggagtataa  | aatggcactg | 3300 |
| tacaatctct | atccaggtgt  | 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  | gagcaccag  | gagccctttt  | cttggatcaa  | ggtggatctg | 3600 |
| ttggcaccaa | tgattattca  | cggcatcaag | acccaggggtg | cccgtcagaa  | gttctccagc | 3660 |
| ctctacatct | ctcagtttat  | catcatgtat | agtcttgatg  | ggaagaagtg  | gcagacttat | 3720 |
| cgaggaaatt | ccactggaac  | cttaatggtc | ttcttttgca  | atgtggattc  | atctgggata | 3780 |

aaacacaata tttttaaccc tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840  
 tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaaa tagttgcagc 3900  
 atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacccctac 3960  
 tttaccaata tgtttgccac ctgggtctct 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 aagtaaagg ttttcagga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260  
 tctctagacc caccgttact gactcgctac ctctgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320  
 cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact 4380  
 cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa ctctggggcg gaccgtcagt ctctctcttc 4440  
 ccccaaaaac ccaaggacac cctcatgac tcccgagccc ctgaggtcac atgctgggtg 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  
 agcctgacct gcctgggtcaa aggccttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 4860  
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttggtact cgacggctcc 4920  
 ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc 4980  
 tcatgtccg tgatgcatga ggctctgcac aaccaactaca cgcagaagag cctctccctg 5040  
 tctccgggta aa 5052

<210> 2

<211> 1684

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena de FVIII con dominio B suprimido-Fc

<220>

<221> característica diversa

10 <222> (1)..(19)

<223> Señal

<220>

<221> característica diversa

<222> (20)..(753)

15 <223> Cadaena pesada (HC)

<220>

<221> característica diversa

<222> (760)..(773)

<223> dominio B

5 <220>

<221> característica diversa

<222> (1457)..(1684)

<223> Región de Fc

<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  
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

10

# ES 2 722 209 T3

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  
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu  
 465 470 475 480

# ES 2 722 209 T3

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

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

# ES 2 722 209 T3

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  
 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

# ES 2 722 209 T3

| 995                                                                           | 1000 | 1005 |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn<br>1010 1015 1020 |      |      |
| Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys<br>1025 1030 1035 |      |      |
| Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr<br>1040 1045 1050 |      |      |
| Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr<br>1055 1060 1065 |      |      |
| Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe<br>1070 1075 1080 |      |      |
| Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met<br>1085 1090 1095 |      |      |
| Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met<br>1100 1105 1110 |      |      |
| Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly<br>1115 1120 1125 |      |      |
| Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser<br>1130 1135 1140 |      |      |
| Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg<br>1145 1150 1155 |      |      |
| Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro<br>1160 1165 1170 |      |      |
| Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser<br>1175 1180 1185 |      |      |
| Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro<br>1190 1195 1200 |      |      |
| Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe<br>1205 1210 1215 |      |      |
| Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp<br>1220 1225 1230 |      |      |
| Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu<br>1235 1240 1245 |      |      |

# ES 2 722 209 T3

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

# ES 2 722 209 T3

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

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Región de Fc

<220>

<221> señal diversa

10 <222> (1)..(60)

<223> señal de kappa de Ig de ratón

<400> 3

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc      120
ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcatgatct cccggacccc tgaggtcaca      180
tgcgtaggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      240
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      300
cgtgtggtca gcgtcctcac cgctcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      360
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag      480
aaccaggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgcctgtggag      540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccggt gttggactcc      600
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccgggtaa a                                          741

```

<210> 4

5 <211> 247

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena de Fc

10 <220>

<221> característica diversa

<222> (1)..(20)

<223> señal heteróloga procedente de la cadena kappa de Ig de ratón

<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

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

```

15

# ES 2 722 209 T3

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

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII de longitud completa-Fc

<220>

<221> señal diversa

10 <222> (1)..(57)

<223> Señal de FVIII

<220>

<221> característica diversa

<222> (7054)..(7734)

<223> Región Fc

<400> 5

|                                                                    |      |
|--------------------------------------------------------------------|------|
| atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc  | 60   |
| accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc  | 120  |
| ggtagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac   | 180  |
| acctcagtcg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc   | 240  |
| gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat  | 300  |
| gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtc tcatgctgtt   | 360  |
| gggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg | 420  |
| gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg  | 480  |
| aaagagaatg gtccaatggc ctctgacca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat   | 540  |
| gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa   | 600  |
| gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta  | 660  |
| ttttagtaag gaaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat  | 720  |
| gctgcatctg ctggggctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct   | 780  |
| ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc  | 840  |
| accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct   | 900  |
| cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg    | 960  |
| gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa | 1020 |
| gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa   | 1080 |
| gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggg caggtttgat  | 1140 |
| gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact  | 1200 |
| tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc  | 1260 |
| cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg  | 1320 |
| aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct  | 1380 |
| attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg ggaagtttg agacacactg   | 1440 |
| ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact  | 1500 |
| gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt  | 1560 |
| ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca  | 1620 |
| actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga  | 1680 |
| gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa  | 1740 |
| agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag  | 1800 |
| aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc agctggagtg  | 1860 |

|             |            |            |             |             |            |      |
|-------------|------------|------------|-------------|-------------|------------|------|
| cagcttgagg  | atccagagtt | ccaagcctcc | aacatcatgc  | acagcatcaa  | tggctatgtt | 1920 |
| tttgatagtt  | tgcagttgtc | agtttgtttg | catgaggtgg  | catactggta  | cattctaagc | 1980 |
| attggagcac  | agactgactt | cctttctgtc | ttcttctctg  | gatatacctt  | caaacacaaa | 2040 |
| atggtctatg  | aagacacact | caccctattc | ccattctcag  | gagaaaactgt | cttcatgtcg | 2100 |
| atggaaaacc  | caggtctatg | gatttctggg | tgcacaaact  | cagactttcg  | gaacagaggc | 2160 |
| atgaccgcct  | tactgaaggt | ttctagtgtg | gacaagaaca  | ctggtgatta  | ttacgaggac | 2220 |
| agttatgaag  | atatttcagc | atacttgctg | agtaaaaaaca | atgccattga  | accaagaagc | 2280 |
| ttctcccaga  | attcaagaca | ccctagcact | aggcaaaaagc | aatttaatgc  | caccacaatt | 2340 |
| ccagaaaatg  | acatagagaa | gactgacctt | tggtttgcac  | acagaacacc  | tatgcctaaa | 2400 |
| atacaaaatg  | tctcctctag | tgatttgttg | 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 | aagaaaacttg | atttcaaagt  | ttctagtaca | 2700 |
| tcaaataatc  | tgatttcaac | aattccatca | gacaatttgg  | cagcaggtac  | tgataataca | 2760 |
| agttccttag  | gacccccaa  | tatgccagtt | cattatgata  | gtcaattaga  | taccactcta | 2820 |
| tttggcaaaa  | agtcacatcc | ccttactgag | tctggtggac  | ctctgagctt  | gagtgaagaa | 2880 |
| aataatgatt  | caaagttggt | agaatcaggt | ttaatgaata  | gccaagaaag  | ttcatgggga | 2940 |
| aaaaatgtat  | cgtcaacaga | gagtggtagg | ttattttaaag | ggaaaagagc  | tcatggacct | 3000 |
| gctttgttga  | ctaaagataa | tgccttattc | aaagttagca  | tctctttgtt  | aaagacaaac | 3060 |
| aaaactttcca | ataattcagc | aactaataga | aagactcaca  | ttgatggccc  | atcattatta | 3120 |
| attgagaata  | gtccatcagt | ctggcaaaat | atattagaaa  | gtgacactga  | gtttaaaaaa | 3180 |
| gtgacacctt  | tgattcatga | cagaatgctt | atggacaaaa  | atgctacagc  | tttgaggcta | 3240 |
| aatcatatgt  | caaataaaa  | tacttcatca | aaaaacatgg  | aatgggtcca  | acagaaaaaa | 3300 |
| gagggcccca  | ttccaccaga | tgcacaaaat | ccagatatgt  | cgttctttta  | gatgctattc | 3360 |
| ttgccagaat  | cagcaaggtg | gatacaaagg | actcatggaa  | agaactctct  | gaactctggg | 3420 |
| caaggcccca  | gtccaaagca | attagtatcc | ttaggaccag  | aaaaatctgt  | ggaaggtcag | 3480 |
| aatttcttgt  | ctgagaaaaa | caaagtggta | gtaggaaagg  | gtgaatttac  | aaaggacgta | 3540 |
| ggactcaaa   | agatgggttt | tccaagcagc | agaaacctat  | ttcttactaa  | cttggataat | 3600 |
| ttacatgaaa  | ataatacaca | caatcaagaa | aaaaaaattc  | aggaagaaat  | agaaaagaag | 3660 |
| gaaacattaa  | tccaagagaa | tgtagttttg | cctcagatac  | atacagtgac  | tggcactaag | 3720 |
| aatttcatga  | agaacctttt | cttactgagc | actaggcaaa  | atgtagaagg  | ttcatatgac | 3780 |

|                                                                     |      |
|---------------------------------------------------------------------|------|
| ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aaatagaaca   | 3840 |
| aagaacacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttgga aggcttggga  | 3900 |
| aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatatc tccataataca  | 3960 |
| agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca   | 4020 |
| ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtgggcc   | 4080 |
| aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctccacacaga tagactacaa tgagaaggag  | 4140 |
| aaagggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct  | 4200 |
| caagcaaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct   | 4260 |
| atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat   | 4320 |
| agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat    | 4380 |
| aacctttctt tagccattct aaccttgag atgactgggt atcaaagaga ggttggctcc    | 4440 |
| ctggggacaa gtgcacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg    | 4500 |
| aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat    | 4560 |
| cagaaggacc tattccctac ggaactagc aatgggtctc ctggccatct ggtctctgtg    | 4620 |
| gaaggagacc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct   | 4680 |
| ggaaaagttc cctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta   | 4740 |
| ttggatcctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa   | 4800 |
| tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct ttaagaaaa aggataccat tttgtccctg     | 4860 |
| aacgcttgtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccgaa   | 4920 |
| atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca    | 4980 |
| gtcttgaaac gccatcaacg ggaataaact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa   | 5040 |
| attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagg aagattttga catttatgat   | 5100 |
| gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cagcactata 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 agataatat atggttaact tcagaaatca ggcctctcgt    | 5400 |
| ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa   | 5460 |
| cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataaa accaaaactt acttttggaa agtgcaacat   | 5520 |
| catatggcac ccactaaaaga tgagtttgac tgcaaaagcct gggcttattt ctctgatgtt | 5580 |
| gacctggaag aagatgtgca ctccaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac  | 5640 |
| acactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc   | 5700 |
| atctttgatg agaccaaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggct  | 5760 |

ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820  
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880  
tggatatctgc 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 ttcttggatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300  
cacggcatca agaccagggt tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360  
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttccactgga 6420  
accttaatgg tcttcttttg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480  
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg caccacaactc attatagcat tcgcagcact 6540  
cttcgcgatg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaaatggag 6600  
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacctc actttaccaa tatgtttgcc 6660  
acctgggtctc cttcaaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720  
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780  
ggagtaacta ctcaggaggat aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttctctc 6840  
atctccagca gtcaagatgg ccacagtggt actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900  
gtttttcagg gaaatcaaga ctccctcaca cctgtgtgta actctctaga cccaccgtta 6960  
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020  
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 7080  
ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttctctt tccccccaaa acccaaggac 7140  
acctcatga tctcccgagc ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 7200  
gacctgagg 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  
acctgcccc catcccgga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 7500  
aaaggcttct atccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 7560  
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttgagc tcgcagcgtt cttcttctct ctacagcaag 7620  
ctcacogtgg acaagagcag gtggcagcag gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 7680  
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 7734

<210> 6

5 <211> 2578

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> cadena de FVIII de longitud completa-Fc

<220>

<221> característica diversa

5 <222> (1)..(19)

<223> Señal de FVIII

<220>

<221> característica diversa

<222> (20)..(759)

10 <223> HC

<220>

<221> característica diversa

<222> (760)..(1667)

<223> dominio B

15 <220>

<221> característica diversa

<222> (2352)..(2578)

<223> Región de Fc

<400> 6

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

20

# ES 2 722 209 T3

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

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

# ES 2 722 209 T3

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  
 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

ES 2 722 209 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|--|--|
| 645 |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |  |  |  |  |
| Tyr | Ile | Leu | Ser | Ile | Gly | Ala | Gln | Thr | Asp | Phe | Leu | Ser | Val | Phe | Phe |  |  |  |  |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Gly | Tyr | Thr | Phe | Lys | His | Lys | Met | Val | Tyr | Glu | Asp | Thr | Leu | Thr |  |  |  |  |
|     |     |     | 675 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Leu | Phe | Pro | Phe | Ser | Gly | Glu | Thr | Val | Phe | Met | Ser | Met | Glu | Asn | Pro |  |  |  |  |
|     |     |     | 690 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Gly | Leu | Trp | Ile | Leu | Gly | Cys | His | Asn | Ser | Asp | Phe | Arg | Asn | Arg | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 705 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Met | Thr | Ala | Leu | Leu | Lys | Val | Ser | Ser | Cys | Asp | Lys | Asn | Thr | Gly | Asp |  |  |  |  |
|     |     |     | 725 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Tyr | Tyr | Glu | Asp | Ser | Tyr | Glu | Asp | Ile | Ser | Ala | Tyr | Leu | Leu | Ser | Lys |  |  |  |  |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asn | Asn | Ala | Ile | Glu | Pro | Arg | Ser | Phe | Ser | Gln | Asn | Ser | Arg | His | Pro |  |  |  |  |
|     |     |     | 755 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Thr | Arg | Gln | Lys | Gln | Phe | Asn | Ala | Thr | Thr | Ile | Pro | Glu | Asn | Asp |  |  |  |  |
|     |     |     | 770 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Glu | Lys | Thr | Asp | Pro | Trp | Phe | Ala | His | Arg | Thr | Pro | Met | Pro | Lys |  |  |  |  |
|     |     |     | 785 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ile | Gln | Asn | Val | Ser | Ser | Ser | Asp | Leu | Leu | Met | Leu | Leu | Arg | Gln | Ser |  |  |  |  |
|     |     |     | 805 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Pro | Thr | Pro | His | Gly | Leu | Ser | Leu | Ser | Asp | Leu | Gln | Glu | Ala | Lys | Tyr |  |  |  |  |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Glu | Thr | Phe | Ser | Asp | Asp | Pro | Ser | Pro | Gly | Ala | Ile | Asp | Ser | Asn | Asn |  |  |  |  |
|     |     |     | 835 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Ser | Leu | Ser | Glu | Met | Thr | His | Phe | Arg | Pro | Gln | Leu | His | His | Ser | Gly |  |  |  |  |
|     |     |     | 850 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Asp | Met | Val | Phe | Thr | Pro | Glu | Ser | Gly | Leu | Gln | Leu | Arg | Leu | Asn | Glu |  |  |  |  |
|     |     |     | 865 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Lys | Leu | Gly | Thr | Thr | Ala | Ala | Thr | Glu | Leu | Lys | Lys | Leu | Asp | Phe | Lys |  |  |  |  |
|     |     |     | 885 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |
| Val | Ser | Ser | Thr | Ser | Asn | Asn | Leu | Ile | Ser | Thr | Ile | Pro | Ser | Asp | Asn |  |  |  |  |
|     |     |     | 900 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |  |  |

# ES 2 722 209 T3

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  
 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

# ES 2 722 209 T3

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

ES 2 722 209 T3

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

# ES 2 722 209 T3

|                                                                               |      |      |
|-------------------------------------------------------------------------------|------|------|
| 1640                                                                          | 1645 | 1650 |
| Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu<br>1655 1660 1665 |      |      |
| Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr<br>1670 1675 1680 |      |      |
| Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile<br>1685 1690 1695 |      |      |
| Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys<br>1700 1705 1710 |      |      |
| Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr<br>1715 1720 1725 |      |      |
| Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser<br>1730 1735 1740 |      |      |
| Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr<br>1745 1750 1755 |      |      |
| Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu<br>1760 1765 1770 |      |      |
| His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp<br>1775 1780 1785 |      |      |
| Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser<br>1790 1795 1800 |      |      |
| Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly<br>1805 1810 1815 |      |      |
| Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr<br>1820 1825 1830 |      |      |
| Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu<br>1835 1840 1845 |      |      |
| Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu<br>1850 1855 1860 |      |      |
| Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His<br>1865 1870 1875 |      |      |
| Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln<br>1880 1885 1890 |      |      |

# ES 2 722 209 T3

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

# ES 2 722 209 T3

|                                                                               |
|-------------------------------------------------------------------------------|
| Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn<br>2135 2140 2145 |
| Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile<br>2150 2155 2160 |
| Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg<br>2165 2170 2175 |
| Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys<br>2180 2185 2190 |
| Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln<br>2195 2200 2205 |
| Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser<br>2210 2215 2220 |
| Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp<br>2225 2230 2235 |
| Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe<br>2240 2245 2250 |
| Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys<br>2255 2260 2265 |
| Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser<br>2270 2275 2280 |
| Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys<br>2285 2290 2295 |
| Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val<br>2300 2305 2310 |
| Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His<br>2315 2320 2325 |
| Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu<br>2330 2335 2340 |
| Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro<br>2345 2350 2355 |
| Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu<br>2360 2365 2370 |

# ES 2 722 209 T3

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro  
2375 2380 2385

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

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de unión a albúmina

<400> 7

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp  
1 5 10

<210> 8

<211> 32

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido de CTP

<400> 8

Asp Pro Arg Phe Gln Asp Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Leu Pro Ser Pro Ser Arg Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu  
20 25 30

<210> 9

10 <211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de CTP

15 <400> 9

Ser Ser Ser Ser Lys Ala Pro Pro Pro Ser Leu Pro Ser Pro Ser Arg  
1 5 10 15

Leu Pro Gly Pro Ser Asp Thr Pro Ile Leu Pro Gln  
20 25

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de PAS

<400> 10

Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Ala Pro Ala  
20

25 <210> 11

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de PAS

<400> 11

Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser  
20

<210> 12

5 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de PAS

10 <400> 12

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Ser Ser  
20

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de PAS

<400> 13

Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ser Ala Pro Ser Ser Pro Ser Pro Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Ser

20 <210> 14

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Péptido de PAS

<400> 14

Ser Ser Pro Ser Ala Pro Ser Pro Ser Ser Pro Ala Ser Pro Ser Pro  
1 5 10 15

Ser Ser Pro Ala  
20

<210> 15

<211> 24

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> Péptido de PAS

<400> 15

Ala Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala Ala Ala Ser Pro  
1 5 10 15

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala  
20

<210> 16

10 <211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de PAS

15 <400> 16

Ala Ser Ala Ala Ala Pro Ala Ala Ala Ser Ala Ala Ala Ser Ala Pro  
1 5 10 15

Ser Ala Ala Ala  
20

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende (i) un polipéptido quimérico, que comprende una porción de Factor VIII (FVIII) y una segunda porción, y (ii) al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable, en la que 15% a 25% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y 75% a 85% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado, en la que el FVIII monocatenario comprende una cadena pesada de FVIII y una cadena ligera de FVIII en una única cadena polipeptídica, y el FVIII procesado comprende una cadena pesada de FVIII y una cadena ligera de FVIII en dos cadenas polipeptídicas.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que (a) 25% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y 75% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado, (b) 20% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y 80% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado, o (c) 15% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII monocatenario, y 85% de la porción de FVIII del polipéptido quimérico es FVIII procesado.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, en la que el polipéptido quimérico que comprende FVIII monocatenario tiene actividad de FVIII comparable a un polipéptido quimérico que comprende FVIII procesado.
4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el polipéptido quimérico es un polipéptido de FVIII de acción prolongada.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que el polipéptido quimérico tiene una semivida más larga que un polipéptido que consiste en la porción de FVIII.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la segunda porción comprende una región de Fc, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal (CTP) de 28 aminoácidos de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietil almidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, pequeñas moléculas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de los mismos.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, en la que el polipéptido quimérico es un híbrido monómero-dímero de FVIII<sub>IFc</sub>.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la porción de FVIII comprende FVIII con dominio B suprimido, o FVIII maduro de longitud completa, o en la que el resto 1645 que corresponde a FVIII maduro de longitud completa, el resto 1648 que corresponde a FVIII maduro de longitud completa, o ambos restos, en el FVIII monocatenario, está sustituido o mutado, en comparación con el FVIII de tipo salvaje.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que la porción de FVIII comprende FVIII con dominio B suprimido.
10. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que es adecuada para la inyección subcutánea, intradérmica, intravascular, intravenosa, intramuscular, espinal, intracraneal, intratecal, intraocular, periocular, intraorbital, intrasinovial o intraperitoneal a un ser humano.
11. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, para uso en la prevención, disminución, o tratamiento de un episodio de sangrado en un sujeto, para el tratamiento profiláctico de un episodio de sangrado en un sujeto, para el tratamiento a demanda de un episodio de sangrado en un sujeto, o en el mantenimiento de la homeostasis en un sujeto que necesita una cirugía.
12. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en la que el episodio de sangrado está asociado con una enfermedad o afección que comprende hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma capitis (trauma de cabeza), sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal, o hemorragia en la vaina del iliopsoas.
13. La composición farmacéutica para uso según la reivindicación 11, en la que la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, tonsilectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, sustitución total de la rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, cirugía de emergencia, o cirugía de sustitución de articulación.
14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, o la composición farmacéutica para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 11-13, que está liofilizada.

Figura 1

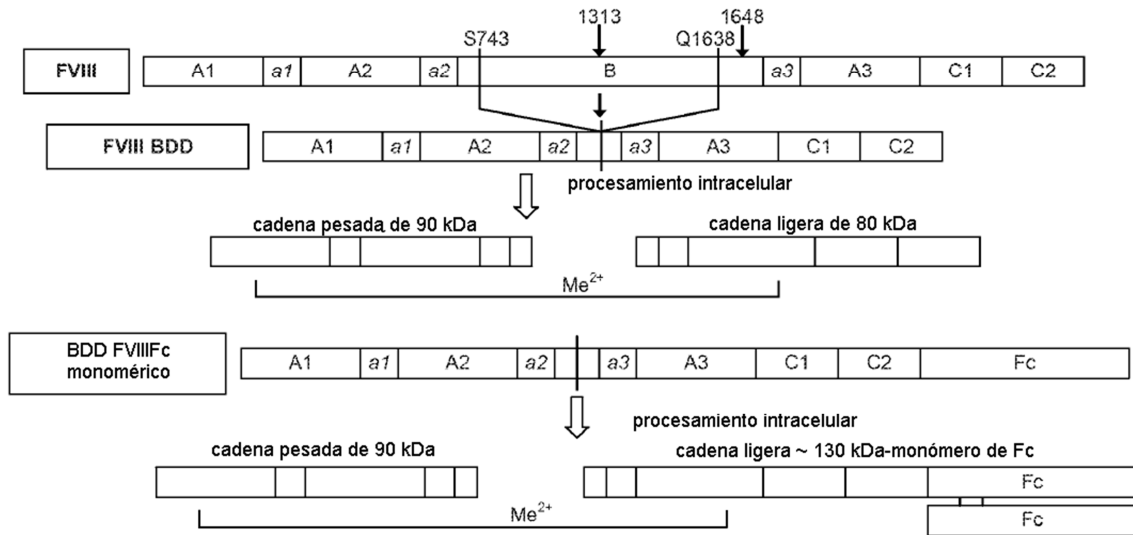


Figura 2

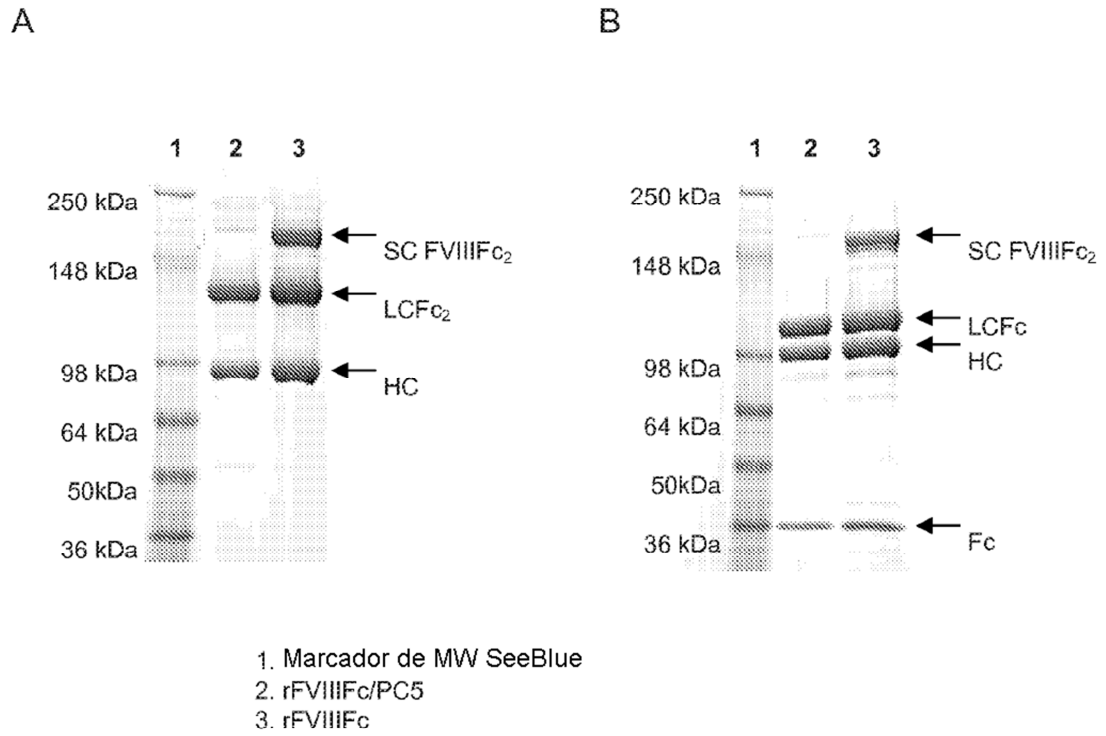


Figura 2C

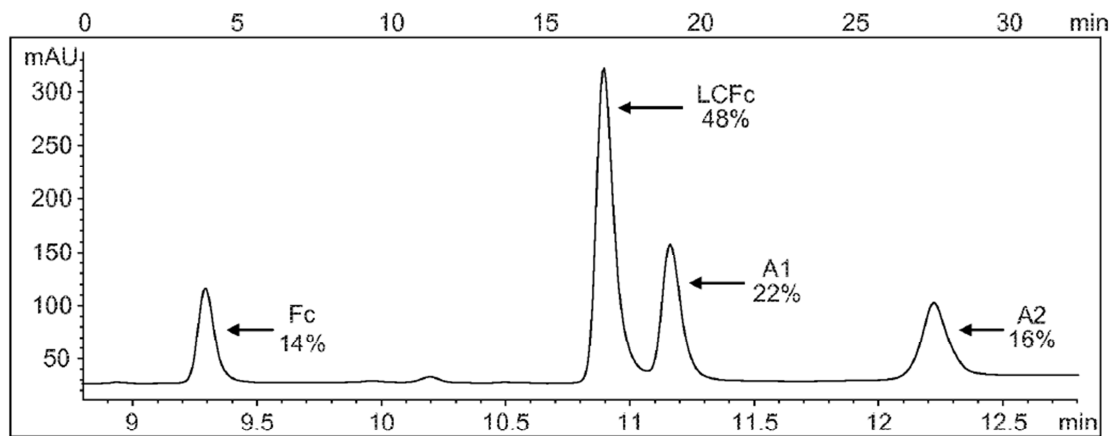


**Fig. 2D**

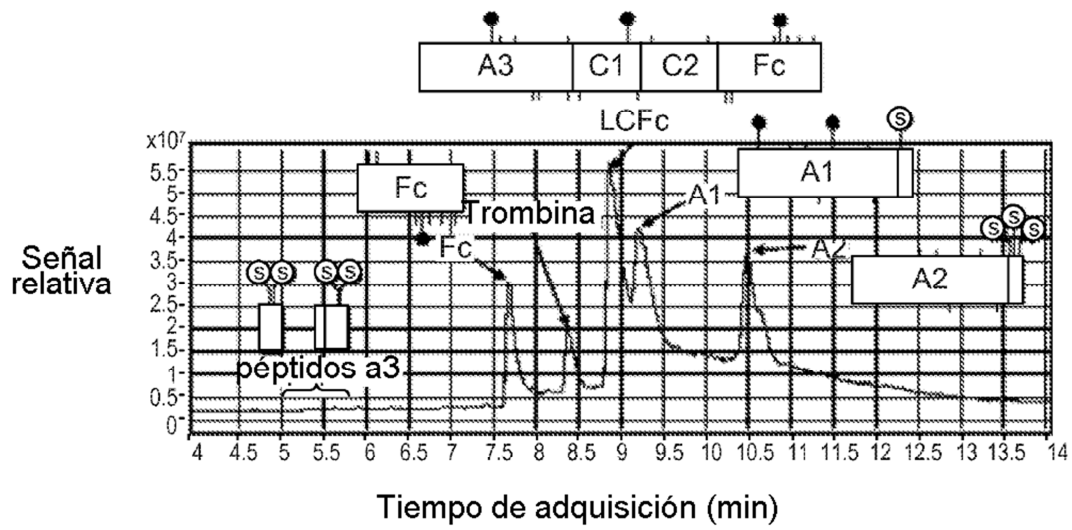


**Fig. 2E**

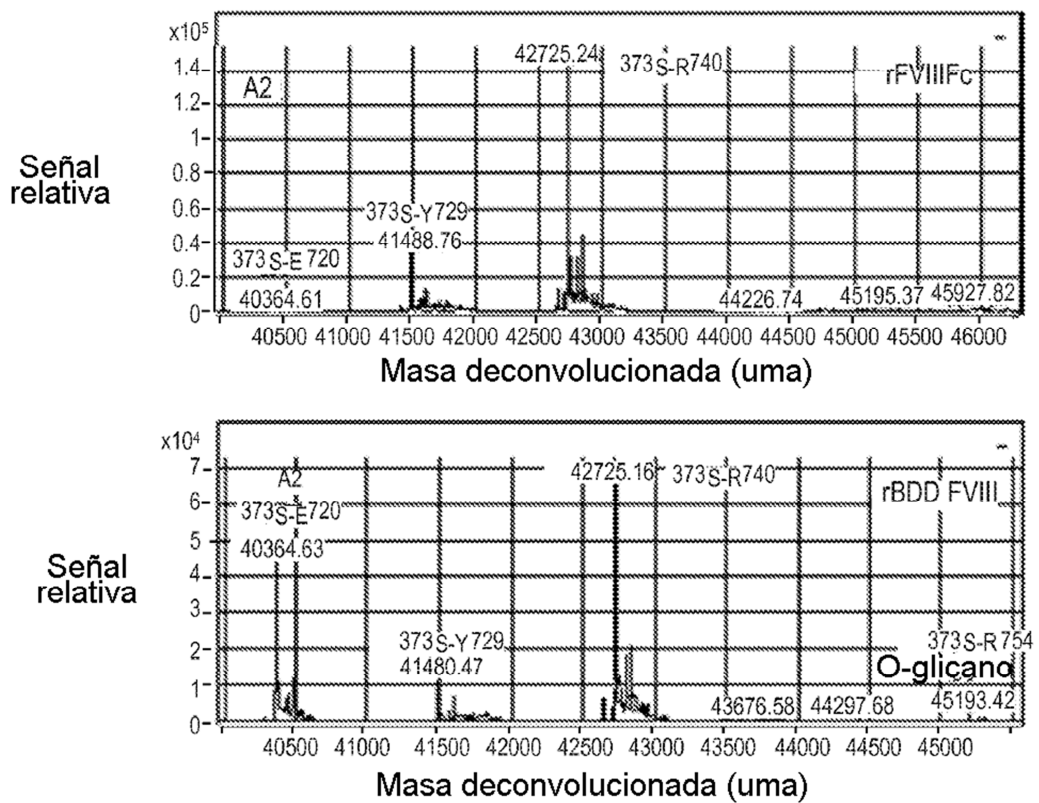


Figura 3

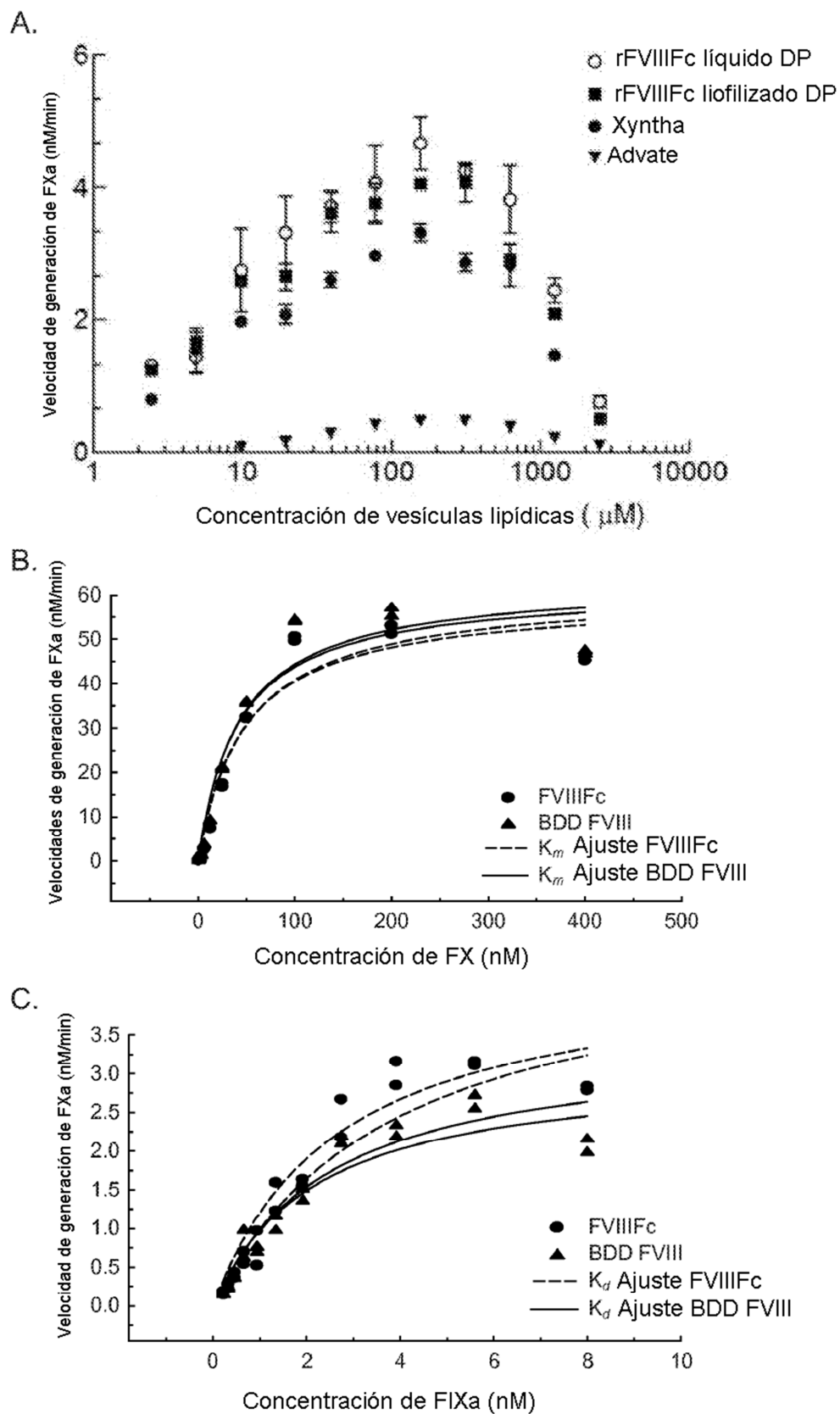


Figura 4

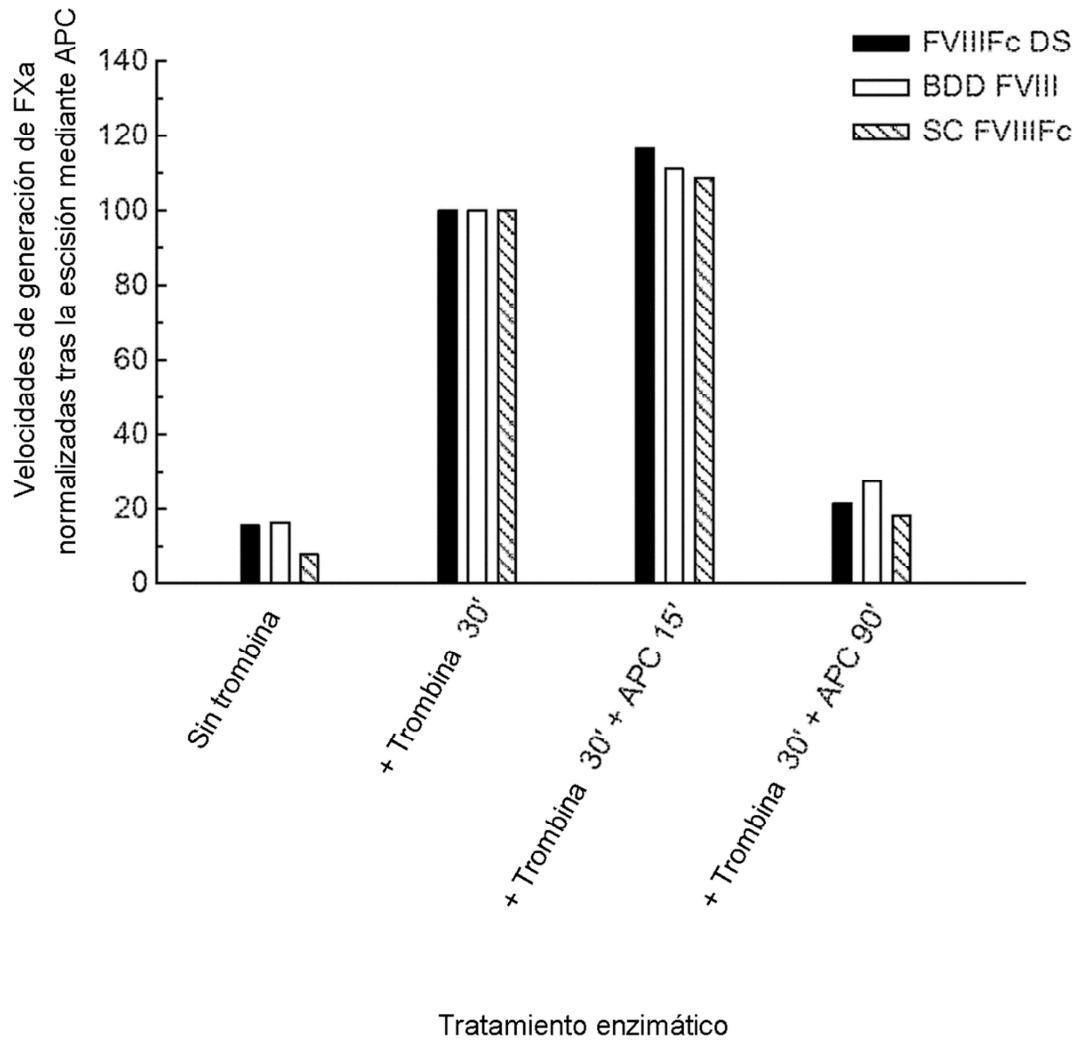


Figura 5A

Nivel de dosis=25

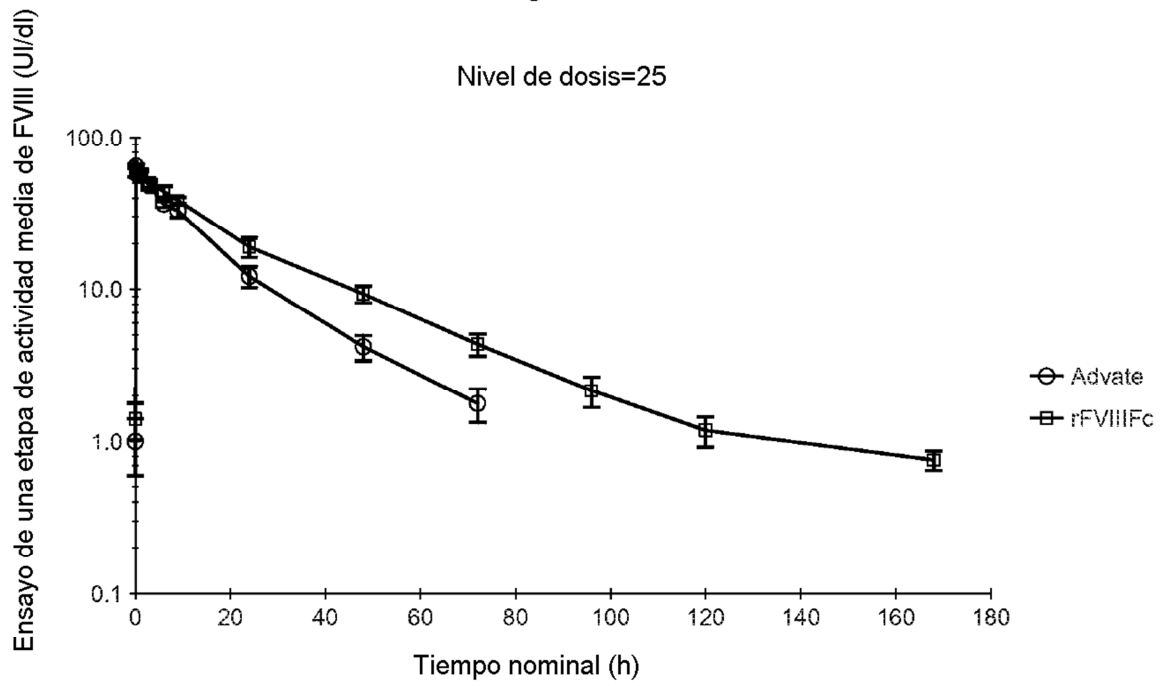


Figura 5B

Nivel de dosis=65

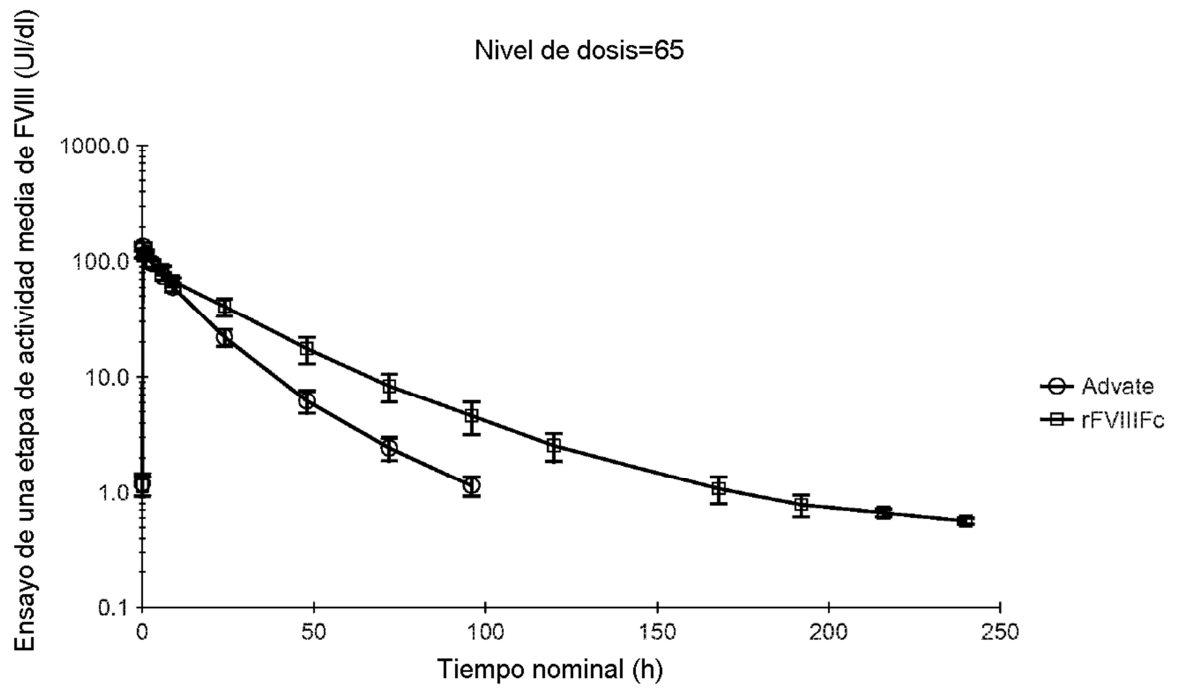


Figura 5C

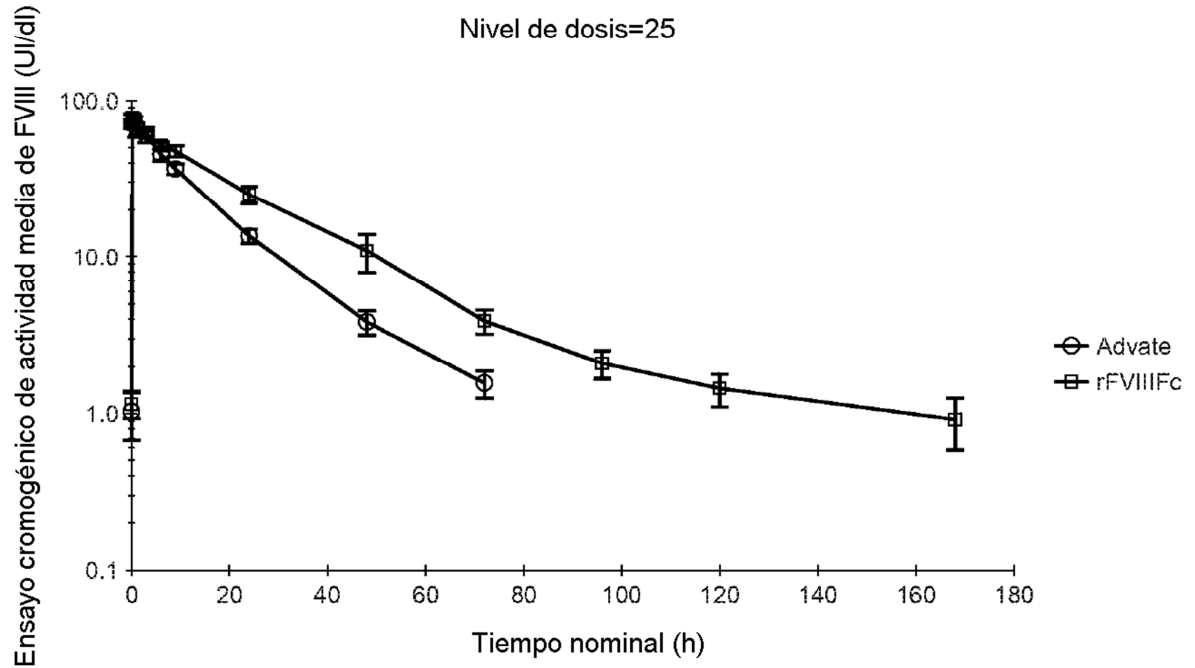


Figura 5D

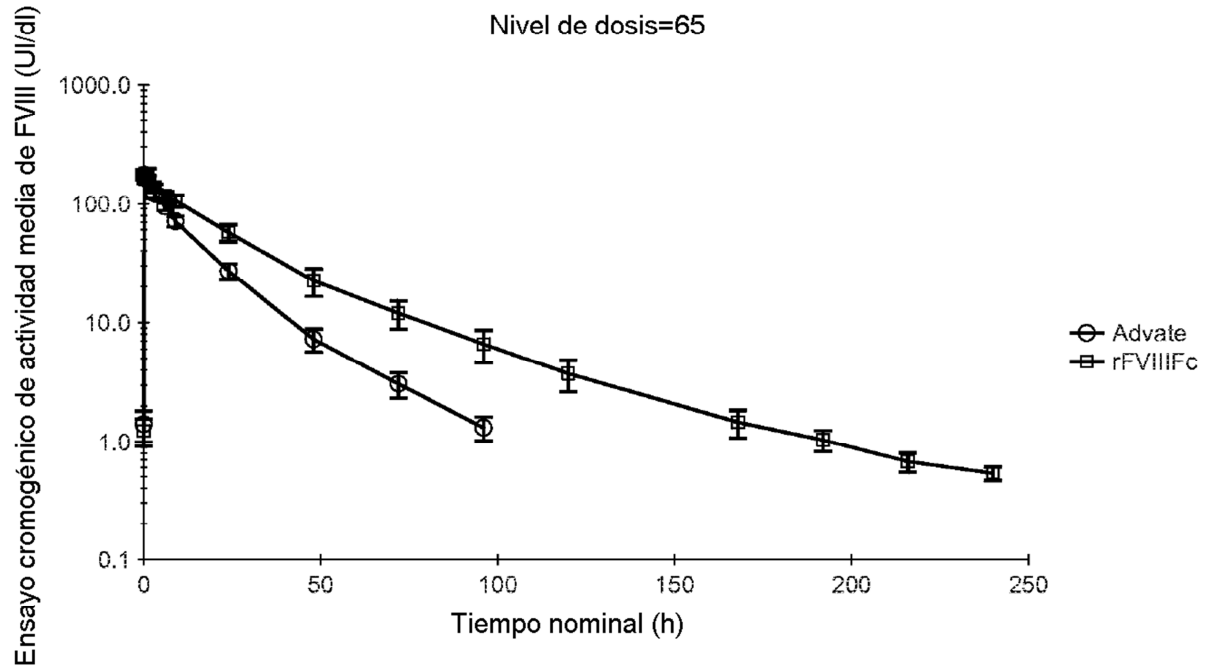


Figura 6A

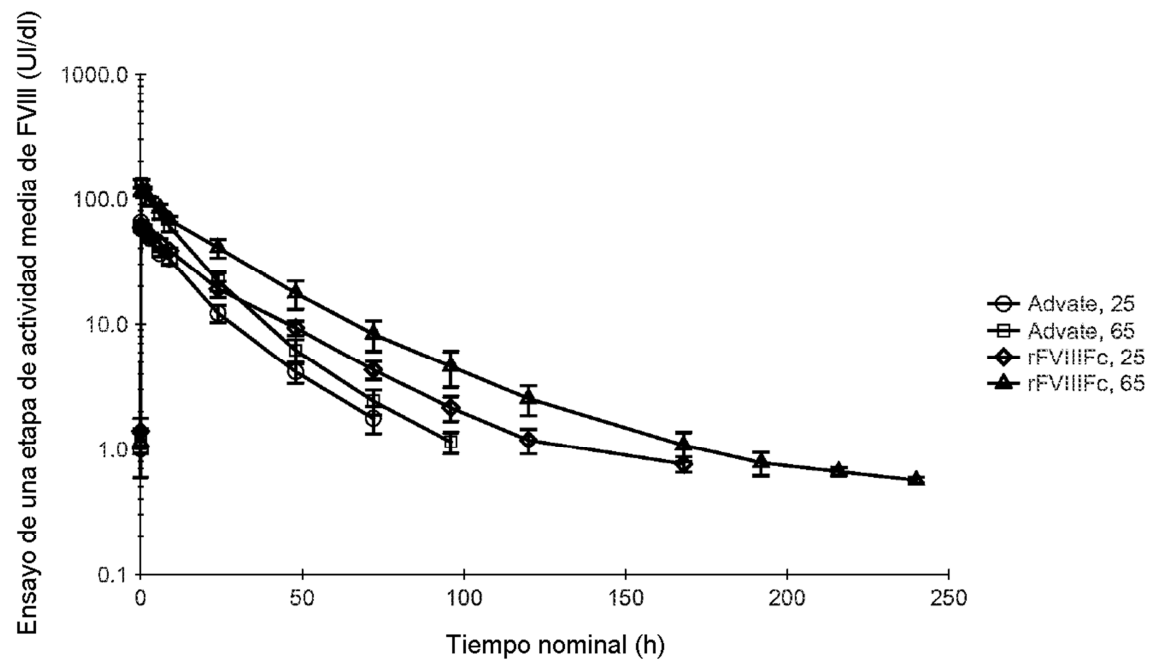


Figura 6B

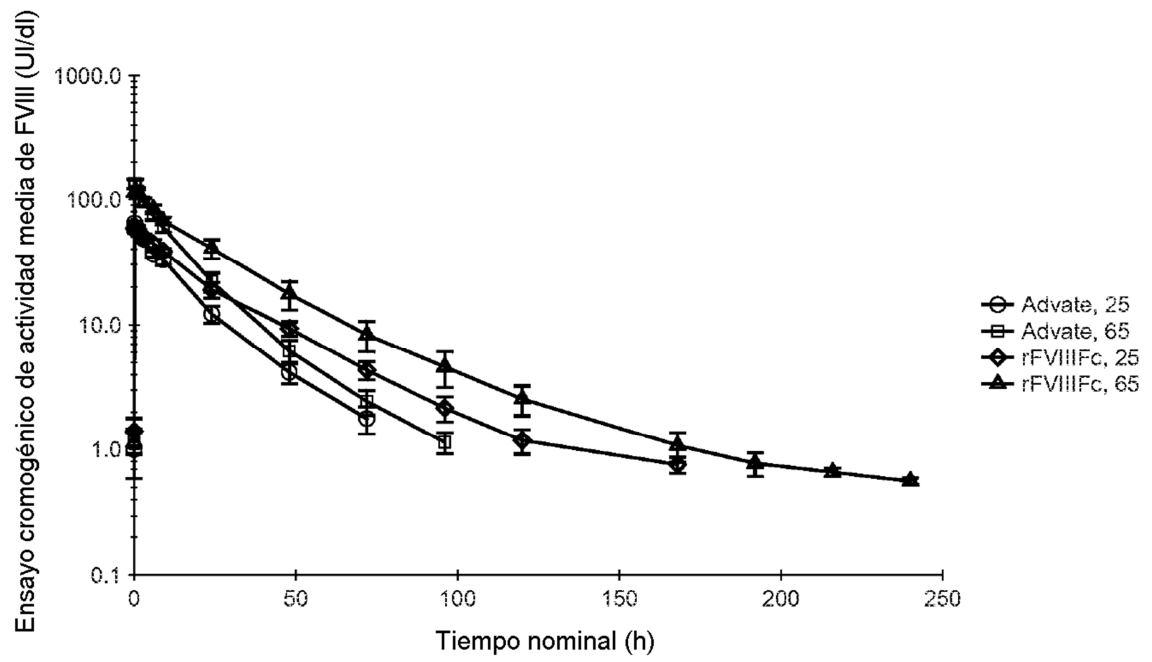


Figura 7A

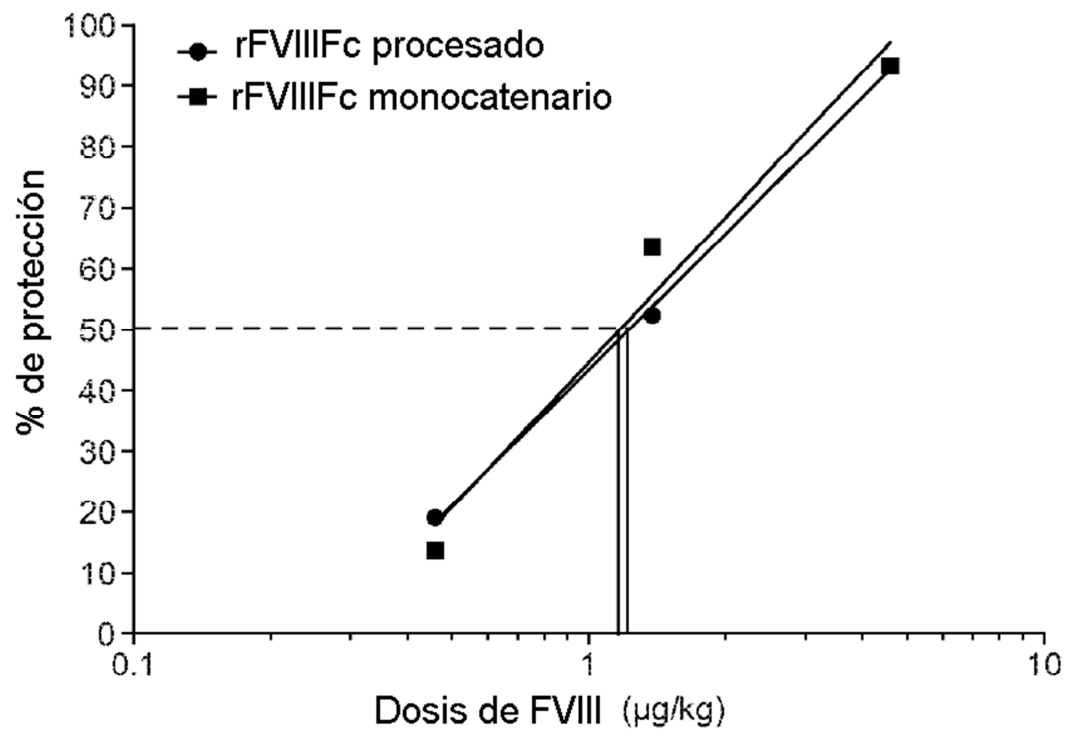


Figura 7B

Supervivencia tras la transección de la vena de la cola

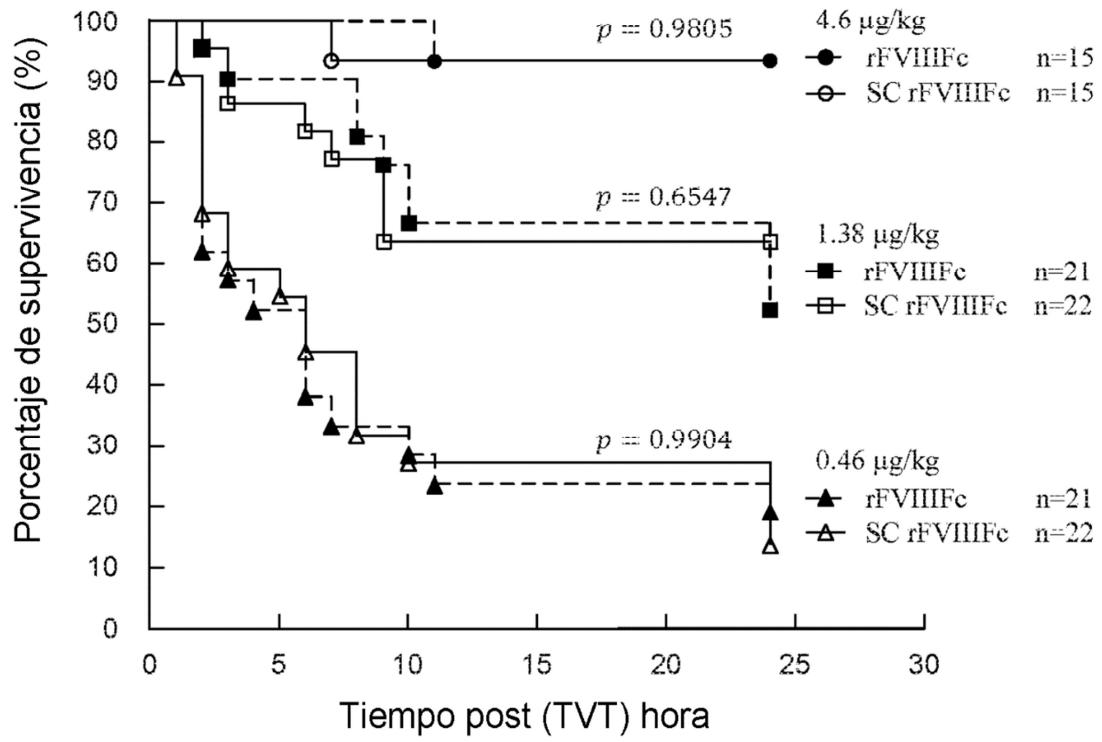


Figura 7C

Resangrados

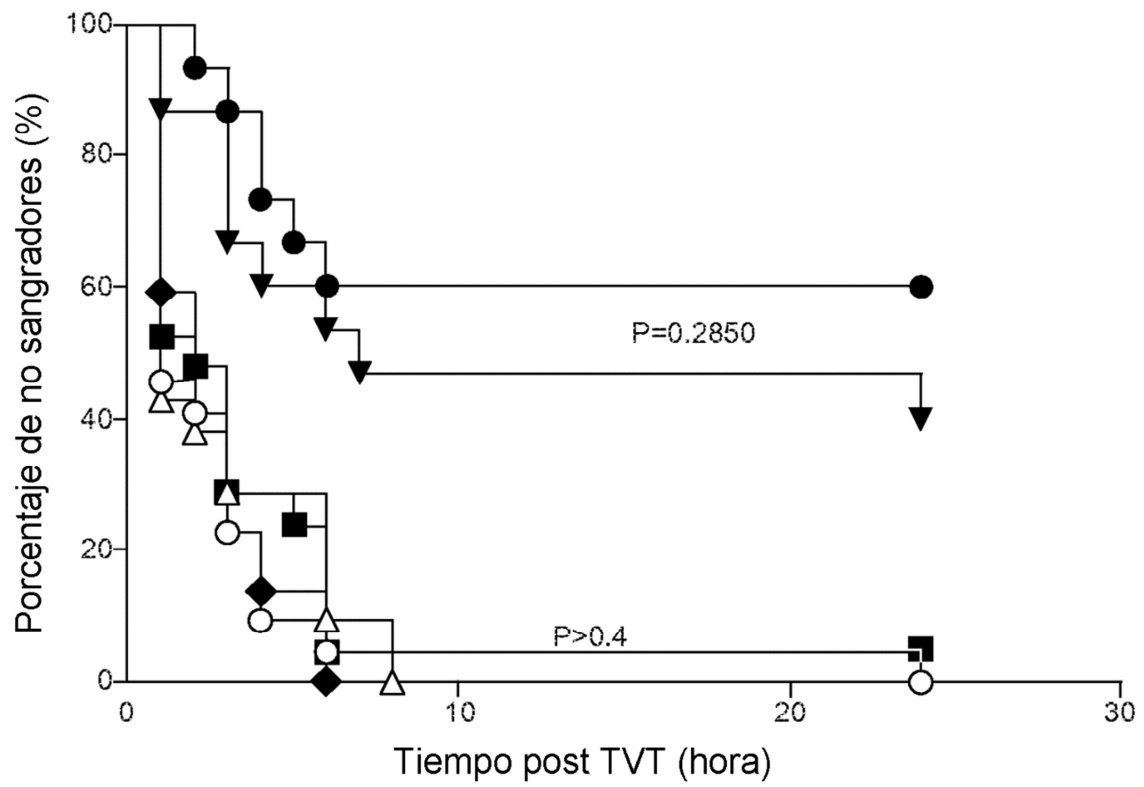


Figura 8 Diseño del estudio

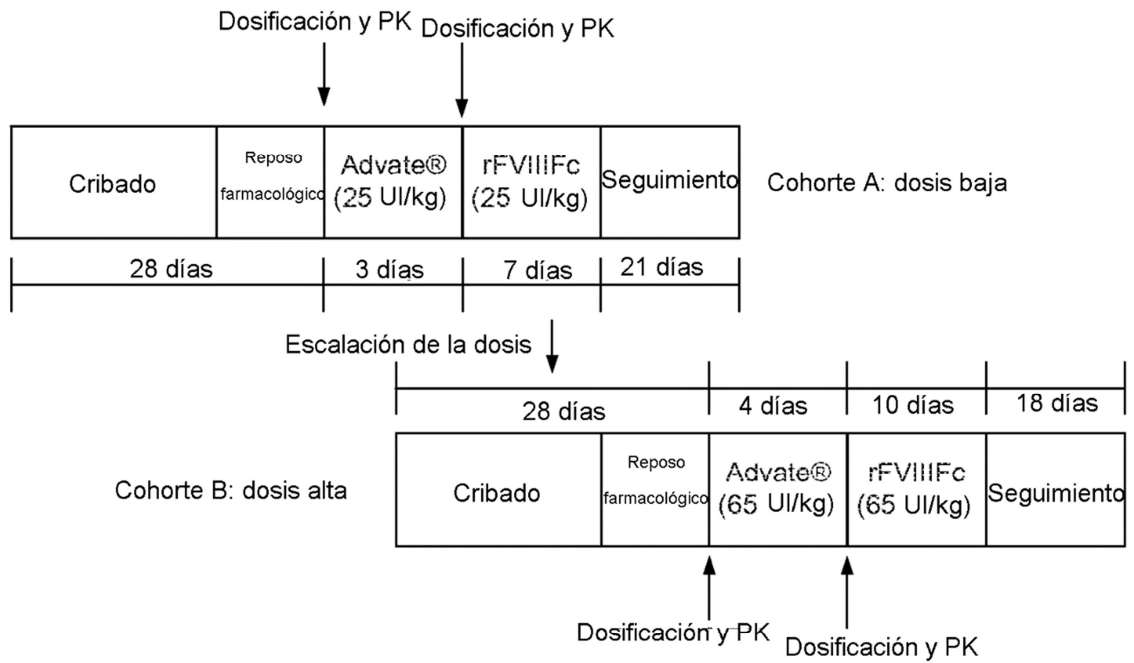


Figura 9

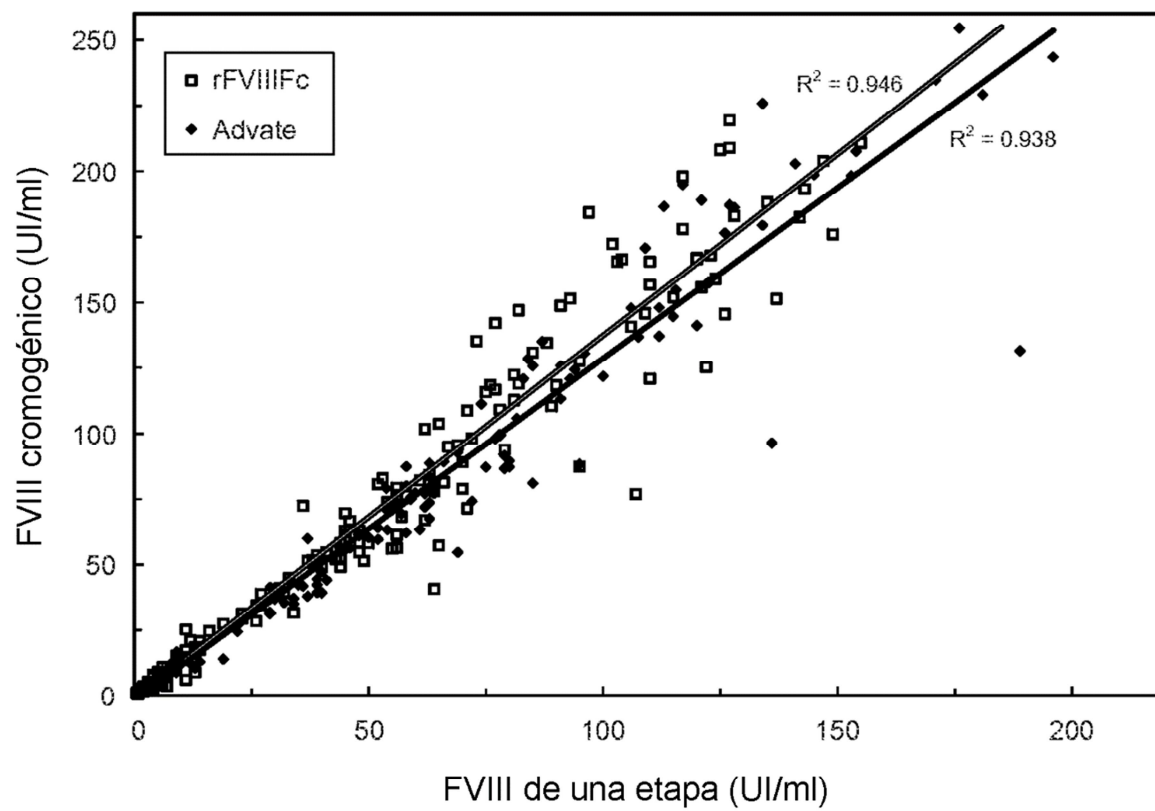


Figura 10

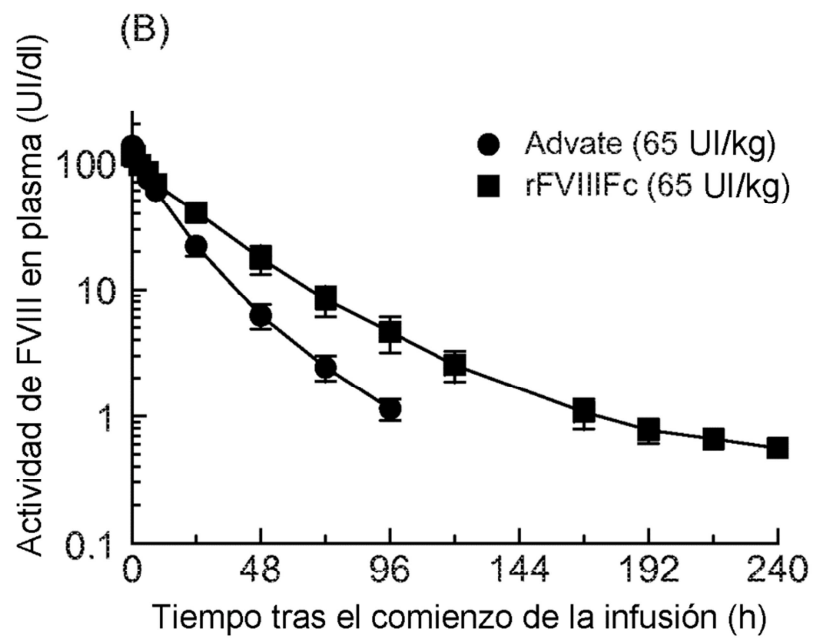
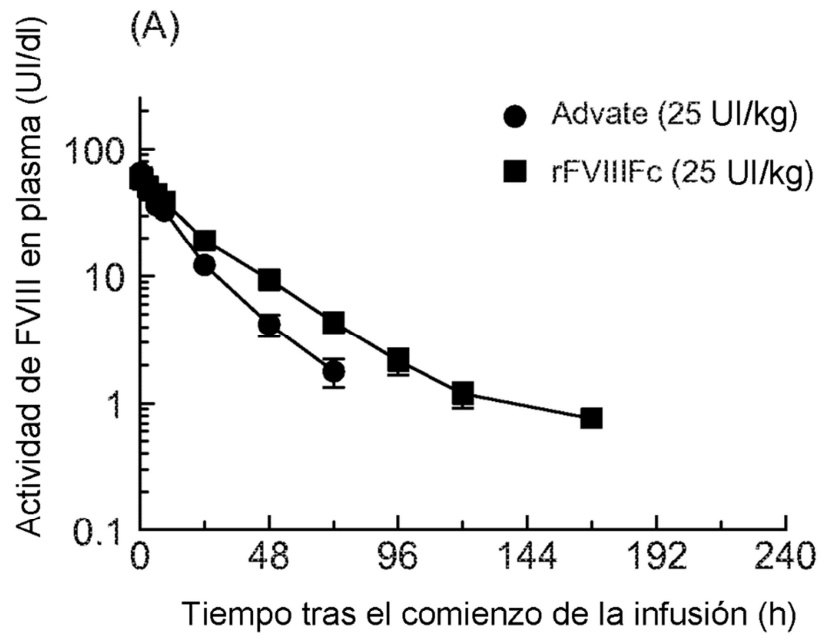


Figura 11

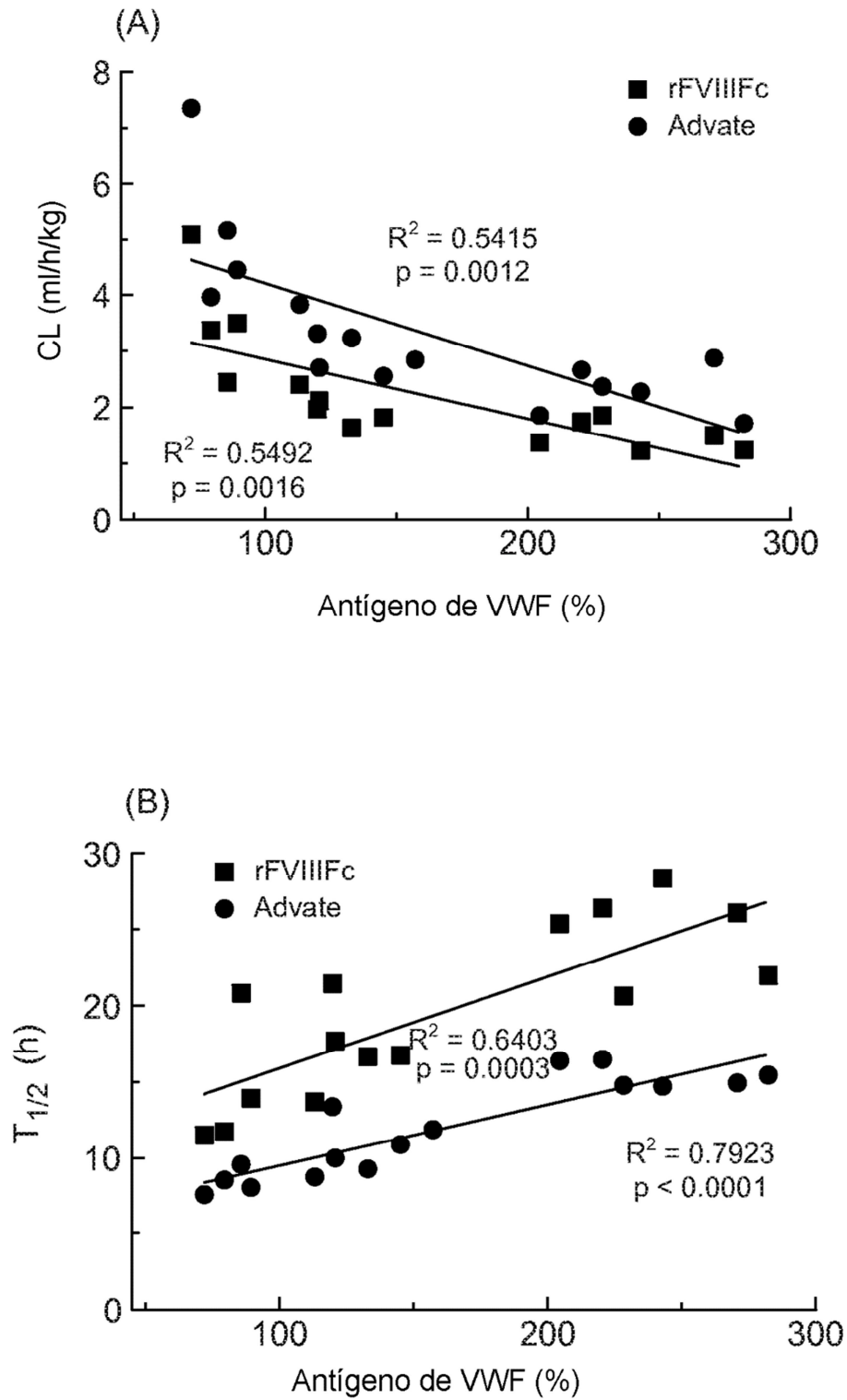


Figura 12

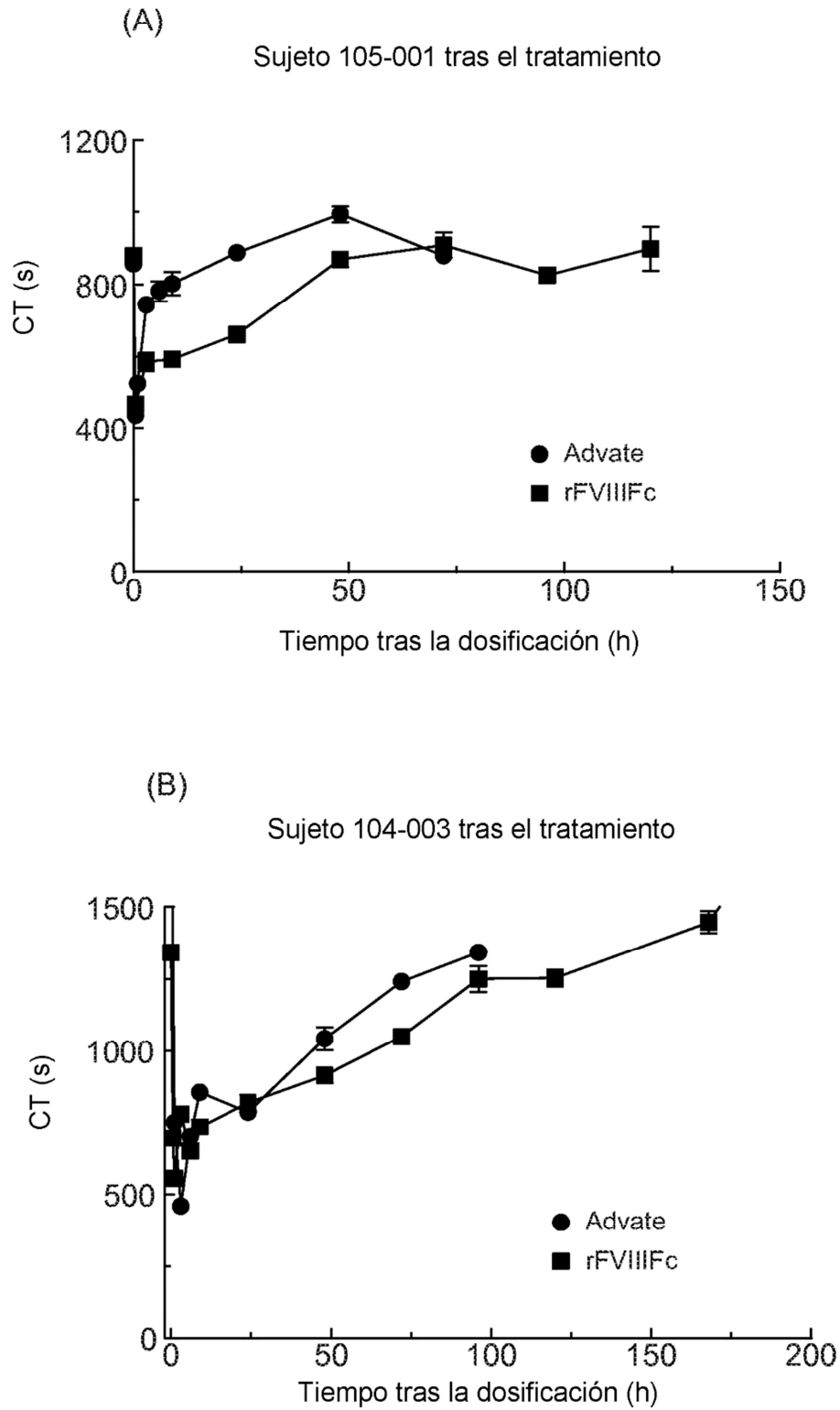


Figura 13A

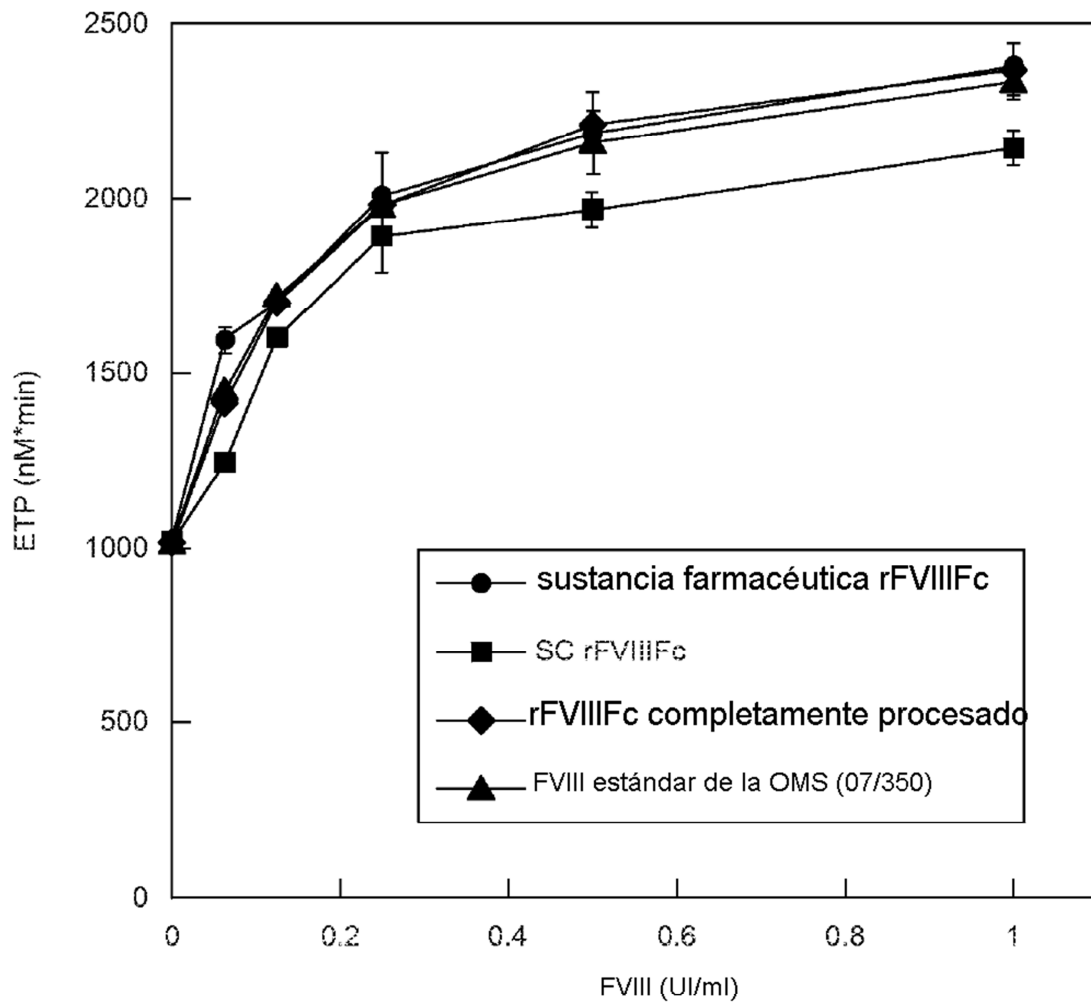


Figura 13B

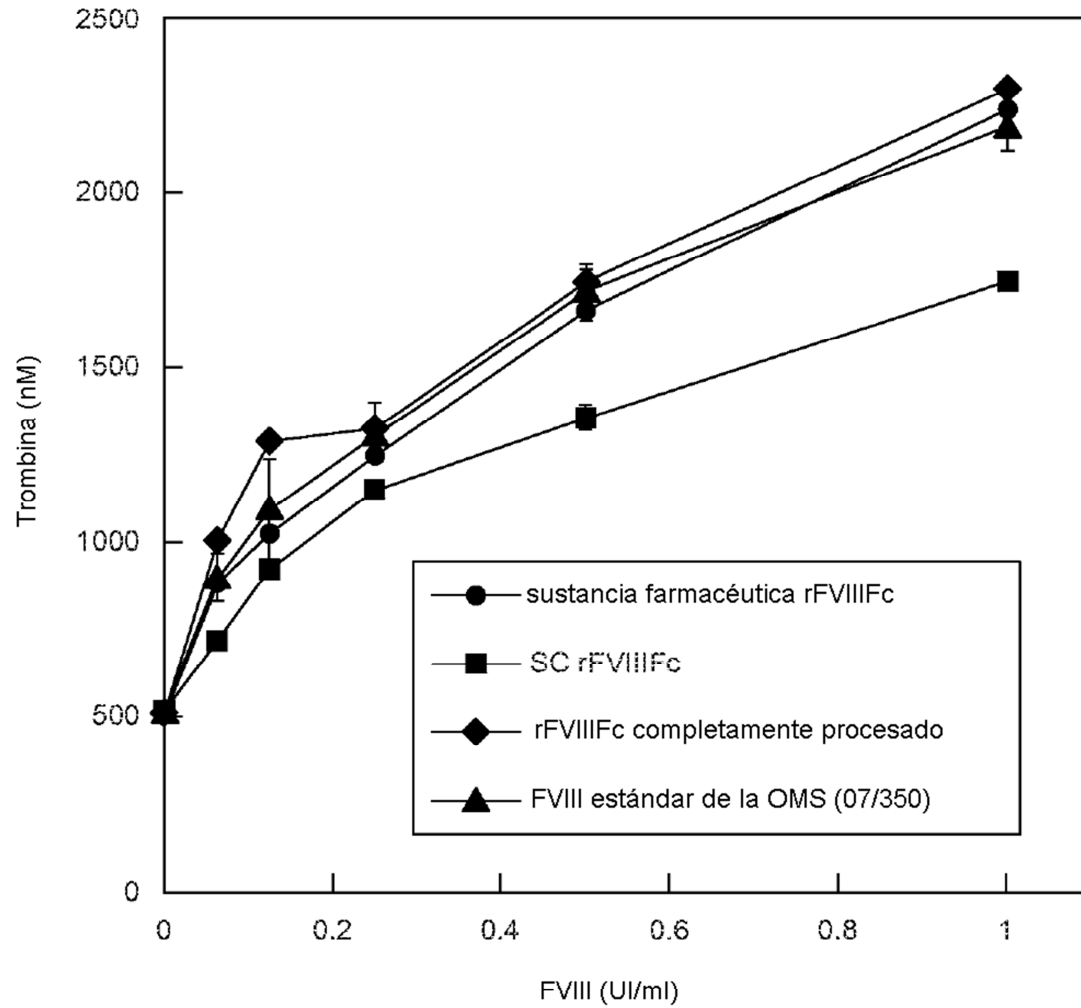


Figura 14

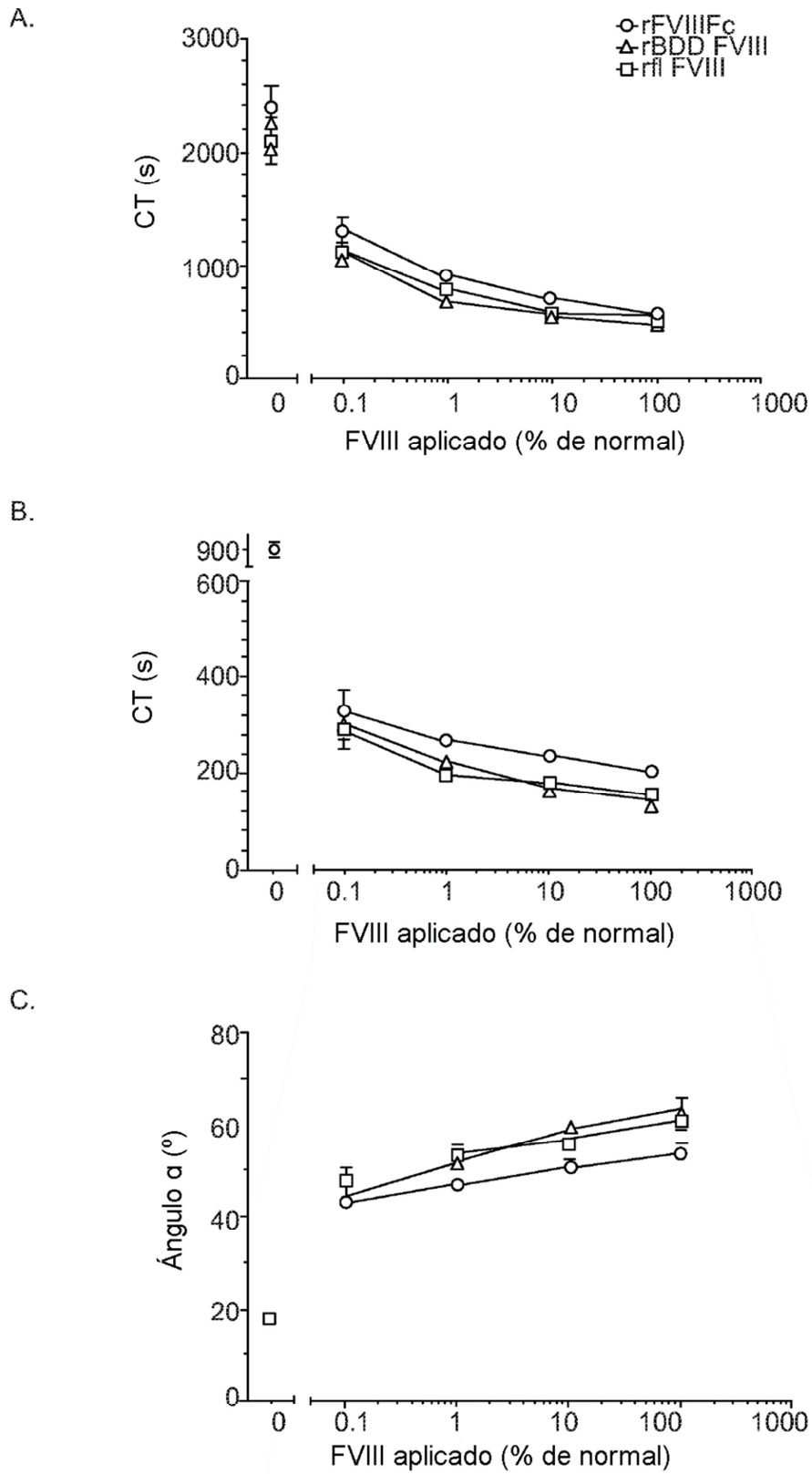


Figura 15

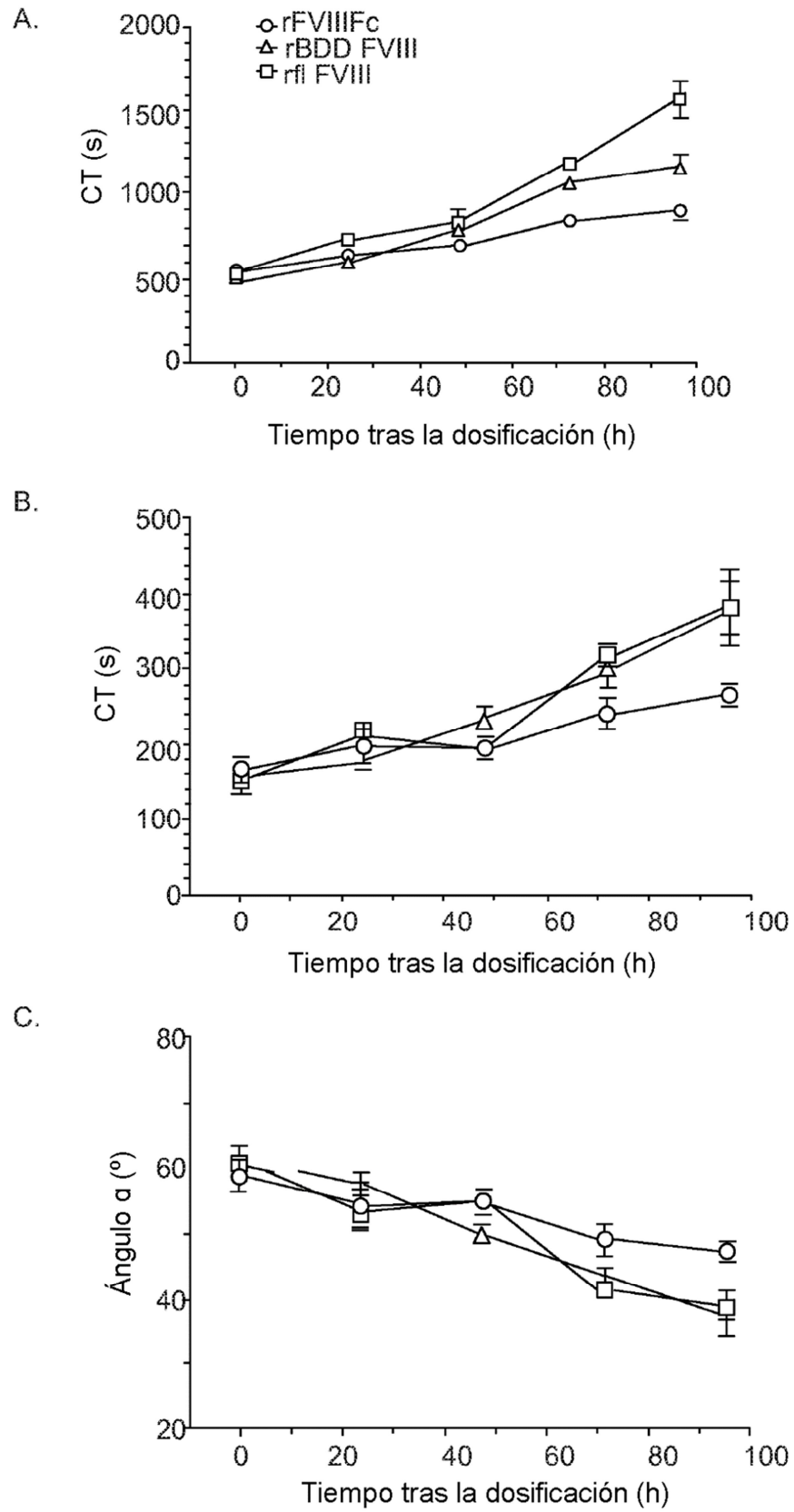
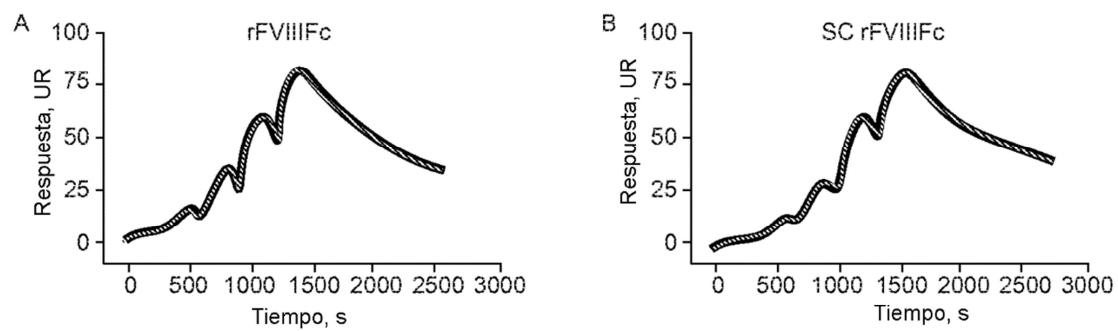


Figura 16A



Curva de unión, negra; ajuste 1:1, roja  
UR, unidades de resonancia; SC, monocatenario

Figura 16B

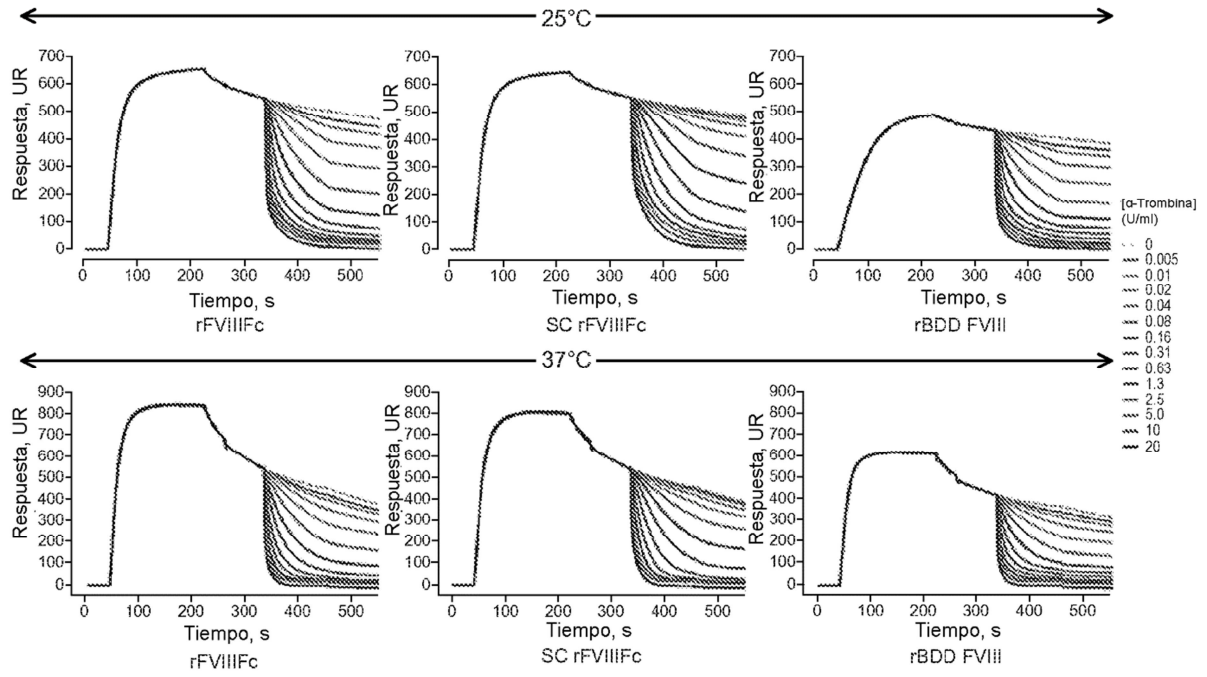


Figura 16C

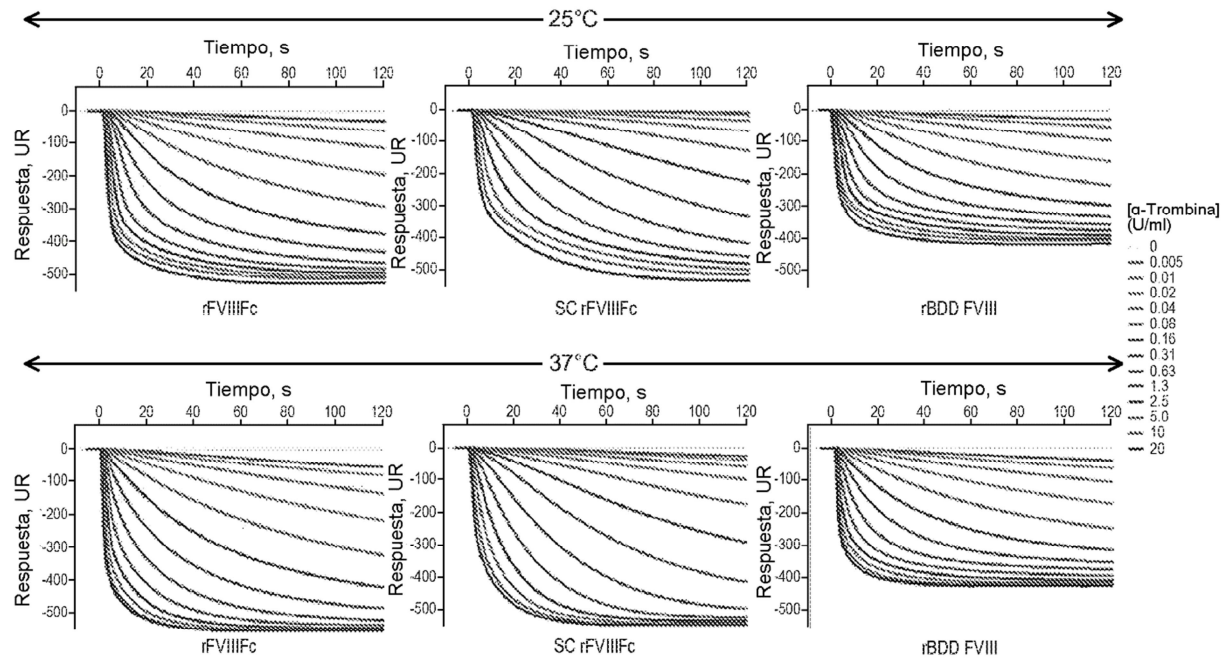


Figura 16D

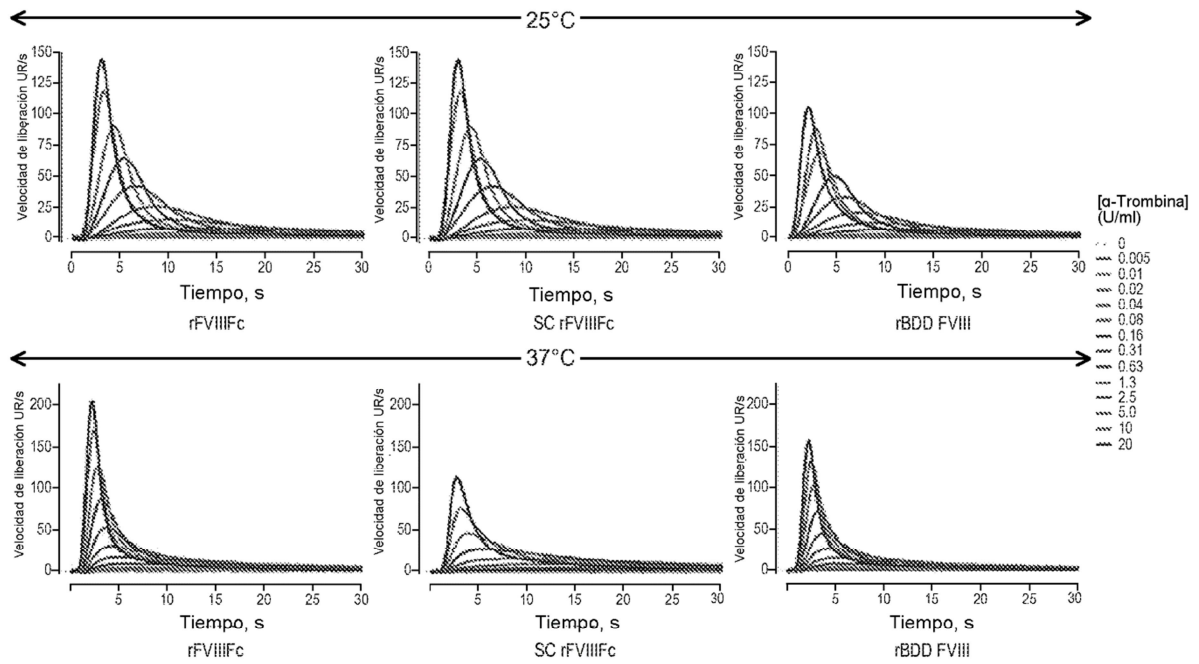


Figura 16E

