

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 659 888**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/37** (2006.01)

**C07K 14/755** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**A61P 7/04** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.12.2010 PCT/US2010/059136**

87 Fecha y número de publicación internacional: **09.06.2011 WO11069164**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.12.2010 E 10835255 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2506868**

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

30 Prioridad:

**04.02.2010 US 301592 P**

**03.12.2010 US 419676 P**

**12.08.2010 US 373113 P**

**07.11.2010 US 410929 P**

**06.12.2009 US 267070 P**

**09.12.2009 US 285054 P**

**09.07.2010 US 363065 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.03.2018**

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:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 659 888 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 de Factor VIII-Fc, y métodos de uso de los mismos

**5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN****Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de los productos terapéuticos para trastornos hemostáticos.

10

**Técnica antecedente**

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

20

El dominio A2 es necesario para la actividad procoagulante de la molécula del factor VIII. Los estudios muestran que el factor VIII porcino tiene una 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 basado en una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre uno o más residuos en los dominios A2 humano y porcino (Lollar, P., et al., J. Biol. Chem. 267:23652-23657 (1992)).

25

El tratamiento de la hemofilia A es mediante terapia de reemplazo dirigida a la restauración de la actividad de FVIII a niveles normales del 1 al 5% para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001)). Existen productos de FVIII recombinantes y derivados de plasma disponibles para tratar episodios de sangrado a demanda o para prevenir episodios de sangrado mediante tratamiento profiláctico. Basándose en vida media de estos productos, los regímenes de tratamiento requieren una administración intravenosa frecuente. Dicha administración frecuente es dolorosa e inconveniente.

30

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

35

40

**BREVE RESUMEN DE LA INVENCIÓN**

La presente descripción proporciona métodos para administrar el Factor VIII; métodos para la administración de polipéptidos quiméricos que comprenden Factor VIII e híbridos de dichos polipéptidos quiméricos; polipéptidos quiméricos que comprenden el Factor VIII e híbridos de dichos polipéptidos quiméricos; polinucleótidos que codifican dichos polipéptidos quiméricos e híbridos; células que comprenden dichos polinucleótidos; y métodos para producir dichos polipéptidos quiméricos e híbridos usando dichas células.

45

La presente descripción proporciona un método para administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de Factor VIII quimérico, por ejemplo, un polipéptido de Factor VIII-Fc quimérico, en un intervalo de dosificación al menos aproximadamente una vez y media más que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sin la porción Fc.

50

El intervalo de dosificación puede ser al menos aproximadamente de una y media a seis veces más largo, una y media a cinco veces más largo, una y media a cuatro veces más largo, una y media a tres veces más largo, o una y media a dos veces más largo, que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser de al menos aproximadamente 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

60

dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser aproximadamente cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más.

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

La presente descripción también proporciona un método de administración de Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de Factor VIII quimérico, por ejemplo,  
 10 un polipéptido del Factor VIII-Fc quimérico, para obtener un área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo (AUC) al menos aproximadamente una y un cuarto de veces mayor que el AUC obtenido por una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII) por ejemplo, sin la porción Fc.

- 15 La presente descripción también proporciona un método de administración de 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 en un intervalo de dosificación de aproximadamente cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más.

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

El tratamiento a demanda incluye tratamiento para un episodio de hemorragia, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, trauma de la cabeza (trauma  
 25 craneal), hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaríngeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal o hemorragia en la vaina del iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, craneotomía,  
 30 osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica o cirugía de reemplazo de articulaciones.

Para el tratamiento a demanda, el intervalo de dosificación de dicho polipéptido quimérico es aproximadamente una vez cada 24-36, 24-48, 24-72, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46,  
 35 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.

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

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

45 El sujeto en los métodos de la descripción puede ser un sujeto humano o puede ser un mamífero no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ratones, perros, primates, monos, gatos, caballos, vacas, cerdos y otros animales domésticos y animales pequeños. La determinación del intervalo de dosificación y el AUC se puede llevar a cabo en un solo sujeto o en una población de sujetos.

50 El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser un Factor VIII humano, o un Factor VIII no humano, tal como el factor VIII porcino, de ratón o canino. El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede tener una delección total o parcial del dominio B.

55 El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos un 90% o un 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 1 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos 1 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos 1 a 684 de SEQ ID NO:12). El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 sin  
 60 una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos

1 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos 1 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos 1 a 684 de SEQ ID NO:12).

El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos un 90% o un 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos -19 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos -19 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos -19 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos -20 a 684 de SEQ ID NO:12). El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos -19 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos -19 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos -19 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos -20 a 684 de SEQ ID NO:12).

La porción Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 741 a 967 de SEQ ID NO:8; aminoácidos 746 a 972 de SEQ ID NO:10; aminoácidos 685 a 924 de SEQ ID NO:12). La porción Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 741 a 967 de SEQ ID NO:8; aminoácidos 746 a 972 de SEQ ID NO:10; aminoácidos 685 a 924 de SEQ ID NO:12).

El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1665 de SEQ ID NO:2) o al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1665 de SEQ ID NO:2). El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1665 de SEQ ID NO:2) o idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1665 de SEQ ID NO:2).

El polipéptido quimérico puede estar en forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido en asociación con dicho polipéptido quimérico, donde dicho segundo polipéptido comprende o consiste esencialmente en un Fc.

El segundo polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 227 de SEQ ID NO:4) o al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos -20 a 227 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 1 a 227 de SEQ ID NO:4) o idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos -20 a 227 de SEQ ID NO:4).

El polipéptido o híbrido quimérico se puede administrar como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

La descripción también proporciona los propios polipéptidos quiméricos e híbridos descritos anteriormente, los polinucleótidos que los codifican, las células embrionarias humanas cultivadas que comprenden los polinucleótidos, y los métodos para producir dichos polipéptidos quiméricos e híbridos, y los polipéptidos producidos por dichos métodos.

Basándose en la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona un polipéptido quimérico que comprende una porción de Factor VIII y una porción distinta de Factor VIII, para su uso en la prevención o el tratamiento de un episodio de hemorragia en un sujeto humano, donde el polipéptido quimérico debe administrarse en una dosis de 25 UI/kg a 65 UI/kg a un intervalo de dosificación de una vez cada 3 o más días, donde la porción diferente de Factor VIII es un compañero de unión a FcRn (FcRn BP). Esta invención y las realizaciones preferidas de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

#### BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

- FIG. 1. Representación esquemática del monómero rFVIII<sub>h</sub>Fc.  
 FIG. 2. WBCT de rFVIII<sub>h</sub>Fc en comparación con ReFacto® en ratones con hemofilia A después de una dosis intravenosa de 50 UI/kg (n = 6 ratones por grupo).  
 FIG. 3. Actividad cromogénica en plasma de ratones con hemofilia A después de una única dosis IV de 50 UI/kg de rFVIII<sub>h</sub>Fc, Refracto® y Adate®.

- FIG. 4. WBCT de rFVIII Fc y Refracto® en perros con hemofilia A (A) rFVIII Fc. (B) Refracto® seguido de rFVIII Fc en un estudio cruzado.
- FIG. 5. Farmacocinética de rFVIII Fc intravenoso y Refracto® en perros con hemofilia A (medido por ELISA).
- FIG. 6. Actividad de rFVIII y Refracto® después de una sola dosis intravenosa en perros con hemofilia A (medida mediante ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII).
- 5 FIG. 7. Concentración plasmática media del grupo en el tiempo de rFVIII Fc y Xyntha después de una única dosis intravenosa (125 UI/kg) en monos cynomolgus (n = 6, media ± DE). Las concentraciones plasmáticas se midieron por ELISA.
- FIG. 8. Curvas individuales de concentración plasmática frente a tiempo de rFVIII Fc y Xyntha después de una única
- 10 dosis intravenosa (125 UI/kg) en monos cynomolgus (n = 6, media ± DE). Las concentraciones plasmáticas se midieron por ELISA. (A) rFVIII Fc por ELISA. (B) Xyntha por ELISA.
- FIG. 9. Actividad cromogénica media en plasma del grupo después de una sola dosis intravenosa (125 UI/kg) de rFVIII Fc y Xyntha en monos cynomolgus (n = 6, media ± DE). La actividad de FVIII se midió usando un ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII.
- 15 FIG. 10. Curvas individuales de actividad cromogénica plasmática frente al tiempo después de una sola dosis intravenosa (125 UI/kg) de rFVIII Fc y Xyntha en monos cynomolgus (n = 6, media ± DE). La actividad de FVIII se midió usando un ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII. (A) Actividad cromogénica de rFVIII Fc. (B) Actividad cromogénica de Xyntha.
- FIG. 11. Caracterización bioquímica de rFVIII-Fc: Activación del Factor X en función de la concentración del Factor
- 20 X.
- FIG. 12. Caracterización bioquímica de rFVIII-Fc: Activación del Factor X en función de la concentración del Factor IXa.
- FIG 13. Actividad de FVIII media del grupo observada (±DE) (ensayo de una fase, 25 UI/kg (A) o 65 UI/kg (B); y ensayo cromogénico, 25 UI/kg (C) o 65 UI/kg (D)) frente al tiempo.
- 25 FIG. 14. Actividad de FVIII media del grupo observada (±DE) (ensayo de una fase (A) o ensayo cromogénico (B)) frente al tiempo.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

- 30 La presente descripción proporciona un método para tratar la Hemofilia A con Factor VIII usando un intervalo de dosificación más largo y/o un AUC mayor de lo que es posible con productos de Factor VIII actualmente conocidos. La presente descripción también proporciona mejores polipéptidos quiméricos del Factor VIII, polinucleótidos quiméricos del Factor VIII, y métodos de producción.
- 35 El tratamiento de la hemofilia A es mediante terapia de reemplazo dirigida a la restauración de la actividad de FVIII a niveles normales del 1 al 5% para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001)). Existen productos de FVIII recombinantes y derivados de plasma disponibles para tratar episodios de sangrado a demanda o para prevenir episodios de sangrado mediante tratamiento profiláctico. Basándose en la vida media de estos productos (10-12 h) (White G.C., et al., Thromb. Haemost. 77:660-7
- 40 (1997); Morfini, M., Haemophilia 9 (suppl 1):94-99; discussion 100 (2003)), los regímenes de tratamiento requieren administración intravenosa frecuente, comúnmente de dos a tres veces a la semana para la profilaxis y de una a tres veces al día para el tratamiento a demanda (Manco-Johnson, M.J., et al., N. Engl. J. Med. 357:535-544 (2007)). Dicha administración frecuente es dolorosa e inconveniente.
- 45 La presente descripción proporciona un método para administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesite, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de Factor VIII quimérico, por ejemplo, un polipéptido de Factor VIII-Fc quimérico, o un híbrido de tal polipéptido, en un intervalo de dosificación al menos aproximadamente una vez y media más que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII),
- 50 por ejemplo, sin la porción Fc.

- El intervalo de dosificación puede ser al menos aproximadamente de una y media a seis veces más largo, una y media a cinco veces más largo, una y media a cuatro veces más largo, una y media a tres veces más largo, o una y media a dos veces más largo, que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho
- 55 Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sin la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser de al menos aproximadamente 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 cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sin la porción Fc. El intervalo de
- 60 dosificación puede ser aproximadamente cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días

o más.

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

5

La presente descripción también proporciona un método de administración de Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido de Factor VIII quimérico, por ejemplo, un polipéptido del Factor VIII-Fc quimérico, o un híbrido de tal polipéptido, para obtener un área bajo la curva de concentración en plasma frente al tiempo (AUC) al menos aproximadamente una y un cuarto de veces mayor que el AUC obtenido por una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII) por ejemplo, sin la porción Fc.

10

La presente descripción también proporciona un método de administración de 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, en un intervalo de dosificación de aproximadamente cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más.

15

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

20

"Administrar", como se usa en el presente documento, significa proporcionar un polipéptido del Factor VIII farmacéuticamente aceptable de la descripción a un sujeto a través de una ruta farmacéuticamente aceptable. Las vías de administración preferidas son intravenosa, por ejemplo, inyección intravenosa e infusión intravenosa. Las vías de administración adicionales incluyen, por ejemplo, administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal y pulmonar. Los polipéptidos quiméricos y las proteínas híbridas se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

25

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

30

El "dominio B" del Factor VIII, como se usa en el presente documento, es el mismo que el dominio B conocido en la técnica que se define por la identidad de secuencia de aminoácidos interna y los sitios de escisión proteolítica por trombina, por ejemplo, los residuos Ser741-Arg1648 del factor VIII humano de longitud completa. Los otros dominios del factor VIII humano se definen por los siguientes residuos de aminoácidos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; A3, residuos Ser1690-Ile2032; C1, residuos Arg2033-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, residuos Glu1649-Arg1689, se denomina usualmente péptido de activación de cadena ligera del factor VIII. Las ubicaciones de los límites para todos los dominios, incluidos los dominios B, para el factor VIII porcino, de ratón y canino también se conocen en la técnica. Preferiblemente, el dominio B del Factor VIII se elimina ("factor VIII con dominio B eliminado" o "BDD FVIII"). Un ejemplo de BDD FVIII es REFACTO (BDD FVIII recombinante), que tiene la misma secuencia que la porción del Factor VIII de la secuencia en la Tabla 2A(i) (aminoácidos -19 a 1438 o 1 a 1438 de SEQ ID NO:2).

35

40

45

Un "factor VIII con dominio B eliminado" puede tener las deleciones completas o parciales descritas en las Patentes de Estados Unidos N.º 6.316.226, 6.346.513, 7.041.635, 5.789.203, 6.060.447, 5.595.886, 6.228.620, 5.972.885, 6.048.720, 5.543.502, 5.610.278, 5.171.844, 5.112.950, 4.868.112 y 6.458.563. En algunas realizaciones, una secuencia del factor VIII con dominio B eliminado de la presente invención comprende una cualquiera de las eliminaciones descritas en la col. 4, línea 4 a la col. 5, línea 28 y los ejemplos 1-5 de la Patente de Estados Unidos N.º 6.316.226 (también en el documento US 6.346.513). En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B eliminado de la presente invención tiene una eliminación descrita en la col. 2, líneas 26-51 y los ejemplos 5-8 de la Patente de Estados Unidos N.º 5.789.203 (también los documentos US 6.060.447, US 5.595.886, y US 6.228.620). En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B eliminado tiene la eliminación descrita en la col. 1, líneas 25 a la col. 2, línea 40 de la Patente de Estados Unidos N.º 5.972.885; col. 6, líneas 1-22 y ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos n.º 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la Patente de Estados Unidos N.º 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la Patente de Estados Unidos n.º 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2, y ejemplo 1 de la Patente de Estados Unidos N.º 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la Patente de Estados

55

60

Unidos N.º 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26, y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la Patente de Estados Unidos n.º 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la Patente de Estados Unidos N.º 6.458.563. En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B eliminado tiene una eliminación de la mayor parte del dominio B, pero aún contiene secuencias amino-terminal del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* el producto de traducción primario en dos cadenas polipeptídicas, como se describe en el documento WO 91/09122. En algunas realizaciones, un factor VIII con dominio B eliminado se construye con una delección de los aminoácidos 747-1638, es decir, prácticamente una delección completa del dominio B. Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un factor VIII con el dominio B eliminado también puede contener una delección de los aminoácidos 771-1666 o los aminoácidos 868-1562 del factor VIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988). Las delecciones del dominio B adicionales que son parte de la invención incluyen, por ejemplo, delección de los aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1986) 83, 5939-5942), 797 a 1562 (Eaton, et al. Biochemistry (1986) 25:8343-8347), 741 a 1646 (Kaufman (Solicitud PCT publicada N.º WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver, et al., DNA (1987) 6:553-564), 741 a 1648 (Pasek (Solicitud PCT N.º 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 delecciones anteriores puede realizarse en cualquier secuencia del Factor VIII.

"Polipéptido quimérico", como se usa en el presente documento, significa un polipéptido que incluye dentro de él al menos dos polipéptidos (o subsecuencias o péptidos) de diferentes fuentes. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete o más polipéptidos de diferentes fuentes, tales como diferentes genes, diferentes ADNc, o diferentes animales u otras especies. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, uno o más enlazadores que unen las diferentes subsecuencias. Por lo tanto, las subsecuencias se pueden unir directamente o se pueden unir indirectamente, a través de enlazadores, o ambas, 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 proteínas. Además, los polipéptidos quiméricos pueden tener adiciones de aminoácidos o péptidos en los extremos N y/o C.

En algunas realizaciones, el polipéptido quimérico comprende una porción de Factor VIII y una porción que no es de Factor VIII. Las porciones ejemplares que no son del Factor VIII incluyen, por ejemplo, Fc, XTEN y albúmina. Los polipéptidos quiméricos ilustrativos de la invención incluyen, por ejemplo, polipéptidos del Factor VIII-Fc quiméricos, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-XTEN, y polipéptidos quiméricos de Factor VIII-albúmina.

Los polipéptidos quiméricos del Factor VIII-Fc ejemplares incluyen, por ejemplo, las SEQ ID NOs:2, 6, 8, 10, y 12 (Tabla 2), con o sin sus secuencias señal y el polipéptido Fc quimérico de SEQ ID NO:4 (Tabla 2).

El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1665 de SEQ ID NO:2) o al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1665 de SEQ ID NO:2). El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1665 de SEQ ID NO:2) o idéntica a la secuencia de aminoácidos de Factor VIII y Fc mostrada en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1665 de SEQ ID NO:2).

Como se ha analizado anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares incluyen el Factor VIII fusionado con uno o más polipéptidos XTEN. Schellenburger et al., Nat. Biotech. 27:1186-90 (2009). El Factor VIII puede fusionarse con extremo N-terminal del polipéptido XTEN o con el extremo C-terminal del polipéptido XTEN, siempre que el componente del factor VIII de la proteína de fusión del Factor VIII-XTEN pueda procesarse por una proteasa para producir un polipéptido que contiene el Factor VIII procesado. Se puede incluir un sitio de proteasa entre la porción XTEN y la porción del Factor VIII para permitir tal procesamiento. Los polipéptidos 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 ha analizado anteriormente, los polipéptidos quiméricos ejemplares también incluyen el Factor VIII fusionado con uno o más polipéptidos de albúmina. Preferiblemente, la albúmina es albúmina humana. El factor VIII puede fusionarse al extremo N-terminal de la albúmina o al extremo C-terminal de la albúmina, siempre que el componente del Factor VIII de la proteína de fusión Factor VIII-albúmina pueda procesarse por una propeptidasa convertasa enzimáticamente activa para producir un polipéptido procesado que contiene Factor VIII. Se conocen ejemplos de albúmina, por ejemplo, fragmentos de la misma, que pueden usarse en la presente invención. Por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 7.592.010; Patente de Estados Unidos N.º 6.686.179; y Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009).

En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico que comprende una porción de Factor VIII tiene una semivida aumentada (t1/2) con respecto a un polipéptido que consiste en la misma porción de Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII. Un polipéptido de Factor VIII quimérico con un t1/2 aumentado puede denominarse en el presente documento Factor VIII de acción prolongada. Los polipéptidos de Factor VIII quiméricos de acción prolongada incluyen, por ejemplo, Factor VIII fusionado a Fc (que incluye, 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 Tabla 2A y las Patentes de Estados Unidos N.º 7.404.956 y 7.348.004), Factor VIII fusionado a XTEN, y Factor VIII fusionado a albúmina.

10 "Cultivo", "para cultivar" y "que cultiva", como se usa en el presente documento, significa incubar células en condiciones in vitro que permitan el crecimiento o división celular o el mantenimiento de células en un estado vivo. "Células cultivadas", como se usa en el presente documento, significa células que se propagan in vitro.

15 "Factor VIII", como se usa en el presente documento, significa polipéptido de factor VIII funcional en su papel normal en la coagulación, a menos que se especifique otra cosa. Por lo tanto, el término Factor VIII incluye polipéptidos variantes que son funcionales. Las proteínas del factor VIII preferidas son las proteínas del factor VIII humano, porcino, canino y murino. Como se describe en la sección Técnica antecedente, 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, 6, 8, 10 y 12 (Tabla 2). Los polipéptidos del factor VIII incluyen, por ejemplo, factor VIII de longitud completa, factor VIII de longitud completa menos Met en el extremo N, factor VIII maduro (menos la secuencia señal), factor VIII maduro con un Met adicional en el extremo N, y/o factor VIII con una eliminación total o parcial del dominio B. Las variantes preferidas del Factor VIII incluyen delecciones del dominio B, ya sean delecciones parciales o  
25 completas.

Se conocen muchas variantes funcionales del factor VIII, como se analiza anteriormente y a continuación. Además, se han identificado cientos de mutaciones no funcionales en el factor VIII en pacientes con hemofilia, y se ha determinado que el efecto de estas mutaciones en la función del factor VIII se debe más a que se encuentran dentro de la estructura tridimensional del factor VIII que a la naturaleza de la sustitución (Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002)). Además, las comparaciones entre el factor VIII de seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente sean necesarios para la función (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); documento US 6.251.632).

35 El gen del factor VIII humano se aisló y se 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); Vehir, G. A., et al., Nature 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; U.S. Pat. N.º 4.757.006), y la secuencia de aminoácidos se dedujo a partir de ADN<sub>c</sub>. Capon et al., Patente de Estados Unidos N.º 4.965.199 describen un método de ADN recombinante para producir factor VIII en células huésped de mamífero y la purificación del factor  
40 VIII humano. Se ha informado sobre la expresión del factor VIII humano en células CHO (ovario de hámster chino) y BHKC (células de riñón de hámster recién nacido). El factor VIII humano ha sido modificado para eliminar parte o todo el dominio B (Patentes de Estados Unidos N.º 4.994.371 y 4.868.112), y se ha realizado la sustitución del dominio B humano del factor VIII con el dominio B del factor V humano (Patente de Estados Unidos N.º 5.004.803). La secuencia de ADN<sub>c</sub> que codifica el factor VIII humano y la secuencia de aminoácidos predicha se muestran en  
45 las SEQ ID NOs:1 y 2, respectivamente, de la Pub. de solicitud de Estados Unidos N.º 2005/0100990.

La Patente de Estados Unidos N.º 5.859.204, Lollar, J. S. informa sobre mutantes funcionales de factor VIII que tienen antigenicidad reducida y inmunorreactividad reducida. Patente de Estados Unidos N.º 6.376.463, Lollar, J. S. también informa sobre mutantes del factor VIII que tienen inmunorreactividad reducida. La Pub. de solicitud de  
50 Estados Unidos N.º 2005/0100990, Saenko et al. informa sobre mutaciones funcionales en el dominio A2 del factor VIII

Se describen varias moléculas del factor VIII funcional, que incluyen delecciones del dominio B, en las siguientes patentes US 6.316.226 y US 6.346.513, ambas asignadas a Baxter; US 7.041.635 asignada a In2Gen; US 5.789.203, US 6.060.447, US 5.595.886, y US 6.228.620 asignada a Chiron; US 5.972.885 y US 6.048.720 asignada a Biovitrum; US 5.543.502 y US 5.610.278 asignada a Novo Nordisk; US 5.171.844 asignada a Immuno Ag; US 5.112.950 asignada a Transgene S.A.; US 4.868.112 asignada a Genetics Institute.

La secuencia del factor VIII porcino se publica, (Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986)),  
60 y se ha informado de la secuencia de ADN<sub>c</sub> porcino completa obtenida de la amplificación por PCR de secuencias

- de factor VIII de una biblioteca de ADNc de bazo de cerdo (Healey, J. F., et al., Blood 88:4209-4214 (1996). Las sustituciones que tenían el factor VIII híbrido humano/porcino de todos los dominios, todas las subunidades y aminoácidos específicos las secuencias se describieron en la Patente de Estados Unidos N.º 5.364.771 de Lollar y Runge, y en el documento WO 93/20093. Más recientemente, el nucleótido y las correspondientes secuencias de aminoácidos de los dominios A1 y A2 del factor VIII porcino y un factor VIII quimérico con dominios porcinos A1 y/o A2 sustituidos por los dominios humanos correspondientes se informaron en el documento WO 94/11503. La Patente de Estados Unidos N.º 5.859.204, Lollar, J. S., también describe el ADNc porcino y secuencias de aminoácidos de ADNc deducidas .6.458.563, asignado a Emory describe un Factor VIII porcino con dominio B eliminado.
- 10 El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos un 90% o un 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 1 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos 1 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos 1 a 684 de SEQ ID NO:12). El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 1 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 1 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos 1 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos 1 a 684 de SEQ ID NO:12).

- El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos un 90% o un 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos -19 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos -19 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos -19 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos -20 a 684 de SEQ ID NO:12). El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos de Factor VIII mostrada en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos -19 a 1438 de SEQ ID NO:2; aminoácidos -19 a 2332 de SEQ ID NO:6; aminoácidos -19 a 740 de SEQ ID NO:8; aminoácidos -19 a 745 de SEQ ID NO:10; o aminoácidos -20 a 684 de SEQ ID NO:12).

- "Cantidad equivalente", como se usa en el presente documento, significa la misma cantidad de actividad de Factor VIII que 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. Están disponibles varios ensayos para medir la actividad del Factor VIII, incluido el ensayo de sustrato cromogénico de la Farmacopea Europea y un ensayo de coagulación de una etapa.

- "Fc", como se usa en el presente documento, se refiere a compañeros de unión a receptor Fc neonatal funcional (FcRn), a menos que se especifique lo contrario. Un compañero de unión a FcRn es cualquier molécula que pueda unirse específicamente por el receptor FcRn con el consiguiente transporte activo por el receptor FcRn del compañero de unión a FcRn. Por lo tanto, el término Fc incluye cualquier variante de Fc de IgG que sea funcional. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister et al. 1994, Nature 372:379). El área de contacto principal del Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los compañeros de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, IgG completa, el fragmento Fc de Igk, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, están todas basadas 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, incluidos los seres humanos. Se conocen las secuencias del FcRn humano, el FcRn de rata y el FcRn de ratón (Story et al. 1994, J. Exp. Med. 180: 2377). Un Fc puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina con o sin la región bisagra de la inmunoglobulina. Se proporcionan variantes de Fc ejemplares en los documentos WO 2004/101740 y WO 2006/074199.

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

- 55 El Fc (o porción de Fc de un polipéptido quimérico) puede contener mutaciones que confieren una semivida aumentada tales como M252Y, S254T, T256E, y combinaciones de las mismas, como se describe en Oganeyan et al., Mol. Immunol. 46:1750 (2009), H433K, N434F, y combinaciones de las mismas, como se describe en Vaccaro et al., Nat. Biotechnol. 23:1283 (2005); los mutantes descritos en las páginas 1-2, párrafo [0012], y los 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 2009/0163699 A1.

- El Fc (o porción de Fc de un polipéptido quimérico) también puede incluir, por ejemplo, las siguientes mutaciones: La región Fc de IgG puede modificarse de acuerdo con procedimientos bien reconocidos tales como mutagénesis de sitio dirigido, y similares, para producir fragmentos modificados de IgG o Fc o porciones de los mismos, que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones alejadas de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que preservan o incluso mejoran la unión al FcRn. Por ejemplo, los siguientes residuos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humano (Fcy1) pueden sustituirse sin pérdida significativa de afinidad de unión a 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, donde, por ejemplo, P238A representa la 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 pueden introducirse individualmente en Fc dando lugar a más de cien compañeros de unión a FcRn distintos del Fc nativo. Además, las combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales se pueden introducir juntas, dando lugar a cientos de compañeros de unión a FcRn adicionales. Algunas de estas mutaciones pueden conferir nuevas funcionalidades al compañero de unión a FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, mejorando así la semivida circulante del compañero de unión a FcRn, y hacer que el compañero de unión a FcRn sea incapaz de unirse a FcyRI, FcyRIIA, FcyRIIB, y FcyRIIIA, 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, al menos tres receptores de Fc gamma humanos parecen reconocer un sitio de unión en IgG dentro de la región bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. Por lo tanto, puede surgir otro ejemplo de nueva funcionalidad y una potencial inmunogenicidad disminuida a partir de mutaciones de esta región, como por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de IgG1 humana "ELLG" por la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con una delección de aminoácido). Se ha demostrado que FcyRI, FcyRII y FcyRIII, que median diversas funciones efectoras, no se unirán a IgG1 cuando se hayan introducido dichas mutaciones (Ward y Ghetie 1995, Therapeutic Immunology 2:77, y Armour et al. 1999, Eur. J. Immunol. 29:2613). Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad que surge a partir de las mutaciones descritas anteriormente, la afinidad por FcRn puede aumentar en algunos casos más allá de la de tipo salvaje. Esta afinidad aumentada puede reflejar un aumento de la frecuencia "activada", una disminución de la frecuencia "inactiva" o tanto un aumento de la frecuencia "activada" como una disminución de la frecuencia "inactiva". Las mutaciones que se cree que imparten una mayor afinidad por FcRn incluyen, por ejemplo, T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).
- El Fc (o la porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser al menos un 90% o un 95% idéntico a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 741 a 967 de SEQ ID aminoácidos 746 a 972 de SEQ ID NO:10; aminoácidos 685 a 924 de SEQ ID NO:12). El Fc (o la porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 2 (aminoácidos 1439 a 1665 de SEQ ID NO:2; aminoácidos 2333 a 2559 de SEQ ID NO:6; aminoácidos 741 a 967 de SEQ ID aminoácidos 746 a 972 de SEQ ID NO:10; aminoácidos 685 a 924 de SEQ ID NO:12).

- Los polipéptidos y proteínas "híbridos", como se usan en el presente documento, significan una combinación de un polipéptido quimérico con un segundo polipéptido. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido en un híbrido pueden estar asociados entre sí a través de interacciones proteína-proteína, tales como carga-carga o interacciones hidrófobas. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido en un híbrido pueden estar asociados entre sí a través de disulfuro u otro u otros enlaces covalentes. Los híbridos se describen en los documentos WO 2004/101740yWO 2006/074199. Véase también, las Patentes de Estados Unidos N.º 7,404,956y7,348,004. 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 realizaciones preferidas, el segundo polipéptido es un polipéptido que comprende un Fc. En realizaciones preferidas, el polipéptido quimérico es un polipéptido del factor VIII-Fc quimérico 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 sola molécula de FVIII humano recombinante con el dominio B eliminado (BDD-rFVIII) fusionado al dominio Fc dimerico de la IgG1 humana, sin una secuencia de enlazador intermedia. Este polipéptido híbrido se denomina en el presente documento proteína de

fusión Fc monomérica de FVIII<sub>h</sub>, híbrido monomérico de FVIII<sub>h</sub>, híbrido monomérico de FVIII<sub>h</sub> y monómero-dímero de FVIII<sub>h</sub>. Véanse el Ejemplo 1, Fig. 1, y la Tabla 2A. Los Ejemplos proporcionan datos preclínicos y clínicos para este polipéptido híbrido.

- 5 El segundo polipéptido en un híbrido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 1 a 227 de SEQ ID NO:4) o al menos un 90% o un 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos -20 a 227 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 1 a 227 de SEQ ID NO:4) o idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos -20 a 227 de SEQ ID NO:4).

La Figura 1 es un esquema que muestra la estructura de un polipéptido quimérico del factor VIII-Fc con el dominio B eliminado, y su asociación con un segundo polipéptido que es un polipéptido Fc. Para obtener este híbrido, se obtuvo la secuencia codificante de FVIII con el dominio B humano recombinante eliminado por reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) a partir de ARN poli A de hígado humano (Clontech) usando cebadores específicos de FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia de señal nativa para FVIII. La delección del dominio B fue de serina 743 (S743; 2287 pb) a glutamina 1638 (Q1638; 4969 pb) para una delección total de 2682 pb. A continuación, la secuencia de codificación para Fc recombinante humano se obtuvo por RT-PCR a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos humanos (Clontech) usando cebadores específicos de Fc. Los cebadores se diseñaron de manera que la secuencia de FVIII con dominio B eliminado se fusionó directamente al extremo N de la secuencia de Fc sin un enlazador intermedio. La secuencia de ADN de FVIII<sub>h</sub>Fc se clonó en el vector de expresión doble de mamífero pBUDCE4.1 (Invitrogen) bajo el control del promotor de CMV. Se obtuvo una segunda secuencia de Fc idéntica que incluía la secuencia señal de Igk de ratón por RT-PCR y se clonó aguas abajo del segundo promotor, EF1 $\alpha$ , en el vector de expresión pBUDCE4.1.

El vector de expresión de rFVIII<sub>h</sub>Fc se transfectó en células 293 de riñón embrionario humano (HEK293H; Invitrogen) usando reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se generaron líneas celulares clonales estables mediante selección con Zeocin (Invitrogen). Se usó una línea celular clonal, 3C4-22, para generar FVIII<sub>h</sub>Fc para la caracterización in vivo. El FVIII<sub>h</sub>Fc recombinante se produjo y purificó (McCue et al. 2009) at Biogen Idec (Cambridge, MA). Se esperaba que la estrategia de transfección descrita anteriormente produjera tres productos, es decir, híbridos monoméricos de rFVIII<sub>h</sub>Fc, híbridos de rFVIII<sub>h</sub>Fc diméricos y Fc dimérico. Sin embargo, esencialmente no se detectó rFVIII<sub>h</sub>Fc dimérico en el medio acondicionado de estas células. Más bien, el medio acondicionado contenía Fc y rFVIII<sub>h</sub>Fc monomérico. Es posible que el tamaño de rFVIII<sub>h</sub>Fc dimérico fuera demasiado grande e impidiera la secreción eficiente de la célula. Este resultado fue beneficioso ya que hizo que la purificación del monómero fuera menos complicada que si las tres proteínas hubieran estado presentes. El material utilizado en estos estudios tenía una actividad específica de aproximadamente 9000 UI/mg.

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

El intervalo de dosificación cuando se administra un polipéptido de Factor VIII quimérico, por ejemplo, un polipéptido de Factor VIII-Fc quimérico (un polipéptido que comprende un Factor VIII o un híbrido) de la invención puede ser al menos aproximadamente una vez y media mayor que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII, por ejemplo, sin la porción Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosificación puede ser al menos aproximadamente de una y media a seis veces más largo, una y media a cinco veces más largo, una y media a cuatro veces más largo, una y media a tres veces más largo, o una y media a dos veces más largo, que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII, por ejemplo, sin la porción Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosificación puede ser de al menos aproximadamente 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 cantidad equivalente de dicho Factor VIII sin la porción diferente del Factor VIII, por ejemplo, sin la porción Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosificación puede ser aproximadamente cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más. El intervalo de dosificación puede ser al menos aproximadamente de uno y medio a 5, uno y medio, 2, 3, 4 o 5 días o más. Para el tratamiento a demanda, el intervalo de dosificación de dicho polipéptido quimérico o híbrido es aproximadamente una vez cada 24-36, 24-48, 24-72, 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.

Preferiblemente, la dosis eficaz es de 25-65 UI/kg (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 62, 64, o 65 UI/kg) y el intervalo de dosificación es una vez cada 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 o más días, o tres veces a la semana, o no más de tres veces a la semana. Preferiblemente, la dosis eficaz es de 65 UI/kg y el intervalo de dosificación es una vez por semana, o una vez cada 6-7 días.

10 El "Factor VIII de acción prolongada" es un Factor VIII que tiene una semivida aumentada (también denominada en el presente documento 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 semivida aumentada de un Factor VIII de acción prolongada puede deberse a la fusión a uno o más polipéptidos diferentes del Factor VIII tales como, por ejemplo, Fc, XTEN o albúmina. La semivida aumentada puede deberse a una o más modificaciones, tales como, por ejemplo, pegilación. Los polipéptidos del Factor VIII de acción prolongada  
15 ejemplares incluyen, por ejemplo, polipéptidos del Factor VIII quiméricos que comprenden Fc, polipéptidos quiméricos de Factor VIII que comprenden XTEN y polipéptidos quiméricos de Factor VIII que comprenden albúmina. Los polipéptidos del factor VIII de acción prolongada ejemplares adicionales incluyen, por ejemplo, Factor VIII pegilado.

20 El polipéptido de "referencia", en el caso de un polipéptido de Factor VIII quimérico de acción prolongada, es un polipéptido que consiste esencialmente en la porción de Factor VIII del polipéptido quimérico, por ejemplo, la misma porción de Factor VIII sin la porción Fc, sin la porción XTEN, o sin la porción de albúmina. Del mismo modo, 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.

25 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 medio de residencia (MRT) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14-41,3 horas;  
30 una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,22-5,19 ml/hora/kg o menos;  
una t<sub>1/2</sub>beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 11-26,4 horas;  
una recuperación progresiva (valor K) (actividad, observado) en dicho sujeto de aproximadamente 1,38-2,88 UI/dl por UI/kg;  
un Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 37,7-79,4 ml/kg; y  
35 una AUC/dosis en dicho sujeto de aproximadamente 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:

40 una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) mayor de 1,38 UI/dl por UI/kg;  
una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) de al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,85, o al menos aproximadamente 2,46 UI/dl por UI/kg.  
una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 2,33 ± 1,08 ml/hora/kg o menos;  
45 una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 1,8-2,69 ml/hora/kg;  
una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes que es de aproximadamente el 65% de la depuración 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 aproximadamente 2,33 ± 8,33 horas;  
50 un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 25,9 - 26,5 horas;  
un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,5 veces mayor que el MRT medio de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;  
una t<sub>1/2</sub>beta media (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 2,33 ± 5,79 horas;  
una t<sub>1/2</sub>beta media (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 18 - 18,4 horas;  
55 una t<sub>1/2</sub>beta media (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,5 veces mayor que la t<sub>1/2</sub>beta media de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;  
una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de aproximadamente 2,33 ± 0,44 UI/dl por UI/kg;  
una recuperación progresiva media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de  
60 aproximadamente 1,85 - 2,46 UI/dl por UI/kg;

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

un Vss medio (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente  $2,33 \pm 12,3$  ml/kg;

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

un AUC/dosis medio (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente  $2,33 \pm 18,2$  UI \* h/dl por UI/kg;

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

"Tratamiento a demanda", como se usa en el presente documento, significa un tratamiento que está destinado a  
 10 tener lugar en un corto periodo de tiempo y que sea en respuesta a una afección existente, tal como un episodio hemorrágico, o una necesidad percibida, tal como la cirugía planeada. Las afecciones que pueden requerir tratamiento a demanda incluyen, por ejemplo, un episodio hemorrágico, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, traumatismo, trauma de la cabeza, hemorragia gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea,  
 15 hemorragia del sistema nervioso central, hemorragia en el espacio retrofaringeo, hemorragia en el espacio retroperitoneal o hemorragia en la vaina del iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción de dientes, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, craneotomía, osteosíntesis, cirugía de trauma, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica o cirugía de  
 20 reemplazo de articulaciones.

Preferiblemente, 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 el 100%) o el 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95%, o el 95-100% de las hemorragias (por ejemplo, hemorragias espontáneas) en una sola dosis. Preferiblemente, más del 80% (más del 81%, más del 82%, más del 83%, más del 84%, más del 85%, más del 86%, más del 87%, más del 88%, más del 89%, más del 90%, más del 91%, más del 92%, más del 93%, más del 94%, más del 95%, más del 96%, más del 97%, más del 98%, o el 100%) o el 80-100%, 80-90%, 85-90%, 90-100%, 90-95%, o el 95-100% de los episodios de sangrado son  
 25 calificados como excelentes o buenos por los médicos después del tratamiento a demanda. Preferiblemente, 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 el 5-20%, 5-15%, 5-10%, 10-20%, o el 10-15% de los episodios de sangrado son calificados como buenos por los  
 30 médicos después del tratamiento a demanda

35 "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan de manera intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico compuesto por residuos de aminoácidos unidos covalentemente.

"Polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan de forma intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico  
 40 compuesto por residuos de nucleótidos unidos covalentemente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, monocatenario o bicatenario, vectores, plásmidos, fagos o virus. Los polinucleótidos incluyen, por ejemplo, los de 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, los 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  
 45 de la Tabla 2.

El "tratamiento profiláctico", como se usa en el presente documento, significa administrar un polipéptido del Factor VIII en dosis múltiples a un sujeto durante un periodo de tiempo para aumentar el nivel de actividad del Factor VIII en el plasma de un sujeto. Preferiblemente, el nivel aumentado es suficiente para disminuir la incidencia de hemorragia  
 50 espontánea o para prevenir hemorragias, por ejemplo, en el caso de una lesión imprevista. Preferiblemente, durante el tratamiento profiláctico, el nivel de proteína en plasma en el sujeto no cae por debajo del nivel inicial para ese sujeto, o por debajo del nivel del Factor VIII que caracteriza la hemofilia grave ( $<1$  UI/dl [1%]).

Preferiblemente, el régimen de profilaxis se "adapta" al paciente individual, preferiblemente determinando los datos  
 55 de PK para cada paciente y administrando el Factor VIII de la invención en un intervalo de dosificación que mantiene un nivel mínimo del 1-3% de actividad de FVIII. Se pueden hacer ajustes cuando un sujeto experimenta episodios hemorrágicos inaceptables definidos como  $\geq 2$  episodios de sangrado espontáneo durante un periodo de dos meses consecutivos. En este caso, el ajuste se dirigirá a niveles mínimos del 3-5%. Preferiblemente, el tratamiento profiláctico da como resultado la prevención y el control de la hemorragia, el control sostenido de la hemorragia, la  
 60 protección sostenida contra la hemorragia, y/o el beneficio sostenido. La profilaxis, por ejemplo, la protección

sostenida se puede demostrar mediante un AUC aumentado hasta el último punto de tiempo medido (AUC-LAST) y una depuración reducida, dando como resultado un aumento de la t1/2 terminal en comparación con el FVIII de acción corta. Preferiblemente, la profilaxis se demuestra por una mejor Cmáx, un mejor Tmáx y/o un mayor tiempo medio de residencia frente al FVIII de acción corta. Preferiblemente, la profilaxis no produce episodios de sangrado espontáneo dentro de aproximadamente 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, 96, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 96 horas, preferiblemente en 72 horas), después de la inyección (por ejemplo, la última inyección). Preferiblemente, la profilaxis da como resultado más del 30% (por ejemplo, más del 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, o el 90%, preferiblemente más del 50%), de reducción media en los episodios de hemorragia al año con una dosificación de una vez a la semana (por ejemplo, 65 UI/kg).

15 "Sujeto", como se usa en el presente documento, significa un mamífero humano o no humano. Los mamíferos no humanos incluyen, por ejemplo, ratones, perros, primates, monos, gatos, caballos, vacas, cerdos y otros animales domésticos y animales pequeños.

20 "Dosis terapéutica", como se usa en el presente documento, significa una dosis que logra un objetivo terapéutico, como se describe en el presente documento. El cálculo de la dosis requerida del factor VIII se basa en el hallazgo empírico de que, en promedio, 1 UI de factor VIII por kg de peso corporal aumenta la actividad del factor VIII plasmático en aproximadamente 2 UI/dl. La dosificación requerida se determina usando la siguiente fórmula:

25 
$$\text{Unidades requeridas} = \text{peso corporal (kg)} \times \text{aumento del factor VIII deseado (UI/dl o \% de normalidad)} \times 0,5 \text{ (UI/kg por UI/dl)}$$

Las dosis terapéuticas que pueden usarse en los métodos de la descripción son de aproximadamente 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.

30 Adicionalmente, las dosis terapéuticas que pueden usarse en los métodos de la descripción son de aproximadamente 10 a aproximadamente 150 UI/kg, más específicamente, aproximadamente 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150 UI/kg, y más específicamente, aproximadamente 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 UI/kg.

35 "Variante", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que difiere del polinucleótido o polipéptido original, pero que conserva sus propiedades esenciales, por ejemplo, la actividad coagulante del factor VIII, o la actividad de Fc (unión a FcRn). Generalmente, las variantes son globalmente muy similares, y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido original. Las variantes incluyen, por ejemplo, fragmentos polipeptídicos y de polinucleótidos, deleciones, inserciones y versiones modificadas de polipéptidos originales.

45 Los polinucleótidos variantes pueden comprender, o como alternativa consisten en, una secuencia de nucleótidos que es al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia que codifica nucleótidos en la SEQ ID NO:1, 3, 5, 7, 9 u 11 (la porción del factor VIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto) o la cadena complementaria a la misma, la secuencia codificante de nucleótidos del mutante conocido y el factor VIII recombinante o Fc tales como los descritos en las publicaciones y patentes citadas en el presente documento o la cadena complementaria a la misma, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, o 12 (la porción de factor VIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos de polinucleótidos de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, los fragmentos descritos en el presente documento). Los polinucleótidos que se hibridan con estas moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de astringencia inferiores también se incluyen como variantes, como lo son los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos siempre que sean funcionales.

55 Los polipéptidos variantes pueden comprender, o como alternativa pueden consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia polipeptídica mostrada en SEQ ID NO:2, 4, 6, 8, 10, o 12 (la porción del factor VIII, la porción Fc, individualmente o en conjunto), y/o fragmentos polipeptídicos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, los fragmentos descritos en el presente documento).

60

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

En la práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos un 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o un 99% idéntico a una secuencia de nucleótidos o polipéptido de la presente invención puede determinarse de manera convencional utilizando programas informáticos conocidos. Un método preferido para 15 determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia problema (secuencia de referencia u original) y una secuencia objeto, también denominada alineación de secuencia global, puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245). En una alineación de secuencias, las secuencias problema y objeto son ambas secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar convirtiendo U en T. El resultado de dicha alineación de secuencia global está en porcentaje de 20 identidad. Los parámetros preferidos usados en una alineación FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son Matriz = Unitaria, k-tupla = 4, Penalización por desemparejamiento = 1, Penalización de unión = 30, Longitud del grupo de aleatorización = 0, Puntuación de corte = 1, Penalización por huecos = 5, Penalización por tamaño de huecos 0,05, Tamaño de ventana = 500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos objeto, la que sea más corta.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia problema debido a eliminaciones 5' o 3', no debido a 25 eliminaciones internas, se debe realizar una corrección manual de los resultados. Esto se debe a que el programa FASTDB no tiene en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia objeto al calcular el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia problema, el porcentaje de 30 identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia problema que son 5' y 3' de la secuencia objeto, que no se corresponden/alinean, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia problema. Si un nucleótido se empareja/alinea se determina por los resultados de la alineación de secuencias FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior utilizando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida 35 es la que se usa para los fines de la presente invención. Solo las bases fuera de las bases 5' y 3' de la secuencia objeto, como se muestra mediante la alineación FASTDB, que no se emparejan/alinean con la secuencia problema, se calculan con el propósito de ajustar manualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia objeto de 90 bases se alinea con una secuencia problema de 100 bases para 40 determinar el porcentaje de identidad. Las eliminaciones se producen en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por lo tanto, la alineación FASTDB no muestra un emparejamiento/alineación de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no emparejadas representan el 10% de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no emparejados/número total de bases en la secuencia problema), por lo que el 10% se resta de la puntuación de porcentaje de identidad que se calcula por el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes coincidieran 45 perfectamente, el porcentaje de identidad final sería del 90%. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia problema de 100 bases. Esta vez, las eliminaciones son eliminaciones internas, de manera que no hay bases en 5' o 3' de la secuencia objeto que no se emparejen/estén alineadas con la secuencia problema. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no están emparejadas/alineadas con la secuencia problema 50 se corrigen manualmente. No se realizarán otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, un 95% "idéntica" a una secuencia de aminoácidos problema de la presente invención, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia problema, excepto que la secuencia polipeptídica objeto puede incluir 55 hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos problema. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos problema, hasta un 5% de los residuos de aminoácidos en la secuencia objeto pueden insertarse, eliminarse, (indeles) o sustituirse con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones amino o carboxi terminales de la secuencia de aminoácidos de 60 referencia o en cualquier lugar entre esas posiciones terminales, intercaladas individualmente entre residuos en la

secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

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

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

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

Las variantes de polinucleótidos pueden contener alteraciones en las regiones codificantes, regiones no codificantes, o ambas. Son especialmente preferidas las variantes de polinucleótidos que contienen alteraciones que producen sustituciones, adiciones o deleciones silenciosas, pero que no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. Se prefieren las variantes de nucleótidos producidas por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. Además, también se prefieren las variantes en las que 5-10, 1-5 o 1-2 aminoácidos se sustituyen, eliminan o añaden en cualquier combinación. Las variantes de polinucleótidos se pueden producir por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un huésped particular (cambiar los codones en el ARNm humano por los preferidos por un huésped bacteriano, tal como *E. coli*).

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

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

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

Como se ha indicado 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 de nucleótido, unión covalente de un lípido o derivado lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de enlaces cruzados covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje 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 transferencia de RNA para proteínas tales como arginilación y ubiquitinación. En algunas realizaciones, el Factor VIII está modificado, por ejemplo, pegilado, en cualquier ubicación conveniente. En algunas realizaciones, el Factor VIII se pega en un aminoácido expuesto en la superficie del Factor VIII, preferiblemente una cisteína expuesta en la superficie, que puede ser una cisteína modificada genéticamente. Mei et al. (2010). En algunas realizaciones, el Factor VIII modificado, por ejemplo, el Factor VIII pegilado, es un Factor VIII de acción prolongada.

El "Volumen de distribución en estado estacionario (V<sub>ss</sub>)", como se usa en el presente documento, tiene el mismo significado que el término utilizado en farmacología, que es el espacio (volumen) aparente en el que se distribuye un fármaco. V<sub>ss</sub> = la cantidad de fármaco en el cuerpo dividida por la concentración en plasma en estado estacionario.

"Aprox.", como se usa en el presente documento para un intervalo, modifica ambos extremos del intervalo. Por lo tanto, "aproximadamente 10-20" significa "aproximadamente de 10 a aproximadamente 20".

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

#### 45 Ejemplo 1

##### Resumen

Se creó una proteína de fusión recombinante del factor VIII-Fc (rFVIII-Fc) con el dominio B eliminado para extender la semivida de FVIII. rFVIII-Fc se estudió en modelos de ratón y perros con hemofilia A grave y se comparó con rFVIII (ReFacto®). El tiempo de coagulación sanguínea total (WBCT) en ratones con hemofilia A se corrigió durante aproximadamente dos o tres veces más y la semivida de eliminación en plasma fue casi dos veces más larga para rFVIII-Fc en comparación con ReFacto®. En perros con hemofilia A, una dosis intravenosa de rFVIII-Fc (125 UI/kg) corrigió el WBCT a la normalidad. El WBCT permaneció por debajo de 20 min, el tiempo consistente con FVIII:C >1%, hasta aproximadamente 96 h, en comparación con 48 h para los perros tratados con ReFacto®. La semivida de eliminación de rFVIII-Fc en el plasma de perro, cuando se midió usando ELISA o ensayos de actividad cromogénica, fue de 2,33 ± 1,7 h y 2,33 ± 0,3 h, respectivamente. ReFacto® corrigió el WBCT durante aproximadamente la mitad del tiempo que rFVIII-Fc y la semivida en plasma fue de 7,0 h. Por lo tanto, la fusión de FVIII en Fc produjo una molécula con una semivida plasmática aumentada y la capacidad de proporcionar una protección prolongada contra el sangrado.

## Introducción

La reducción de la mortalidad, la prevención del daño articular y la mejora de la calidad de vida han sido logros importantes debido al desarrollo de FVIII recombinante y derivado de plasma. La protección prolongada contra la hemorragia representaría otro avance clave en el tratamiento de pacientes con hemofilia A. Los inventores han creado una proteína quimérica recombinante del factor VIII-Fc (rFVIII-Fc) e híbrido como un enfoque para extender la semivida del FVIII.

10 rFVIII-Fc es una proteína híbrida heterodímera compuesta por FVIII con el dominio B eliminado fusionado de manera recombinante al dominio Fc de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1) (Fig. 1, SEQ ID N°:2; Tabla 2A) (Esta proteína también se refiere en el presente documento como proteína de fusión Fc monomérica de FVIII-Fc, híbrido monomérico de FVIII-Fc, híbrido monomérico FVIII-Fc, y monómero-dímero FVIII-Fc). El Fc permite la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la protección de la degradación de IgG y confiere a la IgG la semivida de tres semanas observada en seres humanos (Ghetie V, y Ward ES., *Annu. Rev. Immunol.* 2000;18:739-766;Roopenian DC, y Akilesh S., *Nature Rev. Immunol.* 2007;7:715-725).

El dominio Fc de IgG1 se ha fusionado a factores de crecimiento, citocinas, enzimas y regiones de unión a ligando de receptores (Ashkanazi A, et al., *Int. Rev. Immunol.* 1993;10:219-27;Chamow SM, y Ashkanazi A, *Trends Biotechnol.* 1996;14:52-60;Fisher et al., *N. Engl. J. Med.* 1996;334(26): 1697-702). Varios de estos se han convertido en moléculas terapéuticas importantes (por ejemplo, etanercept, alefacept, abatacept). En estas proteínas de fusión, dos moléculas efectoras están conectadas a dos moléculas de Fc. En este ejemplo, rFVIII-Fc se ha construido como una proteína de fusión Fc monomérica (una copia de un polipéptido que consiste en la secuencia en la Tabla 2A(i) (SEQ ID N°:2) con o sin la secuencia señal y una copia de un polipéptido que consiste en la secuencia en la Tabla 2A(ii) (SEQ ID NO: 4) con o sin la secuencia señal), es decir, con solo una copia de la molécula efectora (véase la Figura 1), y los estudios presentados en el presente documento comparan la farmacodinámica y la farmacocinética de esta novedosa proteína para rFVIII en modelos de ratón y perro de hemofilia A. La secuencia señal es la escisión durante la secreción. Esta construcción de proteínas se denomina en el presente documento proteína de fusión Fc monomérica de FVIII-Fc, híbrido monomérico de FVIII-Fc, híbrido monomérico de FVIII-Fc y monómero-dímero de FVIII-Fc. Véase el Ejemplo 1, Fig. 1, Tabla 2A; y las Patentes de Estados Unidos N.º 7.404.956y7.348.004, para la estructura y producción de esta proteína.

## Métodos y materiales

### 35 Preparaciones de FVIII

#### FVIII-Fc recombinante

La secuencia codificante de FVIII con el dominio B humano recombinante eliminado se obtuvo por reacción en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-PCR) a partir de ARN poli A de hígado humano (Clontech) usando cebadores específicos de FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia de señal nativa para FVIII. La delección del dominio B fue de serina 743 (S743; 2287 pb) a glutamina 1638 (Q1638; 4969 pb) para una delección total de 2682 pb. Véase el Ejemplo 1, Fig. 1, Tabla 2A; y las Patentes de Estados Unidos N.º 7.404.956y7.348.004, para la estructura y producción de esta proteína.

45 La secuencia de codificación para Fc recombinante humano se obtuvo por RT-PCR a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos humanos (Clontech) usando cebadores específicos de Fc. Los cebadores se diseñaron de manera que la secuencia de FVIII con dominio B eliminado se fusionó directamente al extremo N de la secuencia de Fc sin un enlazador intermedio. La secuencia de ADN de FVIII-Fc se clonó en el vector de expresión doble de mamífero pBUDCE4.1 (Invitrogen) bajo el control del promotor de CMV. Se obtuvo una segunda secuencia de Fc idéntica que incluía la secuencia señal de Igk de ratón por RT-PCR y se clonó aguas abajo del segundo promotor, EF1 $\alpha$ , en el vector de expresión pBUDCE4.1.

El vector de expresión de rFVIII-Fc se transfectó en células 293 de riñón embrionario humano (HEK293H; Invitrogen) usando reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Se generaron líneas celulares clonales estables mediante selección con Zeocin (Invitrogen). Se usó una línea celular clonal, 3C4-22, para generar FVIII-Fc para la caracterización in vivo. El FVIII-Fc recombinante se produjo y se purificó (McCue et al. (McCue JT, et al., *J. Chromatogr. A* 2009;7824-7830) at Biogen Idec (Cambridge, MA). Se esperaba que la estrategia de transfección descrita anteriormente produjera tres productos, es decir, híbrido monomérico de rFVIII-Fc, híbrido de rFVIII-Fc dimérico y Fc dimérico. Sin embargo, esencialmente no se detectó rFVIII-Fc dimérico en el medio acondicionado de

estas células. Más bien, el medio acondicionado contenía Fc y rFVIII<sub>1-2</sub> monomérico. Es posible que el tamaño de rFVIII<sub>1-2</sub> dimerico fuera demasiado grande e impidiera la secreción eficiente de la célula. Este resultado fue beneficioso ya que hizo que la purificación del monómero fuera menos complicada que si las tres proteínas hubieran estado presentes. El material utilizado en estos estudios tenía una actividad específica de aproximadamente 9000 UI/mg. Además, estas células humanas produjeron un mayor nivel de proteína que otras células que se intentaron en este experimento.

#### **FVIII recombinante**

10 Se adquirió FVIII con el dominio B eliminado (ReFacto®) en Novartis Pharmaceuticals y se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. ReFacto® (FVIII recombinante con el dominio B eliminado) tiene la misma secuencia de aminoácidos que los aminoácidos 1 a 1438 de SEQ ID NO:2.

#### **Animales con hemofilia A**

15 Los ratones con hemofilia A son inactivaciones del exón 16 de FVIII en un fondo 129 x B6 que se obtuvieron del Dr. Kazazian en la University of Pennsylvania (Bi L, et al., Nat. Genet. 1995;10(1):119-121) y se criaron en Syntonix. Estos ratones muestran tiempos prolongados de coagulación de la sangre entera (>60 min) y, por lo tanto, son un buen modelo de hemofilia A grave.

20 Los perros con hemofilia A eran de la colonia endocriada mantenida en el Francis Owen Blood Research Laboratory en la University of North Carolina, Chapel Hill (Graham, JB, et al., J. Exp. Med. 1949;90:97-111). Estos perros tienen un fenotipo hemofílico grave comparable a la forma grave de la enfermedad humana (Graham, JB, et al., J. Exp. Med. 1949;90:97-111;Lozier, JN, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 2002;99:12991-12996).

25

#### **Diseños de estudio**

##### **Estudios en ratones con hemofilia A**

30 Se estudió el efecto de rFVIII<sub>1-2</sub> y ReFacto® sobre el tiempo de coagulación de sangre entera (WBCT) en ratones con deficiencia de FVIII. Cada proteína se administró por vía intravenosa a 50 UI/kg y se recogió sangre de la vena de la cola de cada ratón antes de la dosis y varios puntos de tiempo después de la dosificación. Las muestras de sangre se incubaron en microtubos a 37 °C y se inspeccionaron visualmente una vez por minuto para determinar la presencia de un coágulo. Se registró el tiempo de formación del coágulo. Si no se formó ningún coágulo en 60 min, el tiempo de coagulación se registró como >60 min. Sangre de los coágulos normales de ratones en aproximadamente 4 min (intervalo 2-7 min, n = 10 ratones) en el ensayo WBCT.

40 En un segundo conjunto de estudios, a los ratones con hemofilia A se les administró una sola dosis intravenosa de 50 UI/kg de rFVIII<sub>1-2</sub>, ReFacto® o Advate® (4 ratones por punto de tiempo). La sangre se recogió mediante punción cardiaca en una décima parte del volumen de citrato sódico al 3,2% 0,25, 8, 24, 48 y 72 h después de la dosificación. Se preparó el plasma y se almacenó a -80 °C hasta el análisis para determinar la actividad de FVIII usando un ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII.

##### **Estudios en perros con hemofilia A**

45

En un estudio de dosis única PK/PD de rFVIII<sub>1-2</sub>, a dos perros con hemofilia A de la colonia Chapel Hill se les administró una sola dosis intravenosa de 125 UI/kg y se tomaron muestras de sangre antes de la dosis y después de la dosificación en puntos de tiempo seleccionados para determinar el WBCT, el tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT), concentración plasmática de FVIII<sub>1-2</sub>, hematología y química sérica. Los puntos de tiempo para el WBCT incluyeron una dosis previa, 5 y 30 minutos y 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72, 96, 144 y 168 h después de la dosificación. Las recogidas de sangre para la actividad de coagulación (aPTT) y la concentración plasmática de FVIII<sub>1-2</sub> incluyeron los puntos de tiempo enumerados anteriormente para el WBCT, así como 15 minutos y 3, 6, 12 horas después de la dosificación.

55 Se realizó un segundo estudio en el que ReFacto® (114 UI/kg para el perro M12 y 120 UI/kg para el perro M38) se administró por vía intravenosa. Se midió el WBCT hasta que los tiempos de coagulación fueron ≥20 min (consistentes con FVIII:C >1%), y luego se administraron 125 UI/kg de rFVIII<sub>1-2</sub> por vía intravenosa a los mismos perros y se tomaron muestras de sangre para determinar el WBCT, aPTT, concentración plasmática de FVIII<sub>1-2</sub>, hematología y química sérica. Los puntos de tiempo para el WBCT incluyeron una dosis previa, 5 y 30 minutos y 1, 2, 4, 8, 24, 32, 48, 72 h después de la dosificación. La sangre también se recogió 96, 120, 144 y 168 h después de la

60

dosificación con FVIII<sub>h</sub>. Las recogidas de sangre para la actividad de coagulación y la concentración plasmática de FVIII<sub>h</sub> incluyeron los puntos de tiempo enumerados anteriormente para el WBCT, así como 15 minutos y 3, 6, 12 horas después de la dosificación.

- 5 El procedimiento de WBCT en perros con hemofilia A fue ligeramente diferente al de los ratones con hemofilia A. Después de la dosificación con rFVIII<sub>h</sub> o ReFacto®, se recogió un ml de sangre en diversos puntos de tiempo y se distribuyeron 0,5 ml en dos tubos de vidrio siliconados que posteriormente se colocaron en un baño de agua a 28 °C. Comenzando en un minuto, un tubo se inclinó cada 30 s, el segundo se dejó sin alterar. Cuando se formó un coágulo en el tubo inclinado, el segundo tubo se inclinó luego cada 30 segundos hasta que se formó un coágulo. El tiempo para detectar un coágulo completamente gelificado en el segundo tubo se registró como el WBCT.

#### Actividad de FVIII en plasma

##### Medición de la actividad de FVIII en plasma mediante ensayo cromogénico específico de FVIII

- 15 Las muestras de plasma se ensayaron para determinar la actividad de FVIII mediante un método cromogénico automático usando un instrumento Sysmex CA1500 y los reactivos fueron de Siemens Healthcare Diagnostics (Dallas, TX, kit N.º B4238-40). La actividad de rFVIII<sub>h</sub> se determinó usando una curva estándar creada usando el concentrado de factor VIII del 7º estándar internacional (NIBSC código 99/678) añadido en plasma agotado en FVIII humano (Stago USA) en concentraciones que varían de 1,5 - 0,016 UI/ml.

##### Medición de rFVIII<sub>h</sub> o FVIII por ELISA

###### FVIII<sub>h</sub> en plasma de perro por ELISA

- 25 Un anticuerpo FVIII específico para el dominio A1 (Green Mountain Antibodies: GMA-8002) se recubrió en placas de 96 pocillos y se incubó durante 1 h a 37 °C. Las placas recubiertas se bloquearon con una solución salina tamponada con Tris que contenía Tween 20, CaCl<sub>2</sub> y albúmina sérica bovina durante 1 h a temperatura ambiente y después, los estándares, controles y muestras que se prepararon en plasma normal de perro, se diluyeron 1:10 y después se añadieron a las placas y se incubaron durante 1 hora a 37 °C. Las placas se lavaron, después se añadió Fc-HRP antihumano de burro (F(ab)<sub>2</sub>) (Jackson: 709-036-098) y se incubaron durante 1 h a 37 °C. Después del lavado, se añadió TMB (sustrato supersensible BioF<sub>x</sub>: TMB-0100-01) a las placas, la reacción de sustrato se inactivó con ácido y la absorbancia se midió en un lector de placas SpectraMax Plus (Molecular Devices) a 450 nm.

###### 35 ReFacto® en plasma de perro por ELISA

- Un anticuerpo anti-FVIII específico para el dominio A1 en la cadena pesada (Green Mountain Antibodies: GMA-8002) se recubrió sobre placas de 96 pocillos y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas recubiertas se bloquearon durante 1 h a 37 °C y después del lavado, los estándares, controles y muestras se prepararon en plasma de perro normal, después se añadieron diluidos 1:10 a las placas y se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron y luego se trataron con el anticuerpo de detección, un conjugado de peroxidasa de rábano picante anti-FVIII pre-diluido (Affinity Biologicals: F8C-EIA-D), y se incubaron a temperatura ambiente durante 1 h. Después del lavado, se añadió TMB (sustrato supersensible BioF<sub>x</sub>: TMBS-0100-01) a las placas durante 10 minutos. La reacción del sustrato se inactivó con ácido y la señal se midió en un lector de placas SpectraMax Plus (Molecular Devices) a una longitud de onda de 450 nm.

##### Medición de fibrinógeno

- La concentración de fibrinógeno en plasma se midió en Esoterix (Research Triangle Park, NC) usando un kit que contiene el reactivo PT-Fibrinógeno-HS HemosIL™ (Instrumentation Laboratory, Lexington, MA, Catálogo n.º 0008468210) y un analizador de coagulación ACL 7000 (Beckman Coulter), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

##### Medición de plaquetas

- 55 Las plaquetas se contaron en sangre entera anticoagulada con EDTA mediante métodos automatizados usando el analizador de hematología Vet-ABC-Diff programado con una tarjeta inteligente específica de especie (SCIL Animal Care Co., Gurnee, IL).

##### 60 Análisis farmacocinético

Los parámetros farmacocinéticos se calcularon mediante análisis no compartimental usando el software WinNonlin de Pharsight, versión 5.2 (Mountain View, Ca). Los parámetros PK incluyeron la concentración máxima en plasma ( $C_{máx}$ ), el área bajo curva de la concentración plasmática frente al tiempo (AUC), semivida de eliminación ( $t_{1/2}$ ), volumen de distribución ( $V_{ss}$ ) y depuración (Cl).

## Resultados

### FVIII-Fc recombinante

10

rFVIII-Fc es una fusión recombinante de FVIII con el dominio B humano eliminado con Fc de IgG1 humana, sin una secuencia de enlazador intermedia (rFVIII-Fc: Figura 1).

El rFVIII-Fc purificado tenía una actividad específica de aproximadamente 9000 UI/mg según se determinó usando un ensayo de actividad cromogénica. El FVIII con el dominio B eliminado (ReFacto®) tiene una actividad específica informada de 9110 - 13700 UI/mg. La conversión de actividad específica en UI/nmol para tener en cuenta la diferencia de tamaño entre FVIII-Fc y ReFacto® (216 kDa y 170 kDa, respectivamente) indica que las dos proteínas tienen actividades específicas aproximadamente equivalentes (1970 UI/nmol para rFVIII-Fc y 1521 - 2287 UI/nmol para ReFacto®). Por lo tanto, la actividad de FVIII de rFVIII-Fc no se ve afectada por la fusión del extremo C del FVIII humano con el extremo N del Fc humano.

20

### Administración a ratones con hemofilia A

Se administró una dosis única de 50 UI/kg de rFVIII-Fc o ReFacto® por vía intravenosa a ratones con deficiencia de FVIII ( $n = 6$ /grupo). Se tomaron muestras de sangre antes de la dosis y después de la dosificación a las 120 h y se determinó el WBCT como se describe en Materiales y métodos. El WBCT inicial fue mayor de 60 min. Los datos de un experimento representativo se muestran en la Figura 2 y en la Tabla 3. Inmediatamente después de la dosificación con rFVIII-Fc o ReFacto®, el WBCT se corrigió en 2-17 minutos. La sangre de ratones tratados con ReFacto® perdió la capacidad de coagulación tras 42 horas, mientras que la sangre de todos los ratones tratados con rFVIII-Fc todavía se coaguló a las 96 horas, la sangre de uno de seis se coaguló tras 113 h, pero todos habían perdido la capacidad de coagulación tras 120 h. Estos datos sugieren que la duración del efecto para rFVIII-Fc es aproximadamente dos o tres veces más larga que para ReFacto®.

30

Se estudió la actividad cromogénica de rFVIII-Fc, ReFacto® o Advate® (FVIII recombinante de longitud completa) en ratones con deficiencia de FVIII después de una sola dosis intravenosa de 50 UI/kg. La sangre se recogió antes de la dosis y después de la dosificación a las 8, 24, 48 y 72 h. La actividad se midió usando un ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII y se muestra en la Figura 3. Los parámetros farmacocinéticos se informan en la Tabla 4. La semivida circulante para rFVIII-Fc fue aproximadamente de 1,6 a 2 veces más larga (11,1 h) en comparación con Advate® (7 h) y ReFacto® (5 h). La  $C_{máx}$  fue de  $2,33 \pm 0,36$  UI/ml para rFVIII-Fc en comparación con  $0,47 \pm 0,30$  UI/ml para Advate® y  $\pm 0,44$  UI/ml para ReFacto®. La exposición sistémica de rFVIII-Fc fue notablemente mayor para rFVIII-Fc ( $22,6$  h · UI/ml) en comparación con ReFacto® ( $6,94$  h · UI/ml) y Advate® ( $3,90$  h UI/ml) y la depuración para rFVIII-Fc fue notablemente menor ( $2,09$  ml/h/kg) en comparación con ReFacto® ( $7,2$  ml/h/kg) y Advate® ( $12,8$  h/ml/kg) en los ratones con hemofilia A.

40

### 45 Administración a perros con hemofilia A

Se estudiaron la farmacodinámica (PD) y la farmacocinética (PK) de rFVIII-Fc en la colonia de perros con hemofilia A de Chapel Hill. Se administró una sola dosis intravenosa de 125 UI/kg de rFVIII-Fc a cada uno de los cuatro perros con hemofilia A y el WBCT se corrigió inmediatamente a la normalidad (Figura 4). El intervalo de WBCT en perros normales es 8-12 min. El WBCT permaneció por debajo de 20 min, el tiempo consistente con FVIII:C  $>1\%$ , hasta aproximadamente 96 h, con la excepción de un perro que tenía un WBCT  $<20$  min hasta 72 h. Además, aPTT también se corrigió inmediatamente a la normalidad (Tabla 6). La concentración de rFVIII-Fc en plasma se midió usando un ELISA específico que se diseñó para detectar tanto las porciones de FVIII como de Fc de la molécula. Las curvas de concentración en plasma frente al tiempo se muestran en la Figura 5. El análisis de PK de los datos mostró que la  $t_{1/2}$  era  $\pm 1,7$  h (Tabla 5). Se obtuvieron resultados similares cuando se midió rFVIII-Fc usando un ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII ( $t_{1/2} = \pm 0,3$  h, Tabla 5) y las curvas de concentración en plasma frente al tiempo fueron similares usando ambos métodos (Figuras 5 y 6). Cuando los datos de actividad se convirtieron de UI/ml a ng/ml usando la actividad específica para rFVIII-Fc, hubo una buena correlación con los datos de ELISA, demostrando así que la proteína que se midió mediante ELISA estaba completamente activa.

60

- Dos de los perros tratados con rFVIII Fc también recibieron una dosis única de ReFacto® 114 UI/kg para el perro M12 y 120 UI/kg para el perro M38, 72 h antes de la dosificación con rFVIII Fc. WBCT y aPTT se corrigieron a la normalidad inmediatamente después de la dosificación con ReFacto®. Sin embargo, la normalización del WBCT después de la dosis única de rFVIII Fc duró aproximadamente el doble de tiempo en comparación con ReFacto® (Figura 4). Además, la semivida plasmática de rFVIII Fc ( $15,7 \pm 1,7$  h) fue aproximadamente dos veces más larga para rFVIII Fc en comparación con ReFacto® (7,0 y 6,7 h) cuando la concentración de proteínas en plasma se midió por ELISA (Tabla 5). Se obtuvieron resultados similares cuando las dos moléculas se midieron por actividad cromogénica específica de FVIII.
- 10 Para evaluar el riesgo potencial de trombogenicidad, se midieron las plaquetas y el fibrinógeno. Después de la dosificación con rFVIII Fc o ReFacto®, el número de plaquetas y la concentración de fibrinógeno en plasma no cambiaron de los valores previos a la dosis (datos no mostrados).

### Análisis

- 15 El FVIII Fc recombinante se produjo en células de riñón embrionario humano 293 (HEK 293) a partir de una línea celular transfectada de forma estable y se purificó a partir del medio de cultivo celular. La producción en una línea celular humana representa un cambio significativo en la fabricación en comparación con los productos de rFVIII comercializados actualmente que se producen en células de ovario de hámster chino o células de riñón de hámster recién nacido.
- 20 La razón de este cambio fue que se esperaba que las células humanas estuvieran mejor equipadas para realizar las modificaciones postraduccionales necesarias para la porción de FVIII de esta molécula.
- La conversión de la actividad específica en UI/nmol para tener en cuenta la diferencia en pesos moleculares para rFVIII Fc y FVIII recombinante con dominio B eliminado (ReFacto®) indicó que las actividades específicas son similares tanto para las proteínas (1970 UI/nmol para rFVIII Fc como para 1521 - 2287 UI/nmol para ReFacto®). Es algo sorprendente que la actividad específica para rFVIII Fc no se vea afectada por la fusión del extremo C de FVIII con el extremo N de Fc ya que los dominios C1 y C2 de FVIII están implicados en la unión de fosfolípidos que es esencial para la actividad de FVIII completa (Fay, PJ, J. Hematology 83:103-8 (2006) y Raut, S, et al., Br. J. Haematol. 107:323 (1999)).
- 30 El tratamiento de la hemofilia A es a demanda en el momento de un episodio de sangrado o por profilaxis para la prevención de hemorragias. Aunque el tratamiento a demanda todavía se usa con frecuencia, existe una tendencia hacia la profilaxis y la prevención del daño articular (Blanchette P, et al., Haemophilia 2004; 10:679-683, Manco-Johnson, MJ, et al., N. Engl. J. Med. 2007;357:535-544). Los productos actuales de FVIII se administran cada dos o tres días para la profilaxis debido a la semivida relativamente corta de 10-12 h para mantener un FVIII:C superior al 1% en los pacientes (Morfini, M, Haemophilia 2003;9 (suppl 1):94-99;discussion 100, White GC, et al., Thromb. Haemost. 1997;77:660-7, Blanchette, P, et al., J. Thromb. Haemost. 2008 Aug;6(8): 1319-26). Las terapias de FVIII de acción más prolongada que brindan protección prolongada contra la hemorragia representarían una mejora notable en la calidad de vida de los pacientes con hemofilia A. Las estrategias para prolongar la semivida de los factores de coagulación incluyen aquellas que han tenido éxito para otras moléculas, incluida la pegilación (Rostin J, et al., Bioconj. Chem. 2000;11:387-96), glucopegilación (Stennicke HR, et al., Thromb. Haemost. 2008;100:920-8), formulación con liposomas pegilados (Spira J, et al., Blood 2006;108:3668-3673, Pan J, et al., Blood 2009;114:2802-2811) y conjugación con albúmina (Schulte S., Thromb. Res. 2008;122 Suppl 4:S14-9). La pegilación representa un enfoque para reducir la depuración, sin embargo, el efecto de la modificación in vivo es actualmente desconocido. El resultado de la pegilación directa de FVIII in vivo es actualmente desconocido, mientras que el FVIII formulado con liposomas pegilados se ha estudiado clínicamente y muestra un modesto o ningún efecto sobre los periodos de sangrado (Spira J, et al., Blood 2006;108:3668-3673, Spira J, et al., Thromb. Haemost. 2008 Sep;100(3):429-34).
- 50 El presente enfoque para extender la semivida de FVIII fue fusionar FVIII de forma recombinante al dominio Fc de IgG1. Fc se une al receptor de origen natural, FcRn, cuya función normal es la protección de la IgG frente a la degradación. Los resultados descritos en el presente documento representan la farmacocinética inicial y la caracterización de la eficacia de rFVIII Fc en comparación con un producto de rFVIII en ratones con hemofilia A y perros con hemofilia A. En ambas especies, la semivida de rFVIII Fc fue aproximadamente el doble que la de rFVIII cuando se midió por la actividad de FVIII o ELISA (solo perros). Estos datos también se correlacionaron bien con los resultados de WBCT de ambos modelos animales, es decir, la duración del efecto de rFVIII Fc en el WBCT fue aproximadamente dos veces más larga en comparación con ReFacto®. En perros, la  $C_{m\acute{a}x}$  y la depuración fueron similares para rFVIII Fc y ReFacto®, pero el AUC y el volumen de distribución en estado estable fueron aproximadamente 1,5 veces y 2 veces mayores para rFVIII Fc en comparación con ReFacto®, respectivamente. Los parámetros PK para ReFacto® en este modelo animal son consistentes con los valores informados en la bibliografía
- 60 (Brinkhous K, et al., Sem. Thromb. Haemost. 2002;28:269-272).

Si estos hallazgos se traducen en la misma extensión de la semivida en seres humanos, esto podría representar un avance significativo en el tratamiento de pacientes con hemofilia A.

## 5 Referencias adicionales

Berkner K., *Methods Enzymol.* 1993;222:450-477.

Bitonti AJ, y Dumont JA., *Adv. Drug Del. Rev.* 2006;58:1106-1118.

10

Dumont JA, et al., *J. Aerosol Med.* 2005;18:294-303.

Dumont JA, et al., *BioDrugs* 2006;20:151-160.

15

Ellis CN, y Krueger GG., *N. Engl. J. Med.* 2001;345:248-55.

Low SC, et al., *Hum Reprod.* 2005;7:1805-1813.

Manco-Johnson, M., *Haemophilia* 2007;13 Suppl;2: 4-9.

20

Mannucci, PM, y Tuddenham, EGD., *N. Engl. J. Med.* 2001;344:1773-1779.

Peyvandi F, et al., *Haemophilia* 2006;12(Suppl 3):82-89.

25

Rodriguez-Merchan, EC., *Semin. Thromb. Hemost.* 2003;29:87-96.

Srou MA, et al., *Ann. Hematol.* 2008; 87:107-12.

## Ejemplo 2

30

El objetivo del estudio fue determinar la farmacocinética y la farmacodinámica de rFVIII Fc y BDD-rFVIII (Xyntha®) en monos cynomolgus después de una única dosis intravenosa.

## Materiales y métodos

35

rFVIII Fc (Biogen Idec), suministrado como un líquido congelado a una concentración de 1,2 mg/ml, y 9882 UI/ml. La actividad específica es 8235 UI/mg. El almacenamiento fue a -70 °C. Se diluyó antes de la inyección.

40

Nombre: Xyntha (Novis Pharmaceuticals), suministrado como un polvo liofilizado que se reconstituyó de acuerdo con las instrucciones del fabricante para producir una solución con una concentración nominal de 525 UI/ml. El almacenamiento fue según las recomendaciones del fabricante.

## Animales

45

Se usaron monos Cynomolgus de la colonia del New Iberia Research Center (NIRC), y el estudio (Estudio NIRC N.º 8733-0903) se realizó bajo un protocolo NIRC IACUC aprobado (APS 2008-8733-058) en el NIRC en New Iberia, LA.

Se usaron en el estudio seis monos cynomolgus sin tratar (tres machos, tres hembras) que se determinó que gozaban de buena salud.

50

El estudio se realizó de conformidad con el protocolo y los procedimientos operativos estándar de UL Lafayette-NIRC.

## Diseño del estudio

55

rFVIII Fc se administró por vía intravenosa a 125 UI/kg a cada uno de los seis monos (tres machos, tres hembras). Se administró Xyntha (BDD-rFVIII) por vía intravenosa a los mismos animales a 125 UI/kg en un diseño cruzado. Los animales del grupo 1 (n = 3) recibieron Xyntha el día 0 y rFVIII Fc el día 3, mientras que los animales del grupo 2 (n = 3) recibieron rFVIII Fc el día 0 seguido de Xyntha el día 4. El día adicional entre las dosis para el grupo 2 fue para asegurarse de que el rFVIII Fc tuviera tiempo suficiente para disminuir por debajo de los niveles iniciales

60

proyectados. Se recogió sangre para plasma en una décima parte del volumen de citrato sódico al 3,2% de cada predosis del animal y después de la dosificación a 0,25, 4, 12, 24, 36, 48 y 72 h para la medición de rFVIII Fc o Xyntha mediante ELISA y un ensayo de la actividad de cromógeno específica de FVIII.

## 5 ELISA para medir rFVIII Fc y FVIII en plasma

### Método para medir rFVIII Fc en plasma de mono

Este ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) está diseñado para cuantificar rFVIII Fc en plasma de mono. En este método ELISA, se diluye anticuerpo IgG-(H+L) antihumano de cabra (absorbido por el mono) de Bethyl Laboratories (Cat. n.º A80-319A) en tampón de recubrimiento y se inmovilizó sobre una placa de muestras de microtitulación de 96 pocillos. La placa se aspira y todos los sitios no adsorbidos se bloquean con la adición de tampón de bloqueo (BSA al 3%/1xTris) durante aproximadamente 2 horas a 37 °C. Las muestras de plasma se diluyen 1:20 con tampón de dilución de muestra de con alto contenido en calcio (leche en polvo desnatada al 3%/TBST con CaCl<sub>2</sub> 30 mM) y se dispensan sobre la placa de muestra. Las placas se incuban durante aproximadamente 2 horas a 37 °C. La placa se lava posteriormente y se añade anticuerpo del Factor VIII (dominio A1) de ratón anti-dominio B eliminado (α.BDDA1) de Green Mountain Antibodies (Cat. n.º GMA-8002) a la placa y se incubaba durante aproximadamente 1 hora a 37 °C. Después de lavar la placa, se añade el anticuerpo IgG2a de cabra anti-ratón conjugado con HRP de Southern Biotech (Cat. n.º 1080-05) a la placa y se incubaba durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. La placa se lava de nuevo, se añade una solución de sustrato de peroxidasa de tetrametilbenzidina (TMB) y se incubaba durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de una solución quelante no ácida. El color se desarrolla en proporción a la cantidad de rFVIII Fc en la muestra. Las placas se leen en un lector de placas de absorbancia usando una sola longitud de onda de detección, 650 nm. Las concentraciones de rFVIII Fc se determinan en una curva estándar obtenida trazando la densidad óptica (DO) frente a la concentración usando un programa de ajuste de curvas logísticas de cuatro parámetros. El intervalo de la curva de calibración de este método es 0,400 ng/ml - 51,2 ng/ml en plasma de mono al 5% (8,00 ng/ml - 1024 ng/ml en plasma de mono al 100%). Se puede incluir un calibrador fuera del intervalo calificado del ensayo a 0,200 ng/ml en plasma de mono al 5% para que sirva como punto de anclaje para facilitar el ajuste de la curva. El punto de anclaje se elimina o se mantiene en función del mejor ajuste de la curva (es decir, el mayor número de estándares leídos dentro de la precisión definida, % de RE).

### Método para medir FVIII en plasma de mono

Este ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) está diseñado para cuantificar FVIII en plasma de mono. En este método de ELISA, el anticuerpo de ratón αBDDA1 FVIII de Green Mountain Antibodies (Cat. n.º GMA-8002) en tampón de recubrimiento y se inmoviliza en una placa de muestra de microtitulación de 96 pocillos. La placa se aspira y todos los sitios no adsorbidos se bloquean con la adición de tampón de bloqueo (BST al 3%/1xTris) durante aproximadamente 1 hora a 37 °C. Las muestras de plasma se diluyen 1:20 con tampón de dilución de muestra de con alto contenido en calcio (tampón de bloqueo con CaCl<sub>2</sub> 100 mM) y se dispensan sobre la placa de muestra. Las placas se incuban durante aproximadamente 2 horas a 37 °C. Después de lavar la placa, un anticuerpo de detección del kit Affinity Biologicals, un anticuerpo policlonal marcado con HRP (Cat. n.º F8C-EIA-D), se diluye adicionalmente en TBS/Tween 20 al 0,05%, se añade a la placa y se incubaba durante aproximadamente 1 hora a temperatura ambiente. La placa se lava de nuevo, se añade una solución de sustrato de peroxidasa de tetrametilbenzidina (TMB) y se incubaba durante aproximadamente 30 minutos a temperatura ambiente. La reacción se detiene mediante la adición de una solución quelante ácida. El color se desarrolla en proporción a la cantidad de FVIII Fc en la muestra. Las placas se leen en un lector de placas de absorbancia usando una sola longitud de onda de detección, 450 nm. Las concentraciones de FVIII se determinan en una curva estándar obtenida trazando la densidad óptica (DO) frente a la concentración usando un programa de ajuste de curva logística de cuatro parámetros. El intervalo de la curva de calibración de este método es 0,625 ng - 20 ng en plasma de mono al 5% (12,5 ng - 400 ng en plasma de mono al 100%). Se pueden incluir dos calibradores fuera del intervalo calificado del ensayo a 0,313 y 0,156 ng/ml en plasma de mono al 5% para que sirvan como puntos de anclaje para facilitar el ajuste de la curva. Los puntos de anclaje se eliminan o se mantienen en función del mejor ajuste de la curva (es decir, el mayor número de estándares leídos dentro de la precisión definida, % de RE).

55

### Ensayo cromogénico específico de FVIII

Se estimó la actividad de FVIII en muestras de plasma de mono cynomolgus en base a la dosis administrada, y luego se diluyó a aproximadamente 0,25-1 UI/ml en plasma agotado en FVIII humano (Diagnostica Stago). Las muestras se analizaron en un Sysmex CA1500 (Siemens Diagnostic Healthcare) utilizando un kit cromogénico de

60

FVIII (Siemens). En este ensayo cromogénico, rFVIIIc en las muestras de plasma se activa mediante trombina. El Factor VIII activado (FVIIIa) luego acelera la conversión del Factor X (FX) en el Factor Xa (FXa) en presencia de Factor IX activado (FIXa), fosfolípidos (PL) e iones de calcio. La actividad de FXa se evalúa por hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilida específico de FXa. La velocidad inicial de liberación de p-nitroanilina (pNA) medida a 405 nm es proporcional a la actividad de FXa y, por lo tanto, a la actividad de FVIII en la muestra. El límite de cuantificación de la actividad de FVIII debido a rFVIIIc en este ensayo es de ~0,3 UI/ml. El ensayo puede medir la actividad total de FVIII hasta un límite inferior de aproximadamente 0,06 UI/ml con una precisión de  $\pm 20\%$ . La actividad calculada de la muestra previa a la dosis para animales individuales se restó del valor en cada punto de tiempo para generar las curvas PD (actividad de FVIII frente al tiempo).

Se generó una curva estándar a partir del concentrado de FVIII del 7<sup>o</sup> estándar internacional de NIBSC diluido a 1 UI/ml en plasma humano con deficiencia de FVIII. Las curvas estándar se diluyeron en serie en el instrumento Sysmex para producir concentraciones de 0,15, 0,1, 0,05, 0,025, 0,0053 y 0,0026 UI/ml. Dado que el instrumento diluye todas las muestras 1:10 internamente, las concentraciones estándar de FVIII corresponden a concentraciones plasmáticas de 1,5 - 0,026 UI/ml, que es el intervalo de actividades de FVIII que puede medirse.

### Análisis PK

Los perfiles de tiempo de concentración se evaluaron usando el módulo de análisis no compartimental en el programa de software WinNonlin (Versión 5.2, Pharsight Corporation, Mountain View, CA).

### RESULTADOS

La concentración de rFVIIIc en plasma de mono se midió usando un formato ELISA tipo sándwich que midió tanto las porciones de FVIII como Fc de la molécula y los datos se informan en la Tabla 7. Todas las muestras predosis estaban por debajo del límite de cuantificación. La Figura 7 ilustra las concentraciones plasmáticas medias de rFVIIIc y Xyntha en el tiempo y las curvas de concentración plasmática individual frente al tiempo se muestran en la Figura 8. En las Tablas 9 y 10 se muestra un resumen de los parámetros PK para rFVIIIc y Xyntha, respectivamente. La  $t_{1/2}$  media para rFVIIIc fue  $11,9 \pm 1,7$  h (intervalo de 9,3 a 14,1 h) y para Xyntha, la  $t_{1/2}$  de eliminación media fue de  $12,7 \pm 4,4$  h (intervalo de 9,2 a 19,9 h).

La actividad de FVIII se midió usando un ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII y los datos se informan en la Tabla 8. La actividad de previa a la dosis debida al FVIII endógeno se restó de todas las muestras. En la Figura 9 se muestra un gráfico de los datos medios del grupo y las curvas de concentración plasmática individual frente al tiempo se muestran en la Figura 10. Se informa un resumen de los parámetros PK para rFVIIIc y Xyntha en las Tablas 9 y 10, respectivamente. La  $t_{1/2}$  de eliminación media fue de  $16,1 \pm 6,9$  h (intervalo de 11,6 a 29,4 h) para rFVIIIc y  $12,5 \pm 1,7$  h (intervalo de 10,4 a 14,3 h) para Xyntha.

### Análisis y conclusiones

Las semividas de eliminación fueron similares para rFVIIIc y Xyntha después de una única dosis intravenosa de 125 UI/kg si el artículo de ensayo se midió mediante ELISA o un ensayo de actividad cromogénica.

### Ejemplo 3

Este será un estudio por primera vez en seres humanos de Fase I/IIa, abierto, cruzado, con escalonado de dosis, multicéntrico diseñado para evaluar la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética de una dosis única de rFVIIIc en sujetos con hemofilia A severa grave (definida como factor VIII endógeno [FVIII]  $<1$  UI/dl [1%]). Se incluirán un total de aproximadamente 12 pacientes previamente tratados y se les administrará rFVIIIc a 25 o 65 UI/kg. Después de la detección (programada dentro de los 28 días previos a la primera dosis de Advate® [rFVIII], el agente de comparación de referencia) y un mínimo de 4 días (96 horas) transcurridos sin tratamiento con FVIII antes de la primera inyección, aproximadamente 6 los sujetos recibirán 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 dosis única, individual y abierta de 25 UI/kg de rFVIIIc para un perfil PK de 7 días (168 horas). Los primeros 3 sujetos recibirán la dosis secuencialmente. Para los primeros tres (3) sujetos dosificados con 25 UI/kg de rFVIIIc, cada sujeto se someterá a una evaluación del inhibidor 14 días (336 horas) después de la inyección de rFVIIIc. La dosificación del siguiente sujeto (solo para los tres primeros sujetos) ocurrirá una vez que se complete la prueba del inhibidor. Después de que el tercer sujeto complete la evaluación del inhibidor de 14 días, los tres sujetos restantes a 25 UI/kg y los seis sujetos a 65 UI/kg se inscribirán secuencialmente con al menos 1 día de diferencia dentro de cada grupo de dosis.

Una semana después de que el último sujeto reciba la dosis de 25 UI/kg del rFVIIIc, se reunirán aproximadamente 6 sujetos únicos para la cohorte de 65 UI/kg. Cada sujeto en la cohorte de 65 UI/kg recibirá una sola dosis de 65 UI/kg de Advate® seguida de un perfil PK de 4 días (96 horas), después se cruzará y recibirá una dosis única abierta de rFVIIIc de 65 UI/kg para un perfil de 10 días (240 horas). Si se produce un episodio hemorrágico antes de la primera inyección de rFVIIIc en cualquier cohorte, se debe utilizar el producto FVIII previo al estudio para el tratamiento y luego debe pasar un intervalo de al menos 4 días antes de recibir la primera inyección de rFVIIIc para el perfil PK.

Se hará el seguimiento de todos los sujetos durante un periodo de evaluación de seguridad de 14 días (336 horas) y 28 días después de la administración de rFVIIIc 25 UI/kg o 65 UI/kg por seguridad. Todos los sujetos se someterán a un muestreo farmacocinético antes y después de la dosificación junto con muestras de sangre para el análisis de la actividad del FVIII en puntos de tiempo designados.

#### Ejemplo 4

15

##### Actividad dentro del complejo Xase

Para investigar la unión de las proteínas FVIII (rBDD FVIII y rFVIIIc) con FIXa, y medir la capacidad de estas proteínas para activar FX, se realizaron estudios cinéticos examinando estas interacciones en el contexto del complejo Xase. Este ensayo implicó la formación del complejo Xase con FIX activado y la proteína rBDD FVIII o rFVIIIc activada en una superficie de fosfolípidos en presencia de calcio, y el control de la conversión de FX en FXa según se mide por escisión de un sustrato cromogénico o fluorogénico.

En resumen, el FVIII se activa primero con  $\alpha$ -trombina durante 5 minutos, luego se mezcla con FIXa en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , y vesículas fosfolípicas sintéticas (fosfatidilserina al 25%(PS)/fosfatidilcolina al 75% (PC)) o plaquetas. En las condiciones descritas a continuación, FVIIIa y FIXa interactúan en presencia de una superficie de fosfolípidos e iones de calcio para formar un complejo Xase activo que media la conversión de FX en FXa a través del procesamiento proteolítico. A su vez, FXa escinde un sustrato cromogénico o fluorogénico específico de FXa. El sustrato escindido es cromogénico y, por lo tanto, la cantidad de sustrato escindido en una solución es indicativa de la cantidad de FXa generada. Esto se cuantifica midiendo la absorbancia de la solución a 405 nm.

##### A. Activación del Factor X

La capacidad de rBDD FVIII y rFVIIIc para activar FX se estudió en el contexto del complejo Xase como se ha descrito anteriormente. Las proteínas de FVIII activadas por trombina se incubaron con FIXa y fosfolípidos en presencia de calcio, luego se añadieron a diferentes concentraciones de FX en presencia de un sustrato específico de FX y se determinaron las tasas de generación de FXa (Figura 11).

Basándose en estos datos, se calcularon la  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  para las diferentes proteínas FVIII en el contexto del complejo Xase (Chang 1997) (Tabla 11). Los datos se expresan como la media de seis análisis (3 experimentos que contienen realizaciones duplicadas)  $\pm$  la desviación estándar correspondiente. Basándose en estos datos, se encontró que estas proteínas (rBDD FVIII y rFVIIIc) tenían valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  comparables, dentro de la variación del ensayo. Por lo tanto, el complejo Xase formado con rFVIIIc se comporta de manera similar al complejo Xase formado con el producto patentado rBDD FVIII (ReFacto) con respecto a las interacciones con fosfolípidos y la capacidad de activar FX. Se ha de apreciar que estos datos comparables también demuestran que rFVIIIc se activa en un grado comparable como rBDD FVIII después de una breve incubación con trombina.

##### B. Interacción con FIXa

La interacción entre rBDD FVIII y rFVIIIc con FIXa también se examinaron en el contexto del complejo Xase. El complejo Xase se ensambló como anteriormente, utilizando una cantidad fija de FX y niveles variables de FIXa, y se determinaron las tasas de generación de FXa (Figura 12). A partir de estos datos, se determinó el valor de  $K_d$  para el complejo de Xase formado con ambas proteínas FVIII con respecto a FIXa (Chang 1997). Los datos se expresan como la media de seis análisis (3 experimentos que contienen realizaciones duplicadas)  $\pm$  la desviación estándar correspondiente (Tabla 12). Se encontró que ambas proteínas tenían valores similares de  $K_d$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , lo que indica que rFVIIIc tiene interacciones comparables con FIXa como el producto patentado rBDD FVIII.

#### Ejemplo 5

Los datos farmacocinéticos provisionales para el ensayo clínico de Fase I/IIa analizados en el Ejemplo 3

demostraron los siguientes resultados para FVIII<sub>INF</sub>. FVIII<sub>INF</sub> tenía aproximadamente un aumento del 50% en la exposición sistémica (AUC<sub>INF</sub>), aproximadamente un 50% de reducción en la depuración (Cl), y aproximadamente un 50-70% de aumento en la semivida de eliminación y el MRT en comparación con ADVATE (rFVIII de longitud completa). Además, FVIII<sub>INF</sub> mostró valores aumentados de C168, TBLP1, TBLP3 y TBLP5 en comparación con ADVATE.

AUC<sub>INF</sub> Área bajo la curva concentración-tiempo de cero a infinito

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

C168 Actividad estimada de FVIII<sub>INF</sub> por encima del valor inicial en aproximadamente 168 h después de la dosis

10 Cl Depuración

MRT Tiempo de residencia medio

TBLP1 Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII<sub>INF</sub> ha disminuido a aproximadamente 1 UI/dl por encima del valor inicial

TBLP3 Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII<sub>INF</sub> ha disminuido a aproximadamente 3 UI/dl por encima del valor inicial

15 TBLP5 Tiempo predicho por el modelo después de la dosis cuando la actividad de FVIII<sub>INF</sub> ha disminuido a aproximadamente 5 UI/dl por encima del valor inicial

### Ejemplo 6

20

Se ha creado una proteína de fusión recombinante del factor VIII-Fc (rFVIII<sub>INF</sub>) con el dominio B eliminado como un enfoque para extender la semivida del FVIII. La farmacocinética (PK) de rFVIII<sub>INF</sub> se comparó con rFVIII en ratones con hemofilia A. Se encontró que la semivida terminal fue el doble a la de rFVIII<sub>INF</sub> en comparación con rFVIII. Con el fin de confirmar que el mecanismo subyacente para la extensión de la semivida se debió a la protección de rFVIII<sub>INF</sub>

25 por FcRn, la PK se evaluó en ratones desactivados de FcRn y ratones transgénicos de FcRn humano. Se administró una sola dosis intravenosa (125 UI/kg) y se midió la concentración plasmática usando un ensayo de actividad cromogénica. La C<sub>máx</sub> fue similar entre rFVIII<sub>INF</sub> y rFVIII (XYNTHA®) en ambas cepas de ratón. Sin embargo, aunque la semivida de rFVIII<sub>INF</sub> fue comparable a la de rFVIII en los ratones desactivados de FcRn, la semivida para rFVIII<sub>INF</sub> se extendió aproximadamente dos veces más que la de rFVIII en los ratones transgénicos de hFcRn. Estos

30 resultados confirman que FcRn media o es responsable de la semivida prolongada de rFVIII<sub>INF</sub> en comparación con rFVIII. Dado que la hemostasis en sangre entera medida por tromboelastometría de rotación (ROTEM) se ha correlacionado con la eficacia de los factores de coagulación en modelos de hemorragia de ratones hemofílicos, así como en aplicaciones clínicas, se buscó evaluar la eficacia ex vivo de rFVIII<sub>INF</sub> en los ratones con hemofilia A usando ROTEM. A los ratones con hemofilia A se les administró una sola dosis intravenosa de 50 UI/kg de rFVIII<sub>INF</sub>,

35 XYNTHA® (FVIII) o ADVATE® (FVIII). A los 5 minutos después de la dosis, la formación de coágulos fue similar con respecto al tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulos (CFT) y el ángulo  $\alpha$ . Sin embargo, rFVIII<sub>INF</sub> mostró un CT significativamente mejorado 72 y 96 horas después de la dosis, y el CFT y el ángulo  $\alpha$  también mejoraron a las 96 horas en comparación con XYNTHA® (FVIII) y ADVATE® (FVIII), consistentes con una PK prolongada de rFVIII<sub>INF</sub>. Por lo tanto, la construcción de una fusión Fc del FVIII produce una molécula con un

40 mecanismo de acción definido que tiene una semivida aumentada y el potencial de proporcionar una protección prolongada contra el sangrado.

35 XYNTHA® (FVIII) o ADVATE® (FVIII). A los 5 minutos después de la dosis, la formación de coágulos fue similar con respecto al tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulos (CFT) y el ángulo  $\alpha$ . Sin embargo, rFVIII<sub>INF</sub> mostró un CT significativamente mejorado 72 y 96 horas después de la dosis, y el CFT y el ángulo  $\alpha$  también mejoraron a las 96 horas en comparación con XYNTHA® (FVIII) y ADVATE® (FVIII), consistentes con una PK prolongada de rFVIII<sub>INF</sub>. Por lo tanto, la construcción de una fusión Fc del FVIII produce una molécula con un

40 mecanismo de acción definido que tiene una semivida aumentada y el potencial de proporcionar una protección prolongada contra el sangrado.

### Ejemplo 7

45 Este Ejemplo presenta los resultados del análisis final para determinar la actividad de FVIII de 16 pacientes tratados con 25 y 65 UI/kg de productos de FVIII. Véanse los Ejemplos 3 y 5.

En este Ejemplo, rFVIII<sub>INF</sub> es una proteína de fusión recombinante que comprende una sola molécula de FVIII

humano recombinante con el dominio B eliminado (BDD-rFVIII) fusionado al dominio Fc dimérico de la IgG1 humana,

50 sin una secuencia de enlazador intermedia. Esta construcción de proteínas se también se denomina en el presente documento proteína híbrida heterodimérica de rFVIII<sub>INF</sub>, proteína de fusión Fc monomérica de FVIII<sub>INF</sub>, híbrido monomérico de FVIII<sub>INF</sub>, híbrido monomérico de FVIII<sub>INF</sub> y monómero-dímero de FVIII<sub>INF</sub>. Véanse el Ejemplo 1, Fig. 1, y la Tabla 2A.

55 Los estudios preclínicos con rFVIII<sub>INF</sub> han mostrado una prolongación de aproximadamente 2 veces de la semivida de la actividad de rFVIII en comparación con los productos de rFVIII comercialmente disponibles. El motivo de este estudio fue evaluar la seguridad y la tolerabilidad de una dosis única de rFVIII<sub>INF</sub> en una formulación líquida congelada y proporcionar datos sobre la PK en sujetos con hemofilia A grave. Para este estudio, 16 sujetos

evaluables estaban disponibles para la evaluación de PK. La administración única de dos dosis de rFVIII<sub>INF</sub> y Advate

60 a una dosis nominal de 25 (n = 6) y 65 UI/kg de peso corporal (n = 10) se infundieron por vía intravenosa durante

aproximadamente 10 minutos. Se obtuvieron muestras de sangre para las evaluaciones de PK en plasma antes de la infusión, así como hasta 10 días después de la dosificación. La PK de la actividad de FVIII para Advate y rFVIII Fc se caracterizaron en este estudio usando un método dependiente del modelo.

## 5 OBJETIVOS

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de la administración única de dos dosis de rFVIII Fc (25 y 65 UI/kg) en pacientes previamente tratados (PTP) de 12 años o más con hemofilia A grave.

- 10 Los objetivos secundarios fueron determinar los parámetros farmacocinéticos (PK) determinados por la actividad farmacodinámica (PD) del FVIII en el tiempo después de una administración única de 25 o 65 UI/kg de rFVIII Fc en comparación con Advate en ensayos de coagulación en una etapa y cromogénicos.

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

- 15 Se recogieron muestras de sangre para la evaluación PK de actividad de FVIII en la visita de selección (28 días antes de la dosificación de Advate); el Día 0 (inyección de Advate) antes de la inyección y a los 10 y 30 minutos y 1, 3, 6 y 9 horas después de la inyección; el Día 1 a las 24 horas después de la inyección de Advate; el Día 2 a las 48 horas después de la inyección de Advate; el Día 3 a las 72 horas después de la inyección de Advate; y el Día 4 a las 96 horas después de la inyección de dosis altas de Advate (Cohorte B solamente).

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

## 30 Modelos y cálculos farmacocinéticos

### Abreviaturas

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

40  $KV\_M = C_{\text{máx\_M}} / \text{Dosis real (UI/kg)}$

$KV\_OB = C_{\text{máx\_OB}} / \text{Dosis real (UI/kg)}$

45  $IVRM = 100 \times C_{\text{máx\_M}} \times \text{Volumen en plasma (dl)} / \text{Dosis total en UI; donde el volumen en plasma está en ml.} = (23,7 \times AI \text{ en cm}) + (9,0 \times P \text{ en kg}) - 1709.$

$IVROB = 100 \times C_{\text{máx\_OB}} \times \text{Volumen en plasma (dl)} / \text{Dosis total en UI; donde el volumen en plasma está en ml,} = (23,7 \times AI \text{ en cm}) + (9,0 \times P \text{ en kg}) - 1709.$

## RESULTADOS

- 50 Figura 13. Perfiles de actividad del FVIII media del grupo observado (+DE) en función del tiempo, ordenados por nivel de dosis, agrupados por compuesto (ensayo de una etapa, 25 UI/kg (A) y 65 UI/kg (B)) y (ensayo cromogénico, 25 UI/kg (C) y 65 UI/kg (D)).
- 55 Figura 14. Perfiles de la actividad de FVIII (+DE) media del grupo observado en función del tiempo, agrupados por nivel de dosis y compuesto (ensayo de una etapa; A) (ensayo cromogénico; B).

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

- 60 La actividad observada de FVIII aumentó bruscamente después de la infusión intravenosa corta de Advate o

rFVIIIc, con valores medios de  $C_{\text{máx}}$  pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) de  $56,6 \pm 4,74$  y  $121 \pm 28,2$  UI/dl para Advate y  $56,6 \pm 8,18$  y  $108 \pm 16,9$  UI/dl para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Todos los pacientes tratados con Advance y rFVIIIc tuvieron aumentos relacionados con la dosis en la actividad de FVIII. El aumento observado tanto en  $C_{\text{máx}}$  como en AUCINF fue ligeramente menor que el proporcional a la dosis en el intervalo de dosis evaluado.

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

La exposición sistémica total a FVIII (evaluada por AUCINF) fue ~48% y un 61% mayor después de la administración de rFVIIIc que Advate a niveles de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores medios de AUCINF pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) 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 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 relación a Advate. Los valores medios de MRT pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) fueron  $17,1 \pm 4,29$  y  $14,9 \pm 4,38$  h para Advate y  $25,9 \pm 5,60$  y  $26,5 \pm 10,1$  h para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de MRT parecen ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

Además, se determinaron los valores del parámetro PK primario para CL y V. Los valores de CL para rFVIIIc solo representaron ~66% de los observados para Advate en dosis equivalentes. Los valores medios de CL pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) fueron  $2,70 \pm 0,729$  y  $4,08 \pm 1,69$  ml/h/kg para Advate y  $1,80 \pm 0,409$  y  $2,69 \pm 1,25$  ml/h/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de V fueron comparables entre Advate y rFVIIIc con los valores medios de V pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) de  $43,9 \pm 4,27$  y  $56,1 \pm 13,4$  ml/kg para Advate y  $45,3 \pm 7,23$  y  $61,6 \pm 10,6$  ml/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Se observaron ligeros aumentos en los valores medios de CL y V al aumentar la dosis de Advate y rFVIIIc; sin embargo, el aumento de las desviaciones estándar a la dosis de 65 UI/kg, junto con los niveles de dosis limitados, confundió una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros. Por ejemplo, el valor de CL medio geométrico del % de CV para el grupo de tratamiento de rFVIIIc aumentó del 23,0% (25 UI/kg) al 48,6% (65 UI/kg).

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

El TBLP1 medio observado ( $\pm$ DE) fue  $2,88 \pm 0,733$  y  $2,93 \pm 0,848$  UI/dl por UI/kg para Advate y  $4,28 \pm 0,873$  y  $5,16 \pm 2,02$  UI/dl por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. El TBLP3 medio observado ( $\pm$ DE) fue  $2,06 \pm 0,527$  y  $2,26 \pm 0,666$  UI/dl por UI/kg para Advate y  $3,09 \pm 0,623$  y  $3,93 \pm 1,59$  UI/dl por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

Los valores medios de IVR y K calculados usando los valores de  $C_{\text{máx}}$  observados (restados con el fármaco inicial y residual dentro del modelo) fueron generalmente mayores que los valores determinados usando los valores de  $C_{\text{máx}}$  pronosticados por el modelo; consistente con una ligera subestimación de la actividad pico observada utilizando el modelo de un compartimiento. Los valores de K medios ( $\pm$ DE) observados fueron  $2,57 \pm 0,198$  y  $2,13 \pm 0,598$  UI/dl por UI/kg para Advate y  $2,46 \pm 0,330$  y  $1,85 \pm 0,332$  UI/dl por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de IVR medios ( $\pm$ DE) observados fueron  $94,1 \pm 15,6$  y  $85,8 \pm 16,5$  % para Advate y  $89,5 \pm 11,9$  y  $74,8 \pm 6,72$  % para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

#### Farmacocinética de dosis única (ensayo cromogénico)

60

La actividad observada de FVIII aumentó bruscamente después de la infusión intravenosa corta de Advate o rFVIIIc, con valores medios ( $\pm$ DE) de  $C_{\text{máx}}$  pronosticados 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.

- 5 Todos los pacientes tratados con Advate y rFVIIIc tuvieron aumentos relacionados con la dosis en la actividad de FVIII. El aumento observado tanto en  $C_{\text{máx}}$  como en AUCINF fue ligeramente menor que el proporcional a la dosis en el intervalo de dosis evaluado.

Después del final de la infusión, la disminución de la actividad de FVIII observada mostró características de desintegración monoexponenciales hasta que se alcanzó el nivel inicial. La velocidad de disminución de la actividad de FVIII fue más lenta para rFVIIIc que para Advate con valores medios ( $\pm$  DE) de semivida de eliminación pronosticados 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 semivida de eliminación parecen ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

15 La exposición sistémica total a FVIII (evaluada por AUCINF) fue ~53% y un 84% mayor después de la administración de rFVIIIc que Advate a niveles de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores medios de AUCINF pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) 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.

20 Similar a la semivida de eliminación, el MRT se prolongó para rFVIIIc con relación a Advate. Los valores medios de MRT pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) fueron  $15,3 \pm 2,86$  y  $56,1 \pm 4,72$  h para Advate y  $56,1 \pm 4,22$  y  $56,1 \pm 11,4$  h para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de MRT parecen ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

25 Además, se determinaron los valores del parámetro PK primario para CL y V. Los valores de CL para rFVIIIc solo representaron ~58-66% de los observados para Advate en dosis equivalentes. Los valores medios de CL pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) fueron  $56,1 \pm 0,527$  y  $56,1 \pm 1,40$  ml/h/kg para Advate y  $56,1 \pm 0,349$  y  $56,1 \pm 0,970$  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 los valores medios de V pronosticados por el modelo ( $\pm$ DE) de  $56,1 \pm 5,52$  y  $43,6$   $56,1 \pm 11,2$  ml/kg for Advate y  $56,1 \pm 6,65$  y  $56,1 \pm 8,91$  ml/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Se observaron aumentos en los valores medios de CL y V al aumentar la dosis de Advate y rFVIIIc; sin embargo, el aumento de las desviaciones estándar a 65 UI/kg junto con los niveles de dosis limitados, confundió una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros.

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

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

45 El TBLP1 medio observado ( $\pm$ DE) fue  $56,1 \pm 0,511$  y  $56,1 \pm 0,978$  UI/dl por UI/kg para Advate y  $56,1 \pm 0,798$  y  $56,1 \pm 2,38$  UI/dl por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. El TBLP3 medio observado ( $\pm$ DE) fue  $56,1 \pm 0,377$  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.

50 Los valores medios de IVR y K calculados usando los valores de  $C_{\text{máx}}$  observados (restados con el fármaco inicial y residual dentro del modelo) fueron generalmente mayores que los valores determinados usando los valores de  $C_{\text{máx}}$  pronosticados por el modelo; consistente con una ligera subestimación de la actividad pico observada utilizando el modelo de un compartimiento. Los valores de K medios ( $\pm$ DE) observados fueron  $56,1 \pm 0,429$  y  $56,1 \pm 0,721$  UI/dl por UI/kg para Advate y  $56,1 \pm 0,451$  y  $56,1 \pm 0,985$  UI/dl por UI/kg para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente. Los valores de IVR medios ( $\pm$ DE) observados fueron  $56,1 \pm 14,5$  y  $56,1 \pm 26,9$  % para Advate y  $56,1 \pm 16,3$  y  $56,1 \pm 33,6$  % para rFVIIIc para los grupos de dosis de 25 y 65 UI/kg, respectivamente.

## 60 CONCLUSIONES

Todos los pacientes tratados con Advance y rFVIII Fc tuvieron aumentos relacionados con la dosis comparables en  $C_{m\acute{a}x}$  y AUCINF en el intervalo de dosis evaluado. Los niveles plasmáticos pico de actividad de Advate y rFVIII Fc se observaron generalmente dentro de la primera hora después del final de la infusión y permanecieron detectables durante varios días después de la dosificación. Después del final de la infusión, la disminución en la actividad de FVIII corregida inicial mostró una disminución monoexponencial hasta que se alcanzó el valor inicial para ambos productos. Los valores de los parámetros para la semivida de eliminación y el MRT parecían ser independientes de la dosis en el intervalo de dosis evaluado para ambos productos de FVIII. Se observaron ligeros aumentos en los valores medios de CL y V al aumentar la dosis de Advate y rFVIII Fc; sin embargo, el aumento de la variabilidad interindividual a 65 UI/kg, junto con los niveles de dosis limitados, confundieron una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros.

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

Los parámetros PK obtenidos a partir de los resultados del Ensayo cromogénico generalmente son acorde a los del Ensayo de una etapa, excepto que el Ensayo cromogénico produjo una estimación más alta de los parámetros de exposición (por ejemplo,  $C_{m\acute{a}x}$ , AUCINF, etc.).

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

### Ejemplo 8

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

Se incluirán aproximadamente 106 sujetos en uno de tres regímenes: un régimen de profilaxis adaptado (grupo 1), un régimen de dosificación semanal (grupo 2) y un régimen a demanda (grupo 3).

#### Grupo 1: Régimen de profilaxis adaptado

El grupo 1 incluirá un grupo global y un subgrupo de PK. Se incluirán aproximadamente 66 sujetos. El régimen inicial será dos veces por semana a 25 UI/kg el primer día, seguido de 50 UI/kg el cuarto día de la semana. A los sujetos se les administrará rFVIII Fc en este régimen de profilaxis semanal hasta que estén disponibles los resultados de PK para rFVIII Fc. Basándose en estos resultados, se establecerá un régimen de profilaxis adaptado para cada individuo, en el que se determinará la dosis y el intervalo para mantener un nivel mínimo del 1-3% de actividad de FVIII. Después, a cada sujeto se le administrará su régimen de profilaxis adaptado durante todo el estudio.

Se supervisarán los sujetos durante todo el estudio y se realizarán ajustes continuos de dosis e intervalos. Solamente se harán ajustes cuando un sujeto experimente episodios hemorrágicos inaceptables definidos como  $\geq 2$  episodios de sangrado espontáneo durante un periodo de dos meses consecutivos. En este caso, el ajuste se dirigirá a niveles mínimos del 3-5%.

#### Grupo 2: Régimen de dosificación semanal

Se incluirán/asignarán al azar aproximadamente 20 sujetos y se someterán a un perfil PK de rFVIII Fc abreviado como se indica a continuación: Lavado de al menos 96 horas; una sola dosis de 65 UI/kg de rFVIII Fc; Muestreo abreviado que comienza con rFVIII Fc el Día 0, incluida la preinyección y 10 ( $\pm 2$ ) minutos, 3 horas 56,1  $\pm$  15 minutos), 72 56,1  $\pm$  2) horas [Día 3] y 96 56,1  $\pm$  2) horas [Día 4] desde el comienzo de la inyección. Después obtener el perfil PK abreviado, a los sujetos se les administrará una dosis fija de 65 UI/kg de rFVIII Fc cada 7 días.

#### Grupo 3: Brazo 3: Régimen a demanda

60

Se evaluarán en el estudio un mínimo de 10 cirugías mayores en al menos 5 sujetos. La cirugía mayor se define como cualquier procedimiento quirúrgico (electivo o de emergencia) que involucre anestesia general y/o asistencia respiratoria en la que se penetra y se expone una cavidad corporal importante, o para la cual se produce un deterioro sustancial de las funciones físicas o fisiológicas (por ejemplo, laparotomía, toracotomía, craneotomía, reemplazo articular y amputación de extremidades).

Para la profilaxis durante la cirugía, los sujetos se tratarán con 35 a 50 UI/kg de rFVIIIc cada 12 a 24 horas. Antes de la cirugía, el médico revisará el perfil PK de rFVIIIc del sujeto y evaluará el régimen de dosis de reemplazo de Factor VIII generalmente requerido para el tipo de cirugía planificada y el estado clínico del sujeto. La recomendación para la dosificación apropiada de rFVIIIc en el periodo de tratamiento quirúrgico, incluido cualquier tiempo de rehabilitación, tendrá en cuenta estos factores.

Los objetivos principales de este estudio son (a) evaluar la seguridad y la tolerabilidad de rFVIIIc administrado como regímenes de profilaxis, a demanda y de tratamiento quirúrgico; y (b) evaluar la eficacia de rFVIIIc administrado como régimen de profilaxis, a demanda y de tratamiento quirúrgico. Los objetivos secundarios de este estudio son (a) caracterizar el perfil PK de rFVIIIc y comparar la PK de FVIIIc con el producto comercializado actualmente, ADVATE; (b) evaluar respuestas individuales con FVIIIc; y (c) para evaluar el consumo de FVIIIc.

#### Objetivos principales

- Evaluar la seguridad y tolerabilidad de rFVIIIc administrado como regímenes de profilaxis, semanales, a demanda, y de tratamiento quirúrgico
- Evaluar la eficacia de rFVIIIc administrado como regímenes de profilaxis adaptada, a demanda, y de tratamiento quirúrgico

#### Objetivos secundarios

- Caracterizar el perfil PK de rFVIIIc y comparar la PK de rFVIIIc con el producto actualmente comercializado, Advate®
- Evaluar las respuestas individuales con rFVIIIc
- Caracterizar el rango de dosis y horarios requeridos para prevenir adecuadamente el sangrado en un régimen de profilaxis; mantener la homeostasis en un entorno quirúrgico; o tratar episodios de sangrado en un entorno a demanda, tratamiento semanal o profilaxis
- Evaluar el consumo de rFVIIIc (por ejemplo, consumo anual total de rFVIIIc por sujeto)

#### Ejemplo 9

##### Evaluación clínica ROTEM

- En el estudio en el Ejemplo 8, además de la medición de la actividad del FVIII en plasma por ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada (aPTT) en una etapa, también se ha explorado la tromboelastometría rotacional de sangre entera (ROTEM) para evaluar la mejora en la hemostasis global por rFVIIIc y Advate en 2 sujetos, específicamente, 1 en la cohorte de dosis baja y 1 en la cohorte de dosis alta.
- rFVIIIc y Advate parecen ser comparativamente activos en la formación de coágulos cuando se añaden a la sangre de los sujetos antes del tratamiento con rFVIIIc. El tiempo de coagulación (CT) fue lineal con respecto a la dosis de rFVIIIc y Advate en el intervalo de aproximadamente un 1% del 100% de lo normal, y la respuesta a la dosis fue comparable entre rFVIIIc y Advate en el mismo sujeto.
- Después de la dosificación con Advate y posteriormente rFVIIIc, se tomaron muestras de sangre entera citrada en diversos puntos de tiempo y se controló la formación de coágulos después de la recalcificación mediante ROTEM. A pesar del CT inicial variable debido a los niveles de residuos de FVIII antes de la dosificación de Advate o rFVIIIc, ambos productos corrigieron eficazmente el CT a niveles comparables 30 minutos después de la inyección. Además, la mejora en el CT se mantuvo mejor en y después de 3 horas después de la inyección de 25 UI/kg de rFVIIIc con respecto a Advate en el sujeto dosificado a esta dosis baja. Sin embargo, la mejora diferencial de rFVIIIc frente a Advate fue mucho menos apreciable a la dosis de 65 UI/kg.

Tablas

- Tabla 1: Secuencias de polinucleótidos

**A. FVIIIc con dominio B eliminado**

(i) Secuencia de ADN de cadena de FVIIIc con dominio B eliminado (péptido señal de FVIII subrayado, región Fc en negrita) (SEQ ID NO:1, que codifica la SEQ ID NO:2)

661				A	TGCAAATAGA	GCTCTCCACC	TGCTTCTTTC
721	<u>TGTGCCTTTT</u>	GCGATTCTGC	TTTAGTGCCA		CCAGAAGATA	CTACCTGGGT	GCAGTGGAAC
781	TGTCATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG		GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCCCTC
841	CTAGAGTGCC	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	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA		AAGAGAATGG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTTCATG		TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC
1261	TCATTGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG		GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGTGTAT		TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG		CTGCATCTGC	TCGGGCCTGG	CCTAAAATGC
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC		TGCCAGGTCT	GATTGGATGC	CACAGGAAAT
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAAATGGCA		CCACTCCTGA	AGTGCCTCA	ATATTCCTCG
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTTGG	AGGAACCATC		GCCAGGCGTC	CTTGGAATC	TGCAAAATA
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG		ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTGTGCATA
1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG		CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG		AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG		ATGACAACCT	TCCTTCCTTT	ATCCAAATTC
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT		GGGTACATTA	CATTGCTGTG	GAAGAGGAGG
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCTCGCCC		CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA		AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATAACA
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA		TTCAGCATGA	ATCAGGAATC	TTGGGACCTT
2101	TACTTTATGG	GGAAAGTTGGA	GACACACTGT		TGATTATATT	TAAGAAATCAA	GCAAGCAGAC
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAAATCACTG		ATGTCCGTCC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC
2221	CAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC		CAATTCTGCC	AGGAGAAATA	TTCAAATATA
2281	AATGGACAGT	GACTGTAGAA	GATGGGCCAA		CTAAATCAGA	TCCTCGGTGC	CTGACCCGCT
2341	ATTACTCTAG	TTTCGTTAAT	ATGGAGAGAG		ATCTAGCTTC	AGGACTCATT	GGCCCTCTCC
2401	TCATCTGCTA	CAAAGAATCT	GTAGATCAAA		GAGGAAACCA	GATAATGTCA	GACAAGAGGA
2461	ATGTCATCCT	GTTTTCTGTA	TTTGATGAGA		ACCGAAGCTG	GTACCTCACA	GAGAATATAC
2521	AACGCTTTCT	CCCCAATCCA	GCTGGAGTGC		AGCTTGAGGA	TCCAGAGTTC	CAAGCCTCCA
2581	ACATCATGCA	CAGCATCAAT	GGCTATGTTT		TTGATAGTTT	GCAGTTGTCA	GTTTGTGTTGC
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA		TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTTCTGTCT
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA		TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCTATTCC
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCTGA		TGGAAAACCC	AGGTCTATGG	ATTCTGGGGT
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA		TGACCCCTTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTTG
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA		GTTATGAAGA	TATTTCAGCA	TACTTGCTGA
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT		TCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC		AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG		ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAAAC		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	GTAAC TTTC A	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAAC T TACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA
3541	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTTCTC	TGATGTTGAC	CTGGAAAAAG
3601	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCCCTG
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC	TTTGATGAGA
3721	CCAAAAGCTG	G TACTTCACT	GAAAAATATGG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC
3781	AGATGGAAGA	TCCCAC TTT	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	GCTGGAAATTT	GGCGGGTGG A	ATGCC TTATT	GGCGAGCATC
4081	TACATGCTGG	GATGAGCACA	CTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCCTGG
4141	GAATGGCTTC	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA	TATGGACAGT
4201	GGGCCCCAAA	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG	AGCACC AAG
4261	AGCCCTTTTC	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GATTATTCAC	GGCATCAAGA
4321	CCCAGGGTGC	CCGTCAGAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA
4381	GTCTTGATGG	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT
4441	TC TTTGGCAA	TGTGGATFCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTTAACCCCT	CCAATTATTG
4501	CTCGATACAT	CCGTTTGCAC	CCAAC TCAAT	ATAGCATTCG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT
4561	TGATGGGCTG	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT
4621	CAGATGCACA	GATTACTGCT	TCATCTACT	TTACCAATAT	GTTTGGCCACC	TGGTCTCCTT
4681	CAAAAGCTCG	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC
4741	CAAAAGAGTG	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAAC TACTC
4801	AGGGAGTAAA	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTCCCTCATC	TCCAGCAGTC
4861	AAGATGGCCA	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA
4921	ATCAAGACTC	CTTCACACCT	GTGGTGAAC T	CTCTAGACCC	ACCGT TACTG	ACTCGCTACC
4981	TTCGAATTCA	CCCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT
5041	GCGAGGCACA	GGACCTCTAC	<b>GACAAAAC T C</b>	<b>ACACATGCC C</b>	<b>ACCGTGCCCA</b>	<b>GCTCCAGAAC</b>
5101	<b>TCCTGGGGCGG</b>	<b>ACCGTCAGTC</b>	<b>TTCTCTTTCC</b>	<b>CCCCAAAACC</b>	<b>CAAGGACACC</b>	<b>CTCATGATCT</b>
5161	<b>CCCGGACCCC</b>	<b>TGAGGTCACA</b>	<b>TGCGTGGTGG</b>	<b>TGGACGTGAG</b>	<b>CCACGAAGAC</b>	<b>CCTGAGGTCA</b>
5221	<b>AGTTCAACTG</b>	<b>GTACGTGGAC</b>	<b>GGCGTGGAGG</b>	<b>TGCATAATGC</b>	<b>CAAGACAAAG</b>	<b>CCCGGGGAGG</b>
5281	<b>AGCAGTACAA</b>	<b>CAGCACGTAC</b>	<b>CGTGTGGTCA</b>	<b>GCGTCCTCAC</b>	<b>CGTCCTGCAC</b>	<b>CAGGACTGGC</b>
5341	<b>TGAATGGCAA</b>	<b>GGAGTACAAG</b>	<b>TGCAAGGTCT</b>	<b>CCAACAAAGC</b>	<b>CCTCCCAGCC</b>	<b>CCCATCGAGA</b>
5401	<b>AAACCATCTC</b>	<b>CAAAGCCAAA</b>	<b>GGGCAGCCCC</b>	<b>GAGAACCACA</b>	<b>GGTGTACACC</b>	<b>CTGCCCCCAT</b>
5461	<b>CCCGGGATGA</b>	<b>GCTGACCAAG</b>	<b>AACCAGGTCA</b>	<b>GCCTGACCTG</b>	<b>CCTGGTCAAAA</b>	<b>GGCTTCTATC</b>
5521	<b>CCAGCGACAT</b>	<b>CGCCGTGGAG</b>	<b>TGGGAGAGCA</b>	<b>ATGGGCAGCC</b>	<b>GGAGAACAAC</b>	<b>TACAAGACCA</b>
5581	<b>CGCCTCCCGT</b>	<b>GTTGGACTCC</b>	<b>GACGGCTCCT</b>	<b>TCTTCTCTA</b>	<b>CAGCAAGCTC</b>	<b>ACCGTGGACA</b>
5641	<b>AGAGCAGGTG</b>	<b>GCAGCAGGGG</b>	<b>AACGTCTTCT</b>	<b>CATGCTCCGT</b>	<b>GATGCATGAG</b>	<b>GCTCTGCACA</b>
5701	<b>ACC ACTACAC</b>	<b>GCAGAAGAGC</b>	<b>CTCTCCCTGT</b>	<b>CTCCGGGTAA</b>	<b>A</b>	□□

**(ii) Secuencia de ADN Fc (péptido señal de Iqk de ratón subrayada) (SEQ ID NO:3, que codifica SEQ ID NO:4)**

7981					<u>ATGGA</u>	<u>GACAGACACA</u>
8041	<u>CTCTGCTAT</u>	<u>GGGTACTGCT</u>	<u>GCTCTGGGTT</u>	<u>CCAGGTTCCA</u>	<u>CTGGTGACAA</u>	<u>AACTCACACA</u>
8101	<u>TGCCACCGT</u>	<u>GCCCAGCACC</u>	<u>TGAACTCCTG</u>	<u>GGAGGACCGT</u>	<u>CAGTCTTCTT</u>	<u>CTTCCCCCA</u>
8161	<u>AAACCCAAGG</u>	<u>ACACCC TCA T</u>	<u>GATCTCCCGG</u>	<u>ACCCCTGAGG</u>	<u>TCACATGCGT</u>	<u>GGTGGTGGAC</u>
8221	<u>GTGAGCCACG</u>	<u>AAGACCC TGA</u>	<u>GGTCAAGTTC</u>	<u>AACTGGTACG</u>	<u>TGGACGGCGT</u>	<u>GGAGGTGCAT</u>
8281	<u>AATGCCAAGA</u>	<u>CAAAGCCGCG</u>	<u>GGAGGAGCAG</u>	<u>TACAACAGCA</u>	<u>CGTACCGTGT</u>	<u>GGTCAGCGTC</u>
8341	<u>CTCACCGTCC</u>	<u>TGCACCAGGA</u>	<u>CTGGCTGAAT</u>	<u>GGCAAGGAGT</u>	<u>ACAAGTGCAA</u>	<u>GGTCTCCAAC</u>
8401	<u>AAAGCCCTCC</u>	<u>CAGCCCCCAT</u>	<u>CGAGAAAACC</u>	<u>ATCTCCAAG</u>	<u>CCAAAGGGCA</u>	<u>GCCCCGAGAA</u>
8461	<u>CCACAGGTGT</u>	<u>ACACCC T GCC</u>	<u>CCCATCCCGC</u>	<u>GATGAGCTGA</u>	<u>CCAAGAACCA</u>	<u>GGTCAGCCTG</u>
8521	<u>ACCTGCCTGG</u>	<u>TCAAAGGCTT</u>	<u>CTATCC CAGC</u>	<u>GACATCGCCG</u>	<u>TGGAGTGGGA</u>	<u>GAGCAATGGG</u>
8581	<u>CAGCCGGAGA</u>	<u>ACA ACTACAA</u>	<u>GACCACGCCT</u>	<u>CCCGTGT TGG</u>	<u>ACTCCGACGG</u>	<u>CTCCTTCTTC</u>
8641	<u>CTCTACAGCA</u>	<u>AGCTCACCGT</u>	<u>GGACAAGAGC</u>	<u>AGGTGGCAGC</u>	<u>AGGGGAACGT</u>	<u>CTTCTCATGC</u> □□
8701	<u>TCCGTGATGC</u>	<u>ATGAGGCTCT</u>	<u>GCACAACCAC</u>	<u>TACACGCAGA</u>	<u>AGAGCCTCTC</u>	<u>CCTGTCTCCG</u>
8761	<u>GGTAAA</u>					□□

**B. FVIII Fc de longitud completa**

**(i) Secuencia de ADN de FVIII Fc de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado. Región Fc en negrita) (SEQ ID NO:5, que codifica la SEQ ID NO:6)**

ES 2 659 888 T3

661					ATG	CAAATAGAGC	TCTCCACCTG
721	CTTCTTTCTG	TGCCTTTTGC	GATTCTGCTT	TAGTGCCACC	AGAAGATACT	ACCTGGGTGC	
781	AGTGGAACCTG	TCATGGGACT	ATATGCAAAG	TGATCTCGGT	GAGCTGCCTG	TGGACGCAAG	
841	ATTTCCCTCCT	AGAGTGCCAA	AATCTTTTCC	ATTCAACACC	TCAGTCGTGT	ACAAAAAGAC	
901	TCTGTTTGTA	GAATTCACGG	ATCACCTTTT	CAACATCGCT	AAGCCAAGGC	CACCTGGAT	
961	GGGTCTGCTA	GGTCCTACCA	TCCAGGCTGA	GGTTTATGAT	ACAGTGGTCA	TTACACTTAA	
1021	GAACATGGCT	TCCCATCCTG	TCAGTCTTCA	TGCTGTTGGT	GTATCCTACT	GGAAAGCTTC	
1081	TGAGGGAGCT	GAATATGATG	ATCAGACCAG	TCAAAGGGAG	AAAGAAGATG	ATAAAGTCTT	
1141	CCCTGGTGGA	AGCCATACAT	ATGTCTGGCA	GGTCCTGAAA	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	TGATCGAGGA	TAGGGATGCT	GCATCTGCTC	GGCCTGGCC	
1441	TAAAATGCAC	ACAGTCAATG	GTTATGTAAA	CAGGTCTCTG	CCAGGTCTGA	TTGGATGCCA	
1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AATGGGCACC	ACTCCTGAAG	TGCACTCAAT	
1561	ATTCTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC	CAGGCGTCCCT	TGGAAATCTC	
1621	GCCAATAACT	TTCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC	CTTGGACAGT	TTCTACTGTT	
1681	TTGTCATATC	TCTTCCCACC	AACATGATGG	CATGGAAGCT	TATGTCAAAG	TAGACAGCTG	
1741	TCCAGAGGAA	CCCCAECTAC	GAATGAAAAA	TAATGAAGAA	GCGGAAGACT	ATGATGATGA	
1801	TCTTACTGAT	TCTGAAATGG	ATGTGGTCAG	GTTTGTGATG	GACAACCTCTC	CTTCCTTTAT	
1861	CCAAATTCGC	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACCTGG	GTACATTACA	TTGCTGTCTGA	
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CCTCGCCCCC	GATGACAGAA	GTTATAAAAAG	
1981	TCAAATTTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG	TACAAAAAAG	TCCGATTTAT	
2041	GGCATAACACA	GATGAAACCT	TTAAGACTCG	TGAAGCTATT	CAGCATGAAT	CAGGAATCTT	
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG	ATTATATTTA	AGAATCAAGC	
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCACGG	AATCACTGAT	GTCCGTCCTT	TGTATTCAAG	
2221	GAGATTACCA	AAAGGTGTAA	AACATTTGAA	GGATTTTCCA	ATTCTGCCAG	GAGAAATATT	
2281	CAAAATATAAA	TGGACAGTGA	CTGTAGAAGA	TGGGCCAACT	AAATCAGATC	CTCGGTGCCT	
2341	GACCCGCTAT	TACTCTAGTT	TCGTTAATAT	GGAGAGAGAT	CTAGCTTCAG	GACTCATTGG	
2401	CCCTCTCCTC	ATCTGCTACA	AAGAATCTGT	AGATCAAAGA	GGAAACCAGA	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	TTCTCTGGAT	ATACCTTCAA	ACACAAAATG	GTCTATGAAG	ACACACTCAC	
2761	CCTATTCCCA	TTCTCAGGAG	AAACTGTCTT	CATGTCGATG	GAAAACCCAG	GTCTATGGAT	
2821	TCTGGGGTGC	CACAACCTAG	ACTTTCGGAA	CAGAGGCATG	ACCGCCTTAC	TGAAGGTTTC	
2881	TAGTTGTGAC	AAGAACACTG	GTGATTATTA	CGAGGACAGT	TATGAAGATA	TTTCAGCATA	
2941	CTTGCTGAGT	AAAAACAATG	CCATTGAACC	AAGAAGCTTC	TCCCAGAATT	CAAGACACCC	
3001	TAGCACTAGG	CAAAAGCAAT	TTAATGCCAC	CACAATTCCA	GAAAATGACA	TAGAGAAGAC	
3061	TGACCCTTGG	TTTGCACACA	GAACACCTAT	GCCTAAAATA	CAAAATGTCT	CCTCTAGTGA	
3121	TTTGTGATG	CTCTTGGCAG	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	AAACTTGATT	TCAAAGTTTC	TAGTACATCA	AATAATCTGA	TTTCAACAAT	
3421	TCCATCAGAC	AATTTGGCAG	CAGGTACTGA	TAATACAAGT	TCCTTAGGAC	CCCCAAGTAT	
3481	GCCAGTTCAT	TATGATAGTC	AATTAGATAC	CACTCTATTT	GGCAAAAAGT	CATCTCCCTT	
3541	TACTGAGTCT	GGTGGACCTC	TGAGCTTGAG	TGAAGAAAAT	AATGATTCAA	AGTTGTTAGA	□□

3601	ATCAGGTTTA	ATGAATAGCC	AAGAAAGTTC	ATGGGGAAAA	AATGTATCGT	CAACAGAGAG
3661	TGGTAGGTTA	TTTAAAGGGA	AAAGAGCTCA	TGGACCTGCT	TTGTTGACTA	AAGATAATGC
3721	CTTATTCAAA	GTTAGCATCT	CTTTGTTAAA	GACAAACAAA	ACTTCCAATA	ATTCAGCAAC
3781	TAATAGAAA	ACTCACATTG	ATGGCCCATC	ATTATTAATT	GAGAATAGTC	CATCAGTCTG
3841	GCAAAATATA	TTAGAAAGTG	ACACTGAGTT	TAAAAAAGTG	ACACCTTTGA	TTCATGACAG
3901	AATGCTTATG	GACAAAAATG	CTACAGCTTT	GAGGCTAAAT	CATATGTCAA	ATAAAACTAC
3961	TTCATCAAAA	AACATGGAAA	TGGTCCAACA	GA AAAAAGAG	GGCCCCATT	CACCAGATGC
4021	ACAAAATCCA	GATATGTCTG	TCTTAAAGAT	GCTATTCTTG	CCAGAATCAG	CAAGGTGSAT
4081	ACA AAGACT	CATGGAAAGA	ACTCTCTGAA	CTCTGGGCAA	GGCCCCAGTC	CRAAGCAATT
4141	AGTATCCTTA	GGACCAGAAA	AATCTGTGGA	AGGTCAGAA	TTCTTGCTG	AGAAAAACAA
4201	AGTGGTAGTA	GGAAAGGGTG	AATTTACAAA	GGACGTAGGA	CTCAAAGAGA	TGGTTTTTCC
4261	AAGCAGCAGA	AACCTATTTT	TTACTAACTT	GGATAATTTA	CATGAAAATA	CATCACACAA
4321	TCAAGAAAA	AAAATTCAGG	AAGAAATAGA	AAAGAAGGAA	ACATTAATCC	AAGAGAATGT
4381	AGTTTTGCCT	CAGATACATA	CAGTACTGAG	CACCTAAGAA	TTCATGAAGA	ACCTTTCTTT
4441	ACTGAGCACT	AGGCAAAATG	TAGAAGGTTT	ATATGACGGG	GCATATGCTC	CAGTACTTCA
4501	AGATTTTAGG	TCATTAATG	ATTCAACAAA	TAGAACAAAG	AAACACACAG	CTCAGTTCTC
4561	AAAAAAGGG	GAGGAAGAAA	ACTTGGAAAG	CTTGGGAAAT	CAAACCAAGC	AAATTGTAGA
4621	GAAATATGCA	TGCACCACAA	GGATATCTCC	TAATACAAGC	CAGCAGAAAT	TTGTCAACGCA
4681	ACCTAGTAAG	AGAGCTTTGA	AACTATTCAG	ACTCCCCTA	GAAGAAACAG	AACTTGAAAA
4741	AAGCATAAAT	GTGGATGACA	CCTCAACCCA	GTGGTCCAAA	AACATGAAAC	ATTTGACCCC
4801	GAGCACCCCT	ACACAGATAG	ACTACAATGA	GAAGGAGAAA	GGGGCCATTA	CTCAGTCTCC
4861	CTTATCAGAT	TGCCTTACGA	GGAGTCATAG	CATCCCCTAA	GCAAAATAGAT	CTCCATACCC
4921	CATTGCAAAG	GTATCATCAT	TTCCATCTAT	TAGACCTATA	TATCTGACCA	GGGTCTTATT
4981	CCAAGACAAC	TCTTCTCATC	TTCCAGCAGC	ATCTTATAGA	AAGAAAAGAT	CTGGGGTCCA
5041	AGAAAGCAGT	CATTTCTTAC	AAGGAGCCAA	AAAAAATAAC	CTTTCTTTAG	CCATTCTAAC
5101	CTTGGAGATG	ACTGGTGTAT	AAAGAGAGGT	TGGCTCCCTG	GGGACAAGTG	CCACAATTC
5161	AGTCACATAC	AAGAAAAGTT	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA	CCAGACTTGC	CCAAAACATC
5221	TGGCAAGATT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTTATCAG	AAGGACCTAT	TCCCTACCGA
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGAA	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGA	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAAGA	GTGGAAATCC	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA
5521	AACACCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCCAAAATA	GAAGTCACCT	GGGCAAGGCA
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TGAAAACGCC	ATCAACGGGA
5701	AATAAATCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATG	GACTATGATG	ATACCATATC
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	AGAGCCCCCC
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATGTCTGCA	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA
5941	GTTCAACAAA	TTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	CCTTATACCG
6001	TGGAGAACATA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA
6061	TAATATCATG	GTAACCTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAACT	TTGTCAAAGCC
6181	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	CTAAAAGATGA
6241	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC	CTGAAAAAAG	ATGTGCACTC
6301	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA	CTGAACCTTG	CTCATGGGAG
6361	ACAAGTCACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTACCATC	TTTGTATGAGA	CCAAAAGCTG
6421	GTACTTCACT	GAAAATATGG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC	TGCAATATCC	AGATGGGAAGA
6481	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT	GGCTACATAA	TGGATACACT
6541	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTCGATGG	TATCTGTCTA	GCATGGGCAG
6601	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTTATTTCTG	TGGACATGTG	TTCCTGTGAC	GAAAAAAGA
6661	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT	TTTGAGACAG	TGGAAATGTT
6721	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGG	ATGCCTTATT	GGCGAGCATC	TACATGCTGG
6781	GATGAGCACA	CTTTTCTG	TGTACAGCAA	TAAGTGTGAG	ACTCCCCTGG	GAATGGCTTC
6841	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTTCAAGCAA	TATGGACAGT	GGGCCCCAAA
6901	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCTTGG	AGCACCAGAG	AGCCCTTTTC
6961	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GACTATTAC	GGCATCAAGA	CCCAGGGTGC
7021	CCGTCCAGAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC	ATCATGTATA	GTCTTGTATGG
7081	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC	TTAATGGTCT	TCTTTGGCAA □ □

7141	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTTAACCCCT	CCAATTATG	CTCGATACAT
7201	CCGTTTGCAC	CCAACCTCATT	ATAGCATTTCG	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT	TGATGGGCTG
7261	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT	CAGATGCACA
7321	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT	CAAAAGCTCG
7381	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG	GTGAATAATC	CAAAAGAGTG
7441	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA	GTAACACTC	AGGGAGTAAA
7501	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA	GTTCCCTCATC	TCCAGCAGTC	AAGATGGCCA
7561	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA	ATCAAGACTC
7621	CTTACACACT	GTGGTGAAC	CTCTAGACCC	ACCGTTACTG	ACTCGCTACC	TTCGAATTCA
7681	CCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT	GAGGATGGAG	GTTCTGGGGT	GCGAGGCACA
7741	GGACCTCTAC	<b>GACAAAAC</b>	<b>ACACATGGCC</b>	<b>ACCGTGCCCA</b>	<b>GCTCCAGAAC</b>	<b>TCTTGGGCGG</b>
7801	<b>ACCGTCAGTC</b>	<b>TTCCTCTTCC</b>	<b>CCCCAAAACC</b>	<b>CAAGGACACC</b>	<b>CTCATGATCT</b>	<b>CCCGGACCCC</b>
7861	<b>TGAGGTCACA</b>	<b>TGCGTGGTGG</b>	<b>TGGACGTGAG</b>	<b>CCACGAAGAC</b>	<b>CCTGAGGTCA</b>	<b>AGTTCAACTG</b>
7921	<b>GTACGTGGAC</b>	<b>GGCGTGGAGG</b>	<b>TGCATAATGC</b>	<b>CAAGACAAAG</b>	<b>CCGCGGGAGG</b>	<b>AGCAGTACAA</b>
7981	<b>CAGCACGTAC</b>	<b>CGTGTGGTCA</b>	<b>GCGTCCTCAC</b>	<b>CGTCCCTGCAC</b>	<b>CAGGACTGGC</b>	<b>TGAATGGCAA</b>
8041	<b>GGAGTACAAG</b>	<b>TGCAAGGTCT</b>	<b>CCAACAAGC</b>	<b>CCTCCAGCC</b>	<b>CCCATCGAGA</b>	<b>AAACCATCTC</b>
8101	<b>CAAAGCCAAA</b>	<b>GGGCAGCCCC</b>	<b>GAGAACCACA</b>	<b>GGTGTACACC</b>	<b>CTGCCCCCAT</b>	<b>CCCGGGATGA</b>
8161	<b>GCTGACCAAG</b>	<b>AACCAGGTCA</b>	<b>GCCTGACCTG</b>	<b>CCTGGTCAA</b>	<b>GGCTTCTATC</b>	<b>CCAGCGACAT</b>
8221	<b>CGCCGTGGAG</b>	<b>TGGGAGAGCA</b>	<b>ATGGGCAGCC</b>	<b>GGAGAACAAC</b>	<b>TACAAGACCA</b>	<b>CGCTCCCCGT</b>
8281	<b>GTTGGACTCC</b>	<b>GACGGCTCCT</b>	<b>TCTTCTCTA</b>	<b>CAGCAAGCTC</b>	<b>ACCGTGGACA</b>	<b>AGAGCAGGTG</b>
8341	<b>GCAGCAGGGG</b>	<b>AACGTCTTCT</b>	<b>CATGCTCCGT</b>	<b>GATGCATGAG</b>	<b>GCTCTGCACA</b>	<b>ACCACTACAC</b>
8401	<b>GCAGAAGAGC</b>	<b>CTCTCCCTGT</b>	<b>CTCCGGGTAA</b>	<b>A</b>		

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

**C.**

(i) Secuencia de ADN de cadena pesada (HC)-Fc (sin enlazador entre HC y Fc) (péptido señal subrayado. región Fc en negrita) (SEQ ID NO:7, que codifica la SEQ ID NO:8)

1	<u>ATGCAAATAG</u>	AGCTCTCCAC	CTGCTTCTTT	CTGTGCCTTT	TGCGATTCTG	CTTTAGTGCC
61	<u>ACCAGAAGAT</u>	ACTACCTGGG	TGCAGTGAAA	CTGTCATGGG	ACTATATGCA	AAGTGATCTC
121	<u>GGTGAGCTGC</u>	CTGTGGACGC	AAGATTTCTT	CCTAGAGTGC	CAAAATCTTT	TCCATTCAAC
181	<u>ACCTCAGTCG</u>	TGTACAAAAA	GACTCTGTTT	GTAGAATTCA	CGGATCACCT	TTTCAACATC
241	<u>GCTAAGCCAA</u>	GGCCACCCTG	GATGGGTCTG	CTAGGTCCCTA	CCATCCAGGC	TGAGGTTTAT
301	<u>GATACAGTGG</u>	TCATTACACT	TAAGAACATG	GCTTCCCATC	CTGTCACTCT	TCATGCTGTT
361	<u>GGTGTATCCT</u>	ACTGGAAAGC	TTCTGAGGGA	GCTGAATATG	ATGATCAGAC	CAGTCAAAGG
421	<u>GAGAAAGAAG</u>	ATGATAAAGT	CTTCCCTGGT	GGAAGCCATA	CATATGTCTG	GCAGGTCCCTG
481	<u>AAAGAGAATG</u>	GTCCAATGGC	CTCTGACCCA	CTGTGCCTTA	CCTACTCATA	TCTTTCTCAT
541	<u>GTGGACCTGG</u>	TAAAAGACTT	GAATTCAGGC	CTCATTGGAG	CCCTACTAGT	ATGTAGAGAA
601	<u>GGGAGTCTGG</u>	CCAAGGAAAA	GACACAGACC	TTGCACAAAT	TTATACTACT	TTTTGCTGTA
661	<u>TTTGATGAAG</u>	GGAAAAGTTG	GCACTCAGAA	ACAAAGAACT	CCTTGATGCA	GGATAGGGAT
721	<u>GCTGCATCTG</u>	CTCGGGCCTG	GCCTAAAATG	CACACAGTCA	ATGGTTATGT	AAACAGGTCT
781	<u>CTGCCAGGTC</u>	TGATTGGATG	CCACAGGAAA	TCAGTCTATT	GGCATGTGAT	TGGAATGGGC
841	<u>ACCCTCCTG</u>	AAGTGCACCTC	AATATTCCTC	GAAGGTCACA	CATTTCTTGT	GAGGAACCAT
901	<u>CGCCAGGCGT</u>	CCTTGGAAAT	CTCGCCAATA	ACTTTCCTTA	CTGCTCAAAC	ACTCTTGATG
961	<u>GACCTTGGAC</u>	AGTTTCTACT	GTTTTGTGAT	ATCTCTTCCC	ACCAACATGA	TGGCATGGAA
1021	<u>GCTTATGTCA</u>	AAGTAGACAG	CTGTCCAGAG	GAACCCCAAC	TACGAATGAA	AAATAATGAA
1081	<u>GAAGCGGAAG</u>	ACTATGATGA	TGATCTTACT	GATTCTGAAA	TGGATGTGGT	CAGGTTTGAT
1141	<u>GATGACAACT</u>	CTCCTTCTT	TATCCAAATT	CGCTCAGTTG	CCAAGAAGCA	TCCTAAAAC
1201	<u>TGGGTACATT</u>	ACATTGCTGC	TGAAGAGGAG	GACTGGGACT	ATGCTCCCTT	AGTCTCGCC
1261	<u>CCCGATGACA</u>	GAAGTTATAA	AAGTCAATAT	TTGAACAATG	GCCCTCAGCG	GATTGGTAGG
1321	<u>AAGTACAAAA</u>	AAGTCCGATT	TATGGCATAAC	ACAGATGAAA	CCTTTAAGAC	TCGTGAAGCT
1381	<u>ATTACAGCATG</u>	AATCAGGAAT	CTTGGGACCT	TTACTTTATG	GGGAAGTTGG	AGACACACTG

1441	TTGATTATAT	TTAAGAATCA	AGCAAGCAGA	CCATATAACA	TCTACCCTCA	CGGAATCACT
1501	GATGTCGGTC	CTTGATATC	AAGGAGATTA	CCAAAAGGTG	TAAAACATTT	GAAGGATTTT
1561	CCAATCTGTC	CAGGAGAAAT	ATTCAAATAT	AAATGGACAG	TGACTGTAGA	AGATGGGCCA
1621	ACTAAATCAG	ATCCTCGGTG	CCTGACCCGC	TATTACTCTA	GTTTCGTAA	TATGGAGAGA
1681	GATCTAGCTT	CAGGACTCAT	TGGCCCTCTC	CTCATCTGCT	ACAAAAGAATC	TGTAGATCAA
1741	AGAGGAAACC	AGATAATGTC	AGACAAGAGG	AATGTCATCC	TGTTTTCTGT	ATTTGATGAG
1801	AACCGAAGCT	GGTACCTCAC	AGAGAATATA	CAACGCTTTC	TCCCCAATCC	AGCTGGAGTG
1861	CAGCTTGAGG	ATCCAGAGTT	CCAAGCCTCC	AACATCATGC	ACAGCATCAA	TGGCTATGTT
1921	TTTGATAGTT	TGCAGTTGTC	AGTTTGTITG	CATGAGGTGG	CATACTGGTA	CATTCTAAGC
1981	ATTGGAGCAC	AGACTGACTT	CCTTTCTGTC	TTCTTCTCTG	GATATACCTT	CAAACACAAA
2041	ATGGTCTATG	AAGACACACT	CACCCTATTC	CCATCTCAG	GAGAAACTGT	CTTCATGTCTG
2101	ATGGAAAACC	CAGGTCTATG	GATTCTGGGG	TGCCACAAC	CAGACTTTCG	GAACAGAGGC
2161	ATGACCGCCT	TACTGAAGGT	TTCTAGTTGT	GACAAGAACA	CTGGTGATTA	TTACGAGGAC
2221	AGTTATGAAG	ATATTTTCAGC	ATACTTGCTG	AGTAAAAACA	ATGCCATTGA	ACCAAGAGAC
2281	<b>AAA</b> ACTCACA	<b>CAT</b> GCCCACC	<b>GTG</b> CCCAGCT	<b>CCAGA</b> ACTCC	<b>TGGG</b> CGGACC	<b>GTC</b> AGTCTTC
2341	<b>CTCT</b> TCCCCC	<b>CAA</b> AACCCAA	<b>GGAC</b> ACCCTC	<b>ATGAT</b> CTCCC	<b>GGAC</b> CCCTGA	<b>GGT</b> CACATGC
2401	<b>GTGG</b> TGGTGG	<b>ACGT</b> GAGCCA	<b>CGA</b> AGACCCT	<b>GAGG</b> TCAAGT	<b>TCA</b> ACTGGTA	<b>CGT</b> GGACGGC
2461	<b>GTGG</b> AGGTGC	<b>ATA</b> ATGCCAA	<b>GACA</b> AAGCCG	<b>CGGG</b> AGGAGC	<b>AGT</b> ACAACAG	<b>CAC</b> GTACCGT
2521	<b>GTGG</b> TAGCG	<b>TCCT</b> CACCGT	<b>CCTG</b> CACCAG	<b>GACT</b> GGCTGA	<b>ATGG</b> CAAGGA	<b>GTAC</b> AAGTGC
2581	<b>AAGG</b> TCTCCA	<b>ACA</b> AAGCCCT	<b>CCC</b> AGCCCC	<b>ATC</b> GAGAAAA	<b>CCAT</b> TCCAA	<b>AGCC</b> AAAGGG
2641	<b>CAGC</b> CCGAG	<b>AAC</b> CACAGGT	<b>GTAC</b> ACCCTG	<b>CCCC</b> ATCCC	<b>GGG</b> ATGAGCT	<b>GACC</b> AAAGAC
2701	<b>CAGG</b> TACGCC	<b>TGAC</b> CTGCCT	<b>GGT</b> CAAAGGC	<b>TTCT</b> TATCCA	<b>GCG</b> ACATCC	<b>CGT</b> GGAGTGG
2761	<b>GAG</b> AGCAATG	<b>GGC</b> AGCCGGA	<b>GAAC</b> ACTAC	<b>AAG</b> ACCACGC	<b>CTCC</b> GTGTT	<b>GGAC</b> TCCGAC
2821	<b>GGCT</b> CTTCT	<b>TCCT</b> TACAG	<b>CAAG</b> CTACC	<b>GTGG</b> ACAAGA	<b>GCAG</b> GTGGCA	<b>GCAG</b> GGGAAC
2881	<b>GTCT</b> TCTCAT	<b>GCT</b> CCGTGAT	<b>GCAT</b> GAGGCT	<b>CTGC</b> ACAACC	<b>ACT</b> TACACGCA	<b>GAAG</b> AGCCTC
2941	<b>TCCCT</b> GTCTC	<b>CGG</b> GTA				

C.

(ii) Secuencia de ADN de cadena pesada (HC)-Fc (enlazador de 5 aminoácidos entre HC y Fc)(péptido señal subrayado. Región Fc en negrita. El enlazador de 5 aminoácidos está doblemente subrayado)(SEQ ID NO:9, que codifica la SEQ ID NO:10)

1	<u>ATG</u> CAAATAG	<u>AGCT</u> CTCCAC	<u>CTG</u> CTTCTTT	<u>CTG</u> TCCTTT	<u>TGC</u> GATTCTG	<u>CTT</u> TAGTGCC
61	<u>ACC</u> AGAAGAT	<u>ACT</u> ACCTGGG	<u>TGC</u> AGTGGAA	<u>CTG</u> TATGGG	<u>ACT</u> ATATGCA	<u>AAG</u> TGATCTC
121	<u>GGT</u> GAGCTGC	<u>CTG</u> TGGACGC	<u>AAG</u> ATTTCTT	<u>CCT</u> AGAGTGC	<u>CAA</u> AATCTTT	<u>TCC</u> ATTC AAC
181	<u>ACCT</u> CAGTCG	<u>TGT</u> ACAAAA	<u>GACT</u> CTGTTT	<u>GTAG</u> AATTCA	<u>CGG</u> ATCACCT	<u>TTT</u> CAACATC
241	<u>GCT</u> AAGCCAA	<u>GGC</u> CACCTG	<u>GAT</u> GGGTCTG	<u>CTAG</u> GTCCCTA	<u>CCAT</u> CCAGGC	<u>TGAG</u> GTATTAT
301	<u>GATA</u> CAGTGG	<u>TCAT</u> TACACT	<u>TAAG</u> AACATG	<u>GCTT</u> CCATC	<u>CTGT</u> CAGTCT	<u>TCAT</u> GCTGTT
361	<u>GGT</u> GTATCCT	<u>ACT</u> GAAAAGC	<u>TTCT</u> GAGGGA	<u>GCTG</u> AATATG	<u>ATG</u> ATCAGAC	<u>CAGT</u> CAAAGG
421	<u>GAG</u> AAAGAAG	<u>ATG</u> ATAAAGT	<u>CTT</u> CCCTGGT	<u>GGA</u> AGCCATA	<u>CAT</u> ATGTCTG	<u>GCAG</u> GTCCCTG
481	<u>AAAG</u> AGAATG	<u>GTCC</u> AATGGC	<u>CTCT</u> GACCCA	<u>CTGT</u> GCCTTA	<u>CCT</u> ACTCATA	<u>TCTT</u> TCTCAT
541	<u>GTGG</u> ACCTGG	<u>TAAA</u> AGACTT	<u>GAAT</u> TACAGC	<u>CTCA</u> TGGGAG	<u>CCCT</u> ACTAGT	<u>ATGT</u> AGAGAA
601	<u>GGG</u> AGTCTGG	<u>CCA</u> AGGAAAA	<u>GAC</u> ACAGACC	<u>TGCA</u> CAAAT	<u>TTAT</u> ACTACT	<u>TTTT</u> GTGTA
661	<u>TTT</u> GATGAAG	<u>GGAA</u> AGTTG	<u>GCA</u> CTCAGAA	<u>ACAA</u> AAGAACT	<u>CCT</u> TGATGCA	<u>GGAT</u> AGGGAT
721	<u>GCT</u> GCATCTG	<u>CTCG</u> GGCCTG	<u>GCCT</u> AAAATG	<u>CAC</u> ACAGTCA	<u>ATGG</u> TTATGT	<u>AAAC</u> AGGTCT
781	<u>CTGC</u> CAGGTC	<u>TGAT</u> TGGATG	<u>CCAC</u> AGGAAA	<u>TCAG</u> TCTATT	<u>GGC</u> ATGTGAT	<u>TGGA</u> ATGGGC
841	<u>ACC</u> ACTCCTG	<u>AAGT</u> GCACCTC	<u>AAT</u> ATTCCTC	<u>GAAG</u> GCACA	<u>CAT</u> TTCTTGT	<u>GAGG</u> AACCAT
901	<u>CGC</u> CAGGCGT	<u>CCT</u> TGGAAAT	<u>CTC</u> GCCAATA	<u>ACT</u> TTCTTA	<u>CTG</u> CTCAAAC	<u>ACT</u> CTTGATG
961	<u>GAC</u> CTGGAC	<u>AGTT</u> TCTACT	<u>GTTT</u> TGTCAT	<u>ATCT</u> CTTCCC	<u>ACCA</u> AACATGA	<u>TGGC</u> ATGGAA
1021	<u>GCT</u> TATGTCA	<u>AAGT</u> AGACAG	<u>CTGT</u> CCAGAG	<u>GAAC</u> CCCAAC	<u>TACG</u> AATGAA	<u>AAAT</u> AATGAA
1081	<u>GAAG</u> CGGAAG	<u>ACT</u> ATGATGA	<u>TGAT</u> CTTACT	<u>GAT</u> TCTGAAA	<u>TGG</u> ATGTGGT	<u>CAGG</u> TTTGAT
1141	<u>GAT</u> GACAACT	<u>CTC</u> CTTCCTT	<u>TAT</u> CCAAAT	<u>CGCT</u> CAGTTG	<u>CCA</u> AGAAGCA	<u>TCCT</u> AAAAC
1201	<u>TGGG</u> TACATT	<u>ACAT</u> TGCTGC	<u>TGA</u> AGAGGAG	<u>GACT</u> GGGACT	<u>ATG</u> CTCCCTT	<u>AGT</u> CTCGCC
1261	<u>CCC</u> GATGACA	<u>GAAG</u> TTATAA	<u>AAGT</u> CAATAT	<u>TTGA</u> ACAATG	<u>GCC</u> CTCAGCG	<u>GATT</u> GGTAGG
1321	<u>AAGT</u> ACAAAA	<u>AAGT</u> CCGATT	<u>TAT</u> GGCATA	<u>ACAG</u> ATGAAA	<u>CCT</u> TTAAGAC	<u>TCGT</u> GAGCT

1381	ATTCAGCATG	AATCAGGAAT	CTTGGGACCT	TACTTTTATG	GGGAAGTTGG	AGACACACTG
1441	TTGATTATAT	TTAAGAATCA	AGCAAGCAGA	CCATATAACA	TCTACCCTCA	CGGAATCACT
1501	GATGTCGGTC	CTTTGTATTC	AAGGAGATTA	CCAAAAGGTG	TAAAACATTT	GAAGGATTTT
1561	CCAATTTCTGC	CAGGAGAAAAT	ATTCAAATAT	AAATGGACAG	TGACTGTAGA	AGATGGGCCA
1621	ACTAAATCAG	ATCCTCGGTG	CCTGACCCGC	TATTACTCTA	GTTTCGTTAA	TATGGAGAGA
1681	GATCTAGCTT	CAGGACTCAT	TGGCCCTCTC	CTCATCTGCT	ACAAAGAATC	TGTAGATCAA
1741	AGAGGAAAACC	AGATAATGTC	AGACAAGAGG	AATGTCATCC	TGTTTTCTGT	ATTTGATGAG
1801	AACCGAAGCT	GGTACCTCAC	AGAGAAATATA	CAACGCTTTC	TCCCCAATCC	AGCTGGAGTG
1861	CAGCTTGAGG	ATCCAGAGTT	CCAAGCCTCC	AACATCATGC	ACAGCATCAA	TGGCTATGTT
1921	TTTGATAGTT	TGCAGTTGTC	AGTTTGTGTTG	CATGAGGTGG	CATACTGGTA	CATTCTAAGC
1981	ATTGGAGCAC	AGACTGACTT	CCTTTCTGTC	TTCTTCTCTG	GATATACCTT	CAAACACAAA
2041	ATGGTCTATG	AAGACACACT	CACCCTATTC	CCATTCTCAG	GAGAAACTGT	CTTCATGTCG
2101	ATGGAAAACC	CAGGTCTATG	GATTCTGGGG	TGCCACAAC	CAGACTTTCG	GAACAGAGGC
2161	ATGACCGCCT	TACTGAAGGT	TTCTAGTTGT	GACAAGAACA	CTGGTGATTA	TTACGAGGAC
2221	AGTTATGAAG	ATATTTGAGC	ATACTTGCTG	AGTAAAAACA	ATGCCATTGA	ACCAAGAAGC
2281	<u>TTCTCCGAGA</u>	<u>ATGACAAAAC</u>	<u>TCACACATGC</u>	<u>CCACCGTGCC</u>	<u>CAGCTCCAGA</u>	<u>ACTCCTGGGC</u>
2341	<b>GGACCGTCAG</b>	<b>TCTTCTCTT</b>	<b>CCCCCAAAA</b>	<b>CCCAAGGACA</b>	<b>CCCTCATGAT</b>	<b>CTCCCGGACC</b>
2401	<b>CCTGAGGTCA</b>	<b>CATGCGTGGT</b>	<b>GGTGGACGTG</b>	<b>AGCCACGAAG</b>	<b>ACCCTGAGGT</b>	<b>CAAGTTCAAC</b>
2461	<b>TGGTACGTGG</b>	<b>ACGGCGTGGA</b>	<b>GGTGCATAAT</b>	<b>GCCAAGACAA</b>	<b>AGCCGCGGGA</b>	<b>GGAGCAGTAC</b>
2521	<b>AACAGCACGT</b>	<b>ACCGTGTGGT</b>	<b>CAGCGTCTCT</b>	<b>ACCGTCTCTG</b>	<b>ACCAGGACTG</b>	<b>GCTGAATGGC</b>
2581	<b>AAGGAGTACA</b>	<b>AGTGCAAGGT</b>	<b>CTCCAACAAA</b>	<b>GCCCTCCCAG</b>	<b>CCCCATCGA</b>	<b>GAAAACCATC</b>
2641	<b>TCCAAAGCCA</b>	<b>AAGGGCAGCC</b>	<b>CCGAGAACCA</b>	<b>CAGGTGTACA</b>	<b>CCCTGCCCC</b>	<b>ATCCCGGGAT</b>
2701	<b>GAGCTGACCA</b>	<b>AGAACCAGGT</b>	<b>CAGCCTGACC</b>	<b>TGCCTGGTCA</b>	<b>AAGGCTTCTA</b>	<b>TCCCAGCGAC</b>
2761	<b>ATCGCCGTGG</b>	<b>AGTGGGAGAG</b>	<b>CAATGGGCAG</b>	<b>CCGGAGAACA</b>	<b>ACTACAAGAC</b>	<b>CACGCCCTCC</b>
2821	<b>GTGTTGGACT</b>	<b>CCGACGGCTC</b>	<b>CTTCTTCTCT</b>	<b>TACAGCAAGC</b>	<b>TCACCGTGGA</b>	<b>CAAGAGCAGG</b>
2881	<b>TGGCAGCAGG</b>	<b>GGAACGTCTT</b>	<b>CTCATGCTCC</b>	<b>GTGATGCATG</b>	<b>AGGCTCTGCA</b>	<b>CAACCCTACT</b>
2941	<b>ACGCAGAAGA</b>	<b>GCCTCTCCCT</b>	<b>GTCTCCGGT</b>	<b>AAA</b>		

**C.**

(iii) Secuencia de ADN de cadena ligera (LC)-Fc (péptido señal subrayado, región Fc en negrita)(SEQ ID NO:11, que codifica la SEQ ID NO:12)

1	<u>ATGGAGACAG</u>	<u>ACACACTCCT</u>	<u>GCTATGGGTA</u>	<u>CTGCTGCTCT</u>	<u>GGGTTCCAGG</u>	<u>TTCCACTGGT</u>
61	<u>GAAATAACTC</u>	<u>GTACTACTCT</u>	<u>TCAGTCAGAT</u>	<u>CAAGAGGAAA</u>	<u>TTGACTATGA</u>	<u>TGATACCATA</u>
121	<u>TCAGTTGAAA</u>	<u>TGAAGAAGGA</u>	<u>AGATTTTGAC</u>	<u>ATTTATGATG</u>	<u>AGGATGAAAA</u>	<u>TCAGAGCCCC</u>
181	<u>CGCAGCTTTC</u>	<u>AAAAGAAAAC</u>	<u>ACGACACTAT</u>	<u>TTTATTGCTG</u>	<u>CAGTGGAGAG</u>	<u>GCTCTGGGAT</u>
241	<u>TATGGGATGA</u>	<u>GTAGCTCCCC</u>	<u>ACATGTTCTA</u>	<u>AGAAACAGGG</u>	<u>CTCAGAGTGG</u>	<u>CAGTGTCCCT</u>
301	<u>CAGTTCAAGA</u>	<u>AAGTTGTTTT</u>	<u>CCAGGAATTT</u>	<u>ACTGATGGCT</u>	<u>CCTTTACTCA</u>	<u>GCCCTTATAC</u>
361	<u>CGTGGAGAAC</u>	<u>TAAATGAACA</u>	<u>TTTGGGACTC</u>	<u>CTGGGGCCAT</u>	<u>ATATAAGAGC</u>	<u>AGAAGTTGAA</u>
421	<u>GATAATATCA</u>	<u>TGGTAACTTT</u>	<u>CAGAAATCAG</u>	<u>GCCTCTCGTC</u>	<u>CCTATTCCCT</u>	<u>CTATTCTAGC</u>
481	<u>CTTATTTCTT</u>	<u>ATGAGGAAGA</u>	<u>TCAGAGGCAA</u>	<u>GGAGCAGAAC</u>	<u>CTAGAAAAAA</u>	<u>CTTTGTCAAG</u>
541	<u>CCTAATGAAA</u>	<u>CCAAAACCTA</u>	<u>CTTTTGGAAA</u>	<u>GTGCAACATC</u>	<u>ATATGGCACC</u>	<u>CACTAAAGAT</u>
601	<u>GAGTTTGACT</u>	<u>GCAAAGCCCTG</u>	<u>GGCTTATTTT</u>	<u>TCTGATGTTG</u>	<u>ACCTGGAAAA</u>	<u>AGATGTGCAC</u>
661	<u>TCAGGCCTGA</u>	<u>TTGGACCCCT</u>	<u>TCTGGTCTGC</u>	<u>CACACTAACA</u>	<u>CACTGAACCC</u>	<u>TGCTCATGGG</u>
721	<u>AGACAAGTGA</u>	<u>CAGTACAGGA</u>	<u>ATTTGCTCTG</u>	<u>TTTTTCACCA</u>	<u>TCTTTGATGA</u>	<u>GACCAAAAGC</u>
781	<u>TGGTACTTCA</u>	<u>CTGAAAATAT</u>	<u>GGAAAGAAAC</u>	<u>TGCAGGGCTC</u>	<u>CCTGCAATAT</u>	<u>CCAGATGGAA</u>
841	<u>GATCCCACTT</u>	<u>TTAAAGAGAA</u>	<u>TTATCGCTTC</u>	<u>CATGCAATCA</u>	<u>ATGGCTACAT</u>	<u>AATGGATACA</u>
901	<u>CTACCTGGCT</u>	<u>TAGTAATGGC</u>	<u>TCAGGATCAA</u>	<u>AGGATTCGAT</u>	<u>GGTATCTGCT</u>	<u>CAGCATGGGC</u>
961	<u>AGCAATGAAA</u>	<u>ACATCCATTC</u>	<u>TATTCATTTT</u>	<u>AGTGGACATG</u>	<u>TGTTCACTGT</u>	<u>ACGAAAAAAA</u>
1021	<u>GAGGAGTATA</u>	<u>AAATGGCACT</u>	<u>GTACAATCTC</u>	<u>TATCCAGGTG</u>	<u>TTTTTGAGAC</u>	<u>AGTGGAAATG</u>
1081	<u>TTACCATCCA</u>	<u>AAGCTGGAAT</u>	<u>TTGGCGGGTG</u>	<u>GAATGCCTTA</u>	<u>TTGGCGAGCA</u>	<u>TCTACATGCT</u>
1141	<u>GGGATGAGCA</u>	<u>CACTTTTTCT</u>	<u>GGTGTACAGC</u>	<u>AATAAGTGTC</u>	<u>AGACTCCCCT</u>	<u>GGGAATGGCT</u>
1201	<u>TCTGGACACA</u>	<u>TTAGAGATTT</u>	<u>TCAGATTACA</u>	<u>GCTTCAGGAC</u>	<u>AATATGGACA</u>	<u>GTGGGCCCCA</u>
1261	<u>AAGCTGGCCA</u>	<u>GACTTCATTA</u>	<u>TTCCGGATCA</u>	<u>ATCAATGCCT</u>	<u>GGAGCACCAA</u>	<u>GGAGCCCTTT</u>
1321	<u>TCTTGATCA</u>	<u>AGGTGGATCT</u>	<u>GTTGGCACCA</u>	<u>ATGATTATTC</u>	<u>ACGGCATCAA</u>	<u>GACCCAGGGT</u>

1381	GCCCGTCAGA	AGTTCTCCAG	CCTCTACATC	TCTCAGTTTA	TCATCATGTA	TAGTCTTGAT
1441	GGGAAGAAGT	GGCAGACTTA	TCGAGGAAAT	TCCACTGGAA	CCTTAATGGT	CTTCTTTGGC
1501	AATGTGGATT	CATCTGGGAT	AAAACACAAT	ATTTTAAACC	CTCCAATTAT	TGCTCGATAC
1561	ATCCGTTTGC	ACCCAACTCA	TTATAGCATT	CGCAGCACTC	TTCGCATGGA	GTTGATGGGC
1621	TGTGATTAA	ATAGTTGCAG	CATGCCATTG	GGAATGGAGA	GTAAAGCAAT	ATCAGATGCA
1681	CAGATTACTG	CTTCATCCTA	CTTTACCAAT	ATGTTTGCCA	CCTGGTCTCC	TTCAAAAGCT
1741	CGACTTCACC	TCCAAGGGAG	GAGTAATGCC	TGGAGACCTC	AGGTGAATAA	TCCAAAAGAG
1801	TGGCTGCAAG	TGGACTTCCA	GAAGACAATG	AAAGTCACAG	GAGTAACTAC	TCAGGGAGTA
1861	AAATCTCTGC	TTACCAGCAT	GTATGTGAAG	GAGTTCCTCA	TCTCCAGCAG	TCAAGATGGC
1921	CATCAGTGGA	CTCTCTTTTT	TCAGAATGGC	AAAGTAAAGG	TTTTTCAGGG	AAATCAAGAC
1981	TCCTTCACAC	CTGTGGTGAA	CTCTCTAGAC	CCACCGTTAC	TGACTCGCTA	CCTTCGAATT
2041	CACCCCCAGA	GTGGGTGCA	CCAGATTGCC	CTGAGGATGG	AGGTTCTGGG	CTGCGAGGCA
2101	CAGGACCTCT	ACGACAAAAC	TCACACATGC	CCACCGTGCC	CAGCTCCAGA	ACTCCTGGGC
2161	<b>GGACCGTCAG</b>	<b>TCTTCTCTT</b>	<b>CCCCCAAAA</b>	<b>CCCAGGACA</b>	<b>CCCTCATGAT</b>	<b>CTCCCGGACC</b>
2221	<b>CCTGAGGTCA</b>	<b>CATGCGTGGT</b>	<b>GGTGGACGTG</b>	<b>AGCCACGAAG</b>	<b>ACCCTGAGGT</b>	<b>CAAGTTCAAC</b>
2281	<b>TGGTACGTGG</b>	<b>ACGGCGTGGA</b>	<b>GGTGCATAAT</b>	<b>GCCAAGACAA</b>	<b>AGCCGCGGGA</b>	<b>GGAGCAGTAC</b>
2341	<b>AACAGCACGT</b>	<b>ACCGTGTGGT</b>	<b>CAGCGTCTC</b>	<b>ACCGTCTGC</b>	<b>ACCAGGACTG</b>	<b>GCTGAATGGC</b>
2401	<b>AAGGAGTACA</b>	<b>AGTGCAAGGT</b>	<b>CTCCAACAAA</b>	<b>GCCCTCCAG</b>	<b>CCCCATCGA</b>	<b>GAAAACCATC</b>
2461	<b>TCCAAAGCCA</b>	<b>AAGGGCAGCC</b>	<b>CCGAGAACCA</b>	<b>CAGGTGTACA</b>	<b>CCTGCCCCC</b>	<b>ATCCCGGGAT</b>
2521	<b>GAGCTGACCA</b>	<b>AGAACCAGGT</b>	<b>CAGCCTGACC</b>	<b>TGCCTGGTCA</b>	<b>AAGGCTTCTA</b>	<b>TCCCAGCGAC</b>
2581	<b>ATCGCCGTGG</b>	<b>AGTGGGAGAG</b>	<b>CAATGGGCAG</b>	<b>CCGAGAACA</b>	<b>ACTACAAGAC</b>	<b>CACGCCTCCC</b>
2641	<b>GTGTTGGA</b>	<b>CCGACGGCTC</b>	<b>CTTCTTCTC</b>	<b>TACAGCAAGC</b>	<b>TCACCGTGGA</b>	<b>CAAGAGCAGG</b>
2701	<b>TGGCAGCAGG</b>	<b>GGAACGTCTT</b>	<b>CTCATGCTCC</b>	<b>GTGATGCATG</b>	<b>AGGCTCTGCA</b>	<b>CAACCACTAC</b>
2761	<b>ACGCAGAAGA</b>	<b>GCCTCTCCCT</b>	<b>GTCTCCGGGT</b>	<b>AAA</b>		□□

Tabla 2: Secuencias polipeptídicas

5

**A. Híbrido monomérico de FVIII-Fc con dominio B eliminado (monómero-dímero de BDD FVIII-Fc): creado coexpresando las cadenas BDD FVIII-Fc y Fc.**

Construcción = Fusión HC-LC-Fc. Un casete de expresión Fc se cotransfecta con BDDFVIII-Fc para generar el monómero BDD FVIII-Fc. Para la cadena BDD FVIII-Fc, la secuencia Fc se muestra en **negrita**; la secuencia de HC se muestra en doble subrayado; la secuencia del dominio B restante se muestra en *cursiva*. Los péptidos señal están subrayados.

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

<p>MQIELSTCFFLCLLRFCFS                  ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNIKPR                  PPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP                  GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKF                  ILLFAVFDGKSWHSETKNLSMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM                  GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK                  VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE                  EDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGFQIRGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYG                  EVGDTLLIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG                  PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW                  YLTENIQRFLEPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS                  VFFSGYTFKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGWLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT                  GDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFSONPPVLKRHQREITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKK                  EDEFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFEFT                  DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPK                  NFVKPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGR                  QVTVQEFALFFTFIDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVM                  AQDQIRRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVE                  CLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPMGASGHIRDFQITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWST                  KEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGN                  VDSSGKIHNI FNPP I IARY IRLHPTHYSIRSTLRMELMGC DLNSCSMPLGMESKAISDAQITASS                  YFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKE                  FLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRIHPQSWVHQIALRMEVL                  GCEAQDLYDKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW                  YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ                  PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY                  SKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	□□
<p>ii) cadena Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos de la cadena de Igk de ratón subrayada) (SEQ ID NO: 4)</p>	
<p>METDTLLLWVLLLWVPGSTG                  DKTHTCPPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH                  NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY</p>	□□
<p>LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS                  RWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</p>	□□
<p><b>B. Híbrido monomérico de FVIII<sub>1-2</sub> de longitud completa (monómero-dímero de FVIII<sub>1-2</sub> de longitud completa): creado coexpresando las cadenas FVIII<sub>1-2</sub> y Fc.</b></p>	
<p>Construcción = fusión HC-B-LC-Fc. Un casete de expresión Fc se cotransfecta con FVIII-Fc de longitud completa para generar el monómero de FVIII<sub>1-2</sub> de longitud completa. Para la cadena FVIII<sub>1-2</sub>, la secuencia Fc se muestra en negrita; la secuencia de HC se muestra con doble subrayado; la secuencia del dominio B se muestra en cursiva. Los péptidos señal están subrayados.</p>	
<p>i) Cadena FVIII<sub>1-2</sub> de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado (SEQ ID NO:6))</p>	

MQIELSTCFFLCLLRFCFS  
 ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRPVPSFPFNTSVVYKKTFLVEFTDHLFNI AKPR  
 PPWMGLLGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP  
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVLDLVDKLNLSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKE  
 ILLFAVFDGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM  
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK  
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDNNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE  
 EDWDYAPILVAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYG  
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGKVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG  
 PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQQRNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW  
 YLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQDFLS  
 VFFSGYTFKHKMYEDTLTLPFSGETVFMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVVSSCDKNT  
 GDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEKTPWFAHRTMP  
 KIQNVSSDMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYTFSDPPSGAIDSNNLSSEMTHFRPQLHHS  
 DMVFTPEGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMP  
 VHYDSQLDITLFGKSSPLTESGGPLSLEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNVSSSTESGRFLFKG  
 KRAHGPALLTKDNALFKVSI SLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENS PSVWQNI LESDTEFK  
 KVTPLIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTSSKNMEMVQKKEGPIPPDAQNPDMSEFFKMLFLPES  
 ARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSEVQGNFLSEKKNKVVVGKGEFTKDVGLKEMVFP  
 SRNLFLTNLDNLHENNTHNQEKIQQEIEKKEITLIQENVVLQIHTVTGTKNFMKNLFLLSSTRQN  
 VEGSYDGAAPVLQDFRSLNDSNRTKKHTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPN  
 TSQQNFVTQRSKRALKQFRLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGA  
 TQSPSLDCLTRSHSIPQANRSPPLPIAKVSSFPSSIRPIYLTRVLFQDNSSHLPAAS YRKKDSGVQE  
 SSHFLQGAKNNSLALITLLEMTGDQREVGLGTSATNSVYKVENTVLPKPDLPKTSKGVVELL  
 PKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLQGTGEGAIKWNEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSK  
 LLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEKSEKTAFFKKKDTILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVT  
 WAKQGRTERLCSQNPVLRKHOREITRITLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRS  
 FQKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNQSGSVPPQFKKVVVFQEFDTGDSFTQPLRYGELNEH  
 LGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRNFKPNETKTYFWKVQ  
 HHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTIFDE  
 TKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRIRWYLLSMGSN  
 ENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFL  
 VYSNKCQTPLGMA SGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI  
 IHGIKTQGARQKFSLSYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGKHNIFNPPII  
 ARYIRLPHPHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARL □ □

HLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLTSMYVKEFLISSSQDGHQWTLFF  
 QNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLRTRYLRHQPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTC  
**CPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE**  
**EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL**  
**TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV**  
**SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** □ □

ii) cadena Fc (péptido señal heterólogo de 20 aminoácidos de la cadena de Igk de ratón subrayada)  
 (SEQ ID NO: 4)

METDTLLLWVLLLVPGSTG  
 DKTHTCPCPAPELLGGPSVFLFPPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH  
 NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  
 RWQQGNVFS SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK □ □

**C. Híbrido heterodimérico de FVIII-Fc**

Se hace cotransfectando las construcciones HC-Fc y LC-Fc. Se han fabricado dos construcciones de HC-Fc. Uno no tiene enlazador entre HC y Fc (HC-Fc) mientras que el otro tiene un enlazador de 5 aminoácidos entre HC y Fc (HC+5-Fc). El péptido señal de FVIII se usó para las construcciones de

HC-Fc, mientras que la secuencia señal de Igk de ratón se usó para la construcción de LC-Fc.

(i) HC-Fc (la secuencia de Fc se muestra en negrita, el péptido señal está subrayado) (SEQ ID NO: 8)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRPVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIKPR  
 PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP  
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKF  
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM  
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK  
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE  
 EDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYG  
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG  
 PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW  
 YLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS  
 VFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFPFSGETVFMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT  
 GDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR**  
**CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN**  
**KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN**  
**YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** □□

(ii) HC + 5-Fc (la secuencia de Fc se muestra en negrita, la secuencia de enlazador de 5 aminoácidos (del dominio B de FVIII) se muestra en cursiva, el péptido señal está subrayado) (SEQ ID NO: 10)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS □□

ATRRYYLGAVELSDWYMQSDLGELPVDARFPPRPVPKSFPFNTSVVYKKTLFVEFTDHLFNIKPR  
 PPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVS YWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFP  
 GGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGLAKEKTQTLHKF  
 ILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGM  
 GTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITFLTAQTLLMDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVK  
 VDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEE  
 EDWDYAPLVLAPDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYG  
 EVGDTLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDG  
 PTKSDPRCLTRYSSFVNMERDLASGLIGPLLCYKESVDQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSW  
 YLTENIQRFPLNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLS  
 VFFSGYTFKHKMVEYEDTLTLFPFSGETVFMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNT  
 GDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPR*SFSQ***DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR**  
**TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK**  
**CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG**  
**QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK** □□

(iii) LC-Fc6His (la secuencia de Fc se muestra en negrita, el péptido señal está subrayado) (SEQ ID NO: 12) (SEQ ID NO:12)

**C. Híbrido heterodimérico de FVIII-Fc**

METDTLLLWVLLLWVPGSTG  
 EITRRTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDEFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSS  
 SPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVQEFQFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQ  
 ASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL  
 EKDVHSGGLIGPLLCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFFTI FDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQME  
 DPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQIRWYLLSMGSNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKM  
 ALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPGLMASGHIRDFQIT  
 ASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMI IHGIKTQGARQKFSSLYISQFII  
 MYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNI FNPPIIARYIRLHPTHYSIRSTLRMELMG  
 CDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVD  
 FQKTMKVTGVTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLD  
 PPLLTRYLRIHPOSWVHQIALRMEVLGCEAQDLY**DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**  
**MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG**  
**KEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW**  
**ESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG**  
**K** □□

Tabla 3. Determinación del tiempo de coagulación de sangre entera (WBCT) en ratones con hemofilia A después de una sola dosis intravenosa de 50 UI/kg de rFVIIIc o ReFacto®.

A.									
Tratamiento	Animal Número	Tiempo de recogida de sangre, h							
		Pre-dosis	0.25	24	36	42	96	113	120
		WBCT, min							
50 UI/kg de ReFacto®	1	>60	18	>60	ND	ND			
	2	>60	5	16	>60	ND			
	3	>60	4	7	>60	ND			
	4	>60	7	8	10	>60			
	5	>60	6	9	16	>60			
	6	>60	5	15	>60	ND			
50 UI/kg de rFVIIIc	7	>60	7				8	>60	ND
	8	>60	5				8	>60	ND
	9	>60	4				16	>60	ND
	10	>60	3				11	4	>60
	11	>60	3				9	>60	ND
	12	>60	4				6	>60	ND

B.		Tiempo de recogida de sangre, h					
Tratamiento	Animal Número	Pre-dosis	0.25	24	48	96	120
		WBCT, min					
50 UI/kg de ReFacto®	1	>60	11	15	>60	>60	ND
	2	>60	3	3	>60	>60	>60
	3	>60	4	6	>60	>60	>60
50 UI/kg de rFVIII Fc	4	>60	3	5	5	>60	>60
	5	>60	3	6	7	13	>60
	6	>60	5	8	9	9	>60

ND = No determinado ya que el punto de tiempo anterior fue >60 min

Tabla 4. Parámetros PK después de una única dosis intravenosa en ratones con hemofilia A (50 UI/kg)

Tratamiento	C <sub>máx</sub> (UI/ml)	AUC (h·UI/ml)	T <sub>1/2</sub> (h)	CL (ml/h/kg)	V <sub>ss</sub> (ml/kg)
rFVIII Fc	1.56	22.6	11.1	2.09	28.4
ReFacto®	0.67	6.94	5.0	7.2	43.8
Advate®	0.47	3.90	7.1	12.8	103

5

Tabla 5. Parámetros PK después de una única dosis intravenosa en perros con hemofilia A (125 UI/kg de rFVIII Fc, 114 y 120 UI/kg de ReFacto®)

A. PK determinada a partir de datos de actividad cromogénica					
Tratamiento	C <sub>máx</sub> (UI/ml)	AUC (h·UI/ml)	T <sub>1/2</sub> (h)	CL (ml/h/kg)	V <sub>z</sub> (ml/kg)
rFVIII Fc	2.0 ± 0.54	25.9 ± 6.47	15.4 ± 0.3	5.1 ± 1.4	113 ± 29
ReFacto®*	2.0	18.2	7.4	6.5	68.7
B. PK determinada a partir de datos ELISA					
Tratamiento	C <sub>máx</sub> (ng/ml)	AUC (h·ng/ml)	T <sub>1/2</sub> (h)	CL (ml/h/kg)	V <sub>z</sub> (ml/kg)
rFVIII Fc	210 ± 33	2481 ± 970	15.7 ± 1.7	6.2 ± 3.0	144 ± 83
ReFacto®*	211	1545	6.9	8.7	85

Media ± DE, n = 4 para rFVIII Fc, n = 2 para ReFacto®\*DE no indicada para ReFacto® ya que había solo dos perros

Tabla 6. Actividad de coagulación medida por aPTT en perros con hemofilia A después de una única dosis intravenosa con rFVIII Fc o ReFacto®.

ID del perro	Tratamiento	aPTT, s	
		Pre-Dosis	5 min después de la dosis
M10	rFVIII Fc	86.5	53.6
M11	rFVIII Fc	99.8	56.4
M12	rFVIII Fc	119	68.7
	ReFacto®	108	60.7
M38	rFVIII Fc	115	76.6
	ReFacto®	118	68.0

10 Tabla 7. Concentración en plasma de rFVIII Fc o Xyntha en monos administrada en una única dosis intravenosa de 125 UI/kg medida por ELISA.

A. Concentración de rFVIII Fc en plasma (µg/ml)								
Tiempo, h	Grupo 1			Grupo 2			Media	DE
	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
Pre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0.25	0.400	0.334	0.374	0.348	0.383	0.323	0.360	0.030
4	0.266	0.259	0.236	0.233	0.259	0.217	0.245	0.019
12	0.165	0.152	0.12	0.15	0.161	0.149	0.150	0.016
24	0.079	0.074	0.047	0.08	0.088	0.076	0.074	0.014
36	0.035	0.04	0.022	0.04	0.041	0.046	0.037	0.008
48	0.019	0.021	BLQ	0.021	0.024	0.025	0.022	0.002

B. Concentración de Xyntha en plasma (µg/ml)								
	Grupo 1			Grupo 2				
Tiempo, h	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362	Media	DE
Pre	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ		
0.25	0.252	0.074	0.155	0.317	0.217	0.167	0.197	0.084
4	0.197	0.159	0.152	0.229	0.19	0.082	0.168	0.051
12	0.137	0.099	0.104	0.166	0.158	0.081	0.124	0.035
24	0.09	0.068	0.051	0.082	0.08	0.084	0.076	0.014
36	0.037	0.043	0.015	0.041	0.035	BLQ	0.034	0.011
48	0.022	BLQ	BLQ	0.017	0.013	BLQ	0.017	0.005

Tabla 8. Concentración en plasma de rFVIIIc o Xyntha en monos administrada a una única dosis intravenosa de 125 UI/kg medida por el ensayo de actividad cromogénica específica de FVIII (indicada en UI/ml).

A. Xyntha						
Tiempo (h)	Grupo 1			Grupo 2		
Predosis	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0.25	5.62	4.55	5.01	4.5	5.15	3.77
4	3.9	4.05	3.2	3.19	3.46	2.36
12	2.51	2.82	1.69	2.17	2.5	2.01
24	1.67	1.66	1.18	0.95	1.57	1.5
36	0.7	0.85	0.48	0.44	0.85	0.82
48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.38	0.48
B. rFVIIIc						
Tiempo (h)	Grupo 1			Grupo 2		
Predosis	604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362
0.25	4.31	3.82	3.54	4.13	4.12	3.68
4	3	3.36	2.53	2.7	2.74	2.81
12	2	2.15	1.42	2.28	2.75	2.22
24	1.01	1.17	0.5	1.5	1.61	1.01
36	BLQ	0.52	0.48	0.88	0.72	0.64
48	0.31	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	0.31	BLQ

BLQ = por debajo del límite de cuantificación

5

Tabla 9. Parámetros PK de rFVIIIc después de una dosis individual de 125 UI/kg

Parámetro PK	Datos ELISA de rFVIIIc								
	unidades	Grupo 1			Grupo 2			Promedio	DE
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T <sub>máx</sub>	h	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
C <sub>máx</sub>	µg/ml	0,4	0,334	0,374	0,348	0,383	0,323	0,368	0,030
T <sub>1/2</sub>	h	11,4	13,3	9,3	12,7	12,7	14,1	11,9	1,7
AUC	µg * h/ml	5,86	5,65	4,37	5,56	4,37	5,58	5,16	0,68
CL	ml/h/kg	2,15	2,23	2,88	2,27	2,07	2,26	2,32	0,29
V <sub>z</sub>	ml/kg	35,3	42,5	38,8	37,9	37,9	46,1	38,5	3,9
MRT	h	15,3	17	12,1	17,1	17,3	19,2	15,8	2,4

Parámetro PK	Datos de actividad cromogénica de rFVIIIc								
	unidades	Grupo 1			Grupo 2			Promedio	DE
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T <sub>máx</sub>	h	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,00
C <sub>máx</sub>	µg/ml	4,31	3,82	3,54	4,13	4,12	3,68	3,93	0,30
T <sub>1/2</sub>	h	13,4	12,0	11,6	17,5	12,4	29,4	16,1	6,9
AUC	µg * h/ml	74,7	75,5	53,5	92,9	88,9	92,7	79,7	15,2
CL	ml/h/kg	1,67	1,65	2,34	1,35	1,41	1,35	1,63	0,38
V <sub>z</sub>	ml/kg	32,3	28,7	39,2	33,9	25,2	57,2	36,1	11,4
MRT	h	17,8	16,8	16,9	25	19,2	33,3	21,5	6,5

Tabla 10. Parámetros PK de Xyntha después de una dosis IV individual (125 UI/kg)

Parámetro PK	unidades	Datos ELISA de Xyntha						Promedio	DE
		Grupo 1			Grupo 2				
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T <sub>máx</sub>	h	0,25	4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,88	1,53
C <sub>máx</sub>	µg/ml	0,252	0,159	0,155	0,317	0,217	0,167	0,21	0,06
T <sub>1/2</sub>	h	13,6	19,9	9,7	11	9,2	nd	12,7	4,4
AUC	µg * h/ml	5,15	4,39	3,17	5,53	4,79	6,32	5,24	0,74
CL	ml/h/kg	2,21	2,6	3,59	2,06	2,38	nd	2,57	0,61
V <sub>z</sub>	ml/kg	43,4	74,7	50,1	32,9	31,5	nd	46,5	17,5
MRT	h	19	28,4	14	16,1	15,9	nd	18,7	5,7

Parámetro PK	unidades	Datos de actividad cromogénica de Xyntha						Promedio	DE
		Grupo 1			Grupo 2				
		604376	606595	C36195	C36066	C36174	604362		
T <sub>máx</sub>	h	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0
C <sub>máx</sub>	µg/ml	5,62	4,55	5,01	4,5	5,15	3,77	4,77	0,64
T <sub>1/2</sub>	h	12,8	14,3	11,4	10,4	11,7	14,6	12,5	1,7
AUC	µg * h/ml	97,1	104,2	71,3	70,7	94,0	82,8	86,7	14,0
CL	ml/h/kg	1,29	1,20	1,75	1,77	1,33	1,51	1,48	0,24
V <sub>z</sub>	ml/kg	23,7	24,8	28,9	26,6	22,5	31,8	26,4	3,5
MRT	h	17,8	20,1	16,0	14,8	18,4	23,2	18,4	3,0

5

Tabla 11. Activación del Factor X

	Km (nM)	V <sub>máx</sub> (nM/min)
rFVIII <sub>FC</sub>	55.0 ± 5.9	65.6 ± 8.6
BDD FVIII	51.0 ± 8.7	73.5 ± 10.1

Tabla 12. Interacción con Factor Ixa

	Kd (nM)	V <sub>máx</sub> (nM/min)
rFVIII <sub>FC</sub>	2.8 ± 0.4	4.5 ± 0.3
BDD FVIII	2.5 ± 0.3	4.0 ± 1.0

**LISTA DE SECUENCIAS**

10

<110> BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.  
 <120> POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS DE FACTOR VIII-FC, Y MÉTODOS DE USO DE LOS MISMOS  
 <130> P37753EP-PCT  
 <140>EP10835255.0<141> 2010-12-06

15

<150>61/419,676  
 <151> 2010-12-03

<150>61/410,929  
 <151> 2010-11-07

20

<150>61/373,113  
 <151> 2010-08-12

25

<150>61/363,065  
 <151> 2010-07-09

<150>61/301,592  
 <151> 2010-02-04

30

<150>61/285,054  
 <151> 2009-12-09

# ES 2 659 888 T3

<150>61/267,070  
<151> 2009-12-06

5 <160> 12

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

10 <211> 5052

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Cadena FVIII Fc con dominio B eliminado

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(57)

20 <223> señal FVIII

<220>

<221> misc\_feature

<222> (4372)..(5052)

25 <223> Región Fc

<400> 1

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240

ES 2 659 888 T3

gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat 300  
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt 360  
gggtgatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaag 420  
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg 480  
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540  
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600  
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660  
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat 720  
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aacaggctct 780  
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatggc 840  
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct 900  
cgccaggcgt ccttggaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcctgatg 960  
gaccttgac agtttctact gttttgcat atctctccc accaacatga tggcatggaa 1020  
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080  
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt 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 gggaagttgg agacacactg 1440  
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500  
gatgtccgtc ctttgatttc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560  
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620  
actaaatcag atcctcgggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680  
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740  
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800  
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tccccaatcc agctggagtg 1860  
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920  
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgagggtg catactggta cattctaagc 1980  
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040  
atggctctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100

ES 2 659 888 T3

atggaaaacc caggctctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160  
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220  
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280  
ttctctcaaa acccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt 2340  
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa 2400  
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagccccc gcagctttca aaagaaaaca 2460  
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca 2520  
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgtccctc agttcaagaa agttgttttc 2580  
caggaattta ctgatggctc ctttactcag cccttatacc gtggagaact aaatgaacat 2640  
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatatcat ggtaactttc 2700  
agaaatcagg cctctcgtcc ctattccttc tattctagcc ttatttctta tgaggaagat 2760  
cagaggcaag gagcagaacc tagaaaaaac tttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac 2820  
ttttgaaag tgcaacatca tatggcacc cactaaagatg agtttgactg caaagcctgg 2880  
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt 2940  
ctggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtgc agtacaggaa 3000  
tttgctctgt ttttcaccat ctttgatgag accaaaagct ggtacttcac tgaaaaatg 3060  
gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatatc cagatggaag atcccacttt taaagagaat 3120  
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180  
caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaa catccattct 3240  
attcatttca tgggacatgt gttcactgta 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 gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600  
ttggaccaa tgattattca cggcatcaag acccaggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660  
ctctacatct ctacagttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720  
cgaggaaatt ccaactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780  
aaacacaata tttttaacct tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840  
tatagattc gcagactct tcgcatggag ttgatggct gtgatttaa tagttgcagc 3900  
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatocctac 3960  
tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg 4020

# ES 2 659 888 T3

```

agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat caaaagagt ggctgcaagt ggacttccag      4080
aagacaatga aagtcacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg      4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt      4200
cagaatggca aagtaaaggt ttttcagggg aatcaagact ctttcacacc tgtggtgaac      4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac      4320
cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact      4380
cacacatgcc caccgtgccc agctccagaa ctccctggcg gaccgtcagt cttcctcttc      4440
ccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacc ctaggtcac atgctggtg      4500
gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag      4560
gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag gacgagtaca acagcacgta ccgtgtggtc      4620
agcgtcctca ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc      4680
tccaacaaag ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaagccaa agggcagccc      4740
cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc      4800
agcctgacct gcctggtaaa aggcttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc      4860
aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttgactc cgacggctcc      4920
ttcttctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc      4980
tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctcctg      5040
tctccgggta aa                                                                5052

```

```

<210> 2
<211> 1684
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

<220>
<223> Cadena FVIII-Fc con dominio B eliminado

```

```

10 <220>
<221> misc_feature
<222> (-19)..(-1)
<223> Señal

```

```

15 <220>
<221> mat_peptide
<222> (1)..(1665)

```

```

20 <220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(734)
<223> Cadena pesada (HC)

```

```

25 <220>
<221> misc_feature
<222> (741)..(754)
<223> Dominio B

```

ES 2 659 888 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1438)..(1665)  
 <223> Región Fc

5

<400> 2

```

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

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
      -1  1                      5                10

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg
      15                      20                25

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val
      30                      35                40                45

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

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln
      65                      70                75

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser
      80                      85                90

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser
      95                      100               105

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp
      110                     115               120               125

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

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser
      145                     150               155

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
      160                     165               170

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
      175                     180               185

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
      190                     195               200               205
  
```

ES 2 659 888 T3

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

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

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val  
 240 245 250

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile  
 255 260 265

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser  
 270 275 280 285

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

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

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro  
 320 325 330

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp  
 335 340 345

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser  
 350 355 360 365

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

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro  
 385 390 395

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn  
 400 405 410

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met  
 415 420 425

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu  
 430 435 440 445

Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu



ES 2 659 888 T3

Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp  
705 710 715

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys  
720 725 730

Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu  
735 740 745

Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln  
750 755 760 765

Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu  
770 775 780

Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe  
785 790 795

Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp  
800 805 810

Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln  
815 820 825

Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr  
830 835 840 845

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His  
850 855 860

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile  
865 870 875

Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser  
880 885 890

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg  
895 900 905

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val  
910 915 920 925

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

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

ES 2 659 888 T3

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His  
 960 965 970

Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe  
 975 980 985

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys  
 990 995 1000 1005

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

Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu  
 1025 1030 1035

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

Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser  
 1055 1060 1065

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

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

Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu  
 1100 1105 1110

His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn  
 1115 1120 1125

Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp  
 1130 1135 1140

Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys  
 1145 1150 1155

Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr  
 1160 1165 1170

Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met  
 1175 1180 1185

Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser  
 1190 1195 1200

ES 2 659 888 T3

Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly  
 1205 1210 1215

Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met  
 1220 1225 1230

Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile  
 1235 1240 1245

Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr  
 1250 1255 1260

His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys  
 1265 1270 1275

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

Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met  
 1295 1300 1305

Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly  
 1310 1315 1320

Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp  
 1325 1330 1335

Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr  
 1340 1345 1350

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

Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe  
 1370 1375 1380

Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser  
 1385 1390 1395

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

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

Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys

ES 2 659 888 T3

				1430						1435							1440
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly			
				1445					1450					1455			
Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met			
				1460					1465					1470			
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser			
				1475					1480					1485			
His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val			
				1490					1495					1500			
Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn			
				1505					1510					1515			
Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp			
				1520					1525					1530			
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala			
				1535					1540					1545			
Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln			
				1550					1555					1560			
Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu			
				1565					1570					1575			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe			
				1580					1585					1590			
Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro			
				1595					1600					1605			
Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly			
				1610					1615					1620			
Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp			
				1625					1630					1635			
Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu			
				1640					1645					1650			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys			
				1655					1660					1665			

<210> 3  
 <211> 741  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 659 888 T3

<220>  
<223> Región Fc

5 <220>  
<221> misc\_signal  
<222> (1)..(60)  
<223> Señal Ig kappa de ratón

10 <400> 3

```

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

```

<210> 4  
15 <211> 247  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
20 <223> Cadena Fc

<220>  
<221> SEÑAL  
<222> (-20)..(-1)  
25 <223> Señal heteróloga de cadena Ig kappa de ratón

<220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (1)..(227)

30 <400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro



ES 2 659 888 T3

<220>  
<223> FVIII Fc de longitud completa

5 <220>  
<221> misc\_signal  
<222> (1)..(57)  
<223> Señal FVIII

10 <220>  
<221> misc\_feature  
<222> (7054)..(7734)  
<223> Región Fc

15 <400> 5

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt	360
ggtgtatcct actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta	660
tttgatgaag ggaaaagtg gcactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctogggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aacaggctct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttggaat ctgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttgac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa	1080
gaagcggag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat	1140
gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact	1200
tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc	1260
cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg	1320

ES 2 659 888 T3

aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380  
attcagcatg aatcaggaat ctggggacct ttactttatg ggaagttgg agacacactg 1440  
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500  
gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560  
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620  
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680  
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740  
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800  
aacccaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tccccaatcc agctggagtg 1860  
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920  
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980  
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040  
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaactgt cttcatgtcg 2100  
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160  
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220  
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280  
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340  
ccagaaaatg acatagagaa gactgaccct tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa 2400  
atacaaaatg tctcctctag tgatttggtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat 2460  
gggctatoct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520  
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc 2580  
catcacagtg gggacatggt atttaccctc gagtccaggc tccaattaag attaatgag 2640  
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700  
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttg cagcaggtag tgataataca 2760  
agttccttag gaccccaag tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820  
tttgcaaaa agtcatctcc cttactgag tctggtggac ctctgagctt gagtgaagaa 2880  
aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag ttcatgggga 2940  
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct 3000  
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagttagca tctctttggt aaagacaaac 3060  
aaaacttoca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta 3120  
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa 3180  
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta 3240

ES 2 659 888 T3

aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatggtcca acagaaaaaa 3300  
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc 3360  
ttgccagaat cagcaaggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg 3420  
caaggcccca gtccaaagca attagtatcc ttaggaccag aaaaatctgt ggaaggtcag 3480  
aatttcttgt ctgagaaaaa caaagtggta gtaggaaagg gtgaatttac aaaggacgta 3540  
ggactcaaag agatggtttt tccaagcagc agaaacctat ttcttactaa cttggataat 3600  
ttacatgaaa ataatacaca caatcaagaa aaaaaattc aggaagaaat agaaaagaag 3660  
gaaacattaa tccaagagaa tgtagttttg cctcagatac atacagtgac tggcactaag 3720  
aatttcatga agaacctttt cttactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac 3780  
ggggcatatg ctccagtact tcaagatttt aggtcattaa atgattcaac aatagaaca 3840  
aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaa ggggaggaag aaaacttggg aggcttggga 3900  
aatcaaacca agcaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatata tcctaataca 3960  
agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaaacaatt cagactccca 4020  
ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtggctc 4080  
aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactaca tgagaaggag 4140  
aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct 4200  
caagcaaata gatctcatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct 4260  
atatactga ccagggctc attccaagac aactcttctc atcttccagc agcatcttat 4320  
agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat 4380  
aacctttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaaagaga ggttggctcc 4440  
ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctccc 4500  
aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560  
cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg 4620  
gaaggagcc ttcttcaggg aacagaggga gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680  
ggaaaagttc ctttctgag 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  
gtcttgaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa 5040  
attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaag aagattttga catttatgat 5100

ES 2 659 888 T3

gaggatgaaa atcagagccc ccgcagcttt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct 5160  
gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaacag 5220  
gctcagagtg gcagtgctccc tcagttcaag aaagttgttt tccaggaatt tactgatggc 5280  
tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaatgaac atttgggact cctggggcca 5340  
tatataagag cagaagtga agataatata atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt 5400  
ccctattoct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460  
cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataa accaaaaactt acttttgaa agtgcaacat 5520  
catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaagcct gggcttattt ctctgatgtt 5580  
gacctggaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac 5640  
acactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacag aatttgctct gttttcacc 5700  
atctttgatg agaccaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaagaaa ctgcagggct 5760  
ccctgcaata tccagatgga agatcccact ttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820  
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880  
tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940  
gtgttactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccagg 6000  
gtttttgaga cagtggaaat gtaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060  
attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt 6120  
cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180  
caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240  
tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300  
cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360  
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgagaaa ttccactgga 6420  
accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480  
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg caccacaactc attatagcat tcgcagcact 6540  
cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600  
agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcactc actttaccaa tatgtttgcc 6660  
acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720  
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780  
ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840  
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900  
gtttttcagg gaaatcaaga ctcttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta 6960  
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020

ES 2 659 888 T3

gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 7080  
ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttctctt tcccccaaa acccaaggac 7140  
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgctggg tgggtggacgt gagccacgaa 7200  
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 7260  
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 7320  
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 7380  
gcccccatcg agaaaaccat ctccaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 7440  
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 7500  
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 7560  
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 7620  
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat 7680  
gaggetctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 7734

<210> 6  
<211> 2578

5 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena FVIII Fc de longitud completa

10 <220>  
<221> SEÑAL  
<222> (-19)..(-1)  
<223> Señal FVIII

15 <220>  
<221> mat\_peptide  
<222> (1)..(2559)

20 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (1)..(740)  
<223> HC

25 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (741)..(1648)  
<223> Dominio B

30 <220>  
<221> MISC\_FEATURE  
<222> (2333)..(2559)  
<223> Región Fc

35 <400> 6

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



ES 2 659 888 T3

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile  
 255 260 265

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser  
 270 275 280 285

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

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

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro  
 320 325 330

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp  
 335 340 345

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser  
 350 355 360 365

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

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro  
 385 390 395

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn  
 400 405 410

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met  
 415 420 425

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu  
 430 435 440 445

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

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro  
 465 470 475

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys  
 480 485 490

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe

ES 2 659 888 T3

495						500										505
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp	
510					515					520					525	
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg	
				530					535					540		
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu	
			545					550					555			
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val	
		560					565					570				
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu	
	575					580					585					
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp	
590					595					600					605	
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val	
				610					615					620		
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp	
			625					630					635			
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe	
		640					645						650			
Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Lys	His	Lys	Met	Val	Tyr	Glu	Asp	Thr	Leu	Thr	
	655					660						665				
Leu	Phe	Pro	Phe	Ser	Gly	Glu	Thr	Val	Phe	Met	Ser	Met	Glu	Asn	Pro	
670					675					680					685	
Gly	Leu	Trp	Ile	Leu	Gly	Cys	His	Asn	Ser	Asp	Phe	Arg	Asn	Arg	Gly	
				690					695					700		
Met	Thr	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Ser	Cys	Asp	Lys	Asn	Thr	Gly	Asp	
			705					710					715			
Tyr	Tyr	Glu	Asp	Ser	Tyr	Glu	Asp	Ile	Ser	Ala	Tyr	Leu	Leu	Ser	Lys	
		720					725						730			
Asn	Asn	Ala	Ile	Glu	Pro	Arg	Ser	Phe	Ser	Gln	Asn	Ser	Arg	His	Pro	
	735					740					745					

ES 2 659 888 T3

Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp  
750 755 760 765

Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys  
770 775 780

Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser  
785 790 795

Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr  
800 805 810

Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn  
815 820 825

Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly  
830 835 840 845

Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu  
850 855 860

Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys  
865 870 875

Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn  
880 885 890

Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met  
895 900 905

Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys  
910 915 920 925

Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu  
930 935 940

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu  
945 950 955

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe  
960 965 970

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala  
975 980 985

Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser Asn  
990 995 1000 1005

ES 2 659 888 T3

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

ES 2 659 888 T3

Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn Arg  
1250 1255 1260

Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu Glu  
1265 1270 1275

Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu Lys  
1280 1285 1290

Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln Asn  
1295 1300 1305

Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg Leu  
1310 1315 1320

Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp Asp  
1325 1330 1335

Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro Ser  
1340 1345 1350

Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala Ile  
1355 1360 1365

Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser Ile  
1370 1375 1380

Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser Ser  
1385 1390 1395

Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe Gln  
1400 1405 1410

Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys Asp  
1415 1420 1425

Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys Lys  
1430 1435 1440

Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly Asp  
1445 1450 1455

Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser Val  
1460 1465 1470

Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp Leu

ES 2 659 888 T3

	1475		1480		1485
Pro Lys Thr Ser Gly	Lys Val Glu Leu Leu	Pro Lys Val His Ile			
	1490		1495		1500
Tyr Gln Lys Asp Leu	Phe Pro Thr Glu Thr	Ser Asn Gly Ser Pro			
	1505		1510		1515
Gly His Leu Asp Leu	Val Glu Gly Ser Leu	Leu Gln Gly Thr Glu			
	1520		1525		1530
Gly Ala Ile Lys Trp	Asn Glu Ala Asn Arg	Pro Gly Lys Val Pro			
	1535		1540		1545
Phe Leu Arg Val Ala	Thr Glu Ser Ser Ala	Lys Thr Pro Ser Lys			
	1550		1555		1560
Leu Leu Asp Pro Leu	Ala Trp Asp Asn His	Tyr Gly Thr Gln Ile			
	1565		1570		1575
Pro Lys Glu Glu Trp	Lys Ser Gln Glu Lys	Ser Pro Glu Lys Thr			
	1580		1585		1590
Ala Phe Lys Lys Lys	Asp Thr Ile Leu Ser	Leu Asn Ala Cys Glu			
	1595		1600		1605
Ser Asn His Ala Ile	Ala Ala Ile Asn Glu	Gly Gln Asn Lys Pro			
	1610		1615		1620
Glu Ile Glu Val Thr	Trp Ala Lys Gln Gly	Arg Thr Glu Arg Leu			
	1625		1630		1635
Cys Ser Gln Asn Pro	Pro Val Leu Lys Arg	His Gln Arg Glu Ile			
	1640		1645		1650
Thr Arg Thr Thr Leu	Gln Ser Asp Gln Glu	Glu Ile Asp Tyr Asp			
	1655		1660		1665
Asp Thr Ile Ser Val	Glu Met Lys Lys Glu	Asp Phe Asp Ile Tyr			
	1670		1675		1680
Asp Glu Asp Glu Asn	Gln Ser Pro Arg Ser	Phe Gln Lys Lys Thr			
	1685		1690		1695
Arg His Tyr Phe Ile	Ala Ala Val Glu Arg	Leu Trp Asp Tyr Gly			
	1700		1705		1710

ES 2 659 888 T3

Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser Gly  
 1715 1720 1725

Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp  
 1730 1735 1740

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His  
 1745 1750 1755

Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn  
 1760 1765 1770

Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe  
 1775 1780 1785

Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala  
 1790 1795 1800

Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr  
 1805 1810 1815

Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe  
 1820 1825 1830

Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys  
 1835 1840 1845

Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr  
 1850 1855 1860

Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu  
 1865 1870 1875

Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr  
 1880 1885 1890

Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile  
 1895 1900 1905

Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala  
 1910 1915 1920

Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met Ala  
 1925 1930 1935

Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn  
 1940 1945 1950

ES 2 659 888 T3

Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr Val  
 1955 1960 1965  
 Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro  
 1970 1975 1980  
 Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile  
 1985 1990 1995  
 Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met  
 2000 2005 2010  
 Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu  
 2015 2020 2025  
 Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser  
 2030 2035 2040  
 Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr  
 2045 2050 2055  
 Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp  
 2060 2065 2070  
 Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys  
 2075 2080 2085  
 Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln  
 2090 2095 2100  
 Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr  
 2105 2110 2115  
 Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn Val  
 2120 2125 2130  
 Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile  
 2135 2140 2145  
 Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser  
 2150 2155 2160  
 Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser  
 2165 2170 2175  
 Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile  
 2180 2185 2190

ES 2 659 888 T3

Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro  
 2195 2200 2205  
 Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg  
 2210 2215 2220  
 Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln  
 2225 2230 2235  
 Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser  
 2240 2245 2250  
 Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser  
 2255 2260 2265  
 Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val  
 2270 2275 2280  
 Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn  
 2285 2290 2295  
 Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro  
 2300 2305 2310  
 Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly  
 2315 2320 2325  
 Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro  
 2330 2335 2340  
 Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe  
 2345 2350 2355  
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu  
 2360 2365 2370  
 Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val  
 2375 2380 2385  
 Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 2390 2395 2400  
 Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val  
 2405 2410 2415  
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu

ES 2 659 888 T3

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

<210> 7  
 <211> 2958  
 5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena pesada (HC)-Fc

10 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)..(57)  
 <223> Señal

15 <220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2278)..(2958)  
 <223> Región Fc

20 <400> 7

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtgga ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180

ES 2 659 888 T3

acctcagtcg tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240  
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgaggtttat 300  
 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccac cgtgcagtct tcatgctggt 360  
 ggtgtatcct actggaagc ttctgagga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420  
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480  
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540  
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600  
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660  
 tttgatgaag ggaaaagtgg gcaactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat 720  
 gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc 780  
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc 840  
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct 900  
 cgccaggcgt ccttggaat ctcgcaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960  
 gaccttgac agtttctact gttttgcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa 1020  
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080  
 gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140  
 gatgacaact ctcttcctt 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  
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560  
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620  
 actaaatcag atcctcgggtg cctgaccgc tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680  
 gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa 1740  
 agaggaaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag 1800  
 aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttc tcccacatcc agctggagtg 1860  
 cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920  
 tttgatagtt tgcaagttgc agtttgttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980  
 attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040

ES 2 659 888 T3

```

atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg      2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc      2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac      2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagagac      2280
aaaactcaca catgcccacc gtgccagct ccagaactcc tgggcgagacc gtcagtcttc      2340
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacatgc      2400
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagaccct gaggtcaagt tcaactggta cgtggacggc      2460
gtggaggtgc ataatgcaa gacaaagccg cgggaggagc agtacaacag cacgtaccgt      2520
gtggtcagcg tcctcaccgt cctgcaccag gactggctga atggcaagga gtacaagtgc      2580
aaggtctcca acaaagccct cccagcccc atcgagaaaa ccatctcaa agccaaaggg      2640
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggatgagct gaccaagaac      2700
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctatccca gcgacatcgc cgtggagtgg      2760
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccagc ctcccgtgtt ggactccgac      2820
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      2880
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      2940
tcctgtctc cgggtaaa

```

<210> 8

<211> 986

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada (HC)-Fc

10

<220>

<221> SEÑAL

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

15 <220>

<221> mat\_peptide

<222> (1)..(967)

<220>

20 <221> MISC\_FEATURE

<222> (741)..(967)

<223> Región Fc

<400> 8

25

```

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

```

```

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser
                -1  1                5                10

```

ES 2 659 888 T3

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg  
15 20 25

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val  
30 35 40 45

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

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln  
65 70 75

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser  
80 85 90

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser  
95 100 105

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp  
110 115 120 125

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

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser  
145 150 155

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile  
160 165 170

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr  
175 180 185

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly  
190 195 200 205

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

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

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val  
240 245 250

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile  
255 260 265

ES 2 659 888 T3

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser  
 270 275 280 285  
  
 Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met  
 290 295 300  
  
 Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His  
 305 310 315  
  
 Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro  
 320 325 330  
  
 Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp  
 335 340 345  
  
 Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser  
 350 355 360 365  
  
 Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr  
 370 375 380  
  
 Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro  
 385 390 395  
  
 Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn  
 400 405 410  
  
 Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met  
 415 420 425  
  
 Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu  
 430 435 440 445  
  
 Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu  
 450 455 460  
  
 Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro  
 465 470 475  
  
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys  
 480 485 490  
  
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe  
 495 500 505  
  
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp



ES 2 659 888 T3

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
770 775 780

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
785 790 795

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
800 805 810

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
815 820 825

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
830 835 840 845

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
850 855 860

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
865 870 875

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
880 885 890

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
895 900 905

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
910 915 920 925

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
930 935 940

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
945 950 955

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
960 965

<210> 9  
<211> 2973

5 <212> ADN  
<213> Secuencia artificial

<220>  
<223> Cadena pesada (HC)-Fc (enlazador de 5 aminoácidos entre HC y Fc)

10 <220>  
<221> misc\_signal  
<222> (1)..(57)  
<223> Señal

15

ES 2 659 888 T3

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2278)..(2292)  
 <223> Enlazador de 5 aminoácidos

5

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (2293)..(2973)  
 <223> Región Fc

10

<400> 9

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc	60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc	120
ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac	180
acctcagctc tgtacaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc	240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat	300
gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttccatc ctgtcagtct tcatgctggt	360
ggtgtatcct actggaaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg	420
gagaaagaag atgataaaat cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggtcctg	480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat	540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa	600
gggagtctgg ccaaggaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta	660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat	720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggtct	780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc	840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct	900
cgccaggcgt ccttgaaaat ctgcgaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg	960
gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacatga tggcatggaa	1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac 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
atcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg	1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500

ES 2 659 888 T3

```

gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaaagggtg taaaacattt gaaggatfff 1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccocg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga 1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcactctgt acaaagaatc tgtagatcaa 1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt attgatgag 1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgccttc tcccgaatcc agctggagtg 1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttg catgagggtg catactggta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt cttttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
atgghaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacagggac 2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga atgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc 2340
ggaccgtcag tcttctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 2400
cctgagggtca catgctggtt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 2460
tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 2520
aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 2580
aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc 2640
tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 2700
gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac 2760
atcgccgtgg agtgggagag caatgggag cgggagaaca actacaagac cacgcctccc 2820
gtgttgact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 2880
tggcagcagg ggaacgtctt ctcactctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 2940
acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 2973

```

<210> 10

<211> 991

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena pesada (HC)+5-Fc

10

<220>

<221> SEÑAL

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

15 <220>

<221> mat\_peptide

ES 2 659 888 T3

<222> (1)..(972)

<220>

<221> MISC\_FEATURE

5 <222> (741)..(745)

<223> Dominio B

<220>

<221> MISC\_FEATURE

10 <222> (746)..(972)

<223> Región Fc

<400> 10

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

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser  
-1 1 5 10

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg  
15 20 25

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val  
30 35 40 45

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

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln  
65 70 75

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser  
80 85 90

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser  
95 100 105

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp  
110 115 120 125

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

Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser  
145 150 155

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile  
160 165 170

15

ES 2 659 888 T3

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr  
 175 180 185

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly  
 190 195 200 205

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

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

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val  
 240 245 250

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile  
 255 260 265

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser  
 270 275 280 285

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

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

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro  
 320 325 330

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp  
 335 340 345

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser  
 350 355 360 365

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

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro  
 385 390 395

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn  
 400 405 410

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met  
 415 420 425

ES 2 659 888 T3

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu  
430 435 440 445

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

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro  
465 470 475

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys  
480 485 490

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe  
495 500 505

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp  
510 515 520 525

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg  
530 535 540

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

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val  
560 565 570

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu  
575 580 585

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp  
590 595 600 605

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

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp  
625 630 635

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe  
640 645 650

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr  
655 660 665

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro



ES 2 659 888 T3

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
 930 935 940

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
 945 950 955

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 960 965 970

<210> 11  
 <211> 2793

5 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Cadena ligera (LC)-Fc

10 <220>  
 <221> misc\_signal  
 <222> (1)..(60)  
 <223> Señal

15 <220>  
 <221> misc\_signal  
 <222> (2113)..(2793)  
 <223> Región Fc

20 <400> 11

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gaaataactc gtactactct tcagtcagat caagaggaaa ttgactatga tgataccata      120
tcagttgaaa tgaagaagga agattttgac atttatgatg aggatgaaaa tcagagcccc      180
cgcagctttc aaaagaaaac acgacactat tttattgctg cagtggagag gctctgggat      240
tatgggatga gtagctcccc acatgttcta agaaacaggg ctcagagtgg cagtgtccct      300
cagttcaaga aagttgtttt ccaggaattt actgatggct cctttactca gcccttatac      360
cgtggagaac taaatgaaca tttgggactc ctggggccat atataagagc agaagttgaa      420
gataatatca tggttaactt cagaaatcag gcctctcgtc cctattcctt ctattctagc      480
cttatttctt atgaggaaga tcagaggcaa ggagcagaac ctagaaaaaa ctttgtcaag      540
cctaatagaaa ccaaaactta cttttggaaa gtgcaacatc atatggcacc cactaaagat      600
gagtttgact gcaaagcctg ggcttatttc tctgatgttg acctggaaaa agatgtgcac      660
tcaggcctga ttggaccctt tctggtctgc cacactaaca cactgaaccc tgctcatggg      720
agacaagtga cagtacagga atttgctctg tttttcacca tctttgatga gaccaaagc      780
tggtacttca ctgaaaatat ggaaagaaac tgcagggctc cctgcaatat ccagatggaa      840
gatcccactt ttaaagagaa ttatcgcttc catgcaatca atggctacat aatggataca      900
ctacctggct tagtaatggc tcaggatcaa aggattcgat ggtatctgct cagcatgggc      960
    
```

ES 2 659 888 T3

agcaatgaaa acatccattc tattcatttc agtggacatg tgttcactgt acgaaaaaaaa 1020  
 gaggagtata aaatggcact gtacaatctc tatccagggtg tttttgagac agtggaaatg 1080  
 ttaccatcca aagctggaat ttggcgggtg gaatgcctta ttggcgagca tctacatgct 1140  
 gggatgagca cactttttct ggtgtacagc aataagtgtc agactcccct gggaatggct 1200  
 tctggacaca ttagagattt tcagattaca gcttcaggac aatatggaca gtgggccccca 1260  
 aagctggcca gacttcatta ttccggatca atcaatgcct ggagcaccaa ggagcccttt 1320  
 tcttgatca aggtggatct gttggcacca atgattattc acggcatcaa gaccaggggt 1380  
 gcccgtcaga agttctccag cctctacatc tctcagttta tcatcatgta tagtcttgat 1440  
 gggaagaagt ggcagactta tcgaggaat tccactggaa ccttaatggt cttctttggc 1500  
 aatgtggatt catctgggat aaaacacaat atttttaacc ctccaattat tgctcgatac 1560  
 atccgtttgc acccaactca ttatagcatt cgcagcactc ttcgcatgga gttgatgggc 1620  
 tgtgatttaa atagttgcag catgccattg ggaatggaga gtaaagcaat atcagatgca 1680  
 cagattactg cttcatccta ctttaccat atgtttgcc cctggtctcc ttcaaaagct 1740  
 cgacttcacc tccaaggag gagtaatgcc tggagacctc aggtgaataa tccaaaagag 1800  
 tggctgcaag tggacttcca gaagacaatg aaagtcacag gagtaactac tcagggagta 1860  
 aatctctgc ttaccagcat gtatgtgaag gagttcctca tctccagcag tcaagatggc 1920  
 catcagtgga ctctctttt tcagaatggc aaagtaaagg ttttccaggg aaatcaagac 1980  
 tccttcacac ctgtggtgaa ctctctagac ccaccgttac tgactcgcta cttcgaatt 2040  
 cacccccaga gttgggtgca ccagattgcc ctgaggatgg aggttctggg ctgcgaggca 2100  
 caggacctct acgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagctccaga actcctgggc 2160  
 ggaccgtcag tcttctctt cccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 2220  
 cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac 2280  
 tggtagctgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaca agccgcggga ggagcagtac 2340  
 aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc 2400  
 aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatoga gaaaaccatc 2460  
 tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat 2520  
 gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgctgtgta aaggcttcta tcccagcgac 2580  
 atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cacgcctccc 2640  
 gtgttgact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg 2700  
 tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac 2760  
 acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaa 2793

<210> 12

<211> 931

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 659 888 T3

<220>  
<223> Cadena ligera (LC)-Fc6His

5 <220>  
<221> SEÑAL  
<222> (-20)..(1)

<220>  
10 <221> mat\_peptide  
<222> (1)..(911)

<220>  
<221> MISC\_FEATURE  
15 <222> (685)..(911)  
<223> Región Fc

<400> 12

```

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
-20                               -15                -10                -5

Gly Ser Thr Gly Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu
      -1  1                               5                10

Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp
      15                               20                25

Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln
      30                               35                40

Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp
      45                               50                55                60

Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
      65                               70                75

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr Asp
      80                               85                90

Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His Leu
      95                               100               105

Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp Asn Ile Met
      110                              115               120

Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser Ser
      125                              130               135               140

```

20

ES 2 659 888 T3

Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg Lys  
 145 150 155  
 Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val Gln  
 160 165 170  
 His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala  
 175 180 185  
 Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile  
 190 195 200  
 Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly  
 205 210 215 220  
 Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp  
 225 230 235  
 Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg  
 240 245 250  
 Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr  
 255 260 265  
 Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu  
 270 275 280  
 Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly  
 285 290 295 300  
 Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr  
 305 310 315  
 Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro  
 320 325 330  
 Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp  
 335 340 345  
 Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr  
 350 355 360  
 Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala  
 365 370 375 380  
 Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly  
 385 390 395

ES 2 659 888 T3

Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn  
400 405 410

Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu  
415 420 425

Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys  
430 435 440

Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp  
445 450 455 460

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met  
465 470 475

Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe  
480 485 490

Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr  
495 500 505

Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn  
510 515 520

Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala  
525 530 535 540

Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser  
545 550 555

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg  
560 565 570

Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys  
575 580 585

Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu  
590 595 600

Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly  
605 610 615 620

His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln  
625 630 635

Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro  
640 645 650

ES 2 659 888 T3

Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln  
 655 660 665  
 Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr  
 670 675 680  
 Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly  
 685 690 695 700  
 Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met  
 705 710 715  
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His  
 720 725 730  
 Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val  
 735 740 745  
 His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr  
 750 755 760  
 Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly  
 765 770 775 780  
 Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile  
 785 790 795  
 Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val  
 800 805 810  
 Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser  
 815 820 825  
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu  
 830 835 840  
 Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro  
 845 850 855 860  
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val  
 865 870 875  
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met  
 880 885 890  
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser  
 895 900 905  
 Pro Gly Lys  
 910

## REIVINDICACIONES

- 1 Un polipéptido quimérico que comprende una porción de Factor VIII y una porción distinta de Factor VIII, para su uso en la prevención o el tratamiento de un episodio de hemorragia en un sujeto humano, donde el polipéptido quimérico debe administrarse en una dosis de 25 UI/kg a 65 UI/kg a un intervalo de dosificación de una vez cada 3 o más días, donde la porción diferente de Factor VIII es un compañero de unión a FcRn (FcRn BP).
2. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, donde el sujeto tiene hemofilia A.
- 10 3. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, donde el intervalo de dosificación es una vez cada 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 días.
4. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la dosis del polipéptido quimérico es de 25 UI/kg, 26 UI/kg, 27 UI/kg, 28 UI/kg, 29 UI/kg, 30 UI/kg, 31 UI/kg, 32 UI/kg, 33 UI/kg, 34 UI/kg, 35 UI/kg, 36 UI/kg, 37 UI/kg, 38 UI/kg, 39 UI/kg, 40 UI/kg, 41 UI/kg, 42 UI/kg, 43 UI/kg, 44 UI/kg, 45 UI/kg, 46 UI/kg, 47 UI/kg, 48 UI/kg, 49 UI/kg, 50 UI/kg, 51 UI/kg, 52 UI/kg, 53 UI/kg, 54 UI/kg, 55 UI/kg, 56 UI/kg, 57 UI/kg, 58 UI/kg, 59 UI/kg, 60 UI/kg, 61 UI/kg, 62 UI/kg, 63 UI/kg, 64 UI/kg, o 65 UI/kg.
- 15 5. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde la dosis del polipéptido quimérico es de 65 UI/kg y el intervalo de dosificación es una vez cada 6-7 días.
6. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el FcRn BP comprende la IgG completa, el fragmento Fc de IgG, o un fragmento de IgG que incluye la región de unión completa de FcRn.
- 25 7. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el polipéptido quimérico es un híbrido monómero-dímero de FVIII<sub>1-2</sub>.
- 30 8. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la porción de Factor VIII comprende el Factor VIII de longitud completa, el Factor VIII maduro, o el Factor VIII con una eliminación total o parcial del dominio B.
9. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en profilaxis.
- 35 10. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en profilaxis adaptada.
- 40 11. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en el tratamiento a demanda.
12. El polipéptido quimérico para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, donde el polipéptido quimérico comprende una secuencia de aminoácidos que es (a) al menos un 90%, 95% o un 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 1665 de SEQ ID NO: 2 o (b) al menos un 90%, 95% o un 100% idéntica a los aminoácidos -19 a 1665 de SEQ ID NO: 2.
- 45

Figura 1

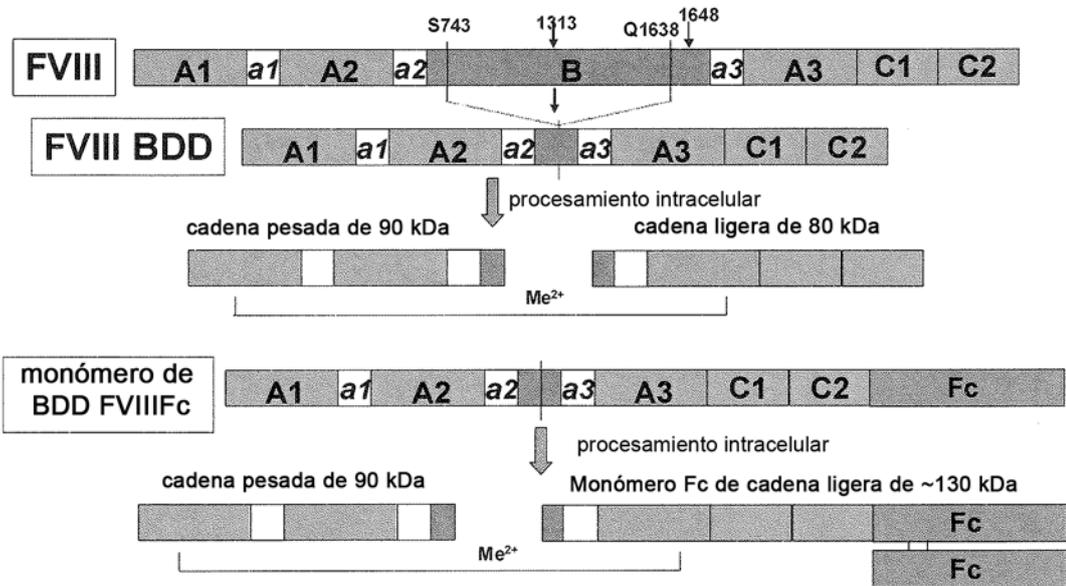


Figura 2

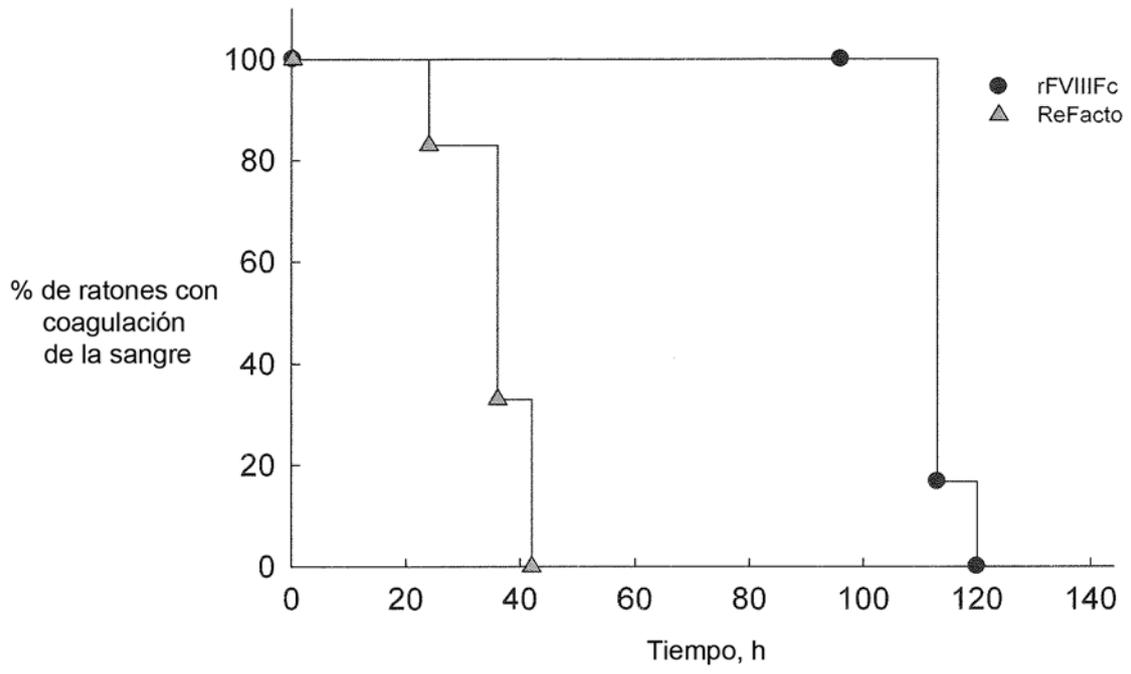


Figura 3

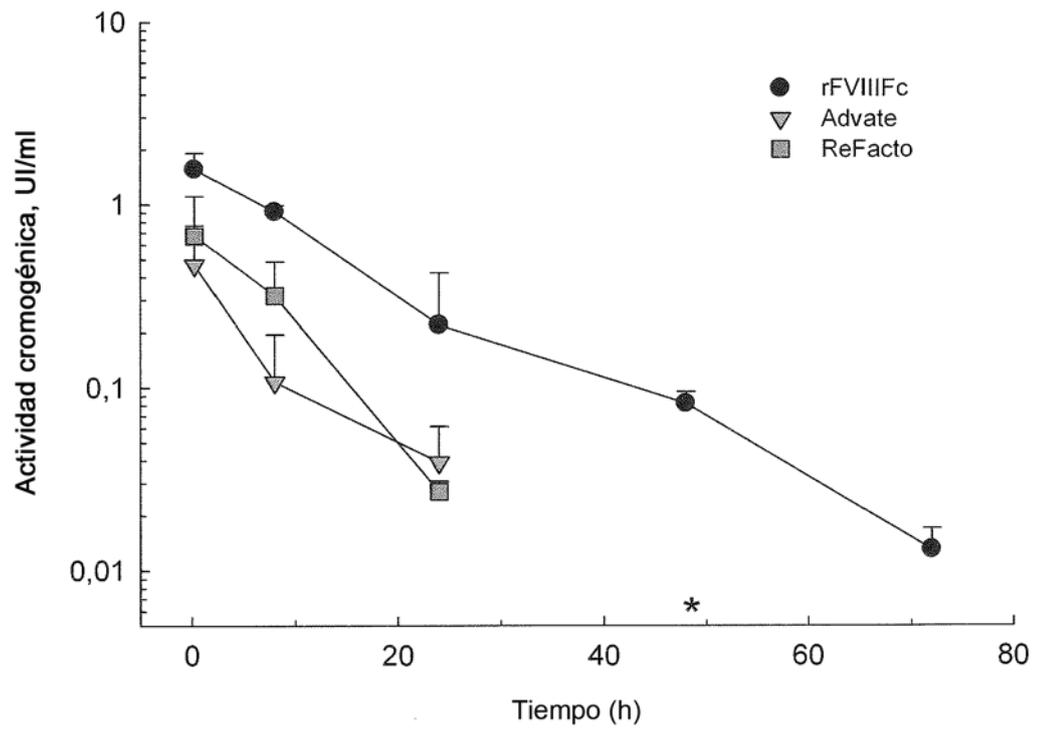


Figura 4A

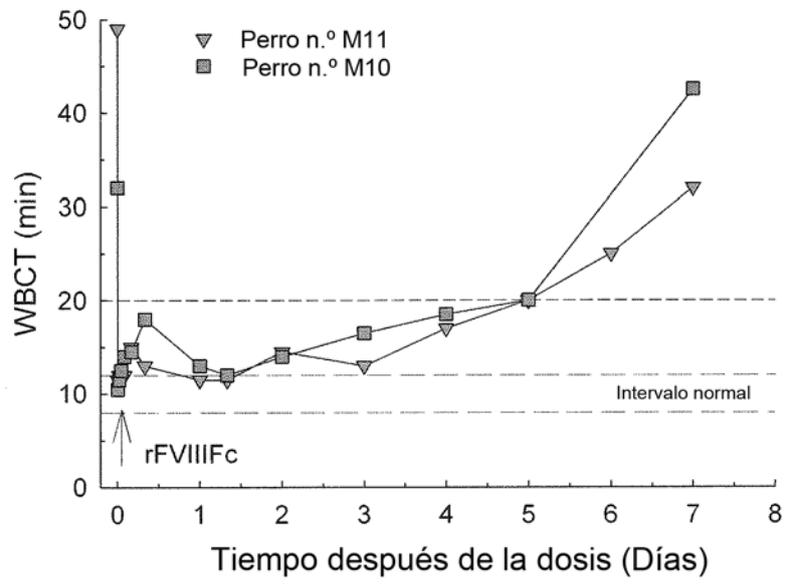


Figura 4B

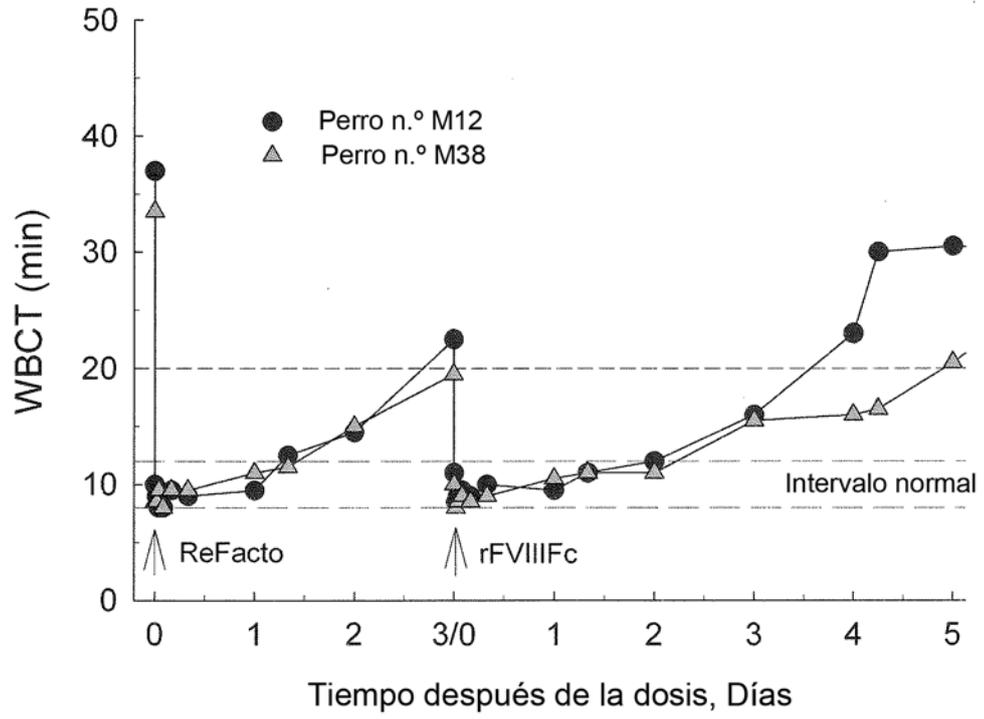


Figura 5

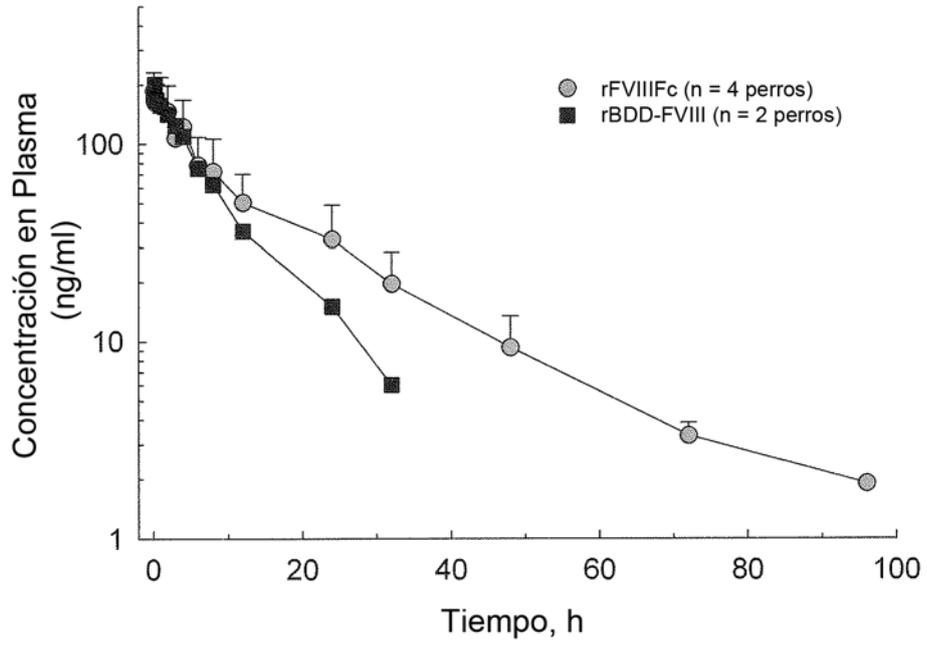


Figura 6

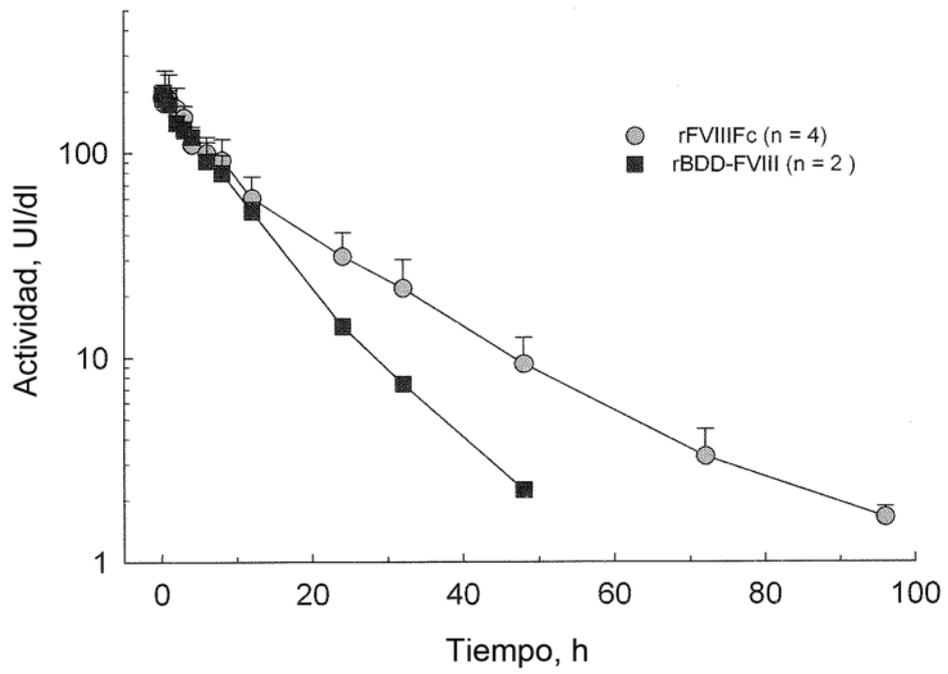


Figura 7

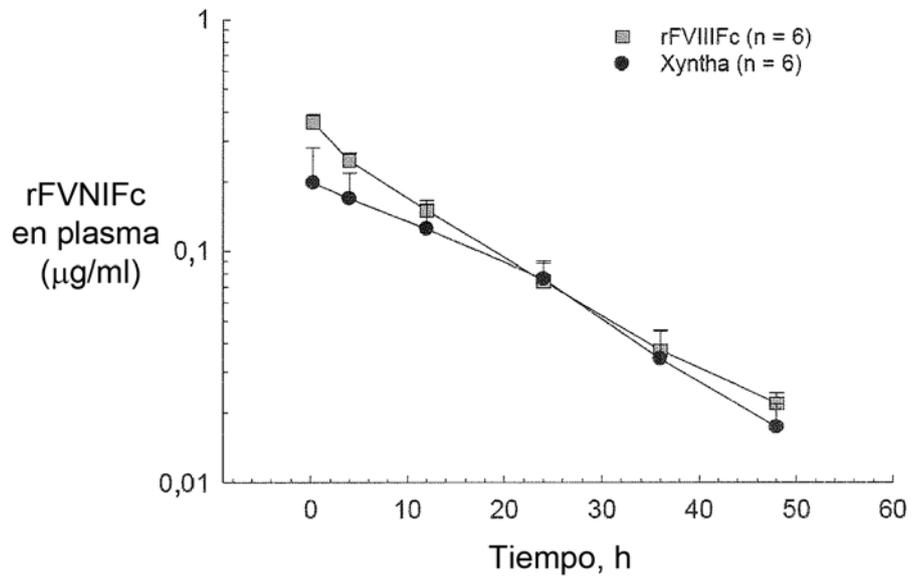
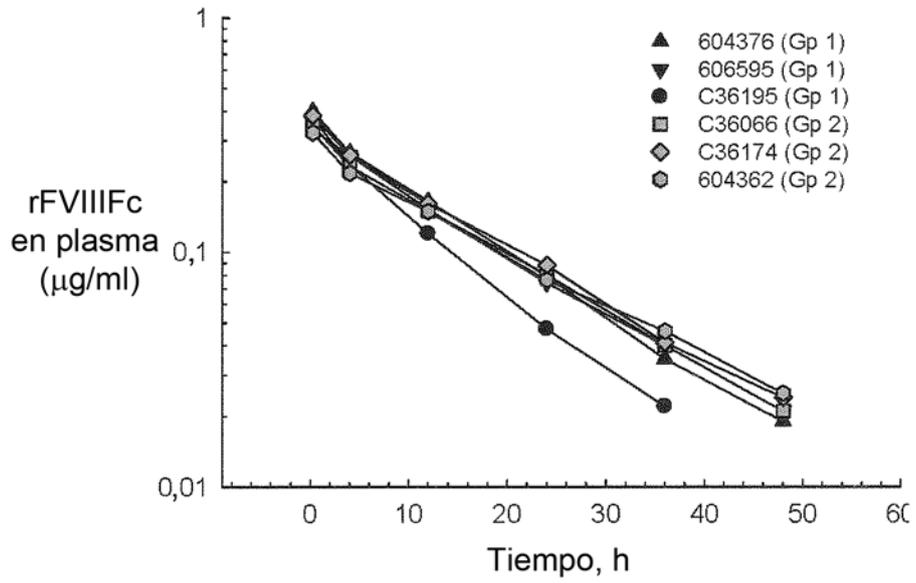


Figura 8

A.



B.

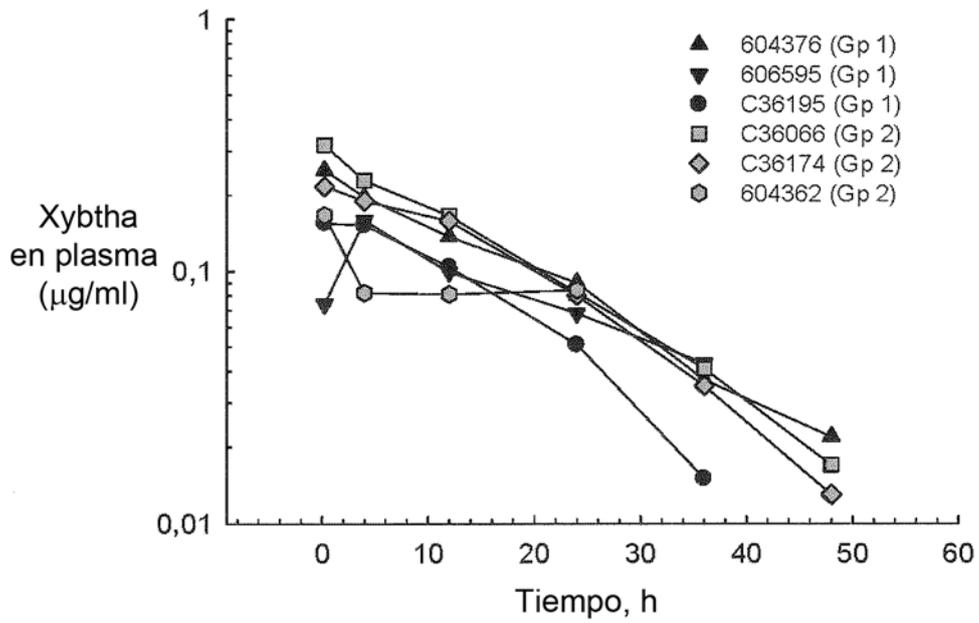


Figura 9

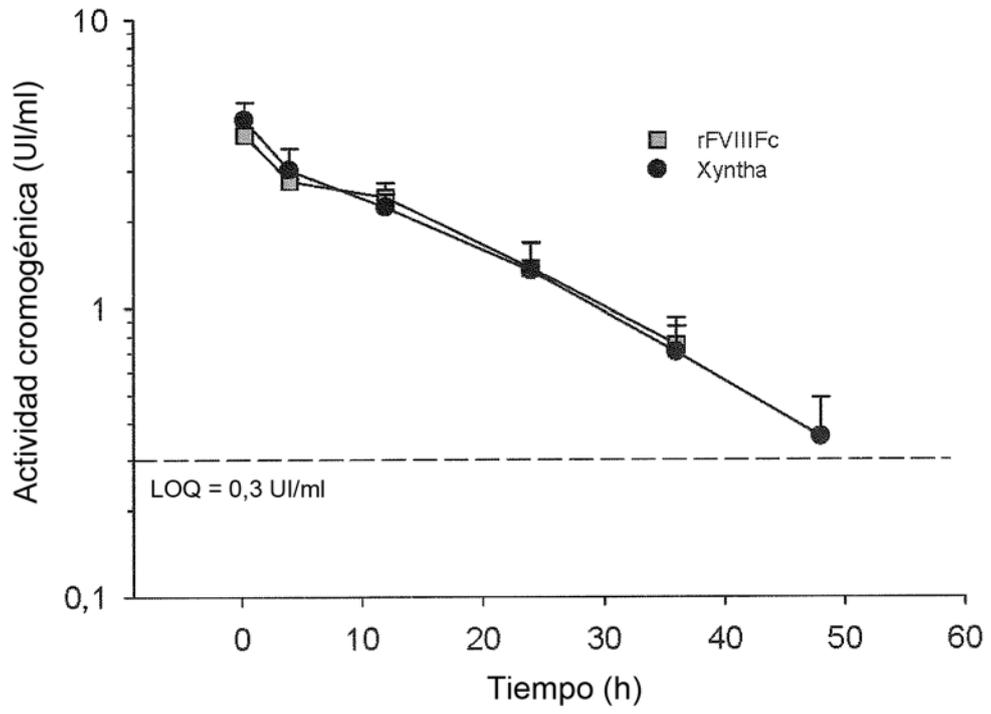


Figura 10

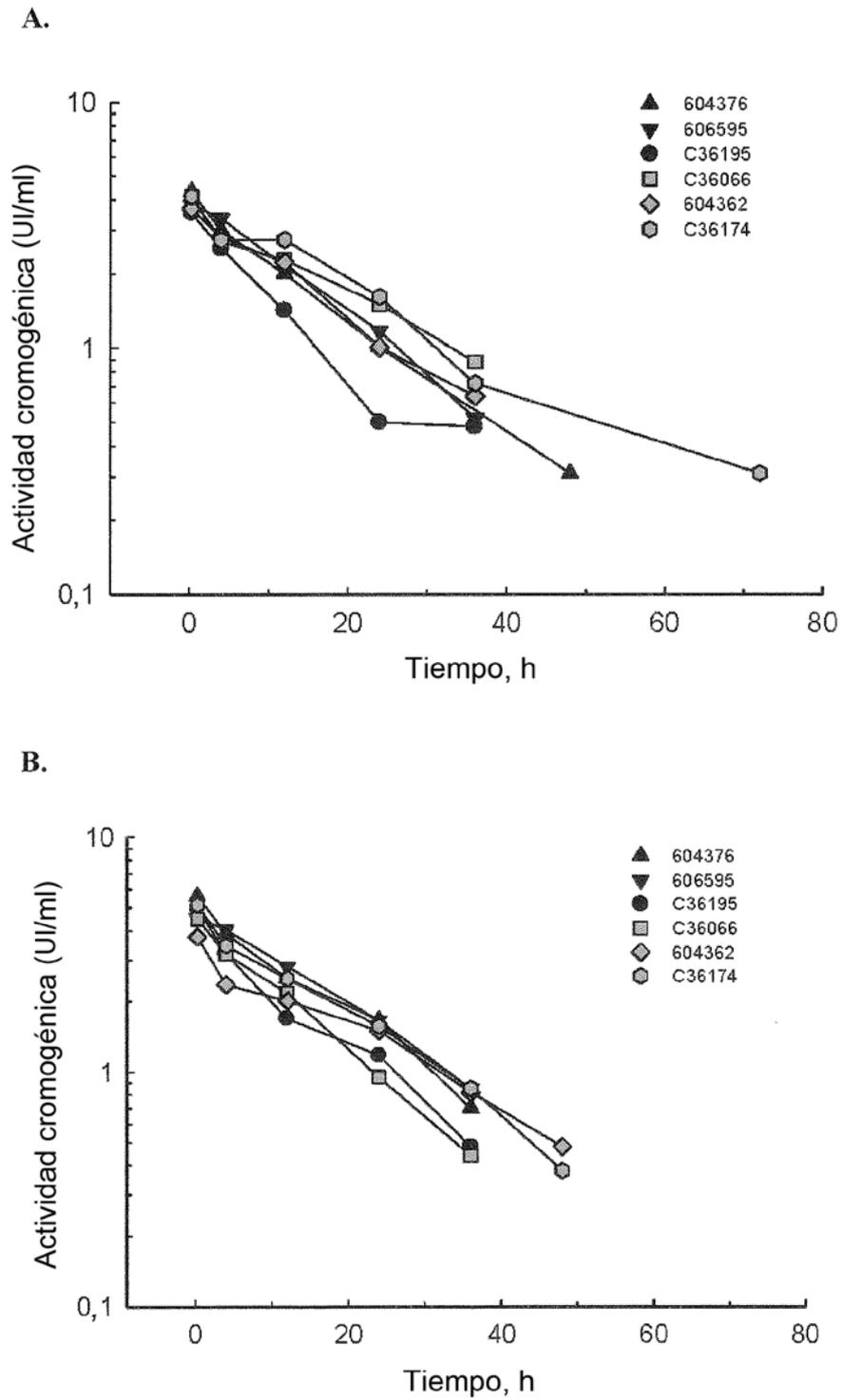


Figura 11

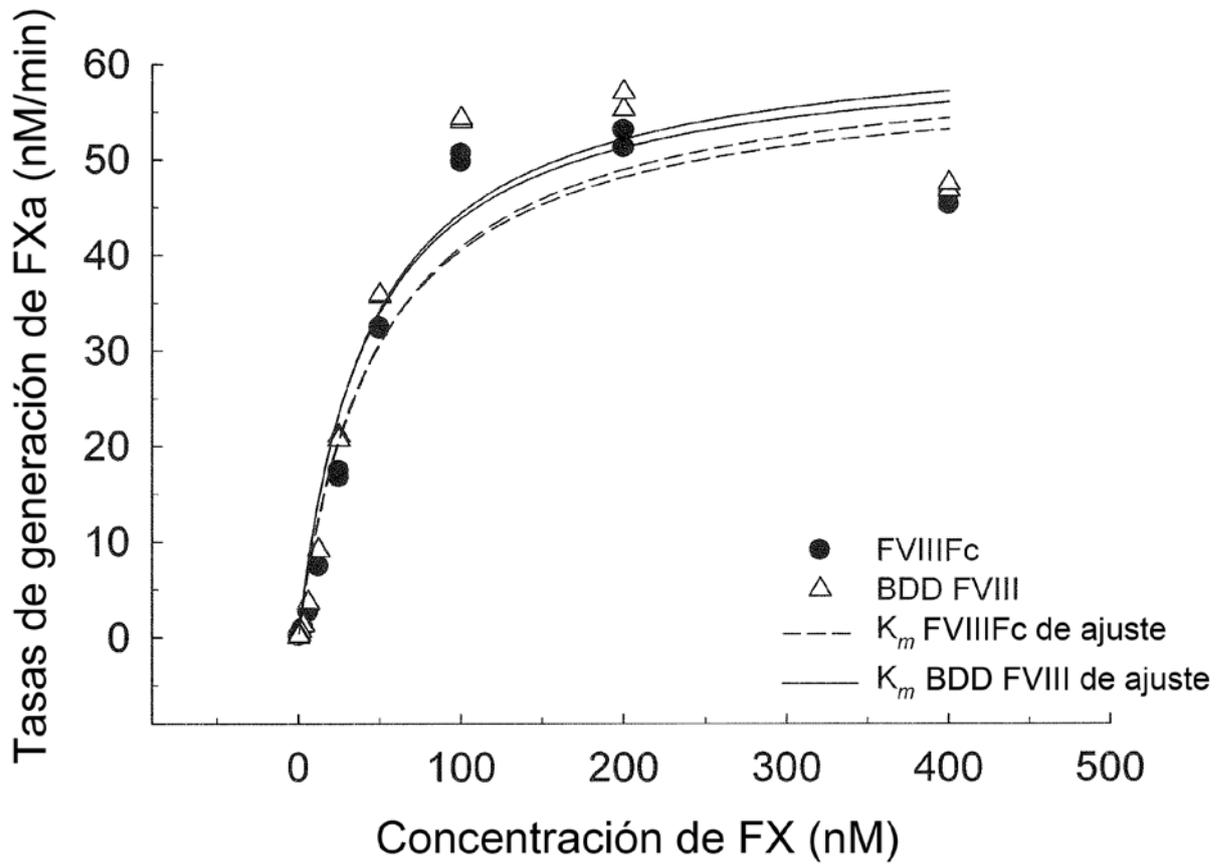


Figura 12

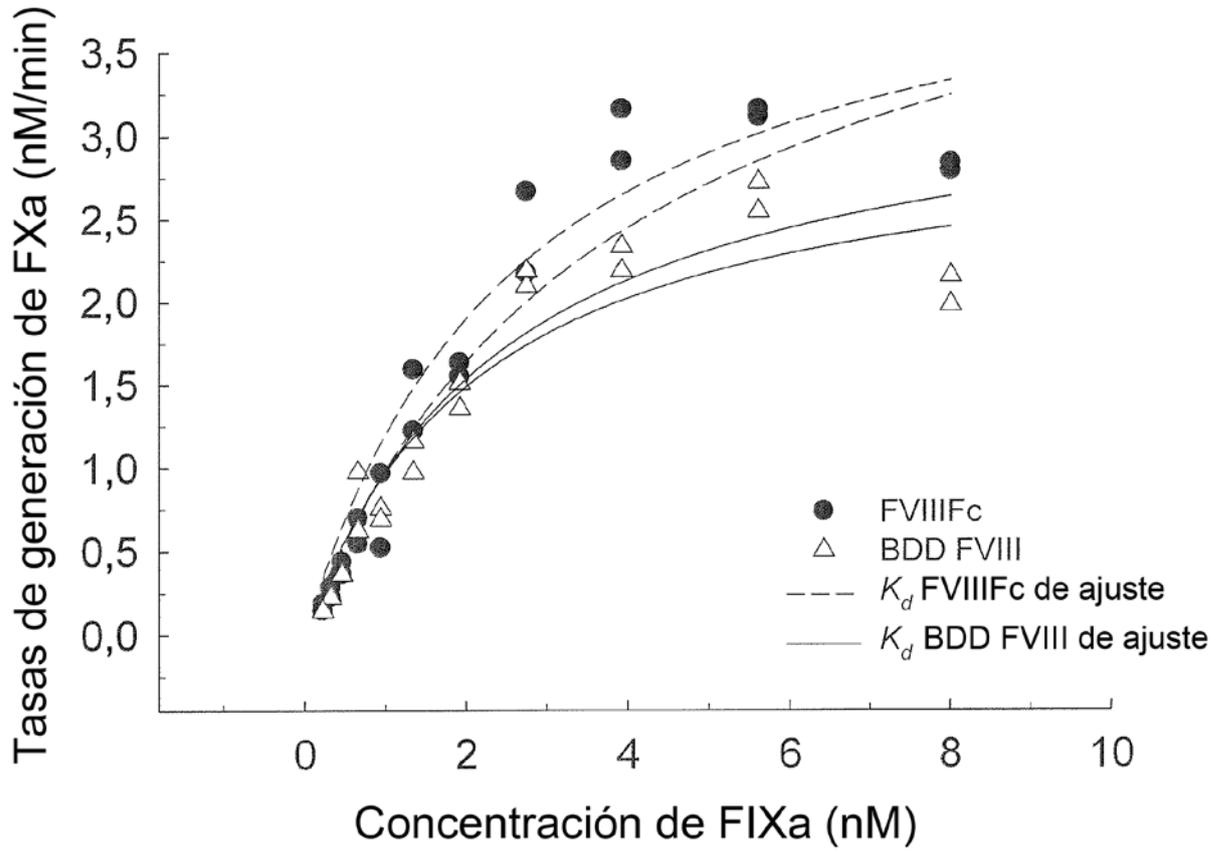


Figura 13A

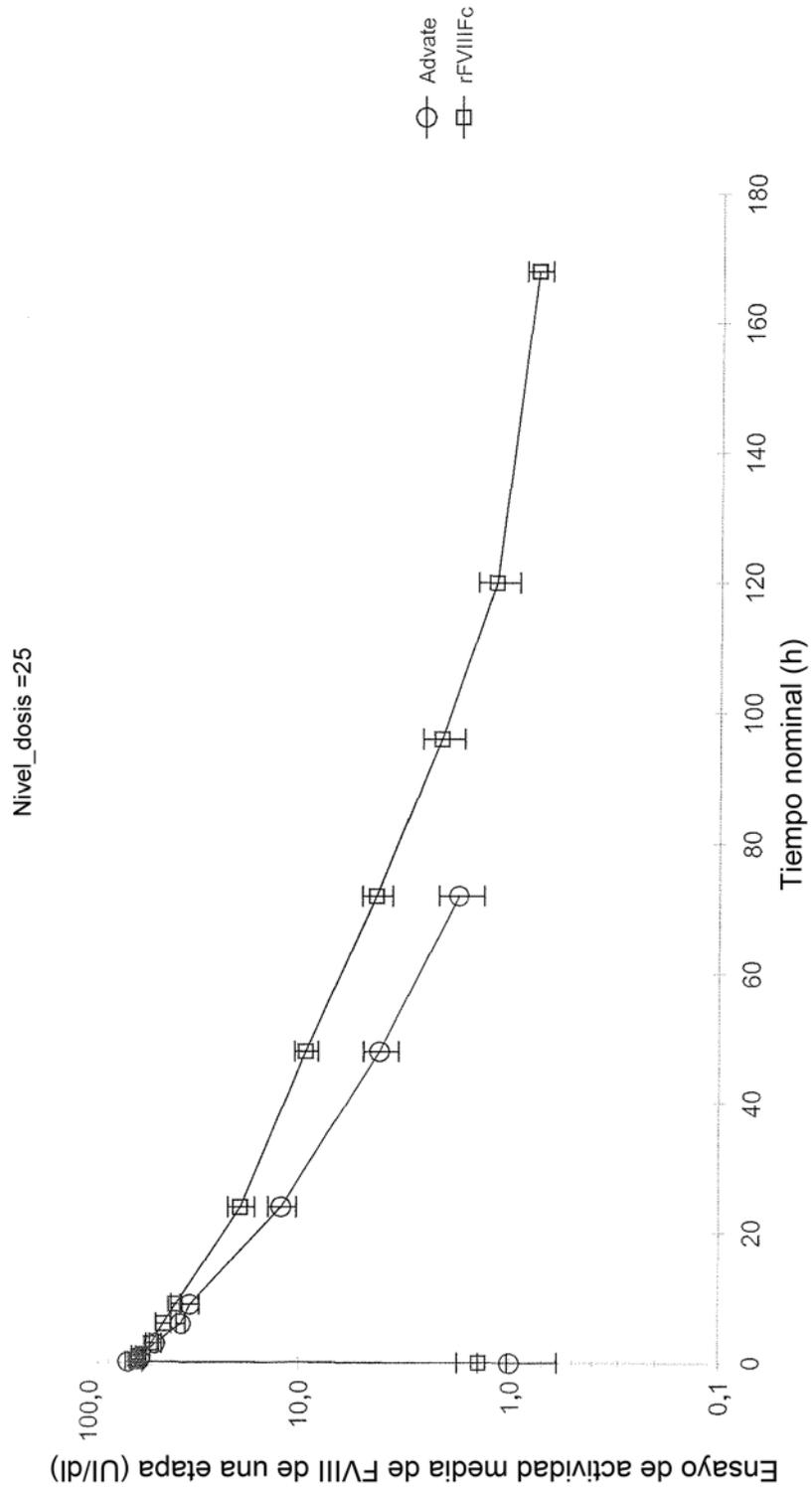


Figura 13B

Nivel\_dosis =65

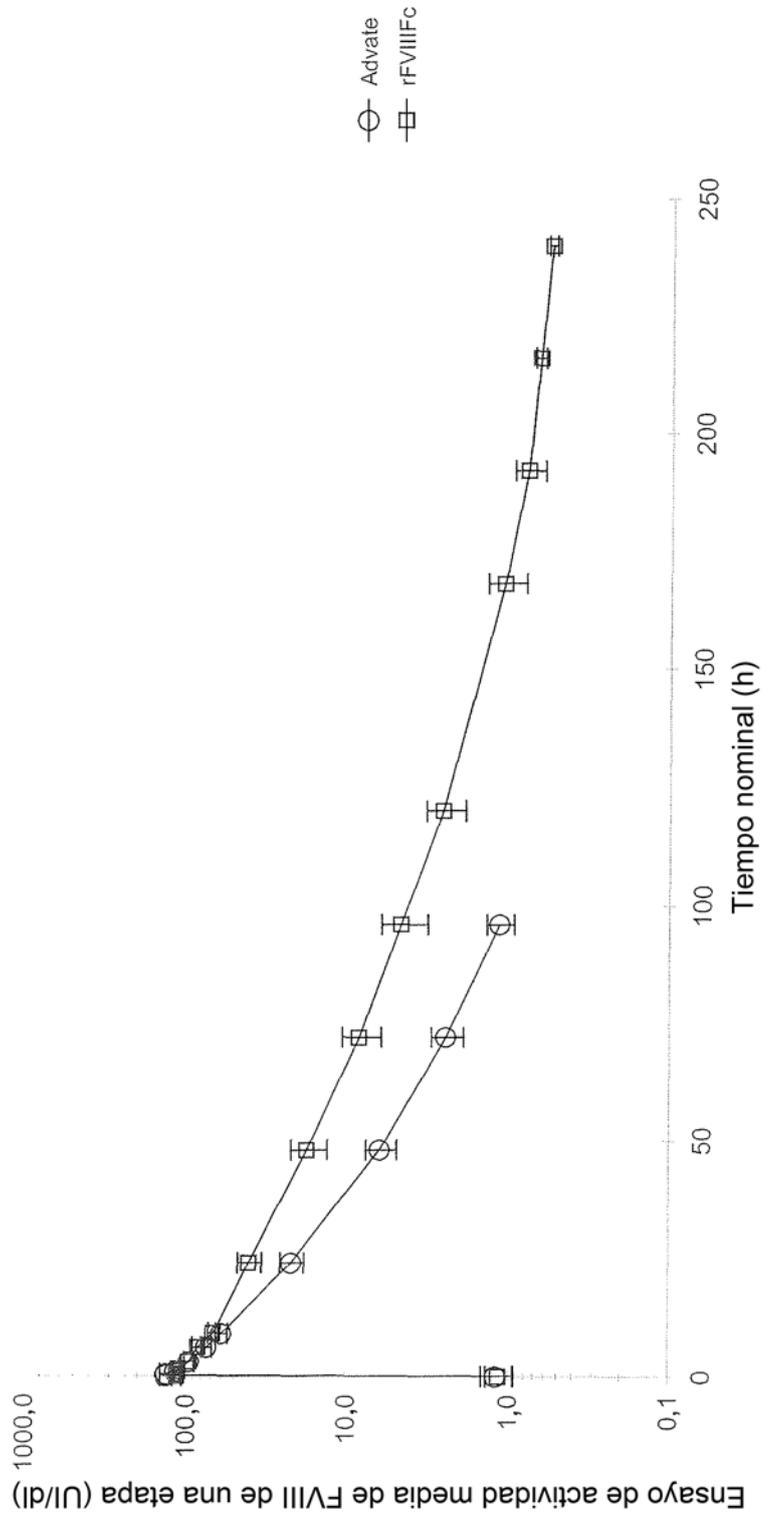


Figura 13C

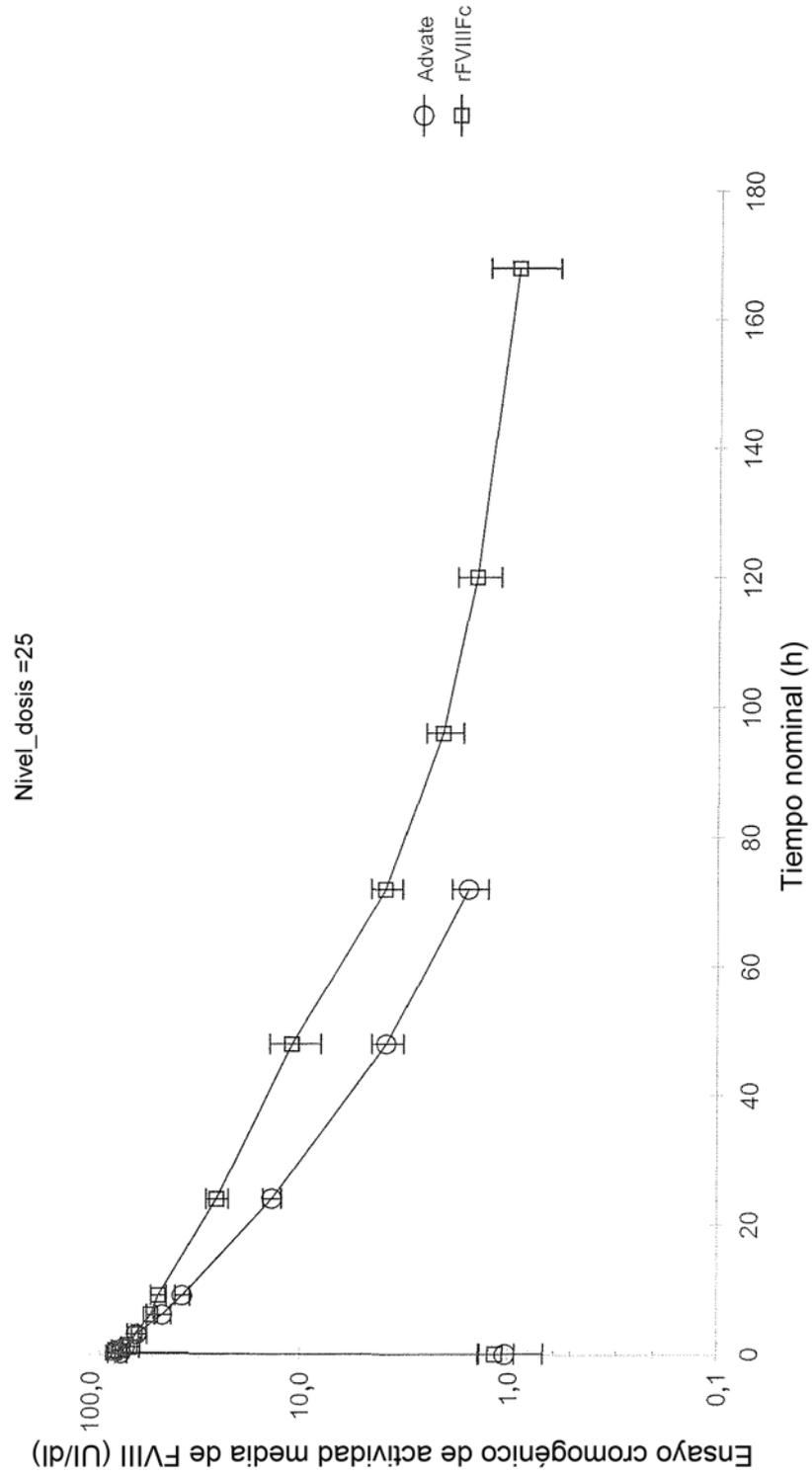


Figura 13D

Nivel\_dosis =65

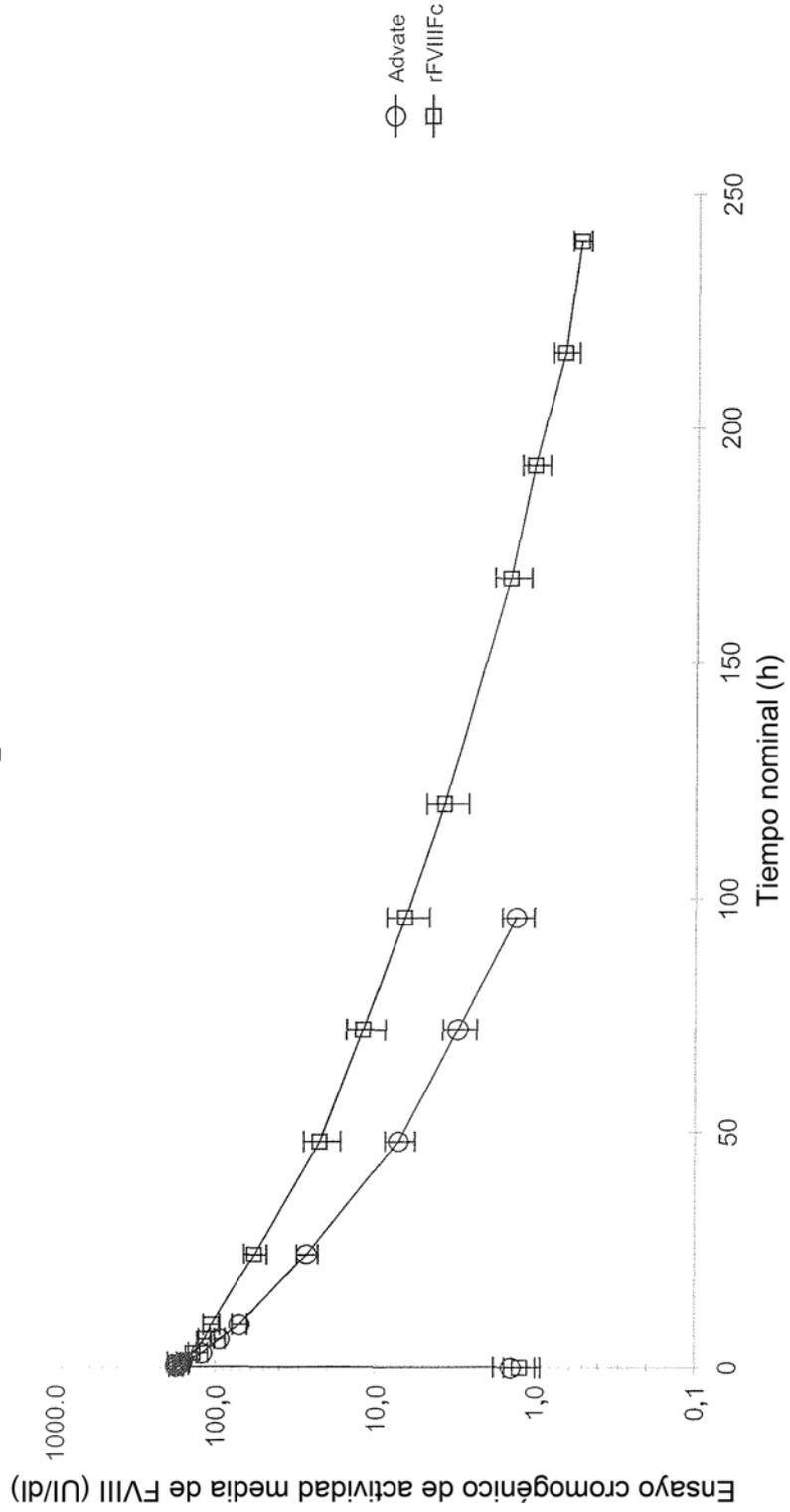


Figura 14A

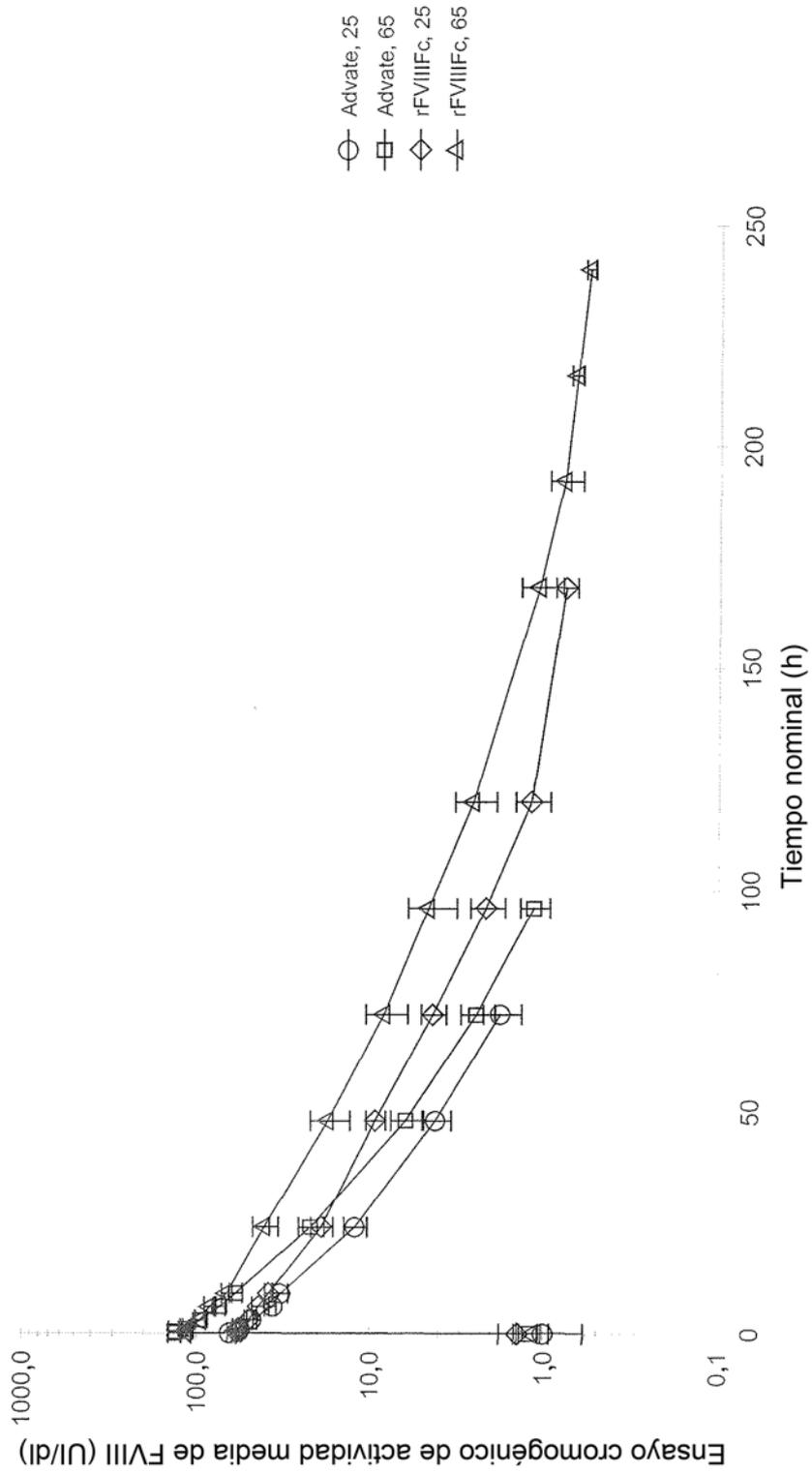


Figura 14B

