

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 195**

51 Int. Cl.:

A61K 38/37 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.03.2014 PCT/US2014/029354**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.09.2014 WO14144795**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.03.2014 E 14725816 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.12.2019 EP 2968477**

54 Título: **Formulaciones de polipéptido de factor VIII**

30 Prioridad:

**15.03.2013 US 201361800293 P
29.04.2013 US 201361817085 P
31.05.2013 US 201361829884 P
26.06.2013 US 201361839477 P
08.08.2013 US 201361863860 P
12.09.2013 US 201361876927 P
19.09.2013 US 201361879955 P
30.10.2013 US 201361897742 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
29.07.2020

73 Titular/es:

**BIOVERATIV THERAPEUTICS INC. (100.0%)
225 Second Avenue
Waltham, MA 02451, US**

72 Inventor/es:

**MALONEY, KEVIN;
ABDUL-FATTAH, AHMAD y
GAGE, DANIEL**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 776 195 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

Formulaciones de polipéptido de factor VIII

Antecedentes de la invención

Campo de la invención

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

Técnica anterior

10 La hemofilia A es un trastorno hemorrágico ligado a X provocado por mutaciones y/o deleciones en el gen de factor VIII (FVIII) dando como resultado una deficiencia de la actividad de FVIII (Peyvandi, F. et al. Haemophilia 12:82-89 (2006)). La enfermedad se caracteriza por hemorragia espontánea y excesivo sangrado después de traumatismo. Con el tiempo, el sangrado repetido en músculos y articulaciones, que frecuentemente empieza en la infancia temprana, da como resultado artropatía hemofílica y daño articular irreversible. Este daño es progresivo y puede conducir a movilidad severamente limitada en las articulaciones, atrofia muscular y dolor crónico (Rodríguez-Merchan, E.C., Semin. Thromb. Hemost. 29:87-96 (2003)).

15 El dominio A2 es necesario para la actividad procoagulante de la molécula de factor VIII. Los estudios muestran que el factor VIII porcino tiene seis veces mayor actividad procoagulante 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 factor VIII humano y porcino parece estar basada en una diferencia en la secuencia de aminoácidos entre uno o más restos en los dominios A2 humanos y porcinos (Lollar, P., et al., J. Biol. Chem. 267:23652-23657 (1992)).

20 El tratamiento de la hemofilia A es por restauración del direccionamiento de la terapia de reemplazo de la actividad de FVIII a 1 a 5 % de los niveles normales para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M., et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-1779 (2001)). Existen productos de FVIII derivados del plasma y recombinantes disponibles para tratar episodios hemorrágicos a demanda o para prevenir los episodios hemorrágicos que ocurren tratando profilácticamente.

25 La mortalidad reducida, prevención del daño articular y calidad de vida mejorada han sido logros importantes debido al desarrollo de FVIII derivado del plasma y recombinante. La prolongada protección del sangrado representaría otro avance clave en el tratamiento de pacientes con hemofilia A.

Breve resumen de la invención

30 Basándose en la divulgación que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una composición farmacéutica que comprende: (a) 50 UI/mL a 2500 UI/mL de un polipéptido rFVIII₁₋₂; (b) 10 mg/mL a 25 mg/mL de sacarosa; (c) 8,8 mg/mL a 14,6 mg/mL de cloruro sódico (NaCl); (d) 0,75 mg/mL a 2,25 mg/mL de L-histidina; (e) 0,75 mg/mL a 1,5 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (f) 0,08 mg/mL a 0,25 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80. Manitol, glicina, alanina, o hidroxietilalmidón no están incluidos en la composición farmacéutica. En otra realización, NaCl es el único agente de carga.

35 En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 13 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL de sacarosa, aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa, o aproximadamente 20,0 mg/mL de sacarosa. En otras realizaciones más, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 13 mg/mL de NaCl, aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl.

40 En aún otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina a aproximadamente 1,55 mg/mL de L-histidina. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende 0,75 mg/mL a 1,5 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado, o aproximadamente 0,8 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado a aproximadamente 1,18 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,13 % de mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80 o aproximadamente 0,20 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

45 En otras realizaciones, la composición farmacéutica comprende el polipéptido rFVIII₁₋₂, que comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % o 95 % idéntica a los aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO: 2 o 20 a 2578 de SEQ ID NO: 6, y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % a 95 % idéntica a los aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, en donde el polipéptido rFVIII₁₋₂ comprende una primera subunidad que comprende aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO: 2 o 20 a 2578 de SEQ ID NO: 6, y una segunda subunidad que comprende los aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 4.

50 En ciertas realizaciones, el polipéptido rFVIII₁₋₂ está presente en una composición farmacéutica a una concentración de aproximadamente 50 UI/mL a aproximadamente 2500 UI/mL, por ejemplo, 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL del polipéptido rFVIII₁₋₂. En

algunas realizaciones, el polipéptido rFVIII_{IFc} está presente en una composición farmacéutica a una concentración de 150 UI/mL, 287,5 UI/mL, 431,25 UI/mL, 575 UI/mL, 862,5 UI/mL, 1150 UI/mL, 1725 UI/mL, 2300 UI/mL, de polipéptido rFVIII_{IFc}.

5 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica comprende: (a) aproximadamente 83 UI/mL, aproximadamente 167 UI/mL, aproximadamente 250 UI/mL, aproximadamente 333 UI/mL, aproximadamente 500 UI/mL, aproximadamente 667 UI/mL, aproximadamente 1000 UI/mL, aproximadamente 1333 UI/mL, aproximadamente 1667 UI/mL, o aproximadamente 2000 UI/mL de polipéptido rFVIII_{IFc}; (b) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (c) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (d) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (e) aproximadamente 0,8 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (f) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

10 En algunas realizaciones, la presente invención incluye un kit farmacéutico que comprende: (a) un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende (i) aproximadamente 250 UI, aproximadamente 500 UI, aproximadamente 750 UI, aproximadamente 1000 UI, aproximadamente 1500 UI, aproximadamente 2000 UI, aproximadamente 3000 UI, aproximadamente 4000 UI, aproximadamente 5000 UI, o aproximadamente 6000 UI de un polipéptido rFVIII_{IFc}, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de cloruro sódico; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,40 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y (b) un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 83 UI/mL, aproximadamente 167 UI/mL, aproximadamente 250 UI/mL, aproximadamente 333 UI/mL, aproximadamente 500 UI/mL, aproximadamente 667 UI/mL, aproximadamente 1000 UI/mL, aproximadamente 1333 UI/mL, aproximadamente 1667 UI/mL, o aproximadamente 2000 UI/mL de un polipéptido rFVIII_{IFc}, respectivamente; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

La divulgación también incluye un método de reducción o disminución de un episodio hemorrágico o tratamiento o prevención de una afección hemorrágica que comprende administrar una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVIII.

La presente invención y las realizaciones preferidas de la misma se explican en las reivindicaciones adjuntas.

30 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra detalles sobre el diseño de la dosificación del subgrupo PK secuencial (Brazo 1) y el muestreo PK.

35 La Figura 2 muestra la actividad de FVIII observada media con rFVIII_{IFc} y rFVIII con el tiempo: ensayo de coagulación de una etapa (escala logarítmica) en el subgrupo farmacocinético secuencial. rFVIII_{IFc} demostró una semivida de eliminación de aproximadamente 50 % más larga y tiempo de residencia medio en comparación con factor VIII no mutante (un polipéptido de FVIII de acción corta) ($P < 0,001$).

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona una formulación para FVIII-Fc.

I. Definiciones

40 Se debe observar que, como se usa en esta memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a menos que el contexto dicte claramente de otro modo. Los términos "un" (o "una"), así como los términos "uno o más," y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en el presente documento.

45 El término "aproximadamente" se usa en el presente documento para significar aproximadamente, alrededor, o en las regiones de. Cuando el término "aproximadamente" se usa conjuntamente con un intervalo numérico, modifica ese intervalo extendiendo los límites por encima y por debajo de los valores numéricos expuestos. En general, el término "aproximadamente" se usa en el presente documento para modificar un valor numérico por encima y por debajo del valor establecido por una varianza de 10 porcentaje, por arriba o por debajo (más alto o más bajo).

50 Además, "y/o" donde se usa en el presente documento se debe considerar divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Así, el término "y/o" como se usa en una expresión tal como "A y/o B" en el presente documento pretende incluir "A y B", "A o B", "A" (solo), y "B" (solo). Asimismo, el término "y/o" como se usa en una expresión tal como "A, B y/o C" pretende englobar cada una de las siguientes realizaciones: A, B, y C; A, B, o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

Se entiende que en cualquier parte donde las realizaciones se describan en el presente documento con la expresión "que comprende," también se proporcionan de otro modo las realizaciones análogas descritas en términos de "que consiste en" y/o "que consisten esencialmente en".

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la técnica a la que se refiere la presente divulgación. Por ejemplo, el Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2ª ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3ª ed., 1999, Academic Press; y el Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revisado, 2000, Oxford University Press, proporcionan al experto un diccionario general de muchos de los términos usados en la presente divulgación.

10 Las unidades, prefijos y símbolos se indican en su forma aceptada por el Système International de Unites (SI). Los intervalos numéricos son incluyentes de los números que definen el intervalo. A menos que se indique lo contrario, las secuencias de aminoácidos se escriben de izquierda a derecha en la orientación de amino a carboxi. Los encabezados proporcionados en el presente documento no son limitaciones de los diversos aspectos o realizaciones de la divulgación, que pueden ser tenidos como referencia a la memoria descriptiva en conjunto. Por consiguiente, los
15 términos definidos inmediatamente a continuación se definen más completamente como referencia a la memoria descriptiva en su totalidad. Los aminoácidos se denominan en el presente documento por cualquiera de sus símbolos conocidos comúnmente de tres letras o por los símbolos de una letra recomendados por la Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB. Los nucleótidos, asimismo, se denominan por sus códigos de una letra aceptados comúnmente.

20 El término "polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto polimérico compuesto de restos de aminoácidos enlazados covalentemente.

El término "polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan indistintamente y se refieren a un compuesto polimérico compuesto de restos de nucleótidos enlazados covalentemente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, de
25 cadena sencilla, o cadena doble, vectores, plásmidos, fagos, o virus. Los polinucleótidos incluyen aquellos en la Tabla 10, que codifican los polipéptidos de la Tabla 11 (véase la Tabla 10). Los polinucleótidos también incluyen fragmentos de los polinucleótidos de la Tabla 10, por ejemplo, los que codifican fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 11, tales como el factor VIII, Fc, secuencia señal, propéptido, y otros fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 11.

"Administrar", como se usa en el presente documento, significa prescribir o dar una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de factor VIII de la invención a un sujeto por una vía farmacéuticamente aceptable. Los
30 ejemplos de las vías de administración incluyen, pero no se limitan a, intravenosa, por ejemplo, inyección intravenosa e infusión intravenosa, por ejemplo, por acceso venoso central. Las vías de administración adicionales incluyen administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal y pulmonar. Las ventajas de la presente invención incluyen: cumplimiento mejorado de la pauta; rotura reducida a través de sangrados; elevada protección de las articulaciones de sangrados; prevención de daño articular; morbilidad reducida; mortalidad reducida; prolongada protección del
35 sangrado; disminución de eventos tromboticos; y calidad de vida mejorada.

Los términos "de acción prolongada" y "de larga duración" se usan indistintamente en el presente documento. En una realización, el término "de acción prolongada" o "de larga duración" indica que una actividad de FVIII como resultado de la administración del polipéptido de FVIII "de acción prolongada" es más larga que la actividad de FVIII de un FVIII
40 no mutante (por ejemplo, ADVATE® o FVIII derivado de plasma ("pdFVIII")). La actividad de FVIII "más larga" se puede medir por cualquier método conocido en la materia, por ejemplo, ensayo de aPTT, ensayo cromogénico, ROTEM®, TGA, etc. En una realización, la actividad de FVIII "más larga" se puede mostrar por $T_{1/2\beta}$ (actividad). En otra realización, la actividad de FVIII "más larga" se puede mostrar por el nivel de antígeno de FVIII presente en plasma, por ejemplo, por $T_{1/2\beta}$ (antígeno). En otras realizaciones, el polipéptido de FVIII de acción prolongada o de larga duración funciona en una cascada de coagulación, por ejemplo, es activo durante un periodo más largo, en
45 comparación con un polipéptido de FVIII no mutante, es decir, un polipéptido que consiste en los aminoácidos 20 a 1457 de SEQ ID NO: 2, es decir, SQ BDD FVIII (REFACTO®) o un polipéptido que consiste en los aminoácidos 20 a 2351 de SEQ ID NO: 6 (ADVATE®).

Los términos "de acción corta" y "de corta duración" se usan indistintamente en el presente documento. El término "de acción corta" o "de corta duración" indica que una actividad de FVIII como resultado de la administración del polipéptido de FVIII "de acción corta" es similar a o la misma que la actividad de FVIII de un FVIII no mutante (por ejemplo,
50 ADVATE® (aminoácidos 20 a 2351 de SEQ ID NO: 6), REFACTO® (aminoácidos 20 a 1457 de SEQ ID NO: 2), o FVIII derivado de plasma ("pdFVIII")) o más corta que la actividad de FVIII de un polipéptido de FVIII de acción prolongada. La actividad de FVIII "más corta" se puede medir por cualquier método conocido en la técnica, por ejemplo, ensayo, de aPTT ensayo cromogénico, ROTEM®, TGA, etc. Los polipéptidos de FVIII de acción corta a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, polipéptido de FVIII maduro no mutante (ADVATE®, RECOMBIMATE®, o HELIXATE®) o polipéptidos de FVIII con dominio B delecionado tales como FVIII SQ BDD (REFACTO® y XYNTHA®) o polipéptidos de FVIII que contienen 21 aminoácidos del dominio B (es decir, SFSQNSRHPSPVLPVLRHQR, SEQ ID NO: 17) (por
55 ejemplo, NOVOEIGHT®).

El término "polipéptido quimérico", como se usa en el presente documento, significa un polipéptido que incluye dentro de él al menos dos polipéptidos (o porciones de los mismos tal como subsecuencias o péptidos) de diferentes fuentes. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más polipéptidos o porciones de los mismos de diferentes fuentes, tales como diferentes genes, diferentes ADNcs, o diferentes animales u otras especies.

5 Los polipéptidos quiméricos pueden incluir uno o más conectores que unen los diferentes polipéptidos o porciones de los mismos. Así, los polipéptidos o porciones de los mismos se pueden unir directamente o se pueden unir indirectamente, mediante conectores, o ambos, dentro de un único polipéptido quimérico. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir péptidos adicionales, tales como secuencias señal y secuencias tales como 6His y FLAG que ayuda en la purificación o detección de proteínas. Además, los polipéptidos quiméricos pueden tener adiciones de aminoácidos

10 o de péptido a los extremos N y/o C. En algunas realizaciones, un polipéptido quimérico es un polipéptido de FVIII de acción prolongada. Los polipéptidos quiméricos a modo de ejemplo de la invención son polipéptidos quiméricos de factor VIII-FcRn BP, por ejemplo, polipéptidos de factor VIII-Fc tales como FVIII-Fc, SEQ ID NO: 2 o 6 (Tabla 11) con o sin su secuencia señal y propéptido.

Polipéptidos y proteínas "híbridos", como se usa en el presente documento, significa una combinación de un polipéptido quimérico con un segundo polipéptido. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido en un híbrido se pueden asociar entre sí mediante interacciones proteína-proteína, tales como interacciones carga-carga o hidrófobas. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido en un híbrido se pueden asociar entre sí mediante disulfuro u otro(s) enlace(s) covalente(s). Los híbridos se describen en los documentos de patente WO 2004/101740 y WO 2006/074199. Véanse también las patentes de EE. UU. Nº 7.404.956 y 7.348.004. El segundo polipéptido puede ser una segunda

15 copia del mismo polipéptido quimérico o puede ser un polipéptido quimérico no idéntico. Véase, por ejemplo, la Tabla 11. En una realización, el segundo polipéptido es un polipéptido que comprende un componente de unión a FcRn. El componente de unión a FcRn se une a FcRn y protege la molécula que contiene el componente de unión a FcRn del catabolismo, extendiendo así la semivida en plasma. En otra realización, el polipéptido quimérico es un polipéptido quimérico factor VIII-Fc y el segundo polipéptido consiste esencialmente en Fc, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante de rFVIII-Fc que consiste en una única molécula de FVIII humano recombinante con dominio B

20 delecionado (BDD-rFVIII) fusionado con el dominio Fc dímérico de la IgG1 humana, sin secuencia conectora intermedia. Este polipéptido híbrido se denomina en el presente documento proteína de fusión monomérica de FVIII-Fc, híbrido de monómero de FVIII-Fc, híbrido monomérico de FVIII-Fc, y monómero-dímero de FVIII-Fc. Véase la Tabla 11A. Los ejemplos proporcionan datos preclínicos y clínicos para este polipéptido híbrido.

El segundo polipéptido en un híbrido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia al menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 11A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 4) o al menos 90 % o 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 11A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de SEQ ID NO: 4). El segundo polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 11A(ii) sin una

25 secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 4) o idéntica a la secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 11A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de SEQ ID NO: 4).

La actividad coagulante del factor VIII se expresa como Unidad(es) Internacional(es) (UI). Una 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, que incluyen el ensayo de coagulación de una etapa

30 (tiempo de tromboplastina parcial activado; aPTT), tiempo de generación de trombina (TGA) y tromboelastometría rotacional (ROTEM®).

El término "liofilizado", como se usa en el presente documento a propósito de la formulación según la invención, indica una formulación que se fabrica por los métodos de liofilización conocidos en la técnica en sí mismos. El disolvente (por ejemplo, agua) se retira por congelación tras la sublimación a vacío y desorción de agua residual a temperatura

35 elevada. En el campo farmacéutico, el liofilizado tiene normalmente una humedad residual de aproximadamente 0,1 a 5 % (p/p) y está presente como un polvo o una torta estable física. El liofilizado se caracteriza por una rápida disolución después de la adición, de un medio de reconstitución.

El término "formulación reconstituida", como se usa en el presente documento, indica una formulación que se liofiliza y se redisuelve mediante la adición de un diluyente. El diluyente puede contener, sin limitación, agua para inyección (WFI), agua bacteriostática para inyección (BWFI), disoluciones de cloruro sódico (por ejemplo, 0,9 % (p/v) de NaCl), disoluciones de glucosa (por ejemplo, 5 % de glucosa), disoluciones que contienen tensioactivo (por ejemplo, 0,01 % de polisorbato 20 o polisorbato 80), una disolución de pH tamponado (por ejemplo, disolución tamponadas con fosfato) y combinaciones de los mismos.

40

"Intervalo de dosificación", como se usa en el presente documento, significa la cantidad de tiempo que transcurre entre las dosis múltiples que se administran a un sujeto. El intervalo de dosificación se puede así indicar como intervalos. El intervalo de dosificación en los métodos de la divulgación usando un BP de FVIII-FcRn quimérico, por ejemplo, un FVIII-Fc quimérico, puede ser al menos uno y medio a ocho veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente (en UI/kg) del factor VIII sin la BP de FcRn, por ejemplo, porción Fc (es decir, un polipéptido que consiste en dicho FVIII). El intervalo de dosificación cuando se administra, por ejemplo, un polipéptido quimérico de factor VIII-Fc (o un híbrido) de la invención puede ser al menos aproximadamente uno y medio a ocho

45 veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente del factor VIII sin el BP de

FcRn, por ejemplo, porción Fc (es decir, un polipéptido que consiste en el factor VIII). El intervalo de dosificación puede ser al menos aproximadamente uno y medio a ocho veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una cantidad equivalente del factor VIII sin, por ejemplo, la porción Fc (o un polipéptido que consiste en el factor VIII).

5 El término "frecuencia de dosis", como se usa en el presente documento, se refiere a la frecuencia de administración de las dosis de un polipéptido de FVIII en un momento dado. La frecuencia de dosis se puede indicar como el número de dosis por un momento dado, por ejemplo, una vez a la semana o una vez en dos semanas.

10 El término "profilaxis de uno o más episodios hemorrágicos" o "tratamiento profiláctico", como se usa en el presente documento, significa administrar un polipéptido de FVIII en dosis múltiples a un sujeto durante un transcurso de tiempo para aumentar el nivel de actividad de FVIII en el plasma de un sujeto. En una realización, "profilaxis de uno o más episodios hemorrágicos" indica el uso de un polipéptido de FVIII para prevenir o inhibir la aparición de uno o más sangrados o episodios hemorrágicos espontáneos o incontrolables o para reducir la frecuencia de uno o más sangrados o episodios hemorrágicos espontáneos o incontrolables. En otra realización, el aumento del nivel de actividad de FVIII es suficiente para reducir la incidencia de sangrado espontáneo o para prevenir el sangrado en caso de una lesión imprevista. El tratamiento profiláctico disminuye o previene episodios hemorrágicos, por ejemplo, los descritos en el tratamiento a demanda. El tratamiento profiláctico puede ser individualizado, como se trata en "intervalo de dosificación", por ejemplo, para compensar la variabilidad entre pacientes.

20 El término "aproximadamente dos veces a la semana", como se usa en el presente documento, significa un número aproximado, y "aproximadamente dos veces a la semana" puede incluir dos veces en una semana, por ejemplo, una primera dosis en tres días y una segunda dosis en tres días, una primera dosis en tres días y una segunda dosis en cuatro días, una primera dosis en cuatro días y una segunda dosis en tres días, una primera dosis en cuatro días y una segunda dosis en cuatro días. El término "aproximadamente dos veces a la semana" también puede incluir cada tres días, cada cuatro días, o cada cinco días.

25 El término "aproximadamente una vez a la semana" como se usa en el presente documento significa un número aproximado, y "aproximadamente una vez a la semana" puede incluir cada siete días \pm dos días, es decir, cada cinco días a cada nueve días. La frecuencia de dosis de "una vez a la semana" puede ser así cada cinco días, cada seis días, cada siete días, cada ocho días, o cada nueve días.

30 El término "profilaxis individualizada" o "profiláctico e individualizado", como se usa en el presente documento, significa el uso de un polipéptido de FVIII para una dosificación y/o intervalo o frecuencia de dosificación individualizado para prevenir o inhibir la aparición de una o más hemorragias o episodios hemorrágicos espontáneos y/o incontrolables o para reducir la frecuencia de una o más hemorragias o episodios hemorrágicos espontáneos y/o incontrolables. "Individualizado" dentro del contexto de la profilaxis se usa de forma sinónima con "personalizado" en toda la presente solicitud. Por ejemplo, "profilaxis individualizada" también significa "profilaxis personalizada" y "profiláctico e individualizado" también significa "profiláctico y personalizado". En una realización, el "intervalo individualizado" incluye cada 3 días \pm 2 días, es decir, cada día a cada cinco días. La frecuencia de dosis de la "profilaxis de intervalo individualizado" puede así ser cada día, cada dos días, cada tres días, cada cuatro días, o cada cinco días.

40 El término "tratamiento a demanda", como se usa en el presente documento, significa tratamiento que pretende tener lugar durante un corto transcurso de tiempo y es en respuesta a una afección existente, tal como a episodios hemorrágicos, o una necesidad percibida a corto plazo tal como una cirugía planeada. El "tratamiento a demanda" se usa indistintamente con tratamiento "episódico". Las afecciones que pueden requerir tratamiento a demanda incluyen episodios hemorrágicos, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo encefálico, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopsoas. También están incluidos episodios hemorrágicos distintos de estos. El sujeto puede estar en necesidad de profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio, o tratamiento para cirugía. Dichas cirugías incluyen cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, otras cirugías dentales/toraco-faciales, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo total de rodilla, otro reemplazo de articulación, craneotomía, osteosíntesis, cirugía para traumatismo, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal o cirugía intratorácica. También están incluidas cirugías distintas de éstas.

50 Afecciones adicionales que pueden requerir tratamiento a demanda incluyen hemorragia menor, hemartrosis, hemorragia muscular superficial, hemorragia de tejido blando, hemorragia moderada, hemorragia intramuscular o de tejido blando con disección, hemorragia de la membrana mucosa, hematuria, hemorragia mayor, hemorragia de la faringe, hemorragia de la retrofaringe, hemorragia del retroperitoneo, hemorragia del sistema nervioso central, cardenales, cortes, arañazos, hemorragia articular, sangrado nasal, sangrado bucal, sangrado de las encías, sangrado intracraneal, sangrado intraperitoneal, hemorragia espontánea menor, sangrado después de traumatismo mayor, cardenal moderado de la piel, o hemorragia espontánea en las articulaciones, músculos, órganos internos o el cerebro. Los motivos adicionales para el tratamiento a demanda incluyen la necesidad de tratamiento perioperatorio para cirugía o extracción dental, cirugía mayor, extensa cirugía bucal, cirugía urológica, cirugía de hernia, cirugía ortopédica tal como reemplazo de rodilla, cadera, u otra articulación mayor.

El término "tratamiento" o "tratar", como se usa en el presente documento, significa mejora o reducción de uno o más síntomas de las enfermedades o trastornos hemorrágicos que incluyen, pero no se limitan a, hemofilia B. En una realización, "tratamiento de" o "tratar" una enfermedad o trastorno hemorrágico incluye la prevención de uno o más síntomas de una enfermedad o trastorno hemorrágico. En una enfermedad o trastorno hemorrágico provocado por una deficiencia de FVIII (por ejemplo, una actividad de FVIII inicial baja), el término "tratamiento" o "tratar" significa una terapia de reemplazo de FVIII. Administrando una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVIII a un sujeto, el sujeto puede lograr y/o mantener un nivel valle en plasma de una actividad de FVIII a aproximadamente 1 UI/dl o por encima de 1 UI/dl. En otras realizaciones, "tratamiento" o "tratar" significa la reducción de la frecuencia de uno o más síntomas de enfermedades o trastornos hemorrágicos, por ejemplo, episodios hemorrágicos espontáneos o incontrolables. El "tratamiento," sin embargo, no necesita ser una cura.

El término "tratamiento perioperatorio", como se usa en el presente documento, significa el uso de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVIII antes, simultáneamente con, o después de un procedimiento operatorio, por ejemplo, una operación quirúrgica. El uso para "tratamiento perioperatorio" de uno o más episodios hemorrágicos incluye profilaxis quirúrgica antes (es decir, preoperatorio), durante (es decir, intraoperatorio), o después de (es decir, posoperatorio) de una cirugía para prevenir uno o más sangrados o episodios hemorrágicos o reducir o inhibir los episodios hemorrágicos espontáneos y/o incontrolables antes, durante y después de una cirugía.

"Nivel inicial", como se usa en el presente documento, es el nivel de factor VIII plasmático medido más bajo en un sujeto antes de administrar una dosis. Los niveles de FVIII en plasma se pueden medir en dos puntos de tiempo antes de la dosificación: en una visita de selección e inmediatamente antes de la dosificación. Alternativamente, (a) el nivel inicial en pacientes cuya actividad de FVIII pretratamiento es <1 %, que no tienen antígeno de FVIII detectable, y no tienen genotipos sentido, se puede definir como 0 %, (b) el nivel inicial para pacientes con actividad de FVIII pretratamiento <1 % y que tienen antígeno FVIII detectable se puede establecer en 0,5 %, (c) el nivel inicial para pacientes cuya actividad de FVIII pretratamiento es entre 1 - 2 % es C_{min} (la actividad más baja durante todo el estudio de PK), y (d) el nivel inicial para pacientes cuya actividad de FVIII pretratamiento es ≥ 2 % se puede establecer en 2 %. La actividad por encima de la predosis inicial se puede considerar fármaco residual del tratamiento anterior, y puede decaer hasta el nivel inicial y restarse de los datos PK tras la dosificación de rFVIIIc.

" $T_{1/2\beta}$," o " $T_{1/2\text{beta}}$ " o "Beta HL", como se usa en el presente documento, es la semivida asociada a la fase de eliminación, $t_{1/2\beta} = (\ln 2) / \text{constante de velocidad de eliminación asociada a la fase terminal}$. $T_{1/2\text{beta}}$ se puede medir por la actividad de FVIII o por el nivel de antígeno FVIII en plasma. $T_{1/2\text{beta}}$ basado en la actividad se muestra como $T_{1/2\text{beta}}$ (actividad), y $T_{1/2\text{beta}}$ basado en el nivel de antígeno FVIII se puede mostrar como $T_{1/2\text{beta}}$ (antígeno). Tanto $T_{1/2\text{beta}}$ (actividad) como $T_{1/2\text{beta}}$ (antígeno) se pueden mostrar como intervalos o una media geométrica.

"Valle", como se usa en el presente documento, es el nivel de actividad de FVIII en plasma más bajo alcanzado después de administrar una dosis de polipéptido quimérico de la invención u otra molécula de FVIII y antes de administrar la siguiente dosis, si hay. Valle se usa indistintamente en el presente documento con "umbral". Los niveles de FVIII del nivel inicial se restan de los niveles de FVIII medidos para calcular el nivel valle.

El término "tasa anualizada de sangrado" ("ABR") como se usa en el presente documento se refiere al número de episodios hemorrágicos (incluyendo sangrado espontáneo y traumático) experimentados por un sujeto durante un periodo de tiempo definido, extrapolado a 1 año. Por ejemplo, dos sangrados en seis meses indicaría una ABR de cuatro. La mediana de la ABR proporciona el valor medio entre todas las ABRs observadas, que indica que la mitad de los sujetos tuvieron ABRs individuales inferiores o iguales a la mediana y la mitad tuvieron ABRs superiores o iguales a la mediana.

El término "intervalo intercuartílico" ("IQR") como se usa en el presente documento se refiere a una medida de dispersión estadística, que es igual a la diferencia entre los cuartiles superior e inferior. A diferencia del intervalo (total), el intervalo intercuartílico es una estadística robusta, que tiene un punto de ruptura de 25 %, y así se prefiere frecuentemente el intervalo total. Para una distribución simétrica (donde la mediana es igual a la línea media, el promedio del primer y tercer cuartiles), la mitad de IQR es igual a la mediana de la desviación absoluta (MAD). La mediana es la medida correspondiente de la tendencia central.

"Sujeto", como se usa en el presente documento, significa un humano. El sujeto como se usa en el presente documento incluye un individuo que se conoce por tener al menos una incidencia de episodios hemorrágicos incontrolados, que ha sido diagnosticado con una enfermedad o trastorno asociado a episodios hemorrágicos incontrolados, por ejemplo, una enfermedad o trastorno hemorrágico, por ejemplo, hemofilia A, que es susceptible a episodios hemorrágicos incontrolados, por ejemplo, hemofilia, o cualquier combinación de los mismos. Los sujetos también pueden incluir un individuo que está en peligro de uno o más episodios hemorrágicos incontrolables antes de una cierta actividad, por ejemplo, una cirugía, una actividad deportiva, o cualquier actividad extenuante. El sujeto puede tener una actividad de FVIII inicial inferior a 1 %, inferior a 0,5 %, inferior a 2 %, inferior a 2,5 %, inferior a 3 %, o inferior a 4 %. Los sujetos también incluyen humanos pediátricos. Los humanos pediátricos son desde el nacimiento hasta 20 años, preferentemente nacimiento hasta 18 años, nacimiento hasta 16 años, nacimiento hasta 15 años, nacimiento hasta 12 años, nacimiento hasta 11 años, nacimiento hasta 6 años, nacimiento hasta 5 años, nacimiento hasta 2 años, o 2 hasta 11 años de edad.

"Dosis terapéutica", "dosis", "dosis eficaz", o "cantidad de dosificación", como se usan en el presente documento, significa una dosis que logra un nivel valle en plasma de una actividad de FVIII al menos aproximadamente 1 UI/dl o superior a 1 UI/dl en el sujeto administrado con una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVIII. Con el fin de la presente invención, en una realización, la "dosis" se refiere a la cantidad de las dosis que mantiene un nivel valle en plasma de una actividad de FVIII en al menos aproximadamente 1 UI/dl o por encima de 1 UI/dl, al menos aproximadamente 2 UI/dl o por encima de 2 UI/dl, al menos aproximadamente 3 UI/dl o por encima de 3 UI/dl, al menos aproximadamente 4 UI/dl o por encima de 4 UI/dl, o al menos aproximadamente 5 UI/dl o por encima de 5 UI/dl durante toda la administración de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVIII. En otra realización, la "dosis" reduce o disminuye la frecuencia de sangrado o trastorno hemorrágico. En otras realizaciones, la "dosis" detiene hemorragias o episodios hemorrágicos incontrolables en curso. En otras realizaciones más, la "dosis" previene el sangrado espontáneo o episodios hemorrágicos en un sujeto susceptible a dicho sangrado espontáneo o episodios hemorrágicos. La "dosis" o "dosis terapéutica" no necesita curar la hemofilia.

El término "articulación diana" se define como una articulación mayor (por ejemplo, cadera, codo, muñeca, hombro, rodilla y tobillo) en la que ocurre sangrado repetido (frecuencia de ≥ 3 episodios hemorrágicos en la misma articulación en un periodo de 6 meses consecutivos).

El término "episodio hemorrágico", como se usa en el presente documento, adopta una definición normalizada de un episodio hemorrágico. Un episodio hemorrágico empezó a partir del primer signo de sangrado, y terminó 72 horas después del último tratamiento para el sangrado, dentro del cual cualquier síntoma de sangrado en la misma localización, o inyecciones separadas menos de o igual a 72 horas, fueron consideradas el mismo episodio hemorrágico. Cualquier inyección para tratar el episodio hemorrágico, tomada más de 72 horas después de la precedente, se consideró la primera inyección para tratar un nuevo episodio hemorrágico en la misma localización. Cualquier sangrado en una localización diferente se consideró un episodio hemorrágico separado independientemente del tiempo desde la última inyección. Esta definición ha sido propuesta por el Subcomité sobre Patrones y Criterios, subcomité de FVIII/FIX de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia y se ha usado por el estudio multicéntrico PedNet en hemofilia.

El término "tasa anualizada de sangrados" (ABRs), como se usa en el presente documento, se refiere al número de episodios hemorrágicos que son anualizados para cada paciente usando la siguiente fórmula:

$$ABR = \frac{\text{Número de episodios hemorrágicos durante el periodo de eficacia}}{\text{Número total de días durante el periodo de eficacia}} \times 365,25$$

"Variante", como se usa en el presente documento, se refiere a un polinucleótido o polipéptido que se diferencia del polinucleótido o polipéptido, original pero que retiene propiedades esenciales del mismo, por ejemplo, actividad coagulante de factor VIII o actividad de Fc (unión a FcRn). En general, las variantes son en general estrechamente similares y, en muchas regiones, idénticas al polinucleótido o polipéptido original. Las variantes incluyen fragmentos de polipéptidos y de polinucleótidos, deleciones, inserciones, y versiones modificadas de polipéptidos originales.

II. Composición farmacéutica

La presente invención se refiere a un polipéptido rFVIII_{IFc} formulado como una composición farmacéutica. La composición farmacéutica se puede formular para administración a seres humanos. Las composiciones farmacéuticas comprenden vehículos farmacéuticamente aceptables, que incluyen, por ejemplo, intercambiadores iónicos, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina de suero humano, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de disodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro sódico, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polivinilpirrolidona, sustancias basadas en celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa de sodio, poliácridatos, ceras, polímeros de bloque de polietileno-polioxiopropileno, polietilenglicol y grasa de la lana. Se conocen bien en la técnica diversos métodos de formulación de la invención.

En ciertas formulaciones proporcionadas en el presente documento, un polipéptido de FVIII se formula como de polvo a torta estéril, libre de conservantes, no pirógeno, liofilizado, de blanco a blanquecino, para administración intravenosa (IV). La formulación se puede proporcionar en un vial de un solo uso.

En ciertas realizaciones, se proporciona una formulación de rFVIII_{IFc} en un vial de un solo uso fabricado para contener, tras la reconstitución con una cantidad apropiada de diluyente, aproximadamente 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL del polipéptido de FVIII de acción prolongada. En ciertas realizaciones en las que el diluyente se añade a un volumen final de aproximadamente 3 mL, un vial de un solo uso puede contener nominalmente aproximadamente 250, aproximadamente 500, aproximadamente 750, aproximadamente 1000, aproximadamente 1500, aproximadamente 2000, unidades internacionales (UI) de rFVIII_{IFc}.

En ciertas realizaciones, la formulación incluye, además del rFVIII_{IFc} activo: sacarosa (que puede actuar de estabilizador), cloruro sódico (que puede actuar de agente de carga), L-histidina (que puede actuar de tampón), cloruro

de calcio, y polisorbato 20 o polisorbato 80 (que puede actuar de estabilizador). La formulación está provista de un diluyente que comprende una disolución estéril de cloruro sódico. En ciertas realizaciones, el diluyente se proporciona en una jeringa precargada.

5 Por consiguiente, en el presente documento se proporciona una composición farmacéutica que comprende una cantidad especificada de un rFVIII Fc (en UI), junto con los excipientes sacarosa, NaCl, L-histidina, cloruro de calcio, y polisorbato 20 o polisorbato 80. Las composiciones proporcionadas en el presente documento comprenden diversas concentraciones de los diversos excipientes, y las concentraciones se pueden expresar de diversas formas. Por ejemplo, la concentración de un excipiente dado se puede expresar como una concentración molar (por ejemplo, M o mM), como un porcentaje en p/v, (por ejemplo, gramos por 100 mL de diluyente), o como miligramos por mililitro (mg/mL). Las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden contener cantidades especificadas de los diversos excipientes a un nivel de precisión que varía desde, por ejemplo, concentraciones aproximadas expresadas hasta solo una cifra significativa (por ejemplo, aproximadamente 0,1 % (p/v)), o con más precisión, por ejemplo, hasta 2, 3, 4, 5 o 6 cifras significativas (por ejemplo, aproximadamente 3,88 mg/mL, con precisión hasta tres cifras significativas). El nivel de precisión necesario puede variar dependiendo de, por ejemplo, los requisitos de una agencia reguladora dada, o el proceso de fabricación. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende una formulación reconstituida, que se puede proporcionar como un liofilizado, opcionalmente acompañado por un diluyente.

20 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 50 UI/mL a aproximadamente 2500 UI/mL de rFVIII Fc, por ejemplo, 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL de un rFVIII Fc. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL de un rFVIII Fc en una formulación que comprende aproximadamente 13,3 mg/mL o aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa, aproximadamente 12,0 mg/mL o aproximadamente 205 mM de NaCl, aproximadamente 1,03 mg/mL o aproximadamente 6,64 mM de L-histidina, aproximadamente 0,80 mg/mL o aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,13 mg/mL o aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

30 En ciertos casos, la composición farmacéutica pre-lioofilización comprende aproximadamente 100 UI/mL a aproximadamente 4000 UI/mL de rFVIII Fc, por ejemplo, 150 UI/mL, 287,5 UI/mL, 431,25 UI/mL, 575 UI/mL, 862,5 UI/mL, 1150 UI/mL, 1725 UI/mL, 2300 UI/mL, 2875 UI/mL, o 3450 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, rFVIII Fc). En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende 150 UI/mL, 287,5 UI/mL, 431,25 UI/mL, 575 UI/mL, 862,5 UI/mL, 1150 UI/mL, 1725 UI/mL, 2300 UI/mL, 2875 UI/mL, o 3450 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIII Fc) en una formulación que comprende aproximadamente 20,0 mg/mL o aproximadamente 2,0 % (p/v) de sacarosa, aproximadamente 18,0 mg/mL o aproximadamente 308 mM de NaCl, aproximadamente 1,55 mg/mL o aproximadamente 9,8 mM de L-histidina, aproximadamente 1,18 mg/mL o aproximadamente 8,0 mM de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,2 mg/mL o aproximadamente 0,02 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

40 En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de sacarosa. En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 1 % (p/v) a aproximadamente 2,5 % (p/v) de sacarosa, preferentemente aproximadamente 1,3 % (p/v) a aproximadamente 2 % de sacarosa (p/v), por ejemplo, aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa o aproximadamente 2,0 % (p/v) de sacarosa. En ciertas realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 25 mg/mL de sacarosa, preferentemente aproximadamente 13 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL de sacarosa, por ejemplo, aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa o aproximadamente 20,0 mg/mL de sacarosa. En otras realizaciones más, se pueden usar agentes estabilizantes tales como trehalosa, rafinosa y/o arginina a estas concentraciones en combinación con sacarosa.

50 En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de NaCl, aproximadamente 175 mM a aproximadamente 225 mM de NaCl, y aproximadamente 200 mM a aproximadamente 210 mM de NaCl, por ejemplo, aproximadamente 205 mM de NaCl. En ciertas realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 8,8 mg/mL a aproximadamente 14,6 mg/mL de NaCl, aproximadamente 10 mg/mL de NaCl a aproximadamente 13 mg/mL, por ejemplo, aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl. En ciertas realizaciones, NaCl se proporciona a la concentración deseada en una disolución de diluyente en la que se reconstituye un liofilizado que comprende un rFVIII Fc.

55 En otra realización, las composiciones de la invención no incluyen agentes de carga tales como manitol, glicina, alanina y/o hidroxietilalmidón. En otras realizaciones, NaCl es el único agente de carga.

60 En ciertos casos, la composición farmacéutica de pre-lioofilización comprende aproximadamente 250 mM a aproximadamente 350 mM de NaCl, aproximadamente 275 mM a aproximadamente 325 mM de NaCl, por ejemplo, aproximadamente 308 mM de NaCl. En ciertos casos relacionados, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 14,6 mg/mL a aproximadamente 20,5 mg/mL de NaCl, aproximadamente 16 mg/mL a aproximadamente 19 mg/mL, por ejemplo, aproximadamente 18,0 mg/mL de NaCl.

En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de L-histidina. En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM de L-histidina, por ejemplo, aproximadamente 6,64 mM de L-histidina o aproximadamente 9,8 mM de L-histidina. En ciertas realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,75 mg/mL a aproximadamente 2,25 mg/mL de L-histidina, por ejemplo, aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina o aproximadamente 1,55 mg/mL de L-histidina. En ciertas realizaciones, se proporciona L-histidina como parte de un liofilizado que, tras la reconstitución con una cantidad apropiada de diluyente, proporciona L-histidina a la concentración deseada.

En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de cloruro de calcio. En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de cloruro de calcio, por ejemplo, aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio o aproximadamente 8 mM de cloruro de calcio. En ciertas realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,75 mg/mL a aproximadamente 1,5 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado, por ejemplo, aproximadamente 0,8 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado o aproximadamente 1,18 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado. En ciertas realizaciones, se proporciona cloruro de calcio como parte de un liofilizado, que, tras la reconstitución con una cantidad apropiada de diluyente, proporciona cloruro de calcio a la concentración deseada.

En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende una cantidad farmacéuticamente aceptable de polisorbato 20 o polisorbato 80. En ciertos casos relacionados, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,008 % (p/v) a aproximadamente 0,025 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80, por ejemplo, aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80 o aproximadamente 0,02 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80. En ciertas realizaciones relacionadas, la composición farmacéutica comprende aproximadamente 0,08 mg/mL a aproximadamente 0,25 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80, por ejemplo, aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80 o aproximadamente 0,20 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80. En ciertas realizaciones, se proporciona polisorbato 20 o polisorbato 80 como parte de un liofilizado, que, tras la reconstitución con una cantidad apropiada de diluyente, proporciona polisorbato 20 o polisorbato 80 a la concentración deseada.

En ciertos casos, la composición farmacéutica comprende: aproximadamente 50 UI/mL a aproximadamente 2500 UI/mL de un rFVIII_{FC}; aproximadamente 1 % (p/v) a aproximadamente 2,5 % (p/v) de sacarosa; aproximadamente 150 mM a aproximadamente 250 mM de NaCl; aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM de L-histidina; aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM de cloruro de calcio; y aproximadamente 0,008 % (p/v) a aproximadamente 0,025 % de polisorbato 20 o polisorbato 80. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona como un liofilizado y un diluyente. En ciertas realizaciones, la cantidad de liofilizado proporciona aproximadamente 3 mL de una composición farmacéutica con los componentes deseados a las concentraciones deseadas.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica comprende: aproximadamente 50 UI/mL a aproximadamente 2500 UI/mL de un rFVIII_{FC}; aproximadamente 10 mg/mL a aproximadamente 25 mg/mL de sacarosa; aproximadamente 8,8 mg/mL a aproximadamente 14,6 mg/mL de NaCl; aproximadamente 0,75 mg/mL a aproximadamente 2,25 mg/mL de L-histidina; aproximadamente 0,75 mg/mL a aproximadamente 1,5 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y aproximadamente 0,08 mg/mL a aproximadamente 0,25 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se proporciona como un liofilizado y un diluyente. En ciertas realizaciones, la cantidad de liofilizado proporciona aproximadamente 3 mL de una composición farmacéutica con los componentes deseados a las concentraciones deseadas.

Las composiciones a modo de ejemplo se proporcionan en la Tabla 1 y en la Tabla 2 en los ejemplos.

Por ejemplo, la divulgación proporciona una composición farmacéutica que comprende: aproximadamente 83 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIII_{FC}); aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; aproximadamente 205 mM de NaCl; aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80. La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende: aproximadamente 167 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIII_{FC}); aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; aproximadamente 205 mM de NaCl; aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80. La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende: aproximadamente 250 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIII_{FC}); aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; aproximadamente 205 mM de NaCl; aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80. La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende: aproximadamente 333 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIII_{FC}); aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; aproximadamente 205 mM de NaCl; aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80. La divulgación proporciona además una composición farmacéutica que comprende: aproximadamente 500 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o

2000 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc); aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado, y aproximadamente 0,10 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

5 La presente divulgación también proporciona los componentes de un kit farmacéutico. Dicho kit incluye uno o más receptores y uniones opcionales. Un kit como se proporciona en el presente documento facilita la administración de una cantidad eficaz de rFVIIIc a un sujeto en necesidad del mismo. En ciertas realizaciones, el kit facilita la administración del rFVIIIc por infusión intravenosa. En ciertas realizaciones, el kit facilita la autoadministración del rFVIIIc por infusión intravenosa.

10 En ciertos casos, la divulgación proporciona un kit farmacéutico que comprende: un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado o torta, donde el polvo o torta comprende: (i) un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc), (ii) sacarosa (y/o trehalosa, rafinosa o arginina); (iii) NaCl; (iv) L-histidina; (v) cloruro de calcio dihidratado; y (vi) polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a combinar con el polvo liofilizado del primer recipiente. En ciertos casos, se proporciona diluyente suficiente para producir aproximadamente 3 mL de una formulación de polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc) con propiedades deseadas como se desvela en el presente documento. En ciertas realizaciones, el segundo recipiente es una jeringa precargada asociada a un émbolo, para permitir la adición del diluyente al primer recipiente, reconstitución del contenido del primer recipiente, y transferencia de nuevo en la jeringa. En ciertas realizaciones, el kit proporciona además un adaptador para unir la jeringa al primer recipiente. En ciertas realizaciones, el kit proporciona además una aguja y tubo de infusión, para unir a la jeringa que contiene la formulación de polipéptido de FVIII reconstituido (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc) para permitir la infusión IV de la formulación.

25 En ciertas realizaciones, se proporciona un rFVIIIc en una cantidad total desde aproximadamente 200 UI hasta aproximadamente 6000 UI, por ejemplo, aproximadamente 250 UI, aproximadamente 500 UI, aproximadamente 750 UI, aproximadamente 1000 UI, aproximadamente 1500 UI, aproximadamente 2000 UI, aproximadamente 3000 UI, aproximadamente 4000 UI, aproximadamente 5000 UI, o aproximadamente 6000 UI.

30 En un caso, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende (i) aproximadamente 250 UI de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc), (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 83 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc); (ii) aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; (iii) aproximadamente 205 mM de NaCl; (iv) aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; (v) aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio; y (vi) aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

40 En un caso adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 500 UI de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc), (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 167 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc); (ii) aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; (iii) aproximadamente 205 mM de NaCl; (iv) aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; (v) aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio; y (vi) aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

50 En un caso adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 750 UI de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc), (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 250 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc); (ii) aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; (iii) aproximadamente 205 mM de NaCl; (iv) aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; (v) aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio; y (vi) aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

1667 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc); (ii) aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; (iii) aproximadamente 205 mM de NaCl; (iv) aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; (v) aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio; y (vi) aproximadamente 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

- 5 En un caso adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 6000 UI de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc), (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un
10 segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 2000 UI/mL de un polipéptido de FVIII (por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o de acción corta, por ejemplo, rFVIIIc); (ii) aproximadamente 1,33 % (p/v) de sacarosa; (iii) aproximadamente 205 mM de NaCl; (iv) aproximadamente 6,64 mM de L-histidina; (v) aproximadamente 5,4 mM de cloruro de calcio; y (vi) aproximadamente
15 0,013 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80.

- En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 250 UI de un rFVIIIc, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o
20 polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 83 UI/mL de un rFVIIIc; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

- 25 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 500 UI de un rFVIIIc, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o
30 polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 167 UI/mL de un rFVIIIc; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

- 35 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 750 UI de un rFVIIIc, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o
40 polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 250 UI/mL de un rFVIIIc; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

- 45 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 1000 UI de un rFVIIIc, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o
50 polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 333 UI/mL de un rFVIIIc; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

- 55 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 1500 UI de un rFVIIIc, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o
60 polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 500 UI/mL de un rFVIIIc; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

5 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 2000 UI de un rFVIII_{IFc}, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 667 UI/mL de un rFVIII_{IFc}; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

10 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 3000 UI de un rFVIII_{IFc}, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 1000 UI/mL de un rFVIII_{IFc}; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

20 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 4000 UI de un rFVIII_{IFc}, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 1333 UI/mL de un rFVIII_{IFc}; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

30 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 5000 UI de un rFVIII_{IFc}, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 1667 UI/mL de un rFVIII_{IFc}; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

40 En una realización adicional, se proporciona un kit farmacéutico que comprende un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, donde el polvo comprende: (i) aproximadamente 6000 UI de un rFVIII_{IFc}, (ii) aproximadamente 40 mg de sacarosa; (iii) aproximadamente 36 mg de NaCl; (iv) aproximadamente 3,1 mg de L-histidina; (v) aproximadamente 2,4 mg de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende: (i) aproximadamente 2000 UI/mL de un rFVIII_{IFc}; (ii) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa; (iii) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl; (iv) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina; (v) aproximadamente 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y (vi) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.

50 En ciertas realizaciones, el primer recipiente de un kit farmacéutico proporcionado en el presente documento es un vial de vidrio que comprende un tapón de goma. En ciertas realizaciones, el segundo recipiente de un kit farmacéutico proporcionado en el presente documento es un cuerpo de jeringa, asociado a un émbolo. En ciertas realizaciones, la jeringa es una jeringa precargada que contiene el diluyente. En ciertas realizaciones, un kit farmacéutico proporcionado en el presente documento comprende además un adaptador para conectar el vial de vidrio con el cuerpo de jeringa. En ciertas realizaciones, un kit farmacéutico proporcionado en el presente documento comprende además tubo de infusión asociado a una aguja para conectar a la jeringa, adecuado para infusión intravenosa.

55 En ciertas realizaciones, se puede lograr una dosis deseada de un rFVIII_{IFc} mediante el uso de un kit farmacéutico como se proporciona en el presente documento. En ciertas realizaciones, se puede usar más de un kit farmacéutico para lograr una dosis deseada. En el presente documento se proporciona un método de combinación, o combinación, de las formulaciones contenidas en dos o más kits farmacéuticos como se proporciona en el presente documento para lograr una dosis deseada.

60 En algunos casos, el polipéptido de FVIII para la composición farmacéutica es un polipéptido de FVIII de acción corta. En otros casos, el polipéptido de FVIII para la composición farmacéutica es un polipéptido de FVIII de acción prolongada.

En algunos casos, un polipéptido de FVIII de acción prolongada en una composición farmacéutica comprende una porción de factor VIII y una porción no de factor VIII, por ejemplo, un resto heterólogo. En un caso, el resto es capaz de prolongar la semivida *in vivo* o *in vitro* del polipéptido de FVIII. Las porciones heterólogas de no factor VIII a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, Fc, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina, CTP (péptido de 28 aminoácidos del extremo C (CTP) de gonadotropina coriónica humana (hCG) con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquier combinación de los mismos. Los polipéptidos de acción prolongada a modo de ejemplo de la invención incluyen, por ejemplo, polipéptidos de factor VIII-Fc, polipéptidos de factor VIII-albúmina, polipéptidos de factor VIII-PAS, polipéptidos de factor VIII-transferrina, polipéptidos de factor VIII-CTP, polipéptidos de factor VIII-PEG, polipéptidos de factor VIII-HES, polipéptidos de unión a factor VIII-albúmina, o polipéptidos de molécula pequeña de unión a factor VIII-albúmina.

El factor VIII (la porción de factor VIII de un polipéptido de FVIII de acción prolongada o FVIII de un polipéptido de FVIII de acción corta) puede ser al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos del factor VIII mostrada en la Tabla 11 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de SEQ ID NO: 2; y aminoácidos 20 a 2351 de SEQ ID NO: 6), en donde la porción de factor VIII tiene actividad de factor VIII. El factor VIII (la porción de factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntica a una secuencia de aminoácidos del factor VIII mostrada en la Tabla 11 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de SEQ ID NO: 2; y aminoácidos 20 a 2351 de SEQ ID NO: 6).

El factor VIII (la porción de factor VIII de un polipéptido de FVIII de acción prolongada o FVIII de un polipéptido de FVIII de acción corta) puede ser al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a una secuencia de aminoácidos del factor VIII mostrada en la Tabla 11 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 1 a 2351 de SEQ ID NO: 6), en donde la porción de factor VIII tiene actividad de factor VIII. El factor VIII (la porción de factor VIII de un polipéptido de FVIII de acción prolongada o un polipéptido de FVIII de acción corta) puede ser idéntica a una secuencia de aminoácidos del factor VIII mostrada en la Tabla 11 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 1 a 2351 de SEQ ID NO: 6).

El polipéptido de acción prolongada puede comprender una secuencia al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica al factor VIII y secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 11A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO: 2) o al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica al factor VIII y secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 11A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de SEQ ID NO: 2), en donde la secuencia tiene actividad de factor VIII. La actividad de factor VIII se puede medir por el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado (aPTT), ensayo cromogénico, u otros métodos conocidos. El polipéptido de FVIII de acción prolongada puede comprender la secuencia idéntica al factor VIII y secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 11A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO: 2) o idéntica al factor VIII y la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 11A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de SEQ ID NO: 2).

Como se trata anteriormente, los polipéptidos de acción prolongada a modo de ejemplo también incluyen factor VIII fusionado con uno o más polipéptidos de albúmina, polipéptidos de unión a albúmina, o moléculas pequeñas de unión a albúmina. En un caso, la albúmina es albúmina humana. La albúmina o proteína de unión a albúmina se puede fusionar con cualquiera del extremo N de FVIII o el extremo C de FVIII o insertarse entre dos aminoácidos en FVIII. Se conocen ejemplos de albúmina, por ejemplo, fragmentos de los mismos, que se pueden usar en la presente invención. Por ejemplo, la patente de EE. UU. N° 7.592.010; la patente de EE. UU. N° 6.686.179; y Schulte, Thrombosis Res. 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009).

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

En ciertos aspectos, un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención comprende al menos un sitio de unión para una molécula pequeña distinta de polipéptido, variante, o derivado que se puede unirse a albúmina del mismo. A ejemplo de dichos restos de unión a albúmina está 2-(3-maleimidopropanamido)-6-(4-(4-yodofenil)butanamido)hexanoato (marca "Albu") como se desvela por Trusselet et al., Bioconjugate Chem. 20:2286-2292 (2009).

Como se trata anteriormente, los polipéptidos de acción prolongada a modo de ejemplo también incluyen factor VIII fusionado con al menos un péptido del extremo C (CTP) de la subunidad β de gonadotropina coriónica humana o fragmento, variante, o derivado de la misma. El CTP se puede fusionar con factor VIII en cualquiera del extremo N de FVIII o el extremo C de FVIII o insertarse entre dos aminoácidos en FVIII. Se conoce que uno o más péptidos CTP

fusionados con o insertados en una proteína recombinante aumentan la semivida *in vivo* de esa proteína. Véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. Nº 5.712.122. Los péptidos CTP a modo de ejemplo incluyen DPRFQDSSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 8) o SSSSKAPPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ. (SEQ ID NO: 9). Véanse, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE. UU. Nº US 2009/0087411 A1.

- 5 Como se trata anteriormente, los polipéptidos de FVIII de acción prolongada a modo de ejemplo también incluyen el factor VII fusionado con al menos una secuencia de PAS o fragmento, variante, o derivado de la misma. La secuencia de PAS se puede fusionar con cualquiera del extremo N de FVIII o con el extremo C de FVIII o insertarse entre dos aminoácidos en FVIII. Un péptido de PAS o secuencia de PAS, como se usa en el presente documento, significa una
- 10 secuencia de aminoácidos que comprende principalmente restos de alanina y serina o que comprende principalmente restos de alanina, serina y prolina, formando la secuencia de aminoácidos la conformación de bobina al azar en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia de PAS es un elemento estructural, un polímero de aminoácidos, o un casete de secuencias que comprende, que consiste esencialmente en, o que consiste en alanina, serina y prolina que se pueden usar como una parte del resto heterólogo en la proteína quimérica. Un polímero de aminoácidos también puede formar conformación de bobina al azar cuando restos distintos de alanina, serina y prolina se añaden como un constituyente menor en la secuencia de PAS. Por "constituyente menor" se indica entonces que
- 15 los aminoácidos distintos de alanina, serina y prolina se pueden añadir en la secuencia de PAS a un cierto grado, por ejemplo, hasta aproximadamente 12 %, es decir, aproximadamente 12 de 100 aminoácidos de la secuencia de PAS, hasta aproximadamente 10 %, hasta aproximadamente 9 %, hasta aproximadamente 8 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 3 %, es decir, aproximadamente 2 %, o
- 20 aproximadamente 1 %, de los aminoácidos. Los aminoácidos diferentes de alanina, serina y prolina se pueden seleccionar del grupo que consiste en Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Thr, Trp, Tyr y Val. En condiciones fisiológicas, un péptido de PAS forma una conformación de bobina al azar y así puede mediar en una elevada estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* para una proteína recombinante de la invención, y tiene actividad procoagulante.
- 25 Los ejemplos no limitantes de los péptidos de PAS incluyen ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 10), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 11), APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 12), APSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 13), SSPSAPSPSPSPASPSPPSPA (SEQ ID NO: 14), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 15), ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO: 16) o cualquier variante, derivado, fragmentos, o combinaciones de los mismos. Los ejemplos adicionales de secuencias de PAS se conocen de, por ejemplo, la publicación de patente de EE. UU. Nº 2010/0292130 A1 y la publicación de solicitud PCT Nº WO 2008/155134 A1. Patente europea concedida EP2173890.

Como se trata anteriormente, los polipéptidos de FVIII de acción prolongada a modo de ejemplo también incluyen factor VIII fusionado con al menos un péptido o fragmento de transferrina, variante, o derivado del mismo. Se puede fusionar al menos un péptido de transferrina con cualquiera del extremo N de FVIII o con el extremo C de FVIII o insertarse entre dos aminoácidos en FVIII. Cualquier transferrina se puede fusionar o insertar en una proteína FVIII recombinante de la invención. Como un ejemplo, Tf humana no mutante (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos, de aproximadamente 75 KDa (no se tiene en cuenta para la glucosilación), con dos dominios principales, N (aproximadamente 330 aminoácidos) y C (aproximadamente 340 aminoácidos), que parece que se originan a partir de una duplicación de gen. Véanse los Números de acceso de GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 y S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

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

Como se trata anteriormente, los polipéptidos de FVIII de acción prolongada a modo de ejemplo también incluyen factor VIII fusionado con al menos un resto de polietilenglicol (PEG).

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

Un polipéptido de FVIII de acción prolongada útil para la invención puede ser PEGilado para incluir restos de mono- o poli-(por ejemplo, 2-4) PEG. Se puede llevar a cabo la PEGilación por cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Los métodos de preparación de un producto PEGilado de proteína incluirán, en general, (i) hacer reaccionar un polipéptido con polietilenglicol (tal como un derivado de éster o aldehído reactivo de PEG) en condiciones en las cuales el péptido de la invención se une a uno o más grupos de PEG; y (ii) obtener el (los) producto(s) de reacción. En general, las condiciones de reacción óptimas para las reacciones serán determinadas individualmente basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado.

Existen varios métodos de unión a PEG disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo Malik F et al., Exp. Hematol. 20:1028-35 (1992); Francis, Focus on Growth Factors 3(2):4-10 (1992); publicaciones de patente europea N° EP0401384, EP0154316 y EP0401384; y publicaciones de solicitud de patente internacional N° WO92/16221 y WO95/34326. Como ejemplo no limitante, las variantes de FVIII pueden contener sustituciones de cisteína en uno o más sitios de inserción en FVIII, y las cisteínas se pueden conjugar además con polímero de PEG. Véase Mei et al., Blood 116:270-279 (2010) y la patente de EE. UU. N° 7.632.921.

Como se trata anteriormente, los polipéptidos de FVIII de acción prolongada a modo de ejemplo también incluyen factor VIII fusionado con al menos un polímero de hidroxietilalmidón (HES). El HES es un derivado de amilopectina que existe de forma natural y se degrada por alfa-amilasa en el cuerpo. El HES presenta propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de reposición de volumen sanguíneo y en terapia de hemodilución en la clínica. Véanse, por ejemplo, Sommermeyer et al., Krankenhauspharmazie 8:271-278 (1987); y Weidler et al., Arzneim.-Forschung/Drug Res. 41: 494-498 (1991).

El HES se caracteriza principalmente por la distribución de pesos moleculares y el grado de sustitución. El HES tiene un peso molecular medio (medio ponderal) de desde 1 hasta 300 kD, desde 2 hasta 200kD, desde 3 hasta 100 kD, o desde 4 hasta 70 kD. El hidroxietilalmidón puede además presentar un grado de sustitución molar de desde 0,1 hasta 3, desde 0,1 hasta 2, desde 0,1 hasta 0,9, o desde 0,1 hasta 0,8, y una relación entre la sustitución C2:C6 en el intervalo de desde 2 hasta 20 con respecto a los grupos hidroxietilo. HES con un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es VOLUVEN® de Fresenius. VOLUVEN® es un coloide artificial, empleado, por ejemplo, para la reposición de volumen usado en la indicación terapéutica para terapia y profilaxis de hipovolemia. Existen varios métodos de unión a HES disponibles para los expertos en la técnica, por ejemplo, los mismos métodos de unión de PEG descritos anteriormente.

En algunos casos, un polipéptido de FVIII de acción prolongada que comprende una porción de FVIII tiene una elevada semivida ($t_{1/2}$) con respecto a un polipéptido que consiste en la misma porción de FVIII sin la porción distinta de FVIII. Un polipéptido de FVIII de acción prolongada con una elevada $t_{1/2}$ se puede denominar en el presente documento un FVIII de larga duración. Los polipéptidos de factor VIII quimérico de acción prolongada incluyen, por ejemplo, factor VIII fusionado con Fc (incluyendo, por ejemplo, polipéptidos de factor VIII quimérico en forma de un híbrido tal como un híbrido de monómero-dímero de FVIII₁Fc; véase Ejemplo, Tabla 11A; y las patentes de EE. UU. N° 7.404.956 y 7.348.004), y el factor VIII fusionado con albúmina.

El polipéptido de factor VIII como se usa en el presente documento es el polipéptido de factor VIII funcional en su función normal en la coagulación, a menos que se especifique de otro modo. Así, el término factor VIII incluye polipéptidos de variante que son funcionales. Las proteínas factor VIII pueden ser las proteínas factor VIII humanas, porcinas, caninas y murinas. Se conocen las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa, ya que son muchos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Los ejemplos de secuencias del factor VIII humano se muestran como subsecuencias en SEQ ID NOs: 2 o 6 (Tabla 11). Los polipéptidos de 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 una Met adicional en el extremo N, y/o factor VIII con una delección completa o parcial del dominio B. Las variantes del factor VIII incluyen delecciones del dominio B, tanto delecciones parciales como completas.

Se conocen muchas variantes del factor VIII funcional, como se trata anteriormente y más adelante. 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 sobre la función del factor VIII es más debido a donde se encuentran dentro de la estructura tridimensional de factor VIII que a la naturaleza de la sustitución (Cutler et al., Hum. Mutat. 19:274-8 (2002)). Además, las comparaciones entre factor VIII de seres humanos y otras especies han identificado restos conservados que es probable se requieran para la función (Cameron et al., Thromb. Haemost. 79:317-22 (1998); documento de patente US 6.251.632).

Se aisló el gen del factor VIII humano 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); Vehar, G. A., et al., Nature 312:337-342 (1984); documentos de patente WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; patente de EE. UU. N° 4.757.006), y la secuencia de aminoácidos se dedujo de ADNc. Capon et al., patente de EE. UU. N° 4.965.199, desvela un método de ADN recombinante para producir factor VIII en células hospedadoras de mamífero y purificación de factor VIII humano. Se ha informado de la expresión de factor VIII humano en células CHO (ovario de hámster chino) y BHK (células de riñón de hámster bebé). Se ha modificado el factor VIII humano para deleccionar parte o todo el dominio B (patentes de EE. UU. N° 4.994.371 y 4.868.112), y se ha realizado la sustitución del dominio

B del factor VIII humano con el dominio B del factor V humano (patente de EE. UU. Nº 5.004.803). La secuencia de ADNc que codifica el factor VIII humano y la secuencia de aminoácidos predicha se muestran en SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente, de la publicación de solicitud de EE. UU. Nº 2005/0100990.

5 La patente de EE. UU. Nº 5.859.204, Lollar, J. S., informa de mutantes funcionales del factor VIII que tienen antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La patente de EE. UU. Nº 6.376.463, Lollar, J. S., también informa de mutantes de factor VIII que tienen inmunorreactividad reducida. La publicación de solicitud de EE. UU. Nº 2005/0100990, Saenko et al., informa de mutaciones funcionales en el dominio A2 del factor VIII.

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

15 Está publicada la secuencia de factor VIII porcino (Toole, J. J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:5939-5942 (1986)), y se ha informado la secuencia de ADNc porcina completa obtenida de la amplificación por PCR de las secuencias del factor VIII de una biblioteca de ADNc de bazo de cerdo (Healey, J. F. et al., Blood 88:4209-4214 (1996)). Se desveló el factor VIII humano/porcino híbrido que tiene sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades, y secuencias de aminoácidos específicas en la patente de EE. UU. Nº 5.364.771 por Lollar y Runge, y en el documento de patente WO 93/20093. Más recientemente, se informó de secuencias de nucleótidos y aminoácidos correspondientes de los dominios A1 y A2 de factor VIII porcino y un factor VIII quimérico con dominios A1 y/o A2 porcinos sustituidos por los dominios humanos correspondientes en el documento de patente WO 94/11503. La patente de EE. UU. Nº 5.859.204, Lollar, J. S., también desvela el ADNc porcino y secuencias de aminoácidos deducidas. La patente de EE. UU. Nº 6.458.563 desvela un factor VIII porcino de dominio B delecionado.

25 Un "dominio B" de factor VIII, como se usa en el presente documento, es el mismo que el dominio B conocido en la técnica que se define por identidad interna de la secuencia de aminoácidos y sitios de escisión proteolítica por trombina, por ejemplo, los restos Ser741-Arg1648 del factor VIII humano maduro de longitud completa. Los otros dominios de factor VIII humano se definen por los siguientes restos de aminoácidos: A1, restos Ala1-Arg372; A2, restos Ser373-Arg740; A3, restos Ser1690-Ile2032; C1, restos Arg2033-Asn2172; C2, restos Ser2173-Tyr2332. La secuencia de A3-C1-C2 incluye los restos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, restos Glu1649-Arg1689, denomina normalmente la región ácida del péptido de activación de la cadena ligera de factor VIII. Las localizaciones de los límites para todos los dominios, que incluyen los dominios B, para factor VIII porcino, de ratón y canino también se conocen en la técnica. En una realización, el dominio B del factor VIII está delecionado ("factor VIII de dominio B delecionado" o "FVIII BDD"). Un ejemplo de un FVIII BDD es REFACTO® (FVIII BDD recombinante), que tiene la secuencia como la porción de factor VIII de la secuencia en la Tabla 11A(i) (aminoácidos 1 a 1457 o 20 a 1457 de SEQ ID NO: 2). En otra realización, el factor VIII de dominio B delecionado contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto, que corresponde a arginina en el resto 754 del factor VIII de dominio B delecionado, que corresponde al resto de arginina 773 de SEQ ID NO: 2, o resto 1648 de factor VIII de longitud completa, que corresponde al resto de arginina 1667 de SEQ ID NO: 6. Los números de restos de la secuencia usada en el presente documento sin referencia a ningún número de SEQ ID corresponden a la secuencia de factor VIII sin la secuencia de péptidos señal (19 aminoácidos) a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, el factor VIII de longitud completa S743/Q1638 corresponde a S762/Q1657 de SEQ ID NO: 6 debido a la secuencia de péptidos señal de 19 aminoácidos. En otras realizaciones, el FVIII de dominio B delecionado comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645, una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648, o una sustitución o mutación en las posiciones de aminoácidos correspondientes a Arginina 1645 y Arginina 1648 en factor VIII de longitud completa. En algunas realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 es un aminoácido diferente del aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648. En ciertas realizaciones, la sustitución o mutación es un aminoácido distinto de arginina, por ejemplo, alanina.

50 Un "factor VIII de dominio B delecionado" puede tener las delecciones completas o parciales desveladas en las patentes de EE. UU. Nº 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 de factor VIII de dominio B delecionado de la presente invención comprende una cualquiera de las delecciones desveladas en la col. 4, línea 4 a col. 5, línea 28 y ejemplos 1-5 de la patente de EE. UU. Nº 6.316.226 (también US 6.346.513). En algunas realizaciones, un factor VIII de dominio B delecionado de la presente invención tiene una delección desvelada en la col. 2, líneas 26-51 y Ejemplos 5-8 de la patente de EE. UU. Nº 5.789.203 (también US 6.060.447, US 5.595.886 y US 6.228.620). En algunas realizaciones, un factor VIII de dominio B delecionado tiene una delección descrita en la col. 1, líneas 25 a col. 2, línea 40 de la patente de EE. UU. Nº 5.972.885; col. 6, líneas 1-22 y ejemplo 1 de la patente de EE. UU. Nº 6.048.720; col. 2, líneas 17-46 de la patente de EE. UU. Nº 5.543.502; col. 4, línea 22 a col. 5, línea 36 de la patente de EE. UU. Nº 5.171.844; col. 2, líneas 55-68, figura 2, y ejemplo 1 de la patente de EE. UU. Nº 5.112.950; col. 2, línea 2 a col. 19, línea 21 y tabla 2 de la patente de EE. UU. Nº 4.868.112; col. 2, línea 1 a col. 3, línea 19, col. 3, línea 40 a col. 4, línea 67, col. 7, línea 43 a col. 8, línea 26, y col. 11, línea 5 a col. 13, línea 39 de la patente de EE. UU. Nº 7.041.635; o col. 4, líneas 25-53, de la patente de EE. UU. Nº 6.458.563. En algunas realizaciones, un factor VIII de dominio B delecionado tiene una delección de la mayor parte del dominio B, pero todavía

contiene secuencias de extremo amino del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primaria en dos cadena de polipéptidos (es decir, sitio de procesamiento intracelular), como se desvela en el documento de patente WO 91/09122. En algunas realizaciones, un factor VIII de dominio B delecionado se construye con una deleción de aminoácidos 747-1638, es decir, prácticamente una deleción completa del dominio B. Hoeben R.C., et al. J. Biol. Chem. 265 (13): 7318-7323 (1990). Un factor VIII de dominio B delecionado también puede contener una deleción de los aminoácidos 771-1666 o los aminoácidos 868-1562 del factor VIII. Meulien P., et al. Protein Eng. 2(4): 301-6 (1988). Deleciones del dominio B adicionales que son parte de la invención incluyen, por ejemplo: deleción de los aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83:5939-5942 (1986)), 797 a 1562 (Eaton et al., Biochemistry 25:8343-8347 (1986)), 741 a 1646 (Kaufman (solicitud PCT publicada N° WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver et al., DNA 6:553-564 (1987)), 741 a 1648 (Pasek (solicitud PCT N° 88/00831)), 816 a 1598 o 741 a 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, documento de patente EP 295597)), cada una de las cuales es. En algunas realizaciones, FVIII de dominio B delecionado comprende una deleción parcial en el dominio B, es decir, que tiene 21 aminoácidos del dominio B (es decir, SFSQNSRHP SQNPPVLKRHR, que es SEQ ID NO: 17) desvelado en la publicación de EE. UU. N° 20100286067 y la publicación de EE. UU. N° US 20120093840. Cada una de las deleciones anteriores se puede hacer en cualquier secuencia de factor VIII.

En una realización, la porción del factor VIII de dominio B delecionado en un polipéptido de FVIII se procesa en dos cadenas conectadas (o asociadas) por un enlace metálico, comprendiendo la primera cadena una cadena pesada (A1-A2-B parcial) y comprendiendo una segunda cadena una cadena ligera (A3-C1-C2). En otra realización, la porción de factor VIII de dominio B delecionado es un factor VIII de cadena sencilla. El factor VIII de cadena sencilla puede comprender un sitio de procesamiento intracelular, que corresponde a Arginina en el resto 754 del factor VIII de dominio B delecionado (resto 773 de SEQ ID NO: 2) o en el resto 1648 del factor VIII de longitud completa (resto 1657 de SEQ ID NO: 6).

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

Un polipéptido de FVIII usado en el presente documento puede comprender factor VIII procesado o factor VIII de cadena sencilla o una combinación de los mismos. "Factor VIII procesado", como se usa en el presente documento, significa factor VIII que se ha escindido en Arginina 1648 (para factor VIII de longitud completa) o Arginina 754 (para factor VIII de dominio B delecionado), es decir, sitio de procesamiento intracelular. Debido a la escisión en el sitio de procesamiento intracelular, el factor VIII procesado comprende dos cadenas de polipéptidos, siendo la primera cadena una cadena pesada y siendo la segunda cadena una cadena ligera. Por ejemplo, el proteína de fusión de factor VIII procesado-Fc (es decir, Cadena pesada y Cadena ligera fusionadas con Fc) corren a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa en una SDS-PAGE no reductora, respectivamente, y 90 kDa y 105 kDa en una SDS-PAGE reductora, respectivamente. Por tanto, en una realización, al menos aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % de la porción del factor VIII en el polipéptido de acción prolongada o en el polipéptido de FVIII de acción corta es factor VIII procesado. En otra realización, aproximadamente 50 %, aproximadamente 60 %, aproximadamente 70 %, aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % de la porción del factor VIII en el polipéptido de acción prolongada o en el polipéptido de FVIII de acción corta es factor VIII procesado. En una realización particular, el polipéptido de FVIII que comprende factor VIII procesado se purifica (o aísla) del polipéptido que comprende factor VIII de cadena sencilla, y al menos aproximadamente 75 %, aproximadamente 80 %, aproximadamente 85 %, aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 %, aproximadamente 99 %, o aproximadamente 100 % de la porción del factor VIII en el polipéptido de acción prolongada o en el polipéptido de FVIII de acción corta es factor VIII procesado. En algunas realizaciones, el polipéptido de FVIII comprende aproximadamente 15 % a 25 % de polipéptido de FVIII de cadena sencilla y aproximadamente 75 % a aproximadamente 85 % de polipéptido de FVIII procesado.

"Factor VIII de cadena sencilla", "factor VIII SC" o "SCFVIII", como se usan en el presente documento, significa factor VIII que no ha sido escindido en el sitio Arginina (resto 1648 para factor VIII de longitud completa (es decir, resto 1667 de SEQ ID NO: 6) o resto 754 para factor VIII de dominio B delecionado (es decir, resto 773 de SEQ ID NO: 2). Por tanto, el factor VIII de cadena sencilla en el polipéptido de FVIII usado en el presente documento comprende una cadena sencilla. En una realización, el factor VIII de cadena sencilla contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto. En otra realización, el factor VIII de cadena sencilla de la invención comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645, una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648, o una sustitución o mutación en las posiciones de aminoácidos correspondientes a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el factor VIII de longitud completa. En otras realizaciones, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 es un aminoácido diferente del aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648. En ciertas realizaciones, la sustitución o mutación es un aminoácido distinto de arginina, por ejemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina,

fenilalanina, treonina, triptófano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina, o taurina. La proteína de fusión de factor VIII de cadena sencilla-Fc pueden correr a aproximadamente 220 kDa en una SDS-PAGE no reductora y a aproximadamente 195 kDa en una SDS-PAGE reductora.

5 La porción del factor VIII en el polipéptido de FVIII usado en el presente documento tiene actividad de factor VIII. La actividad de factor VIII se puede medir por cualquier método conocido en la materia. Por ejemplo, uno de los métodos puede ser un ensayo cromogénico. El mecanismo del ensayo cromogénico se basa en los principios de la cascada de coagulación de la sangre, donde el factor VIII activado acelera la conversión del factor X en factor Xa en presencia de factor IX activado, fosfolípidos e iones de calcio. La actividad de factor Xa se evalúa por hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilida (pNA) específico para factor Xa. La tasa inicial de liberación de p-nitroanilida medida a 405 nM es directamente proporcional a la actividad de factor Xa y así a la actividad de factor VIII en la muestra. El ensayo cromogénico se recomienda por el Subcomité del factor VIII y factor IX del Comité Científico y de Normalización (SSC) de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH). Desde 1994, el ensayo cromogénico también ha sido el método de referencia de la Farmacopea Europea para la asignación de potencia del concentrado de FVIII. Así, en una realización, el polipéptido de FVIII que comprende el factor VIII de cadena sencilla tiene actividad de factor VIII comparable a un polipéptido de FVIII que comprende factor VIII procesado, cuando la actividad del factor VIII se mide *in vitro* por un ensayo cromogénico.

20 En cierta realización, un polipéptido de FVIII de acción prolongada es un híbrido de monómero-dímero de FVIII. Para obtener un híbrido de monómero-dímero de FVIII, se obtuvo la secuencia codificante de FVIII de dominio B deleciónado recombinante humano por reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (RT-PCR) de ARN de poli A de hígado humano (Clontech) usando cebadores específicos de FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia señal nativa para FVIII. La deleción de dominio B era desde serina 743 (S743; 2287 pb) hasta glutamina 1638 (Q1638; 4969 pb) para una deleción total de 2682 pb. Entonces, la secuencia codificante 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. Se diseñaron cebadores de forma que la secuencia de FVIII de dominio B deleciónado se fusionara directamente con el extremo N de la secuencia de Fc sin conector intermedio. Se clonó la secuencia de ADN de FVIII-Fc en el vector de expresión doble de mamífero pBUDCE4.1 (Invitrogen) bajo el control del promotor del CMV. Se obtuvo por RT-PCR una segunda secuencia de Fc idéntica que incluye la secuencia señal de Igk de ratón y se clonó aguas abajo del segundo promotor, EF1 α , en el vector de expresión pBUDCE4.1.

30 En una realización, un componente de unión a FcRn puede ser una región Fc. Un componente de unión a FcRn es cualquier molécula que se pueda unir específicamente por el receptor FcRn con transporte activo consecuente por el receptor FcRn del componente de unión a FcRn. Así, el término Fc incluye cualquier variante de Fc de IgG que sea funcional. Se ha descrito la región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister et al., Nature 372:379 (1994)). La principal área de contacto de Fc con el FcRn está cerca del empalme de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una cadena pesada de Ig sencilla. Los componentes de unión a FcRn incluyen, por ejemplo, IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región completa de unión de FcRn. Los principales sitios de contacto incluyen los restos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311 y 314 del dominio CH2 y restos de aminoácidos 385-387, 428 y 433-436 del dominio CH3. Las referencias hechas a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, se basan todas en Kabat et al. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD. (El receptor FcRn ha sido aislado de varias especies de mamífero que incluyen seres humanos. Se conocen las secuencias del FcRn humano, FcRn de rata y FcRn de ratón (Story et al., J. Exp. Med. 180: 2377 (1994)). Un Fc puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina con o sin la región bisagra de la inmunoglobulina. Las variantes de Fc a modo de ejemplo se proporcionan en los documentos de patente WO 2004/101740 y WO 2006/074199.

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

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

55 Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) también puede incluir, por ejemplo, las siguientes mutaciones: La región Fc de IgG se puede modificar según procedimientos bien reconocidos, tales como mutagénesis dirigida al sitio y similares dando IgG modificada o fragmentos Fc o porciones de los mismos que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones remotas de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que preservan o incluso potencian la unión al FcRn. Por ejemplo, se pueden sustituir los siguientes restos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humana (Fcy1) sin pérdida significativa de afinidad de unión de Fc por FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A,

5 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 prolina no mutante sustituida con alanina en la posición número 238. Además de alanina, se pueden sustituir otros aminoácidos por los aminoácidos no mutantes en las posiciones especificadas anteriormente. Se pueden introducir mutaciones individualmente en Fc que dan lugar a más de cien componentes de unión a FcRn distintos de Fc nativo. Además, se pueden introducir juntas combinaciones de dos, tres, o más de estas mutaciones individuales, que dan lugar a cientos más componentes de unión a FcRn. Ciertas de estas mutaciones pueden conferir nueva funcionalidad al componente de unión a FcRn. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que retira un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, potenciando así la semivida en circulación del componente de unión a FcRn, y convertir el componente de unión a FcRn en 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, que se; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591). Además, al menos tres receptores de Fc gamma humanos parecen reconocer un sitio de unión sobre IgG dentro de la región bisagra inferior. En general, los aminoácidos 234-237. Por tanto, otro ejemplo de nueva funcionalidad y posible inmunogenicidad reducida puede surgir de mutaciones de esta región, como, por ejemplo, reemplazando los aminoácidos 233-236 de IgG1 humana "ELLG" por la secuencia correspondiente de "PVA" de IgG2 (con una delección de aminoácido). Se ha mostrado que FcyRI, FcyRII y FcyRIII que median en diversas funciones efectoras no se unirán a IgG1 cuando se hayan introducidas dichas mutaciones (Ward y Ghetie, Therapeutic Immunology 2:77 (1995); y Armour et al., Eur. J Immunol. 29:2613 (1999)). Como ejemplo adicional de nueva funcionalidad que surge de las mutaciones descritas anteriormente, se puede aumentar la afinidad por FcRn más allá de la no mutante en algunos casos. Este aumento de la afinidad puede reflejar un aumento de la constante de "asociación", una disminución de la constante de "disociación", o ambos, un aumento de la constante de "asociación" y una disminución de la constante de "disociación". Las mutaciones que se cree que confieren un aumento de la afinidad por FcRn incluyen, por ejemplo, T256A, T307A, E380A y N434A (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591 (2001)).

30 La Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser al menos 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 11 (aminoácidos 1458 a 1684 de SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2352 a 2578 de SEQ ID NO: 6). La Fc (o porción Fc de un polipéptido quimérico) puede ser idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc mostrada en la Tabla 11 (aminoácidos 1458 a 1684 de SEQ ID NO: 2 y aminoácidos 2352 a 2578 de SEQ ID NO: 6).

35 Como una cuestión práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de nucleótidos o polipéptido de la presente invención, se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos. En una realización, se puede determinar un método para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia de búsqueda (secuencia de referencia u original) y una secuencia objetivo, también denominado un alineamiento global de secuencias, usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). En un alineamiento de secuencias, las secuencias de consulta y objetivo son ambas secuencias de ADN. Se puede comparar una secuencia de ARN convirtiendo U's en T's. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias es en porcentaje de identidad. En otra realización, los parámetros usados en un alineamiento FASTDB de secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalización por desapareamiento=1, Penalización por unión=30, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Penalización por hueco=5, Penalización por tamaño de hueco 0,05, Tamaño de ventana=500, o la longitud de la secuencia de nucleótidos objetivo, sea cual sea más corta.

45 Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a delecciones de 5' o 3', no debido a delecciones internas, se debe hacer una corrección manual en los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncaciones de 5' y 3' de la secuencia objeto cuando se calcula el porcentaje de identidad. Para secuencias objeto truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de bases de la secuencia de consulta que están 5' y 3' de la secuencia objeto, que no están apareadas / alineadas, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un nucleótido se aparea / alinea, se determina por los resultados del alineamiento de secuencias de FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un porcentaje final de puntuación de identidad. Esta puntuación corregida es lo 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 presentan por el alineamiento de FASTDB, que no están apareadas / alineadas con la secuencia de consulta, se calculan a efectos de ajustar manualmente el porcentaje de puntuación de identidad.

60 Por ejemplo, se alinea una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de consulta de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las delecciones ocurren en el extremo 5' de la secuencia objeto y, por tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento / alineamiento de las primeras 10 bases en el extremo 5'. Las 10 bases no apareadas representan 10 % de la secuencia (número de bases en los extremos 5' y 3' no apareadas/número total de bases en la secuencia de consulta), entonces se resta 10 % de la puntuación de porcentaje de identidad calculada por

el programa FASTDB. Si las 90 bases restantes estuvieran perfectamente apareadas, el porcentaje de identidad final sería 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 bases con una secuencia de consulta de 100 bases. Esta vez las deleciones son deleciones internas, de manera que no existen bases en 5' o 3' de la secuencia objeto que no están apareadas / alineadas con la consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las bases 5' y 3' de la secuencia objeto que no están apareadas / alineadas con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se hacen otras correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Por un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos, por ejemplo, 95 % "idéntica" a una secuencia de aminoácidos de consulta de la presente invención, se pretende que la secuencia de aminoácidos del polipéptido objeto sea idéntica a la secuencia de consulta, excepto que la secuencia de polipéptidos objeto puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de consulta. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95 % idéntica a una secuencia de aminoácidos de consulta, hasta 5 % de los restos de aminoácidos en la secuencia objeto se pueden insertar, deleccionar, (indels) o sustituir con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden ocurrir en las posiciones de extremo amino o carboxi de la secuencia de aminoácidos de referencia o en cualquier parte entre las posiciones terminales, intercaladas ya sea individualmente entre restos en la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como una cuestión práctica, si cualquier polipéptido particular es al menos 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (la porción de factor VIII, la porción Fc, individualmente o juntos) o 4, o un factor VIII conocido o secuencia de polipéptidos de Fc, se puede determinar convencionalmente usando programas informáticos conocidos. En una realización, se puede determinar un método para determinar la mejor correspondencia global entre una secuencia de consulta (secuencia de referencia u original) y una secuencia objeto, también denominada un alineamiento global de secuencias, usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245(1990). En un alineamiento de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son o ambas secuencias de nucleótidos o ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias es en porcentaje de identidad. En otra realización, los parámetros usados en un alineamiento de aminoácidos de FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuple=2, Penalización de desapareamiento=1, Penalización por unión=20, Longitud de grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Tamaño de ventana=longitud de secuencia, Penalización por hueco=5, Penalización por tamaño de hueco=0,05, Tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia objeto de aminoácidos, sea cual sea más corta.

Si la secuencia objeto es más corta que la secuencia de consulta debido a deleciones del extremo N o C, no debido a deleciones internas, se debe hacer una corrección manual en los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no tiene en cuenta truncaciones del extremo N y C de la secuencia objeto cuando se calcula el porcentaje de identidad global. Para secuencias objeto truncadas en los extremos N y C, con respecto a la secuencia de consulta, el porcentaje de identidad se corrige calculando el número de restos de la secuencia de consulta que están en el extremo N y C de la secuencia objeto, que no están apareadas / alineadas con un resto objeto correspondiente, como un porcentaje de las bases totales de la secuencia de consulta. Si un nucleótido se aparea / alinea, se determina por los resultados del alineamiento de secuencias de FASTDB. Este porcentaje se resta entonces del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a un porcentaje final de puntuación de identidad. Este porcentaje final de puntuación de identidad es lo que se usa para los fines de la presente invención. Solo restos de los extremos N y C de la secuencia objeto, que no están apareados / alineados con la secuencia de consulta, se consideran a efectos de ajustar manualmente el porcentaje de puntuación de identidad. Es decir, solo posiciones de restos de consulta fuera de los restos más alejados del extremo N y C de la secuencia objeto.

Por ejemplo, se alinea una secuencia objeto de 90 restos de aminoácido con una secuencia de consulta de 100 restos para determinar el porcentaje de identidad. La deleción ocurre en el extremo N de la secuencia objeto y, por tanto, el alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento / alineamiento de los primeros 10 restos en el extremo N. Los 10 restos no apareados representan 10 % de la secuencia (número de restos en los extremos N y C no apareados / número total de restos en la secuencia de consulta), entonces se resta 10 % del porcentaje de puntuación de identidad calculado por el programa FASTDB. Si los 90 restos restantes estuvieran perfectamente apareados, el porcentaje final de identidad sería 90 %. En otro ejemplo, se compara una secuencia objeto de 90 restos con una secuencia de consulta de 100 restos. Esta vez las deleciones son deleciones internas, de manera que no existen restos en los extremos N o C de la secuencia objeto que no están apareados / alineados con la consulta. En este caso, el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Una vez más, solo las posiciones de restos fuera de los extremos N y C de la secuencia objeto, como se presenta en el alineamiento FASTDB, que no están apareadas / alineadas con la secuencia de consulta se corrigen manualmente. No se hacen 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. En una realización, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones silenciosas, adiciones, o deleciones, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En otra realización, se producen variantes de nucleótido por sustituciones silenciosas debido a la degeneración del código genético. En otras realizaciones, variantes en las que 5-10, 1-5, o 1-2 aminoácidos están sustituidos, deleccionados, o

añadidos en cualquier combinación. Se pueden producir variantes de polinucleótidos por una variedad de motivos, por ejemplo, para optimizar la expresión de codones para un hospedador particular (codones de cambio en el ARNm humano por otros, por ejemplo, un hospedador bacteriano tal como *E. coli*).

5 Las variantes que existen de forma natural se denominan "variantes alélicas" y se refieren a una de varias formas alternas de un gen que ocupa un locus dado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar en cualquiera del nivel de polinucleótido y/o polipéptido y están incluidas en la presente invención. Alternativamente, se pueden producir variantes que no existen de forma natural por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

10 Usando 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, se pueden delecionar uno o más aminoácidos del extremo N o extremo C de la proteína secretada sin pérdida sustancial de la función biológica. Ron et al., J. Biol. Chem. 268: 2984-2988 (1993), informaron de proteínas KGF de variante que tenían actividad de unión a heparina incluso después de delecionar 3, 8 o 27 restos de aminoácidos del extremo amino. Similarmente, el interferón gamma presentó hasta diez veces mayor actividad después de delecionar 8-10 restos de aminoácidos del extremo carboxi de esta proteína. (Dobeli et al., J. Biotechnology 7:199-216 (1988))

15 Además, una enorme evidencia demuestra que las variantes retienen frecuentemente una actividad biológica similar a la de la proteína que existe de forma natural. Por ejemplo, Gayle y colaboradores (J. Biol. Chem 268:22105-22111 (1993), realizaron un amplio análisis mutacional de la citocina IL-1a humana. Usaron mutagénesis al azar para generar más de 3.500 mutantes individuales de IL-1a que promediaron 2,5 cambios de aminoácido por variante a lo largo de la longitud entera de la molécula. Se examinaron múltiples mutaciones en cada posición posible de aminoácido. Los investigadores encontraron que "la mayoría de la molécula podría ser alterada con poco efecto sobre cualquiera [unión o actividad biológica]." (Véase el Resumen.) En realidad, solo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de las más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que se diferenció significativamente en actividad de la no mutante.

25 Como se ha establecido anteriormente, las variantes de polipéptido 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 de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glucosilación, 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 mediada por ARN de transferencia de aminoácidos a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación. En algunas realizaciones, se modifica el factor VIII, por ejemplo, se pegila, en cualquier localización conveniente. En algunas realizaciones, el factor VIII se pegila en un aminoácido del factor VIII expuesto en la superficie, por ejemplo, una cisteína expuesta en la superficie, que puede ser una cisteína manipulada. Ídem. En algunas realizaciones, el factor VIII modificado, por ejemplo, factor VIII pegilado, es un factor VIII de acción prolongada.

III. Método de administración

40 El tratamiento de la hemofilia A es una terapia de reemplazo que se dirige a la restauración de actividad de FVIII a 1 a 5 % de los niveles normales para prevenir el sangrado espontáneo (Mannucci, P.M. et al., N. Engl. J. Med. 344:1773-9 (2001)).

45 La presente divulgación también incluye métodos de administración de la composición farmacéutica de la invención. La presente divulgación proporciona un método de administración de una composición farmacéutica a un sujeto humano en necesidad del mismo (por ejemplo, paciente humano), que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido del factor VIII, por ejemplo, un polipéptido de FVIII de acción prolongada o un polipéptido de FVIII de acción corta, por ejemplo, un polipéptido de factor VIII-Fc, o un híbrido de dicho polipéptido en un intervalo de dosificación.

50 En algunos casos, la composición farmacéutica de la invención se usa para reducir o disminuir uno o más episodios hemorrágicos o la frecuencia (por ejemplo, una afección hemorrágica) en un sujeto en necesidad de la misma. En otros casos, la composición farmacéutica de la invención se usa para tratar o prevenir una afección hemorrágica en un sujeto en necesidad del mismo.

55 La afección hemorrágica se puede provocar por un trastorno de la coagulación de la sangre. Un trastorno de la coagulación de la sangre también se puede denominar una coagulopatía. En un ejemplo, el trastorno de la coagulación de la sangre, que se puede tratar con una composición farmacéutica de la presente divulgación, es hemofilia. En otro ejemplo, el trastorno de la coagulación de la sangre, que se puede tratar con una composición farmacéutica de la presente divulgación, es hemofilia A.

En algunos casos, el tipo de sangrado asociado a la afección hemorrágica se selecciona de hemartrosis, sangrado muscular, sangrado bucal, hemorragia, hemorragia en músculos, hemorragia bucal, traumatismo, traumatismo

encefálico, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneal, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura de huesos, sangrado del sistema nervioso central, en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal y sangrado en la vaina del iliopectíneo.

5 En otros casos, el sujeto que padece la afección de sangrado está en necesidad de tratamiento para cirugía, que incluye, por ejemplo, profilaxis quirúrgica o manejo perioperatorio. En un ejemplo, la cirugía se selecciona de cirugía menor y cirugía mayor. Los procedimientos quirúrgicos a modo de ejemplo incluyen extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, craneotomía, osteosíntesis, cirugía para traumatismo, cirugía intracraneal, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, cirugía de reemplazo articular (por ejemplo, reemplazo total de rodilla, reemplazo de cadera, y similares), cirugía cardíaca y cesárea.

10 La presente divulgación también proporciona un método de reducción o disminución de una tasa anualizada de sangrado (ABR) de un sujeto que tiene hemofilia que comprende administrar al sujeto una dosis eficaz de un polipéptido de FVIII. En un caso, un polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra en un intervalo de dosificación de cada tres días o más. En otro caso, la dosis eficaz es entre aproximadamente 20 UI/kg y aproximadamente 90 UI/kg. En otros casos, la dosis eficaz es 20-30 UI/kg, 30-40 UI/kg, 40-50 UI/kg, 50-60 UI/kg, 60-70 UI/kg, 70-80 UI/kg, o 80-90 UI/kg. En aún otros casos, la dosis eficaz es 20 UI/kg, 25 UI/kg, 30 UI/kg, 35 UI/kg, 40 UI/kg, 45 UI/kg, 50 UI/kg, 55 UI/kg, 60 UI/kg, 65 UI/kg, 70 UI/kg, 75 UI/kg, 80 UI/kg, 85 UI/kg, o 90 UI/kg.

En ciertos casos, la administración de un polipéptido de FVIII es para profilaxis individualizada (personalizada) y da como resultado una ABR inferior a aproximadamente 5,5, inferior a aproximadamente 5,4, inferior a aproximadamente 5,3, inferior a aproximadamente 5,2, inferior a aproximadamente 5,1, inferior a aproximadamente 5,0, inferior a aproximadamente 4,9, inferior a aproximadamente 4,8, inferior a aproximadamente 4,7, inferior a aproximadamente 4,6, o inferior a aproximadamente 4,5. En otros casos, la administración da como resultado una ABR de aproximadamente 4,7 a 0. En algunos casos, la mediana de la ABR es aproximadamente 1,6. En aún otras realizaciones, la media de la ABR es aproximadamente 2,9. En un aspecto de la pauta de profilaxis individualizada, la dosis eficaz es aproximadamente 25 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg administrada cada tres a cinco días. Por ejemplo, la dosis eficaz es aproximadamente 25 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg administrada cada tres días. En otro caso, la dosis eficaz es aproximadamente 50 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada cuatro días o cada cinco días. En otros casos, la dosis eficaz es hasta 65 UI/kg cada tres días. En todavía otros casos, la dosis eficaz de un polipéptido de FVIII se modifica basándose en el perfil farmacocinético del paciente. En un ejemplo, la patente se administra con dos dosis inicialmente, una primera dosis de 25 UI/kg en el día 1 y una segunda dosis de 50 UI/kg en el día 4. Si los datos farmacocinéticos muestran menos de 1 % de nivel valle de actividad de FVIII normal después de las dos dosis iniciales, el paciente se administra entonces con aproximadamente 25 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada tres días. En otro ejemplo, si los datos farmacocinéticos muestran más de 1 % de nivel valle de actividad de FVIII normal durante cinco días desde la dosificación, el paciente se administra entonces con aproximadamente 50 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada cinco días. Si el paciente experimenta más de dos sangrados espontáneos durante un periodo de ocho semanas después de la administración de aproximadamente 50 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada cinco días, el paciente se administra con uno de los siguientes: (1) hasta aproximadamente 65 UI/kg cada tres días (para el nivel valle objetivo de hasta 5 % del normal), (2) aproximadamente 50 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada cuatro días (para el nivel valle objetivo hasta 5 % de normal), o (3) aproximadamente 25 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada tres días (para el nivel valle objetivo de 1 % a 3 % del normal). Si el paciente que recibe aproximadamente 50 UI/kg a aproximadamente 65 UI/kg cada cuatro días todavía experimenta más de dos sangrados espontáneos, la dosis máxima puede ascender hasta aproximadamente 65 UI/kg cada tres días. En algunos ejemplos, el intervalo intercuartílico (IQR) de la ABR para la pauta de profilaxis individualizada es 0 a 4,7.

En algunos casos, la administración de un polipéptido de FVIII es para una profilaxis semanal y da como resultado una ABR inferior a aproximadamente 9,0, inferior a aproximadamente 8,9, inferior a aproximadamente 8,8, inferior a aproximadamente 8,7, inferior a aproximadamente 8,6, inferior a aproximadamente 8,5, o inferior a aproximadamente 8,4. En un ejemplo, la administración da como resultado una ABR entre aproximadamente 8,4 y 0. En otro ejemplo, la mediana de la ABR para una profilaxis semanal es aproximadamente 3,6. En otros ejemplos, la media de la ABR para una profilaxis semanal es aproximadamente 8,8. En otras realizaciones, una dosis eficaz para una profilaxis semanal es aproximadamente 65 UI/kg una vez cada semana, por ejemplo, cada cinco días, cada seis días, cada siete días, cada ocho días, o cada nueve días. En algunos ejemplos, el IQR de la ABR para la pauta de profilaxis semanal es 1,9 a 8,4.

En otros casos, la administración de un polipéptido de FVIII es para tratamiento episódico o a demanda y da como resultado una ABR inferior a aproximadamente 55, inferior a aproximadamente 54, inferior a aproximadamente 53, inferior a aproximadamente 52, inferior a aproximadamente 51, inferior a aproximadamente 50, inferior a aproximadamente 49, inferior a aproximadamente 48, o inferior a aproximadamente 47. En un ejemplo, la administración da como resultado una ABR entre aproximadamente 49 y 0, por ejemplo, entre 48,7 y 0. En otro ejemplo, la mediana de la ABR para tratamiento episódico (a demanda) es aproximadamente 33,5. En otros ejemplos, la media de la ABR para tratamiento episódico (a demanda) es aproximadamente 37,23. En otras realizaciones, una dosis eficaz para tratamiento a demanda es aproximadamente 10 UI/kg a 75 UI/kg cada 12 a 24 horas. En algunos ejemplos, la IQR de la ABR para el tratamiento a demanda es 21,1 a 48,7.

En algunos casos, la dosis eficaz para profilaxis individualizada, profilaxis semanal, o tratamiento episódico es una dosis fija o una dosis estratificada. En un aspecto, la dosis fija es aproximadamente 2.000 UI por dosis, aproximadamente 2,500 UI por dosis, aproximadamente 3.000 UI por dosis, aproximadamente 3,500 UI por dosis, o aproximadamente 4.000 UI por dosis.

5 El intervalo de dosificación para un polipéptido de FVIII de acción prolongada puede ser al menos aproximadamente uno y medio a seis veces más largo, uno y medio a cinco veces más largo, uno y medio a cuatro veces más largo, uno y medio a tres veces más largo, o uno y medio a dos veces más largo, que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente del factor VIII sin la porción no de factor VIII (un polipéptido que consiste en la porción de factor VIII), por ejemplo, sin la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser al menos aproximadamente uno y medio,
10 dos, dos y medio, tres, tres y medio, cuatro, cuatro y medio, cinco, cinco y medio o seis veces más largo que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente del factor VIII sin la porción no de factor VIII (un polipéptido que consiste en la porción de factor VIII), por ejemplo, sin la porción Fc. El intervalo de dosificación puede ser aproximadamente cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, o catorce días o más largo.

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

Para tratamiento a demanda, el intervalo de dosificación de una composición farmacéutica que comprende un polipéptido de FVIII es aproximadamente una vez cada 24-36, 24-48, 24-72, 24-96, 24-120, 24-144, 24-168, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71 o 72 horas o más.

20 En un caso, el sujeto está en necesidad de tratamiento a demanda (episódico). En otro caso, el tratamiento a demanda (episódico) resuelve más de 80 % (más de 80 %, más de 81 %, más de 82 %, más de 83 %, más de 84 %, más de 85 %, más de 86 %, más de 87 %, más de 88 %, más de 89 %, más de 90 %, más de 91 %, más de 92 %, más de 93 %, más de 94 %, más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 %, más de 99 %, o 100 %) o 80-100 %, 80-90 %, 85-90 %, 90-100 %, 90-95 % o 95-100 % de sangrados (por ejemplo, sangrados espontáneos) en una dosis
25 única. En otro caso, más de 80 % (más de 81 %, más de 82 %, más de 83 %, más de 84 %, más de 85 %, más de 86 %, más de 87 %, más de 88 %, más de 89 %, más de 90 %, más de 91 %, más de 92 %, más de 93 %, más de 94 %, más de 95 %, más de 96 %, más de 97 %, más de 98 % o 100 %) o 80-100 %, 80-90 %, 85-90 %, 90-100 %, 90-95 %, o 95-100 % de los episodios hemorrágicos se clasifican como excelentes o buenos por los médicos después del tratamiento a demanda (episódico). En otros casos, más de 5 % (más de 6 %, más de 7 %, más de 8 %, más de 9 %, más de 10 %, más de 11 %, más de 12 %, más de 13 %, más de 14 %, más de 15 %, más de 16 %, más de 17 %, más de 18 %, más de 19 %, más de 20 %), o 5-20 %, 5-15 %, 5-10 %, 10-20 %, o 10-15 % de los episodios hemorrágicos son clasificados como justos por los médicos después del tratamiento a demanda.

35 En otros casos, la composición farmacéutica que comprende un polipéptido FVIII se usa para profilaxis. La profilaxis se puede demostrar por mejor $C_{máx}$, mejor $T_{máx}$, y/o mayor tiempo de residencia medio frente a FVIII de acción corta. En algunos casos, la profilaxis da como resultado episodios hemorrágicos no espontáneos en el plazo 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), después de la inyección (por ejemplo, la última inyección). En ciertos casos, la profilaxis da como resultado más de 30 % (por
40 ejemplo, más de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, o 90 %, por ejemplo, más de 50 %), de reducción media en episodios hemorrágicos anualizados con dosificación de una vez a la semana (por ejemplo, a 65 UI/kg).

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

IV. Método de preparación

Se puede fabricar un polipéptido FVIII en una célula hospedadora que comprende un vector que codifica el polipéptido de FVIII. En un caso, la célula hospedadora se transforma con uno o más vectores que comprenden una primera
50 secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido FVIII y un primer polipéptido de FcRn, una segunda secuencia de nucleótidos que codifica un segundo polipéptido de FcRn, y opcionalmente una tercera secuencia de nucleótidos que codifica una proteína convertasa, por ejemplo, PC5. Como se usa en el presente documento, un vector de expresión se refiere a cualquier construcción de ácidos nucleicos que contenga los elementos necesarios para la transcripción y la traducción de una secuencia codificante insertada, o en el caso de un vector viral de ARN, los
55 elementos necesarios para la replicación y la traducción, cuando se introduce en una célula hospedadora apropiada. Los vectores de expresión pueden incluir plásmidos, fagémidos, virus, y derivados de los mismos.

Una secuencia de control de la expresión génica como se usa en el presente documento es cualquier secuencia de nucleótidos reguladora, tal como una secuencia promotora o combinación de promotor-potenciador, que facilita la

eficiente transcripción y traducción del ácido nucleico codificante al que se une operativamente. La secuencia de control de la expresión génica puede ser, por ejemplo, un promotor de mamífero o viral, tal como un promotor constitutivo o inducible. Los promotores constitutivos de mamífero incluyen, pero no se limitan a, los promotores para los siguientes genes: hipoxantina fosforibosil transferasa (HPRT), adenosina desaminasa, piruvato cinasa, promotor de beta-actina, y otros promotores constitutivos. Los promotores virales a modo de ejemplo que funcionan constitutivamente en células eucariotas incluyen, por ejemplo, promotores del citomegalovirus (CMV), virus simio (por ejemplo, SV40), virus del papiloma, adenovirus, virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), virus del sarcoma de Rous, citomegalovirus, las repeticiones terminales largas (LTR) del virus de la leucemia de Moloney, y otros retrovirus, y el promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores constitutivos. Los promotores útiles como secuencias de expresión génicas de la invención también incluyen promotores inducibles. Los promotores inducibles se expresan en presencia de un agente inductor. Por ejemplo, se induce el promotor de la metalotioneína para promover la transcripción y la traducción en presencia de ciertos iones metálicos. Los expertos habituales en la técnica conocen otros promotores inducibles.

Los ejemplos de vectores incluyen, pero no se limitan a, vectores virales o vectores plasmídicos. Los vectores plasmídicos han sido ampliamente descritos en la técnica y son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. En los últimos años, se ha encontrado que los vectores plasmídicos son particularmente ventajosos para administrar genes a células *in vivo* debido a su incapacidad para replicarse dentro de e integrarse en un genoma hospedador. Estos plásmidos, sin embargo, que tienen un promotor compatible con la célula hospedadora, pueden expresar un péptido de un gen operativamente codificado dentro del plásmido. Algunos plásmidos comúnmente usados disponibles de proveedores comerciales incluyen pBR322, pUC18, pUC19, diversos plásmidos de pcDNA, pRC/CMV, diversos plásmidos de pCMV, pSV40 y pBlueScript. Los ejemplos adicionales de plásmidos específicos incluyen pcDNA3.1, número de catálogo V79020; pcDNA3.1/hygro, número de catálogo V87020; pcDNA4/myc-His, número de catálogo V86320; y pBudCE4.1, número de catálogo V53220, todos de Invitrogen (Carlsbad, CA.). Otros plásmidos son bien conocidos por los expertos habituales en la técnica. Además, los plásmidos pueden ser diseñados a medida usando técnicas convencionales de biología molecular para retirar y/o añadir fragmentos específicos de ADN.

El vector o vectores de expresión se transfectan o co-transfectan entonces en una célula diana adecuada, que expresará los polipéptidos. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, precipitación con fosfato de calcio (Wigler et al. (1978) *Cell* 14:725), electroporación (Neumann et al. (1982) *EMBO J* 1:841) y reactivos basados en liposomas. Se puede utilizar una variedad de sistemas de vector de expresión de hospedador para expresar las proteínas descritas en el presente documento que incluyen tanto células procariotas como eucariotas. Estos incluyen, pero no se limitan a, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante o vectores de expresión de ADN de plásmido que contienen una secuencia codificante apropiada; levadura u hongos filamentosos transformados con vectores de expresión recombinantes de levadura u hongos que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de insecto infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, baculovirus) que contienen una secuencia codificante apropiada; sistemas de células de planta infectadas con vectores de expresión de virus recombinante (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor o virus del mosaico del tabaco) o transformados con vectores de expresión plasmídicos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen una secuencia codificante apropiada; o sistemas de células animales, que incluyen células de mamífero (por ejemplo, células HEK 293, CHO, Cos, HeLa, HKB11 y BHK).

En un caso, la célula hospedadora es una célula eucariota. Como se usa en el presente documento, una célula eucariota se refiere a cualquier célula animal o de planta que tiene un núcleo definitivo. Las células eucariotas de animales incluyen células de vertebrados, por ejemplo, mamíferos, y células de invertebrados, por ejemplo, insectos. Las células eucariotas de plantas pueden incluir específicamente, sin limitación, células de levadura. Una célula eucariota es distinta de una célula procariota, por ejemplo, bacterias.

En ciertos casos, la célula eucariota es una célula de mamífero. Una célula de mamífero es cualquier célula derivada de un mamífero. Las células de mamífero incluyen específicamente, pero no se limitan a, líneas celulares de mamífero. En una realización, la célula de mamífero es una célula humana. En otro caso, la célula de mamífero es una célula HEK 293, que es una línea celular de riñón embrionario humano. Las células HEK 293 están disponibles como CRL-1533 de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA, y como células 293-H, Catálogo N° 11631-017 o células 293-F, Catálogo N° 11625-019 de Invitrogen (Carlsbad, Calif.). En algunos casos, la célula de mamífero es una célula PER.C6®, que es una línea celular humana derivada de la retina. Las células PER.C6® están disponibles de Crucell (Leiden, Países Bajos). En otras realizaciones, la célula de mamífero es una célula de ovario de hámster chino (CHO). Las células CHO están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. (por ejemplo, CHO-K1; CCL-61). En todavía otros casos, la célula de mamífero es una célula de riñón de hámster bebé (BHK). Las células BHK están disponibles de la Colección Americana de Cultivos Tipo, Manassas, VA. (por ejemplo, CRL-1632). En algunos casos, la célula de mamífero es una célula HKB11, que es una línea celular híbrida de una célula HEK293 y una línea humana de linfocitos B. Mei et al., *Mol. Biotechnol.* 34(2): 165-78 (2006).

El método puede comprender además etapas de purificación. Se conocen bien en la técnica diversas etapas de purificación conocidas.

Ejemplos

Ejemplo 1. Descripción del producto

rFVIII Fc es una proteína de fusión de acción prolongada, completamente recombinante, que consiste en factor de coagulación VIII (FVIII) humano enlazado covalentemente al dominio Fc de inmunoglobulina humana G1 (IgG1). La porción de factor VIII de rFVIII Fc tiene una secuencia de aminoácidos primaria y modificaciones postraduccionales que son comparables a la forma de 90 + 80 kDa del factor VIII (es decir, dominio B deletado). El dominio Fc de rFVIII Fc contiene las regiones bisagra, CH2 y CH3 de IgG1. rFVIII Fc contiene 1882 aminoácidos con un peso molecular aparente de aproximadamente 220 kilodáltones.

rFVIII Fc se produce por tecnología de ADN recombinante en una línea celular de riñón embrionario humano (HEK), que se ha caracterizado ampliamente. La línea celular expresa rFVIII Fc en un medio de cultivo celular definido que no contiene ninguna proteína derivada de fuentes animales o humanas. rFVIII Fc se purifica por una serie de etapas de cromatografía que no requieren el uso de un anticuerpo monoclonal. El proceso incluye una etapa de inactivación viral con detergente y múltiples etapas de eliminación viral que incluyen una etapa de cromatografía de afinidad y una etapa de nanofiltración que retiene virus de 15 nm. No se usan aditivos humanos o animales en los procesos de cultivo celular, purificación y formulación.

rFVIII Fc está en el grupo farmacoterapéutico: antihemorrágicos, factor VIII de coagulación de la sangre. Se proporciona como de un polvo a torta estéril, sin conservantes, no pirógeno, liofilizado, de blanco a blanquecino, para administración intravenosa (IV) en un vial de un solo uso, acompañado por un diluyente líquido en una jeringa precargada. Además de rFVIII Fc, la composición farmacéutica comprende sacarosa liofilizada, cloruro sódico, L-histidina, cloruro de calcio y polisorbato 20 o polisorbato 80, y comprende agua esterilizada para inyecciones. Cada vial de un solo uso contiene nominalmente 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 o 6000 Unidades Internacionales (UI) de rFVIII Fc. Cuando se reconstituye con diluyente proporcionado, el producto contiene los siguientes excipientes: sacarosa, cloruro sódico, L-histidina, cloruro de calcio y polisorbato 20 o polisorbato 80, a las concentraciones mostradas en la Tabla 1 o Tabla 2 a continuación. La composición farmacéutica se formula para administración intravenosa solo después de la reconstitución.

Cada envase contiene un vial de polvo (vidrio de tipo 1) con un tapón (butilo) y un precinto Flip-Off (aluminio), 3 mL de disolvente en una jeringa precargada (vidrio de tipo 1) con un pistón (butilo), un protector (butilo) y un dispositivo de reconstitución de adaptador de vial estéril.

TABLA 1: Formulaciones de rFVIII Fc tras la reconstitución con diluyente líquido

rFVIII Fc UI/mL *	% de sacarosa (p/v)	NaCl (mM)	L-histidina (mM)	Cloruro de calcio (mM)	Polisorbato-20 % (p/v)
83 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
167 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
250 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
333 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
500 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
667 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
1000 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
1333 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
1667 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013
2000 UI/mL	1,33	205	6,64	5,4	0,013

TABLA 2: Formulaciones de rFVIIIc tras la reconstitución con diluyente líquido

Componente	Concentración										
	250 UI/vial	500 UI/vial	750 UI/vial	1000 UI/vial	1500 UI/vial	2000 UI/vial	3000 UI/vial	4000 UI/vial	5000 UI/vial	6000 UI/vial	
rFVIIIc*	83 UI/mL	167 UI/mL	250 UI/mL	333 UI/mL	500 UI/mL	667 UI/mL	1000 UI/mL	1333 UI/mL	1667 UI/mL	2000 UI/mL	
Sacarosa	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	13,3 mg/mL	
Cloruro sódico	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	12,0 mg/mL	
L-Histidina	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	1,03 mg/mL	
Cloruro de calcio dihidratado	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	0,80 mg/mL	
Polisorbato 20	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	0,13 mg/mL	

*La potencia (UI) se determina usando el ensayo cromogénico de la Farmacopea Europea frente a un patrón interno que se referencia al patrón de la OMS. La actividad específica de rFVIIIc es 4000-10000 UI/mg de proteína.

Ejemplo 2. Método de formulación

- El medicamento de rFVIII_{FC} es un polvo liofilizado estéril para inyección previsto para administración intravenosa. Se suministra en viales de un solo uso asépticamente cargados que contienen nominalmente 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000, 5000 y 6000 UI por vial. Los viales son viales de vidrio de 10 mL USP/Ph. Eur. tipo 1 precintados con un tapón de liofilización de caucho butílico recubierto con teflón de 20 mm y precinto de aluminio plegado Flip-Off.
- 5 Antes de la liofilización, el objetivo de volumen de llenado nominal para viales de 250 a 6000 UI es 3 mL. La composición de excipientes de la formulación antes de la liofilización es la misma para todas las concentraciones de dosificación. El polvo para inyección se reconstituye con 3 mL de diluyente que comprende agua esterilizada para inyecciones suministrado en una jeringa precargada estéril.
- 10 Las composiciones de las disoluciones de medicamento antes de la liofilización se presentan en la Tabla 3. Las composiciones de los medicamentos tras la reconstitución se presentan en la Tabla 1 o en la Tabla 2. (Ejemplo 1).

TABLA 3: Concentraciones pre-liofilización de los componentes de formulación de rFVIII Fc

Componente	Concentración											
	250 UI/vial	500 UI/vial	750 UI/vial	1000 UI/vial	1500 UI/vial	2000 UI/vial	3000 UI/vial	4000 UI/vial	5000 UI/vial	6000 UI/vial		
rFVIII Fc	150 UI/mL *	287,5 UI/mL **	431,25 UI/mL **	575 UI/mL **	862,5 UI/mL **	1150 UI/mL **	1725 UI/mL **	2300 UI/mL **	2875 UI/mL **	3450 UI/mL **		
Sacarosa	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL	20,0 mg/mL		
Cloruro sódico	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL	18,0 mg/mL		
L-Histidina	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL	1,55 mg/mL		
Cloruro de calcio dihidratado	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL	1,18 mg/mL		
Polisorbato 20	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL	0,2 mg/mL		
Agua para inyección	Para preparar 1 mL ***											
Volumen llenado	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL	2,0 mL		

* Se incluye un 20 % de exceso para la concentración de 250 UI/vial para garantizar que, después de las variaciones de proceso y de ensayo, en el vial esté presente al menos la concentración nominal.

** Se incluye un 15 % de exceso para las concentraciones de 500-6000 UI/vial para garantizar que, después de las variaciones de proceso y de ensayo, en el vial esté presente al menos la concentración nominal.

*** Retirado durante la liofilización.

Ejemplo 3. Dosificación y método de administración / método de cálculo de dosis estimadas iniciales

rFVIII Fc es factor antihemofílico (recombinante) de acción prolongada indicado en adultos y niños (≥12 años) con hemofilia A (deficiencia congénita de factor FVIII) para, por ejemplo, el control y la prevención de episodios hemorrágicos, profilaxis rutinaria para prevenir o reducir la frecuencia de episodios hemorrágicos, y manejo perioperatorio (profilaxis quirúrgica).

La dosificación de rFVIII Fc se puede estimar como se describe en este ejemplo, pero también se puede determinar por pruebas convencionales tales como los ensayos de actividad de FVIII descritos en cualquier parte en el presente documento.

Se espera que 1 UI de rFVIII Fc por kg de peso corporal aumente el nivel en circulación de factor VIII por 2 [UI/dL]. Se ha mostrado que rFVIII Fc tiene una semivida en circulación prolongada.

Puesto que los pacientes pueden variar en su farmacocinética (por ejemplo, semivida, recuperación *in vivo*) y respuestas clínicas a rFVIII Fc, se puede estimar el aumento pico *in vivo* esperado en el nivel de factor VIII expresado como UI/dL (o % del normal) o la dosis requerida usando las siguientes fórmulas:

$$\text{UI/dL (o \% del normal)} = [\text{Dosis total (UI) / peso corporal (kg)}] \times 2 \text{ (UI/dL por UI/kg)}$$

$$\text{Dosis (UI)} = \text{Peso corporal (kg)} \times \text{Aumento deseado de factor VIII (UI/dL o \% del normal)} \times 0,5 \text{ (UI/kg por UI/dL)}$$

Se puede usar la siguiente tabla (Tabla 4) para guiar la dosificación en episodios hemorrágicos:

TABLA 4: Guía para la dosificación de rFVIII Fc para el tratamiento de sangrado

Gravedad del sangrado	Nivel deseado de factor VIII (UI/dL o % del normal)	Dosis (UI/kg)/Frecuencia de dosis (horas)
Menor y moderada Por ejemplo: articulación, músculo superficial/sin compromiso neurovascular (excepto iliopsoas), laceración profunda y renal, tejido blando superficial, membranas mucosas	40-60	20-30 UI/kg Repetir cada 24-48 horas hasta que se resuelva el sangrado
Mayor Por ejemplo: músculo iliopsoas y profundo con lesión neurovascular, o pérdida sustancial de sangre, retroperitoneo, SNC, garganta y cuello, gastrointestinal.	80-100	40-50 UI/kg Repetir cada 12-24 horas hasta que se resuelva el sangrado
Adaptado de WFH 2012		

La posterior dosificación y duración del tratamiento depende de la respuesta clínica individual, la gravedad de la deficiencia de factor VIII, y la localización y grado del sangrado.

Se puede usar la siguiente tabla (Tabla 5) para guiar la dosificación para el manejo perioperatorio (profilaxis quirúrgica):

TABLA 5: Guía para la dosificación de rFVIII Fc para el tratamiento perioperatorio (profilaxis quirúrgica)

Tipo de cirugía	Nivel objetivo de factor VIII (UI/dL o % del normal)	Dosis (UI/kg)/Frecuencia de dosis (horas)
Menor Operaciones menores que incluyen extracción dental no complicada	50 a 80	25-40 UI/kg Una única infusión puede ser suficiente. Repetir cada 24 horas según se necesite para controlar el sangrado.

<p>Mayor</p> <p>Operaciones mayores que incluyen cirugía de reemplazo articular intra-abdominal</p>	<p>80 a 120</p>	<p>Una dosis preoperatoria inicial de 40-60 UI/kg seguida por una dosis repetida de 40-50 UI/kg después de 8-24 horas y luego cada 24 horas para mantener la actividad de FVIII dentro del intervalo objetivo.</p> <p>rFVIIIc tiene una semivida más larga que el plasma y productos de FVIII recombinante (véase el Ejemplo 5)</p>
--	------------------------	---

Para profilaxis rutinaria, la pauta recomendada es 50 UI/kg cada 3-5 días. La dosis se puede ajustar basándose en la respuesta del paciente en el intervalo de 25-65 UI/kg.

Para una profilaxis semanal, la dosis recomendada es 65 UI/kg.

- 5 rFVIIIc está contraindicado en pacientes que han manifestado reacciones de hipersensibilidad graves, que incluyen anafilaxia, al producto o sus componentes. No se observaron reacciones de hipersensibilidad graves en ensayos clínicos; sin embargo, se sabe que éstas ocurren usando otros factores de reemplazo de factor VIII.

- 10 La respuesta clínica a rFVIIIc puede variar. Si el sangrado no se controla con la dosis recomendada, se puede determinar el nivel en plasma del factor VIII, y se puede administrar una dosis suficiente de rFVIIIc para lograr una respuesta clínica satisfactoria. Si deja de aumentar el nivel de factor VIII en plasma del paciente como era de esperar o si el sangrado no se controla después de la administración de rFVIIIc, se debe sospechar de la presencia de un inhibidor (anticuerpos neutralizantes), y realizar pruebas apropiadas. Los pacientes que usan rFVIIIc se pueden monitorizar para el desarrollo de inhibidores del factor VIII por observaciones clínicas apropiadas y pruebas de laboratorio conocidas por los expertos habituales en la técnica.

- 15 Se puede monitorizar el plasma del paciente para niveles de actividad del factor VIII, por ejemplo, se ha logrado y mantenido el ensayo de coagulación de una etapa para confirmar niveles adecuados del factor VIII, cuando se indique clínicamente. El plasma del paciente se puede monitorizar adicionalmente para el desarrollo de inhibidores del factor VIII.

20 **Ejemplo 4. Ensayo clínico de fase 3 de semivida prolongada de la fusión recombinante de Fc-factor VIII (Estudio "A-LONG")**

Resumen del estudio A-LONG

- 25 En el estudio A-LONG, se incluyeron 165 pacientes masculinos de edad 12 años de edad y mayores. El estudio A-LONG tuvo tres brazos de tratamiento: profilaxis individualizada, profilaxis semanal y tratamiento episódico (a demanda) (Brazos 1, 2 y 3, respectivamente). En un subgrupo de pacientes a través de los brazos de tratamiento, se evaluó rFVIIIc en el manejo perioperatorio de pacientes que requirieron un procedimiento quirúrgico mayor durante el estudio.

- 30 En total, el 92,7 por ciento de los pacientes completaron el estudio. FVIIIc recombinante fue, en general, bien tolerado. No se detectaron inhibidores para rFVIIIc y no se informó de casos de anafilaxia en ningún paciente, todos ellos cambiados de productos de factor VIII comercialmente disponibles. El investigador no evaluó acontecimientos adversos graves que estuvieran relacionados con el fármaco.

Los acontecimientos adversos más comunes (incidencia de ≥ 5 por ciento) que ocurren fuera del periodo de tratamiento perioperatorio fueron nasofaringitis, artralgia, cefalea e infección de las vías respiratorias superiores.

- 35 La mediana (media) de la tasa anualizada de sangrados (ABR), que incluye sangrados espontáneos y traumáticos, fue 1,6 (2,9) en el brazo de profilaxis individualizada, 3,6 (8,8) en el brazo de profilaxis semanal y 33,6 (37,2) en el brazo de tratamiento episódico. En el brazo de profilaxis individualizada, la mediana del intervalo de dosificación fue 3,5 días. Durante los últimos 3 meses en el estudio, el 30 por ciento de los pacientes en el brazo de profilaxis individualizada lograron un intervalo de dosificación medio de al menos 5 días.

Se evaluó el control de sangrado en todos los pacientes que experimentaron un episodio hemorrágico durante el estudio. En total, se controló el 98 por ciento de los episodios hemorrágicos por una o dos inyecciones de rFVIIIc.

- 40 Además, se evaluó rFVIIIc en el manejo perioperatorio de 9 pacientes que se sometieron a 9 procedimientos quirúrgicos mayores. Los médicos prácticos clasificaron la eficacia hemostática de rFVIIIc como excelente o buena en el 100 por cien de estas cirugías.

- 45 A-LONG incluyó el análisis farmacocinético (PK) de rFVIIIc en todos los pacientes en el estudio. En el subconjunto definido en el protocolo de pacientes con gran muestreo PK, la semivida terminal aproximada de rFVIIIc fue 19,0 horas en comparación con 12,4 horas para ADVATE® [factor antihemofílico (recombinante), método de plasma / sin albúmina], de acuerdo con los resultados obtenidos en el estudio de fase 1/2 de rFVIIIc.

Sobre el estudio A-LONG y el programa de rFVIII Fc

5 A-LONG fue un estudio de fase 3 multicéntrico, global, de etiqueta abierta, que evaluó la eficacia, seguridad y farmacocinética de rFVIII Fc inyectado por vía intravenosa. El estudio se diseñó para evaluar rFVIII Fc en el control y la prevención de sangrado, profilaxis rutinaria y manejo perioperatorio en pacientes con hemofilia A. A-LONG implicó a 60 centros de tratamiento de hemofilia en 19 países en 6 continentes.

10 El estudio A-LONG tuvo tres brazos de tratamiento. En el Brazo 1 (profilaxis individualizada; n=117), los pacientes se trataron con 25-65 UI/kg de rFVIII Fc, en un intervalo de cada tres a cinco días, que se individualizó para mantener niveles valle de factor suficientes para prevenir el sangrado. En el Brazo 2 (profilaxis semanal; n=24), se trataron pacientes con una dosis semanal de 65 UI/kg. En el Brazo 3 (tratamiento episódico; n=23), los pacientes recibieron tratamiento episódico de rFVIII Fc según se necesitara para el sangrado. En un subgrupo de pacientes a través de brazos de tratamiento, se evaluó rFVIII Fc en el ámbito quirúrgico.

15 Las medidas de eficacia primaria fueron la tasa anualizada de sangrado por paciente en el Brazo 1 frente al Brazo 3, y la farmacocinética de rFVIII Fc frente a rFVIII (ensayo de coagulación de una etapa [tiempo de tromboplastina parcial activada] y los ensayos cromogénicos calibrados con plasma de referencias humanas normales con potencia trazable a los patrones de la Organización Mundial de la Salud). Los criterios de evaluación de la seguridad incluyeron la incidencia de acontecimientos adversos y el desarrollo de inhibidores (ensayo de Bethesda modificado por Nijmegen) en pacientes estudiados durante hasta 54 semanas. Los criterios de evaluación de eficacia secundaria incluyeron ABR en el Brazo 2 frente al Brazo 3, número anualizado de episodios hemorrágicos espontáneos y articulares, número de inyecciones y dosis por inyecciones para resolver un sangrado, y evaluaciones de los investigadores de la respuesta de los pacientes a cirugía con rFVIII Fc usando una escala de respuesta de sangrado (subgrupo de cirugía solo), respuesta al tratamiento de episodios hemorrágicos y la farmacocinética de rFVIII Fc frente a ADVATE®. Se evaluaron anticuerpos no neutralizantes (NNAs) con un ensayo de anticuerpos de unión a anti-rFVIII Fc basados a electroquimioluminiscencia.

25 Los estudios clínicos en curso de rFVIII Fc incluyen los estudios Kids A-LONG y ASPIRE. Kids A-LONG es un estudio de fase 3 de etiqueta abierta en niños tratados previamente con hemofilia A por debajo de la edad de 12, que está activamente reclutando pacientes. ASPIRE es un estudio a largo plazo de etiqueta abierta para pacientes que completaron el estudio A-LONG o que completan el estudio Kids A-LONG.

Diseño del estudio A-LONG

30 Diseño: Estudio global, de etiqueta abierta, multicéntrico, fase 3. El protocolo del estudio fue autorizado por los Comités locales de ética médica para cada institución participante, y el estudio se realizó según las directrices para buenas prácticas clínicas de la Conferencia Internacional de Armonización.

Objetivos: Evaluar la eficacia y seguridad de proteína de fusión de factor VIII recombinante-Fc (rFVIII Fc) inyectada por vía intravenosa en el control y la prevención de episodios hemorrágicos, profilaxis rutinaria y manejo perioperatorio en individuos con hemofilia A grave.

35 Criterios de inclusión clave:

Varones

≥12 años de edad y al menos 40 kg

Diagnóstico de hemofilia A grave definida como <1 % (<1 UI/dL) de actividad de factor VIII (FVIII) endógeno

40 Pacientes previamente tratados (PTPs): historia de ≥150 días de exposición (EDs) documentada previa a algún producto de FVIII actualmente comercializado, estado en profilaxis ≥ 2 veces por semana con un producto de FVIII (para el Brazo 1 solo), o experimentado ≥ 12 sangrados en los últimos 12 meses en una pauta episódica.

Sin inhibidores de FVIII actuales / previos de actividad medible.

Sin historia de inhibidores, o historia de hipersensibilidad o anafilaxia asociada con algún FVIII o administración de inmunoglobulinas intravenosas

45 Todos los sujetos (o sus tutores en el caso de menores) dieron el consentimiento informado por escrito antes de la participación en el estudio.

Brazos de tratamiento: Los detalles del diseño del estudio A-LONG se describen a continuación.

50 Se administró el Brazo 1 (profilaxis individualizada) con 25-65 UI/kg cada 3-5 días (intervalo de dosificación máximo 5 días). Los sujetos se trataron con una dosis inicial de 25 UI/kg en el día 1 y 50 UI/kg en el día 4, que posteriormente se ajustó para mantener niveles valle de factor suficientes para prevenir el sangrado. Se permitieron ajustes de dosis adicionales a los niveles valle objetivo de 3 a 5 UI/dL después de la semana 7 si el sujeto experimentó ≥2 sangrados moderados/graves durante un periodo consecutivo de 8 semanas; 10 a

20 UI/kg de rFVIIIc (objetivo 20-40 UI/dL de FVIII) para episodios hemorrágicos menores; 15 a 30 UI/kg de rFVIIIc (objetivo 30-60 UI/dL de FVIII) para episodios hemorrágicos de moderados a mayores; 40 a 50 UI/kg de rFVIIIc (objetivo 80-100 UI/dL de FVIII) para episodios hemorrágicos de mayores a potencialmente mortales.

5 Se administró el Brazo 2 (profilaxis semanal) con dosis de 65 UI/kg. Los sujetos se trataron con 65 UI/kg una vez a la semana sin ajuste de dosis o de intervalo.

Se administró el Brazo 3 (tratamiento episódico [demanda]) con dosis de 10-50 UI/kg. Los sujetos recibieron tratamiento episódico de rFVIIIc según se necesitara para el sangrado.

10 Se estableció un subgrupo de manejo perioperatorio. En este subgrupo, se administró rFVIIIc antes y tras la cirugía en el subconjunto de pacientes que requirieron un procedimiento quirúrgico mayor durante el estudio. Los sujetos en cualquier brazo de tratamiento podrían ser incluidos en el subgrupo de cirugía. Elegibilidad: cirugía mayor requerida; ≥ 12 días de exposición a rFVIIIc con título de inhibidor negativo tras este periodo y en el plazo de 4 semanas antes de la cirugía; y, completaron, como mínimo, el muestreo PK abreviado.

15 Todos los sujetos (excluyendo el subgrupo PK secuencial) se sometieron a muestreo PK pre-inyección con rFVIIIc hasta 96 horas post-inyección, según el programa: pre-inyección, 30 (± 3) minutos, 3 horas (± 15 minutos), 72 (± 2) horas (Día 3) y 96 (± 2) horas (Día 4) desde el inicio de la inyección.

20 Se realizó evaluación farmacocinética (PK). Todos los sujetos en todos los brazos tuvieron una evaluación PK inicial después de su primera dosis de rFVIIIc. Se asignó un subconjunto de sujetos del Brazo 1 al subgrupo PK secuencial especificado en el protocolo para comparar la estabilidad de las propiedades PK de rFVIIIc con el tiempo con la del factor VIII recombinante (rFVIII, ADVATE® [factor antihemofílico (recombinante), método de plasma/sin albúmina], octocog alfa) del siguiente modo:

Antes del tratamiento en el Brazo 1, se evaluó la PK después de una dosis única de ADVATE® 50 UI/kg. Entonces se evaluó la PK en estos mismos sujetos después de una dosis única de rFVIIIc 50 UI/kg.

Se repitió la PK de rFVIIIc a 12 a 24 semanas.

25 Los detalles sobre el diseño de la dosificación del subgrupo PK secuencial (Brazo 1) y el muestreo PK se describen en la Figura 1

Medidas de resultados de eficacia clave (incluidos en la lectura inicial):

- a. Tasa anualizada de sangrado (ABR) en el Brazo 1 frente al Brazo 3
- b. Brazo de profilaxis individualizada en comparación con el brazo de tratamiento episódico.
- c. Número de inyecciones requeridas para resolver un episodio hemorrágico
- 30 d. Número de inyecciones requeridas para resolver episodios hemorrágicos
- e. Mediana de la dosis requerida para resolver los episodios hemorrágicos
- f. Evaluaciones de médicos prácticos de la respuesta de los sujetos a cirugía con rFVIIIc usando una escala de 4 puntos

Las medidas de resultados PK incluyeron:

- 35 a. La evaluación PK primaria se basó en los niveles de actividad de FVIII determinados en un laboratorio central por el ensayo de coagulación de una etapa y por el ensayo cromogénico contra patrones de plasma comercialmente disponibles.
- b. PK de rFVIIIc y ADVATE®
- 40 c. Se compararon las propiedades PK de rFVIIIc con rFVIII (ADVATE®; subgrupo PK secuencial). La duración de todo el estudio fue ≤ 75 semanas para todos los sujetos. El criterio primario de valoración de la eficacia fue la tasa anualizada de sangrado (ABR; Brazos 1 y 2 frente al Brazo 3). Se evaluaron la dosis y el intervalo de profilaxis, número de inyecciones requeridas para el tratamiento de episodios hemorrágicos, y la hemostasia perioperatoria.

Las medidas de resultados de seguridad clave incluyeron:

- 45 a. Incidencia del desarrollo del inhibidor. El estudio fue impulsado para detectar la aparición de inhibidores con un intervalo de confianza del 95 % bilateral usando el método exacto de Clopper-Pearson si se observó la formación de 2 casos de inhibidor.
- b. Incidencia de acontecimientos adversos (AEs) que ocurren fuera del periodo de tratamiento perioperatorio

Se evaluó la adherencia al tratamiento (medidas de adherencia) usando diarios electrónicos del paciente.

Resultados de A-LONG

Sujetos

5 Se incluyeron un total de 165 sujetos en el estudio. La medida de la edad fue 30 años (intervalo, 12-65) y 8 % tuvieron <18 años. El número de pacientes en cada brazo del estudio fue: Brazo 1 (profilaxis individualizada), n = 118; Brazo 2 (profilaxis semanal), n=24; Brazo 3 (tratamiento episódico), n = 23; y subgrupo de tratamiento perioperatorio, n = 9, 9 cirugías (8 sujetos del Brazo 1 y 1 del Brazo 2). Los sujetos de cada brazo de tratamiento fueron aptos para entrar en el subgrupo de cirugía si requirieron cirugía mayor, tuvieron ≥12 EDs a rFVIIIc y un título de inhibidor negativo tras este periodo y en el plazo de 4 semanas antes de la cirugía. Los pacientes con el tratamiento episódico previo tuvieron 10 un mayor número medio de episodios hemorrágicos en los 12 meses antes del estudio, y una mayor proporción de pacientes en los Brazos 2 y 3 tuvieron articulaciones diana. Para pacientes con profilaxis previa, el 87 % informaron inyección al menos tres veces a la semana.

15 92,7 % de los sujetos completaron el estudio. En total, 153 (aproximadamente 93 %) sujetos completaron el estudio; 112/118 (95 %) en el Brazo 1, 19/24 (79%) en el Brazo 2 y 22/23 (96 %) en el Brazo 3. Los motivos para la interrupción prematura fueron: Brazo 1 - retirada del sujeto (n=2), decisión del médico (n=2), otro (n=1), muerte (n=1); Brazo 2 - retirada del sujeto (n=2; pueden haber contribuido a los acontecimientos adversos (AEs) relacionados con el fármaco del estudio), AEs (n=2), otro (n=1); Brazo 3 - otro (n=1).

La edad, raza y geografía de los sujetos fueron representativos de la población global con hemofilia A que tenía acceso al tratamiento, como se resume en la Tabla 6.

20 **TABLA 6. Características demográficas de los sujetos de A-LONG**

Características demográficas	Brazo 1 (N=118)	Brazo 2 (N=24)	Brazo 3 (N=23)	Total N=165
Edad (años), mediana (mín-máx)	29,0 (12-65)	31,5 (18-59)	34,0 (13-62)	30,0 (12-65)
Peso (kg), mediana (mín-máx)	71,65 (42,0-127,4)	75,85 (50,0-105,0)	70,00 (48,0-110,4)	71,60 (42,0-127,4)
IMC (kg/m ²), mediana (mín-máx)	23,90 (15,3-37,1)	24,60 (18,8-37,4)	22,80 (17,2-35,6)	23,90 (15,3-37,4)
Raza, n (%)				
Blanca	79 (66,9)	12 (50,0)	16 (69,6)	107 (64,8)
Negra	7 (5,9)	1 (4,2)	2 (8,7)	10 (6,1)
Asiática	27 (22,9)	11 (45,8)	5 (21,7)	43 (26,1)
Otra	5 (4,2)	0	0	5 (3,0)
Localización geográfica - n (%)				
Europa	34 (28,8)	3 (12,5)	4 (17,4)	41 (24,8)
América del Norte	44 (37,3)	5 (20,8)	7 (30,4)	56 (33,9)
Otra*	40 (33,9)	16 (66,7)	12 (52,2)	68 (41,2)

ES 2 776 195 T3

Características demográficas	Brazo 1 (N=118)	Brazo 2 (N=24)	Brazo 3 (N=23)	Total N=165
Genotipo - n (%)				
Inversión del intrón 22	41 (35,0)	7 (33,3)	9 (39,1)	57 (35,4)
Desplazamiento del marco	24 (20,5)	4 (19,0)	6 (26,1)	34 (21,1)
Mutación de aminoácido	22 (18,8)	4 (19,0)	1 (4,3)	27 (16,8)
Mutación terminadora	19 (16,2)	6 (28,6)	1 (4,3)	26 (16,1)
Cambio del sitio de corte y empalme	7 (6,0)	0	4 (17,4)	11 (6,8)
Inversión del intrón 1	3 (2,6)	0	1 (4,3)	4 (2,5)
Duplicación	1 (0,9)	0	0	1 (0,6)
NA	0	0	1 (4,3)	1 (0,6)
Antígeno de factor de von Willebrand – mediana de UI/dL (IQR)	118,0 (85, 151)	129,0 (86, 166)	131,0 (83, 155)	118,0 (85, 153)
Pauta de FVIII pre-estudio - n (%)				
Profilaxis	87 (73,7)	0	0	87 (52,7)
Episódica	31 (26,3)	24 (100)	23 (100)	78 (47,3)
Nº estimado de sangrados antes de 12 meses – mediana (IQR) †				
Profilaxis previa	6,0 (2, 15)	--	--	6 (2, 15)
Episódico previo	27,0 (17, 41)	29,5 (19, 44)	24,0 (15, 36)	27 (18, 40)
≥1 Articulación diana - n (%)				
Profilaxis previa	47 (39,8)	-	-	47 (28,5)
Episódico previo	26 (22,0)	22 (91,7)	18 (78,3)	66 (40,0)
Antecedentes familiares del inhibidor	4 (3,4)	1 (4,2)	2 (8,7)	7 (4,2)
VIH positivo	25 (21,2)	4 (16,7)	7 (30,4)	36 (21,8)
VHC positivo	55 (46,6)	14 (58,3)	13 (56,5)	82 (49,7)
IMC, índice de masa corporal; VIH, virus de la inmunodeficiencia humana; VHC, virus de la hepatitis C UI/dL indica unidades internacionales por decilitro, IMC índice de masa corporal, VIH virus de la inmunodeficiencia humana, VHC virus de la hepatitis C, NA no aplicable. *Otros incluyeron Australia, Nueva Zelanda, Brasil, Hong Kong, India, Japón, Rusia y Sudáfrica. † El cálculo se basó en datos disponibles.				

5

Los sujetos recibieron rFVIIIFc durante una mediana (mín-máx) de 30,5 (<1-54) semanas con una mediana (mínima a máxima) en los brazos 1, 2 y 3 de 32,1 (9, 54), 28,0 (<1, 38) y 28,9 (15, 32) semanas, respectivamente. En total, 111 sujetos (67,7 %) tuvieron >50 EDs para el fármaco en estudio. Se administraron un total de 9356 inyecciones durante el estudio, correspondiente a 9170 EDs (100,2 años de exposición-paciente). En general, 93,6 % de los pacientes cumplieron tanto la dosis prescrita como el intervalo en los brazos de profilaxis.

En general, 93,6 % de los sujetos se adhirieron a tanto la dosis prescrita como al intervalo de dosificación prescrito en los brazos del tratamiento para la profilaxis.

Eficacia

En total, se incluyeron 163 sujetos en los análisis de eficacia. Se excluyó un sujeto debido a que solo recibió ADVATE® (Brazo 1); otro sujeto se retiró antes de la evaluación de eficacia (Brazo 2). La mediana de ABR con los percentiles 25 y 75 (el intervalo intercuartílico [IQR]) fue del siguiente modo: Brazo 1 – brazo de profilaxis individualizada: 1,6 (0,0, 4,7); Brazo 2 – brazo de profilaxis semanal: 3,6 (1,9, 8,4); y Brazo 3 – brazo de tratamiento episódico: 33,6 (21,1, 48,7). La mayoría de los episodios hemorrágicos fueron espontáneos. En los Brazos 1, 2 y 3, respectivamente, 45,3 %, 17,4 %, y 0 % no tuvieron episodios hemorrágicos y 13,7 %, 34,8 % y 0 % tuvieron 1 episodio hemorrágico.

Mediana del intervalo de dosificación:

- a. En el brazo de profilaxis individualizada, la mediana del intervalo de dosificación fue 3,5 días, durante los últimos 3 meses en el estudio.
- b. El 30 por ciento de los pacientes en el brazo de profilaxis individualizada alcanzó un intervalo de dosificación medio de al menos 5 días.
- c. En general, la mediana del intervalo de dosificación (IQR) con profilaxis individualizada tuvo como objetivo lograr un valle de FVIII de al menos 1 a 3 UI/dL (con el máximo intervalo de dosificación de 5 días permitido en el protocolo) fue 3,5 (3,2-4,4) días (Tabla 7) basado en la mediana de la dosis semanal (IQR) de 78 (72-91) UI/kg.
- d. Aproximadamente el 30 % de los sujetos alcanzaron un intervalo de dosificación medio de 5 días durante los últimos 3 meses en el estudio. El 100 % de los sujetos tuvieron intervalos de dosificación medios ≥ 2 días durante todo el estudio.

La mediana de la dosis por inyección para la pauta episódica del Brazo 3 fue 26,5 UI/kg (n=23) y la mediana de la dosis total por episodio hemorrágico fue 27,4 UI/kg (n=23).

TABLA 7. Farmacocinética comparativa para rFVIII Fc frente a rFVIII (n=28)¹

Parámetro PK	Media geométrica para PK de rFVIII Fc (IC del 95 %)	Media geométrica para PK de rFVIII (IC del 95 %)	Media geométrica de la relación entre sujetos (IC del 95 %) valor de p
Eliminación $t_{1/2}$ (h)	18,97 (17,03. 21,12)	12,43 (11,14. 13,86)	1,53 (1,36. 1,71) <0,001
CL (mL/h/kg)	1,95 (1,71. 2,22)	3,041 (2,71. 3,41)	0,64 (0,60. 0,69) <0,001
Tiempo hasta 1 UI/dL (días) (dosis de 50 UI/kg)	4,92 (4,43. 5,46)	3,30 (2,99. 3,65)	1,49 (1,41. 1,57) <0,001

¹Brazo 1 grupo PK secuencial, modelo compartimental, ensayo de una etapa. Estimaciones e ICs del 95 % para medias geométricas y relaciones de medias geométricas; significación estadística evaluada al nivel bilateral de 0,05; PK, farmacocinética; CI, intervalo de confianza; C_{máx}, concentración máxima; ABC, área bajo la curva; $t_{1/2}$, semivida; CL, eliminación; MRT, tiempo de residencia medio; V_{ss}, volumen de distribución en el estado estacionario.

Control de sangrado: se controlaron aproximadamente 98 % (97,7 %) episodios hemorrágicos por una o dos inyecciones de rFVIII Fc. El 87,3 % de los sangrados se controlaron con una inyección. El 1,7 % requirió tres inyecciones.

Manejo perioperatorio: En general, se realizaron 9 cirugías mayores en 9 sujetos (8 sujetos del Brazo 1; 1 sujeto del Brazo 2), que incluyeron artroplastia de rodilla (n=5), reparación laparoscópica de hernia inguinal (n=2), apendectomía (n=1) y artroscopia (n=1). Los médicos prácticos evaluaron la eficacia hemostática de rFVIII Fc como excelente (8/9) o buena (1/9) en el 100 % de las cirugías. La mediana (mín, máx) de pérdida de sangre estimada disponible para 7/9 cirugías fue 15,0 (0, 600) mL durante la cirugía y 0,0 (0, 1100) mL post-operatoriamente; drenaje post-quirúrgico).

PK

Los datos PK comparativos para rFVIII Fc y ADVATE® disponibles de 28 sujetos en el subgrupo PK secuencial del Brazo 1 se resumen en la Tabla 7.

- a. rFVIII Fc demostró una semivida de eliminación aproximadamente 50 % más larga (Figura 2) y tiempo de residencia medio en comparación con ADVATE® (P<0,001) debido a una reducción del 35 % en la eliminación de rFVIII Fc con respecto a ADVATE®.

- b. El tiempo medio geométrico hasta 1 UI/dL de actividad de FVIII tras una dosis de 50 UI/kg fue aproximadamente 5 días para rFVIII Fc frente a aproximadamente 3 días para ADVATE® ($P < 0,001$; Tabla 7, Figura 2).
- c. La recuperación incremental para rFVIII Fc fue clínicamente comparable con ADVATE®.
- 5 d. No hubo desplazamiento en las propiedades PK de rFVIII Fc como se evidencia por las propiedades PK comparables entre los perfiles PK de rFVIII Fc del nivel inicial y de repetición.
- e. Se obtuvieron resultados PK análogos cuando el análisis se basó en el ensayo cromogénico de FVIII.
- f. Los ensayos de coagulación de una etapa y cromogénicos midieron con exactitud y con precisión tanto rFVIII Fc como ADVATE® utilizando patrones de FVIII en plasma comercialmente disponibles.
- 10 La semivida terminal media geométrica (intervalo de confianza del 95 %) de rFVIII Fc fue aproximadamente 19,0 horas (17,0, 21,1) horas, que es 1,53 veces más largo que la de ADVATE® (aproximadamente 12,4 (11,1, 13,9) horas).
- El tiempo medio geométrico (IQR) hasta 1 % de actividad de FVIII tras 50 UI/kg de rFVIII Fc fue aproximadamente 5 días (4,92 (4,43, 5,46) días). Se observaron perfiles PK comparables de rFVIII Fc en la semana 14. La mediana del intervalo de dosificación con profilaxis individualizada fue 3,5 días y la mediana de la dosis por semana fue 78 UI/kg; aproximadamente 30 % de los sujetos alcanzaron un intervalo de dosificación medio de ≥ 5 días durante los últimos 3 meses en el estudio (sujetos con ≥ 6 meses en el estudio) como se muestra en la Tabla 8. El 98 % de los episodios hemorrágicos se controlaron con 1-2 inyecciones.
- 15

TABLA 8. Resumen de dosificaciones profilácticas

	n	Brazo 1 Profilaxis individualizada	n	Brazo 2 Profilaxis semanal
Mediana de la dosis, UI/kg/semana (IQR)				
Global	117	77,9 (72,3-91,2)	23	65,6 (64,2-68,2)
Últimos 3 meses ¹	112	77,7 (71,9-106,2)	16	65,5 ² (64,3-67,3)
Intervalo de dosificación media, días (IQR)				
Global	117	3,5 (3,2-4,4)		
Últimos 3 meses ¹	112	3,5 ³ (3,0-5,0)		
¹ Basado en los últimos 3 meses en el estudio para sujetos en el estudio ≥ 6 meses				
² Dosis fija de 65 UI/kg/semana.				
³ 30 % de los sujetos alcanzaron dosificación impulsada por la farmacocinética cada 5 días para mantener valles 1 % a 3 % por encima del nivel inicial.				
IQR, intervalo intercuartílico.				

20 Seguridad

No se detectaron inhibidores de rFVIII Fc, y no se informaron casos de anafilaxia, alergia, o acontecimientos trombóticos graves.

rFVIII Fc fue, en general, bien tolerado, y no se evaluaron acontecimientos adversos graves que estuvieran relacionados con rFVIII Fc.

- 25 Los AEs más comunes, independientemente de la causalidad, (incidencia ≥ 5 %) que ocurren fuera del periodo de manejo perioperatorio fueron nasofaringitis, artralgia (dolor articular), cefalea e infección de las vías respiratorias superiores, como se resume en la Tabla 9.

12 sujetos (7,3 %) experimentaron al menos un AE grave (SAE) fuera del periodo de tratamiento perioperatorio.

No se evaluaron SAEs que estuvieran relacionados con el fármaco por el investigador.

5 Se ha observado una incidencia insignificante de anticuerpo no neutralizante (NNA) bajo ensayo de NNA, que es aproximadamente 20 veces más sensible que el ensayo de Bethesda. Se encontraron cinco sujetos positivos para NNAs en el nivel inicial, pero todos tuvieron al menos una evaluación negativa durante el estudio. Seis sujetos, cuatro en el estudio del Brazo 1 y dos en el estudio del Brazo 2, se volvieron positivos durante el estudio. En casi todos los casos, sin embargo, los anticuerpos fueron transitorios y de bajo título, y en todos los casos los anticuerpos se dirigieron contra FVIII.

10 En general, 14 (8,5 %) sujetos informaron SAEs. El investigador no determinó SAEs como relacionados con el fármaco del estudio, y los SAEs informados no fueron experimentados en más de 1 sujeto. Hubo 1 muerte durante el estudio, atribuida a la sobredosis de polisustancias, y el investigador la evaluó como sin relacionar con rFVIII Fc.

TABLA 9. Resumen de acontecimientos adversos (AEs)

	Total N-164	
	n (%)	
Cualquier AE	108	(65,9)
AEs más comunes (≥5 % de sujetos)		
Nasofaringitis	20	(12,2)
Artralgia	13	(7,9)
Cefalea	9	(5,5)
Infección de las vías respiratorias superiores	9	(5,5)

Resumen

Pautas Individualizadas y profilácticas semanales produjeron medianas de tasas anualizadas de sangrados bajas de un solo dígito

15 En el brazo de profilaxis individualizada, la mediana del intervalo de dosificación fue 3,5 días. Durante los últimos 3 meses en el estudio, 30 por ciento de pacientes en el brazo de profilaxis individualizada alcanzó un intervalo de dosificación medio de al menos 5 días.

20 Se controlaron 98 % de los episodios hemorrágicos por una o dos inyecciones de rFVIII Fc. En total, se trataron 757 episodios hemorrágicos (Brazo 1=209; Brazo 2=92; Brazo 3=456) en 106 de los 164 sujetos. 87,3 % requirieron una única inyección de rFVIII Fc para la resolución, y 97,8 % requirieron ≤2 inyecciones. Se resolvieron un total de 85,6 %, 80,4 % y 89,5 % de los episodios hemorrágicos con 1 inyección de rFVIII Fc en los Brazos 1, 2 y 3, respectivamente.

Los médicos prácticos evaluaron la eficacia hemostática de rFVIII Fc durante la cirugía como excelente o buena en el 100 % de las cirugías.

La semivida de rFVIII Fc fue aproximadamente 19,0 horas en comparación con 12,4 horas para ADVATE®.

25 Ningún sujeto desarrolló un inhibidor o experimentó una reacción anafiláctica a rFVIII Fc.

FVIII Fc recombinante fue, en general, bien tolerado.

30 A-LONG fue el estudio de fase 3 esencial global de mayor registro de rFVIII de larga duración en hemofilia A grave realizado hasta la fecha. El estudio mostró que rFVIII Fc ofrece las posibilidades de una frecuencia de inyección notablemente reducida, carga de tratamiento reducida, una mejora en los desenlaces clínicos para la prevención de sangrados en pacientes con hemofilia A grave.

Objetivo del diseño del estudio: El estudio se diseñó para evaluar la eficacia y seguridad de rFVIII Fc en el control y la prevención de episodios hemorrágicos, profilaxis rutinaria y manejo perioperatorio en sujetos con hemofilia A grave. Además, el estudio se diseñó para evaluar la dosis eficaz y el intervalo de rFVIII Fc para profilaxis, así como la factibilidad de un tratamiento semanal a una dosis de 65 UI/Kg.

35 El tratamiento episódico es la administración de factor de reemplazo solo según se necesite para tratar episodios hemorrágicos después de que hayan empezado. El tratamiento profiláctico es la administración regular de factor de reemplazo para prevenir episodios hemorrágicos.

La pauta inicial fue 25 UI/kg en el día 1 y 50 UI/kg en el día 4. La dosis y frecuencia del tratamiento se podrían ajustar basándose en el perfil PK de los sujetos y el objetivo era mantener niveles valle de factor suficientes para prevenir episodios hemorrágicos usando dosis entre 25 UI/kg y 65 UI/kg e intervalos de tratamiento de 3 a 5 días.

5 Más de la mitad de los pacientes con hemofilia A grave en los EE. UU. no siguen todavía una pauta de profilaxis, debido en parte a la carga del tratamiento. Los presentes inventores incluyeron, por tanto, la pauta posológica semanal en el estudio A-LONG para evaluar si esta pauta daría como resultado una menor ABR en comparación con una pauta episódica. La mediana de ABR en la pauta semanal era 3,59 (IQR 1,9, 8,4) en comparación con 33,6 (IQR 21,1, 48,7) para tratamiento episódico.

10 Todos los sujetos tuvieron una evaluación PK inicial para caracterizar la PK de rFVIIIc en una población representativa de pacientes con hemofilia A.

15 Se realizó muestreo PK más amplio en un subconjunto de sujetos en el brazo de profilaxis individualizada (Brazo 1) en el nivel inicial después de una dosis única de ADVATE® (50 UI/kg), y después de un lavado de 4 días, seguido por una dosis única de rFVIIIc (50 UI/kg). Se tomaron muestras de sangre para ADVATE® durante un periodo de 72 horas. Entonces se tomaron muestras de sangre para rFVIIIc durante un periodo de 120 horas. La evaluación PK de rFVIIIc en este subconjunto se repitió a las 12 a 24 semanas con el mismo programa de muestreo PK.

20 En el manejo perioperatorio, una única inyección de rFVIIIc fue suficiente para mantener la hemostasia hasta la fecha final/momento de todas las cirugías mayores a una mediana de la dosis de 51,4 UI/kg. La mediana del consumo de rFVIIIc (resumido a lo largo de todas las inyecciones durante cada periodo de tiempo referenciado) fue 80,6 UI/kg en el día de la cirugía mayor, 161,3 UI/kg para los Días 1-3 días tras la cirugía, y 387,1 UI/kg para los Días 4-14 tras la cirugía. La hemostasia perioperatoria con rFVIIIc se evaluó como excelente o buena para las 9 cirugías mayores. Ningún sujeto informó un episodio hemorrágico durante los periodos posoperatorio o de rehabilitación. En general, se informaron 7 acontecimientos adversos (AEs) en 4 (44,4 %) sujetos en el subgrupo de cirugía, de los que 6 AEs fueron de gravedad leve o moderada, y 1 AE se consideró grave. Se informaron dos AEs graves (hernia inguinal y apendicitis) en 2 sujetos. Los investigadores evaluaron todos los AEs durante el periodo perioperatorio como sin relacionar con el tratamiento de rFVIIIc.

25 Los médicos prácticos evaluaron la eficacia hemostática de rFVIIIc como excelente o buena en el 100 % de las cirugías en una escala de 4 puntos que incluye excelente, buena, justa y mala/ninguna.

rFVIIIc produjo baja mediana de ABRs de 3,59 en el brazo de profilaxis semanal y 1,60 en el brazo de profilaxis de intervalo individualizado. A diferencia, el brazo de tratamiento episódico tuvo una mediana de ABR de 33,57.

30 En el brazo de tratamiento individualizado, el intervalo de dosificación medio fue 3,5 días a una mediana de la dosis de 77,7 UI/kg durante los últimos 3 meses en el estudio.

La semivida terminal fue aproximadamente 18,97 horas para rFVIIIc y aproximadamente 12,3 horas para ADVATE®.

El 97,8 % de los episodios hemorrágicos se controló por una o dos inyecciones.

35 Los médicos prácticos evaluaron la eficacia hemostática de rFVIIIc para tratamiento perioperatorio como excelente o buena en el 100 % de las cirugías.

El Brazo 2 fue una pauta posológica semanal. Se diseñó para investigar el beneficio para los pacientes de la terapia de profilaxis, y para comparar los resultados con sujetos usando una pauta de tratamiento episódico. La mediana de la ABR en el Brazo 2 fue 3,59 en comparación con 33,57 para la pauta de tratamiento episódico (Brazo 3).

40 La mediana de la dosis por inyección requerida para la resolución del sangrado fue 27,4 UI/kg, y la mediana de la dosis total requerida fue 28,2 UI/kg.

45 La mediana del número de inyecciones requerida para la resolución de un episodio hemorrágico fue coherentemente 1,0 cuando se administró el tratamiento en el plazo de 8 horas desde la aparición del sangrado, independientemente del tipo o la localización del sangrado. En general, los sujetos evaluaron que 78,8 % de inyecciones de rFVIIIc en el Brazo 1, 64,8 % en el Brazo 2, y 79,7 % de inyecciones en el Brazo 3 produjeron respuesta excelente o buena. La mediana del intervalo de dosificación de 3,5 días del Brazo 1 representa el intervalo de dosificación que se puede lograr por la mayoría de los pacientes: 30 % de pacientes fueron capaces de alcanzar un intervalo de dosificación de al menos 5 días. Algunos pacientes fueron capaces de alcanzar una pauta de profilaxis semanal (Brazo 2) con una mediana de la ABR de 3,59 episodios hemorrágicos.

50 Los sujetos en el brazo de profilaxis individualizada recibieron una dosis inicial de 25 UI/kg en el día 1 y 50 UI/kg en el día 4. El diseño del estudio permitió el ajuste del intervalo de dosificación y la dosis para mantener los niveles de factor valle objetivo y para prevenir el sangrado. Los presentes inventores creen que la mediana del intervalo de dosificación y la dosis basada en los últimos 6 meses en el estudio es el más representativo de la pauta de profilaxis individualizada.

El 87,3 % de los episodios hemorrágicos se resolvieron con una inyección de rFVIIIc y el 97,8 % se resolvieron con una o dos inyecciones. Para los 96 (12,7 %) episodios hemorrágicos que requirieron más de 1 inyección para la resolución, la mediana del intervalo entre la primera y la segunda inyección fue 30,9 horas.

5 La evaluación global de los investigadores de la respuesta del sujeto a su pauta de rFVIIIc asignada se evaluó como excelente o eficaz para 99,4 %, 100 % y 98,1 % de las visitas del sujeto en los Brazos 1, 2, y 3, respectivamente.

En A-LONG, se midió la actividad del factor de coagulación usando un ensayo de coagulación de una etapa (aPTT) y un ensayo cromogénico. Las semividas informadas se basan en los resultados del ensayo de coagulación de una etapa. Mientras que las semividas de rFVIIIc y ADVATE® fueron ambas ligeramente más largas con el ensayo cromogénico, las relaciones entre los productos fueron coherentes entre los dos ensayos.

10

TABLA 10: Secuencias de polinucleótidos

A. FVIIIc de dominio B delecionado

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

661				<u>A</u>	<u>TGCAATAGA</u>	<u>GCTCTCCACC</u>	<u>TGCTTCTTTC</u>
721	TGTGCCTTTT	GCGATTCTGC	TTTAGIGCCA	CCAGAAGATA	CTACCTGGG	GCAGTGGAAC	
781	TGTGATGGGA	CTATATGCAA	AGTGATCTCG	GTGAGCTGCC	TGTGGACGCA	AGATTTCTCT	
841	CTAGAGTGCC	AAAATCTTTT	CCATPCAACA	CCTCAGTCGT	GTACAAAAAG	ACTCTGTFTG	
901	TAGAAATCAC	GGATCACCTT	TTCAACATCG	CTAAGCCAAG	GCCACCCTGG	ATGGGTCTGC	
961	TAGGTCCTAC	CATCCAGGCT	GAGGTTTATG	ATACAGTGGT	CATTACACTT	AAGAACATGG	
1021	CTTCCCATCC	TGTCAGTCTT	CAIGCTGTTG	GTGTATCCTA	CTGGAAAGCT	TCTGAGGGAG	
1081	CTGAATATGA	TGATCAGACC	AGICAAAGGG	AGAAAGAAGA	TGATAAAGTC	TTCCCTGGTG	
1141	GAAGCCATAC	ATATGTCTGG	CAGGTCCTGA	AAGAGAAATG	TCCAATGGCC	TCTGACCCAC	
1201	TGTGCCTTAC	CTACTCATAT	CTTCTCATG	TGGACCTGGT	AAAAGACTTG	AATTCAGGCC	
1261	TCATPGGAGC	CCTACTAGTA	TGTAGAGAAG	GGAGTCTGGC	CAAGGAAAAG	ACACAGACCT	
1321	TGCACAAATT	TATACTACTT	TTTGCTGTAT	TTGATGAAGG	GAAAAGTTGG	CACTCAGAAA	
1381	CAAAGAACTC	CTTGATGCAG	GATAGGGATG	CTGCATCTGC	TCGGCCCTGG	CCTAAAATGC	
1441	ACACAGTCAA	TGGTTATGTA	AACAGGTCTC	TGCCAGGTC	GATFGGATGC	CACAGGAAAT	
1501	CAGTCTATTG	GCATGTGATT	GGAAATGGGCA	CCACTCCTGA	AGTGCACCTCA	ATATTCCTCG	
1561	AAGGTCACAC	ATTTCTTGTG	AGGAACCATC	GCCAGGCGTC	CTTGGAAAAT	TCCCAATATA	
1621	CTTTCCTTAC	TGCTCAAACA	CTCTTGATGG	ACCTTGGACA	GTTTCTACTG	TTTTTGCATA	
1681	TCTCTTCCCA	CCAACAATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA	AGTAGACAGC	TGTCCAGAGG	
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA	CTATGATGAT	GATCTTACTG	
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACTC	TCCTTCTCTT	ATCCAAATTC	
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACCT	GGGTACATTA	CATTGCTGCT	GAAGAGGAGG	
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCTCGCCC	CCGATGACAG	AAGTTATAAA	AGTCAATATT	
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA	AGTCCGATTT	ATGGCATAACA	
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA	ATCAGGAAAT	TTGGGACCTT	
2101	TACTTTATGG	GGAAAGTTGA	GACACACTGT	TGATTATATT	TAGAATCAA	GCAAGCAGAC	
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAAATCACT	ATGTCCTGTC	TTTGTATTCA	AGGAGATTAC	
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCCTGC	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	GTTTGTTTGC	
2641	ATGAGGTGGC	ATACTGGYAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA	GACTGACTTC	CTTTCTGTCT	
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA	AGACACACTC	ACCCTATTCC	
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTGCA	TGGAAAACCC	AGGTCATGG	ATTCTGGGGT	
2821	GCCACAACCT	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCCGCTT	ACTGAAGGTT	TCTAGTTGTG	
2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA	TATTTAGCA	TACTTGCTGA	
2941	GTA AAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA	CCCACCAGTC	TTGAAACGCC	
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT	GACTATGATG	
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG	GATGAAAATC	
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAAACAC	GACACTATTT	TATGTCTGCA	GTGGAGAGGC	
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT	CAGAGTGGCA	
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAAATTTAC	TGATGGCTCC	TTTACTCAGC	
3301	CTTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAAACAT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT	ATAAGAGCAG	
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAACTTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC	TATTCCTTCT	
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT	AGAAAAAATC	
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAACCTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT	ATGGCACCCA	

ES 2 776 195 T3

3541 CTAAAGATGA GTTTACTGTC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TGATGTTGAC CTGGAAAAAG
3601 ATGTGCACTC AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCCTG
3661 CTCTATGGGAG ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTCACCATC TTTGATGAGA
3721 CCAAAAGCTG GTA~~CTT~~CACT GAAAATATGG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATA~~F~~CC
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 ATGC~~CA~~CTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG
4021 TGGAAATGTT ACCATCCAAA GCTGGAATTT GCGGGTGGGA ATGCCTTATT GGCGAGCATC
4081 TACATGCTGG GATGAGCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCCTGG
4141 GAATGGCTTC TGGACACATT AGAGATTTTC AGATTACAGC TTCAGGACAA TATGGACAGT
4201 GGGCCCCAAA GCTGGCCAGA CTTCA~~TT~~TATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG
4261 AGCCCTTTTC TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGACCAAT GATTATTAC GGCA~~TC~~AGA
4321 CCCAGGGTGC CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA
4381 GTCTTGATGG GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT
4441 TCTTTGGCAA TGTGGATTCA TCTGGGATAA AACACAATAT TTTTAA~~CC~~CT CCAAT~~F~~ATTG
4501 CTCGATACAT CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTGG CAGCACTCTT CGCATGGAGT
4561 TGATGGGCTG TGATTTAAAT AGTTGCAGCA TGCCATTGGG AATGGAGAGT AAAGCAATAT
4621 CAGATGCACA GATTACTGCT TCATCCTACT TTACCAATAT GTTTGCCACC TGGTCTCCTT
4681 CAAAAGCTCG ACTTCACCTC CAAGGGAGGA GTAATGCCTG GAGACCTCAG GTGAATAATC
4741 CAAAAGAGTG GCTGC~~AG~~TG GACTTCCAGA AGACAATGAA AGTCACAGGA GTA~~ACT~~ACTC
4801 AGGGAGTAAA ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC
4861 AAGATGGCCA TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTCAGGGAA
4921 ATCAAGACTC CTTCACACCT GTGGTGA~~ACT~~ CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC
4981 TTCGAATTCA CCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT
5041 GCGAGGCACA GGACCTCTAC GACAAA~~ACT~~ ACACATGCC ACCGTGCCCA GCTCCAGA~~AC~~
5101 TCGTGGGCGG ACCGTCAGTC TTCTCTTCC CCCC~~AAA~~ACC CAAGGACACC CTCATGATCT
5161 CCCGGACCCC TGAGGTCACA TGCGTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC CCTGAGGTCA
5221 AGTTCAACTG GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG CCGGGGAGG
5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGGCAAGGCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGA~~CC~~ACA GGTGTACACC GTGCC~~CC~~CAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAAGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAA~~A~~ GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCTCCCCTG GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCTCTA CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

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

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA CTGGTGACAA AACTCAGACA
8101 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGA~~ACT~~CCTG GGAGGACCGT CAGTCTTCTT CTTCCCCCA
8161 AAACCCAAG ACACCC~~TC~~AT GATCTCCCGG ACCCTGAGG TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA CGTACCGTGT GGTCAAGCTC
8341 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCC~~F~~CC CAGCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAG CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCC~~T~~GCC CCCATCCC~~GC~~ GATGAGCTGA CCAAGAACCA GGTCAAGCTG
8521 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG TGGAGTGGGA GAGCAATGGG
8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCC~~T~~ CCCGTGTGG ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
8641 CTCTACAGCA AGCTC~~CC~~GT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC AGGGGAACGT CTTCTCATGC
8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
8761 GGTA~~A~~

B. FVIIIc de longitud completa

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

```

661                                     ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
721 CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC AGAAGATACT ACCTGGGTGC
781 AGTGGAACCTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
841 ATTTCTCCTT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC TCAGTCGTGT AAAAAAGAC
901 TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT AAGCCAAGGC CACCTGGAT
961 GGGTCTGCTA GGTCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT ACAGTGGTCA TTACACTTAA
1021 GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT GTATCCTACT GGAAGCTTC
1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
1141 CCCTGGTGGG AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCCCGAAA GAGAATGGTC CAATGGCCTC
1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG GACCTGGTAA AAGACTTGA
1261 TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
1441 TAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAG CAGGTCTCTG CCAGGTCTGA TTGGATGCCA
1501 CAGGAAATCA GTCTATTGGC ATGTGATTGG AATGGGCACC ACTCCTGAAG TGCACTCAAT
1561 ATTCCTCGAA GGTACACAT TTCTTGTGAG GAACATCGC CAGGCGTCTT TGGAAATCTC-
1621 GCCAATAACT TTCCTTACTG CTCAAACT CTTGATGGAC CTTGGACAGT TTCTACTGTT
1681 TTGTTCATATC TCTTCCCACC AACATGATGG CATGGAAGCT TATGTCAAAG TAGACAGCTG
1741 TCCAGAGGAA CCCCAACTAC GAATGAAAAA TAATGAAGAA GCGGAAGACT ATGATGATGA
1801 TCTTACTGAT TCTGAAATGG ATGTGGTCAG GTTTGATGAT GACAACTCTC CTTCTTTTAT
1861 CCAAATTCGC TCAGTTGCCA AGAAGCATCC TAAAACCTGG GTACATTACA TTGCTGCTGA
1921 AGAGGAGGAC TGGGACTATG CTCCCTTAGT CCTCGCCCCC GATGACAGAA GTTATAAAAG
1981 TCAATATTTG AACAATGGCC CTCAGCGGAT TGGTAGGAAG TACAAAAAAG TCCGATTTAT
2041 GGCATACACA GATGAAACCT TTAAGACTCG TGAAGCTAT T CAGCATGAAT CAGGAATCTT
2101 GGGACCTTTA CTTTATGGGG AAGTTGGAGA CACACTGTTG ATTATATTTA AGAATCAAGC
2161 AAGCAGACCA TATAACATCT ACCCTCACGG AATCACTGAT GTCCGTCTT GTATTCAAG
2221 GAGATTACCA AAAGGTGTAA AACATTTGAA GGATTTTCCA ATTCTGCCAG GAGAAATATT
2281 CAAATATAAA TGGACAGTGA CTGTAGAAGA TGGGCCAACT AAATCAGATC CTCGGTGCCT
2341 GACCCGCTAT TACTCTAGTT TCGTTAATAT GGAGAGAGAT CTAGCTCAG GACTCATTGG
2401 CCCTCTCCTC ATCTGTACA AAGAATCTGT AGATCAAAGA GGAACCAGA TAATGTCAGA
2461 CAAGAGGAAT GTCATCCTGT TTTCTGTATT TGATGAGAAC CGAAGCTGGT ACCTCACAGA
2521 GAATATACAA CGCTTTCTCC CCAATCCAGC TGGAGTGCAG CTTGAGGATC CAGAGTTCCA
2581 AGCCTCCAAC ATCATGCACA GCATCAATGG CTATGTTTTT GATAGTTTGC AGTTGTCAGT
2641 TTGTTTGCAT GAGGTGGCAT ACTGGTACAT TCTAAGCATT GGAGCACAGA CTGACTTCTT
2701 TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT ATACCTTCAA ACACAAATG GTCTATGAAG ACACACTCAC
2761 CCTATTCCCA TTCTCAGGAG AACTGTCTT CATGTGATG GAAAACCCAG GTCTATGGAT
2821 TCTGGGGTGC CACAACFCAG ACTTTCGGAA CAGAGGCATG ACCGCCTTAC TGAAGTTTTT
2881 TAGTTGTGAC AAGAACACTG GTGATTATTA CGAGGACAGT TATGAAGATA TTTCAGCATA
2941 CTTGCTGAGT AAAAACAATG CCATTGAACC AAGAAGCTTC TCCCAGAATT CAAGACACCC
3001 TAGCACTAGG CAAAAGCAAT TTAATGCCAC CACAATTCCA GAAAATGACA TAGAGAAGAC
3061 TGACCCCTGG TTTGCACACA GAACACCTAT GCCTAAAATA CAAAATGTCT CCTCTAGTGA
3121 TTTGTTGATG CTCTTGGCAG AGAGTCTTAC TCCACATGGG CTATCCTTAT CTGATCTCCA
3181 AGAAGCCAAA TATGAGACTT TTTCTGATGA TCCATCACCT GGAGCAATAG ACAGTAATAA
3241 CAGCCTGTCT GAAATGACAC ACTTCAGGCC ACAGCTCCAT CACAGTGGGG ACATGGTATT
3301 TACCCCTGAG TCAGGCCTCC AATTAAGATT AATGAGAAA CTGGGACAAA CTGCAGCAAC
3361 AGAGTTGAAG AAACCTTGATT TCAAAGTTTC TAGTACATCA AATAATCTGA TTTCAACAAT
3421 TCCATCAGAC AATTTGGCAG CAGGTACTGA TAATACAAGT TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT
3481 GCCAGTTCA 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
    
```

ES 2 776 195 T3

3721 CTTATTCAAA GTTAGCATCT CTTTGTAAAA GACAAACAAA ACTTCCAATA ATTCAGCAAC
 3781 TAATAGAAAG ACTCACATTG ATGGCCCATC ATTATTAATT GAGAATAGTC CATCAGTCTG
 3841 GCAAAATATA TTAGAAAGTG ACACAGACTT TAAAAAAGTG ACACCTTTTGA TTCATGACAG
 3901 AATGCTTATG GACAAAAATG CTACAGCTTT GAGGCTAAAT CATATGTCAA ATAAAACTAC
 3961 TTCATCAAAA AACATGGAAA TGGTCCAAAC GAAAAAAGAG GGCCCCATTC CACCAGATGC
 4021 ACAAAATCCA GATATGTCGT TCTTTAAGAT GCTATTCTTG CCAGAATCAG CAAGGTGGAT
 4081 ACAAAGGACT CATGGAAAGA ACTCTCTGAA CTCTGGGCAA GGCCCCAGTC CAAAGCAATT
 4141 AGTATCCTTA GGACCAGAAA AATCTGTGGA AGGTCAGAAAT TTCTTGTCTG AGAAAAACAA
 4201 AGTGGTAGTA GGAAAGGGTG AATTTACAAA GGACGTAGGA CTCAAAGAGA TGGTTTTTCC
 4261 AAGCAGCAGA AACCTATTTT TACTAAGCTT GGATAATTTA CATGAAAATA ATACACACAA
 4321 TCAAGAAAAA AAAATTCAGG AAGAAATAGA AAAGAAGGAA ACATTAATCC AAGAGAATGT
 4381 AGTTTTGCCT CAGATACATA CAGTGACTGC CACTAAGAAT TTCATGAAGA ACCTTTTCTT
 4441 AGTGGCACT AGGCAAAATG TAGAAGGTTT ATATGACGGG GCATATGCTC CACTATTCTA
 4501 AGATTTTAGG TCATTTAAATG ATTCAACAAA TAGAACAAAG AAACACACAG CTCATTTCTC
 4561 AAAAAAAGGG GAGGAAGAAA ACTTGGGAGG CTGGGGAAT CAAACCAAGC AAATGTGAGA
 4621 GAAATATGCA TGCACCACAA GGATATCTCC TAATACAAGC CAGCAGAATT TTGTCACGCA
 4681 ACCTACTAAG AGACCTTGA AACAATTCAC ACTCCCCTA GAAGAAACAG AACTTCAAAA
 4741 AAGGATAATT GTGGATGACA CTCCACCCCA GTGGTCCAAA AACATGAATC ATTTGACCCC
 4801 GAGCACCCCT ACACAGATAG ACTACAATGA GAAGGAGAAA GGGGCCATTA CTCAGTCTCC
 4861 CTATCAGAT TGCCTTACGA GGAGTCATAG CATCCCTCAA GCAAAATAGAT CTCCTTACC
 4921 CATTGCAAAG GTATCATCAT TTCCATCTAT TAGACCTATA TATCTGACCA GGGTCTATT
 4981 CCAAGACAAC TCTTCTCATC TTCCAGCAGC ATCTTATAGA AAGAAAGATC TTGCGGTCCA
 5041 AGAAAGCAGT CATTTCTTAC AAGGAGCCAA AAAAAATAC CTTTCTTTAG CCATTTCTAAC
 5101 CTTGGAGATG ACTGGTGATC AAAGAGAGGT TGGCTCCCTG GGGACAAGTG CCACAAATTC
 5161 AGTCACATAC AAGAAAGTTG AGAACACTGT TCTCCCGAAA CCAGACTTGC CCAAAACATC
 5221 TGGCAAAGTT GAATGTCTC CAAAAGTTCA CATTATCAG AAGGACCTAT TCCCTACGGA
 5281 AACTAGCAAT GGGTCTCCTG GCCATCTGGA TCTCGTGGAA GGGAGCCTTC TTCAGGGAAC
 5341 AGAGGGAGCC ATTAAGTGGA ATGAAGCAA CAGACCTGGA AAAGTTCCCT TTCTGAGAGT
 5401 AGCAACAGAA AGCTCTGCAA AGACTCCCTC CAAGCTATTT GATCCTCTTG CTTGGGATAA
 5461 CCACATGGT ACTCAGATAC CAAAAGAAGA GTGGAATCC CAAGAGAAGT CACCAGAAAA
 5521 AAGCCTTTT AAGAAAAAGG ATACCATTTT GTCCCTGAAC GCTTGTGAAA GCAATCATGC
 5581 AATAGCAGCA ATAAATGAGG GACAAAATAA GCCCGAAATA GAAGTCACCT GGGCAAAGCA
 5641 AGGTAGGACT GAAAGCTGT GCTCTCAAAA CCCACCAGTC TTGAAACGCC ATCAACGGGA
 5701 AATAACTCGT ACTACTCTTC AGTCAGATCA AGAGGAAATG GACTATGATG ATACCATATC
 5761 AGTTGAAATG AAGAAGGAAG ATTTTGACAT TTATGATGAG GATGAAAATC AGAGCCCCCG
 5821 CAGCTTTCAA AAGAAAACAC GACACTATTT TATTGCTGCA GTGGAGAGGC TCTGGGATTA
 5881 TGGGATGAGT AGCTCCCCAC ATGTTCTAAG AAACAGGGCT CAGAGTGGCA GTGTCCCTCA
 5941 GTTCAAGAAA GTTGTTTTCC AGGAATTTAC TGATGGCTCC TTTACTCAGC CCTTATACCG
 6001 TGGAGAATA AATGAACATT TGGGACTCCT GGGGCCATAT ATAAGAGCAG AAGTTGAAGA
 6061 TAATATCATG GTAACCTTCA GAAATCAGGC CTCTCGTCCC TATTCCTTCT ATTCTAGCCT
 6121 TATTTCTTAT CAGGAAGATC AGAGGCAAGG AGCACAACCT AGAAAAACT TTGTCAAGCC
 6181 TAATGAAACC AAAACTTACT TTTGGAAAGT GCAACATCAT ATGGCACCCA CTAAGATGA
 6241 GTTGTACTCC AAAGCCTGGG CTTATTTCTC TCATGTTGAC CTGCAAAAAG ATGTCCACTC
 6301 AGGCCTGATT GGACCCCTTC TGGTCTGCCA CACTAACACA CTGAACCCTG CTCATGGGAG
 6361 ACAAGTGACA GTACAGGAAT TTGCTCTGTT TTTACCATC TTTGATGAGA CCAAAAGCTG
 6421 GTACTTCACT GAAAAATATG AAAGAAACTG CAGGGCTCCC TGCAATATCC AGATGGAAGA
 6481 TCCCCTTTT AAAGAGAATT ATCGCTTCCA TGCATCAAT GGCTACATAA TGGATACACT
 6541 ACCTGGCTTA GTAATGGCTC AGGATCAAAG GATTCGATGG TATCTGTCTA GCATGGGCG
 6601 CAATGAAAAC ATCCATTCTA TTCATTTCAG TGGACATGTG TTCACTGTAC GAAAAAAGA
 6661 GGAGTATAAA ATGGCACTGT ACAATCTCTA TCCAGGTGTT TTTGAGACAG TGGAAATGTT
 6721 ACCATCCAAA GCTGGAAATT GCGGGGTGGA ATGCCTTATT GCGGAGCATC TACATGCTGG
 6781 GATGASCACA CTTTTTCTGG TGTACAGCAA TAAGTGTGAG ACTCCCCTG GAATGGCTTC
 6841 TCGACACATT ACAGATTTTC AGATTACACC TTCAGGACAA TATCCACAGT GCCTCCAAA
 6901 GCTGGCCAGA CTTTATTATT CCGGATCAAT CAATGCCTGG AGCACCAAGG AGCCCTTTTC
 6961 TTGGATCAAG GTGGATCTGT TGGCACCAAT GATTATTAC GGCATCAAGA CCCAGGGTGC
 7021 CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC TCTACATCTC TCAGTTTATC ATCATGTATA GTCTTGATGG
 7081 GAAGAAGTGG CAGACTTATC GAGGAAATTC CACTGGAACC TTAATGGTCT TCTTTGGCAA
 7141 TGTGGAITCA TCTGGGATAA AACACAATA TTTAACCCT CCAATYATTG CTCGATACAT
 7201 CCGTTTGCAC CCAACTCATT ATAGCATTCG CAGCACTCTT GCATGGAGT 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 GTAACTACTC AGGGAGTAAA
 7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
 7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT TTTTCAGGGAA ATCAAGACTC
 7621 CTTACACACT GTGGTGAACCT CTCTAGACCC ACCGTTACTG ACTCGCTACC TTCGAATTCA
 7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
 7741 GGACCTCTAC **GACAAA**ACTC **ACACAT**GCCC **ACCGT**GCCCA **GCTCC**AGAAC **TCTT**GGGCGG
 7801 **ACCGT**CAGTC **TTCCT**CTTCC **CCCC**AAAACC **CAAGG**ACACC **CTCAT**GATCT **CCCG**GACCCC
 7861 **TGAGG**TCACA **TGCGT**GGTGG **TGGAC**GTGAG **CCACG**AAGAC **CCTG**AGGTCA **AGTT**CAACTG
 7921 **GTACG**TGCAC **GGCGT**GGAGG **TGCATA**ATGC **CAAGAC**AAAG **CCGCG**GAGG **AGCAG**TACAA
 7981 **CAGCA**CTAC **CGTGT**GGTCA **GCGT**CCTCAC **CGT**CCTGCAC **CAGG**ACTGGC **TGAAT**GGCAA
 8041 **GGAGT**ACAAAG **TGCA**AGGTCT **CCAACA**AAAG **CCTCC**CAGCC **CCCAT**CGAGA **AAACC**ATCTC
 8101 **CAAAG**CCAAA **GGCAG**CCCC **GAGA**ACCACA **GGTGT**ACACC **CTG**CCCCCAT **CCCG**GGATGA
 8161 **GCTG**ACCAAG **AACC**AGGTCA **GCCT**GACCTG **CCTG**GTCAAA **GGCT**TCTATC **CCAG**CGACAT
 8221 **CGCCG**TGGAG **TGGG**AGACCA **ATGG**CAGCC **GGAG**AACAAC **TACA**AGACCA **CGCCT**CCCGT
 8281 **GTTG**ACTCC **GACG**GCTCCT **TCTT**CCTCTA **CAGC**AAGCTC **ACCG**TGCACA **AGAG**CAGGTG
 8341 **GCAG**CAGGGG **AACG**TCTTCT **CATG**CTCCGT **GATG**CATGAG **GCTC**TGCACA **ACCA**CTACAC
 8401 **GCAG**AAGAGC **CTCT**CCCTGT **CTCC**GGGTAA A

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

TABLA 11: Secuencias de polipéptidos

A. Híbrido de monómero de FVIII-Fc de dominio B delecionado (monómero-dímero de FVIII BDDFc): creado por coexpresión de cadenas de FVIII BDDFc y Fc.

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

i) Cadena de FVIII de dominio B delecionado-Fc (secuencia señal de 19 aminoácidos subrayada) (SEQ ID NO: 2)

MQI**ELST****CF****FL****CLL****R****FC****F****S**
ATRRYYLGAVELSWDYMOSDLGELPVDARFPPRPVKSEFNTSVVYKKTLEVEFTDHLF
NIAKPRPPWMGLIGPTIQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSIHAVGVSYWKASEGAIFYDDQ
TSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSHVDLVKDLNSGLIGA
LLVCREGLAKEKTO~~TLHK~~FILLFAVDEGKSWHSETKNSLMODRDAASARAWPKMHT
VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGITPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIITL
TAQTLIMDLGGFLFCHISSHQHDMFAVYKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTD
SEMDVVRFDNNSPSFQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLAPDDRSYKSOY
LNNPQORIGRKYKRVREMA~~Y~~TDETEKTREAIQHESGILGPLLYGEVGDLLIIFKNOASRP
YNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIEKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRY
YSSEVNMERDLASGLIGPLLYCYKESVDORGNQIMSDKRNVILFSVLEENRSWYLTENIQ
RFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLQLSVCLHEVA~~Y~~WYILSIGAQTDELSVEF
SGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSPENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC
DKNTGDYVEDSYEDISA~~Y~~LLSKNNAIEPRFSQNPVLRHQREITRTLQSDQEEIDYDD
TISVEMKKEDFDIYEDENQSPRSFQKKTIRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNRNAQSG
SVPQFKKVVVFQEF~~T~~DGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSF

A. Híbrido de monómero de FVIII-Fc de dominio B delecionado (monómero-dímero de FVIII BDDFc): creado por coexpresión de cadenas de FVIII BDDFc y Fc.

YSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDL
 EKDVHSGGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQVIVQEFALFFTFDETKSWYFTENMERNCRAP
 CNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQRIRWYLLSMGNSENIHSIHFSGH
 VFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSN
 KCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAP
 MIIHGKIQGARQKFSSLYISQFHIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGKIHNI
 FNPPIIARYIRLHPITHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMF
 ATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTQGVKSLLSMY
 VKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRYLRHPQSWVH
 QIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
 VVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
 KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG
 FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCV
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
 DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
 AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV
 LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

B. Híbrido de monómero de FVIII-Fc de longitud completa (monómero-dímero de FVIII-Fc de longitud completa): creado por coexpresión de cadenas de FVIII-Fc y Fc.

Construcción = fusión HC-B-LC-Fc. Se cotransfecta un casete de expresión de Fc con FVIII-Fc de longitud completa para generar el monómero de FVIII-Fc de longitud completa, para la cadena de FVIII-Fc, la secuencia de Fc se muestra en **negrita**; la secuencia de HC se muestra en subrayado doble; la secuencia del dominio B se muestra en *cursiva*. Los péptidos señal están subrayados.

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

MQIELSTCFFLCLRFCFS
ATRRYYLGAVELSDWYMOSDLGELPVDAREFPPRVPKSFPFNTSVVYKKTLEVEFTDHLF
NIKPRPPWMGLLGPITQAEVYDVTVVITLKNMASHPVSLHAGVSYWKASEGAEYDDQ
TSQREKLEDDKVFPGGSHITYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSYLSIIVDLVKDLNSGLIGA
LLVCREGSLAKEKQTLHKFILLFAVEDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHT
VNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFL
TAQTLMDLGGFLLCHESSHQHDGMEAYVKVDSCEPEFQLRMKNNEEAEDYDDDLTD
SEMDVVREDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVLPDDRYSYKSOY
LNGPQORIGRKYKRVREMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGDILLIFKNOASRP
YNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPIIPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRY
YSSEYNNMERDLASGLIGPLLICYKESVDQRGNOIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQ
RFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVDSLOLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDELSVFF
SGYTEFKHKMVYEDTLTFPFSGETVFMENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC

B. Híbrido de monómero de FVIII_{Fc} de longitud completa (monómero-dímero de FVIII_{Fc} de longitud completa):
creado por coexpresión de cadenas de FVIII_{Fc} y Fc.

DKNTGDYYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNSRHPSTROKQFNATTIPENDIEKTD_{PWF}
AHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKEYETFSDDPSPGAIDSNNLSLEMT_{HF}
RPQLHHS_{GDMVFT}PESGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFKVSSTSNLISTIPSDNLAAGTDNT
SSLGPPSMPVHYDSQLD_{TL}FLFGKSSPLTESGGPLSLSEENNDKLLSGLMNSQESSWGKNV
SSTESGRLFKGKRAHG_{PALL}TKDNALFKV_{SIS}LLKTNKTSNNSATNRKTHIDG_{PS}LLIENSPSVW
QNILESDTEFKKV_{TPLI}HDRMLMDKNATALRLNHMSNKT_{TSS}KNMEMVQQKKEG_{PIPP}DAQN
PDMSFFKMLFLPESARWI_{QRT}HGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSVEG_{QNF}LSEKNKVVVG
KGEFTKDVGLKEMVFPSSRN_{LFL}TNLDNLHENNTHNQEKKIQEEIEK_{KETLI}QENVVLPQIHT
VTG_{TKN}FMKNLFLSTRQ_{NV}EGSYDGAYAPVIQDFRSLNDSTNRTKKHTAHF_SKKGEEENLF
GLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQNFVTQ_{RS}KRALKQFRLPLEETE_{LEKRII}VDDTSTQWSK
NMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQ_SPLSDCLTRSHSIPQANRSPLPIAKVSSFP_{SIR}PIYLTRVLF
QDNSSHLPAASYRKKDSGVQ_{ESS}HFLQGAKNNLSLAILTLEMTGDQ_{RE}VGSLGTSATNSVTY
KKVENTVLPK_{PDL}PKTSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEG_{SLL}QGTGGAIKW
NEANRPGKVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEK_{SPEK}TAFKKKDTI
LSLNACESNHAAINEGQ_{NK}PEIEVTWAKQGRTERLCSQ_{NPP}VLKRHQREITRTTLQSDQEEI
DYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLNR
AQSGSVLPQFKVVFQEF_{TD}GSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMV_{TFR}NQASR
PYSFYSSLISYEEDQRQGAEP_{RKN}FVKPNETKTYFWK_{VQ}HHMAPTKDEFDCKAWAYFS
DVDLEKDVHSGLIGPLL_{VCH}TNTLNPAHG_{RQ}VTVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERN
CRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPGLVMAQDQ_{RIR}WYLLSMGSNENIHSIHF
SGHVFTVRKKEEYK_{MALYN}LYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLV
YSNKCQTP_{LG}MASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDL
LAPMIIHGIKTQGARQK_{FSS}L_{YIS}QFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIK
HNIFNPPIARYIRLHP_{THYS}IRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTN
MFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEW_{LQ}VD_{FQ}KTMKVTGVTTQGVKSL_{LS}TS
MYVKEFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVKVFQGNQDSFTPVVNSLDP_{PLL}TRYLRIHPQSW
VHQIALRMEVLGCEAQDL_{YDK}TH_{TCPP}CAPELLGGPSVFLFFPKPKDTLMISRTPEV
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK_{TP}PVLDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

METD_{TLLL}WV_{LLL}WVPGSTG
DKTHTCPPCAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
GVEVHNAKTKFREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISK
AKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK_{TP}PV
LDSDGSEFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Listado de secuencias

<110> BIOGEN IDEC MA INC.

<120> FORMULACIONES DE POLIPÉPTIDO del factor VIII

5

<130> 2159.436PC0B/C-K/CMC

<140> Por asignar

<141> Con la presente

10

<160> 18

ES 2 776 195 T3

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 5052

5

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII Fc de dominio B deletado

10

<400> 1

```
atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc      60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc     120
ggtagagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac     180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc     240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgaggtttat     300
gatacagtcg tcattacact taagaacatg gcttcccata ctgtcagctc tcatgctggt     360
gggtgatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg     420
gagaaagaag atgataaagt cttccctggg ggaagccata catatgtctg gcaggctctg     480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat     540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa     600
gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttctgta     660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ccttgatgca ggatagggat     720
gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctc     780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc     840
accactoctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacct     900
cgccaggcgt ccttggaat ctgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg     960
gacctggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaactga tggcatggaa    1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa    1080
gaagcggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat    1140
gatgacaact ctcttcctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact    1200
```

ES 2 776 195 T3

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 gggaggttg 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
agaggaaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgctttc tcccgaatcc agctggagtg	1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt cctttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa	2040
atgggtctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagttgt gacaagaaca ctgggtgatta ttacaggagc	2220
agttatgaag atatttcagc atacttgctg agtaaaaaa atgccattga accaagaagc	2280
ttctctcaaa acccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactactctt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgat gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca tttatgatga ggatgaaaat cagagcccc gcagctttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctgggatt atgggatgag tagctcccca	2520
catggtctaa 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
ttttgaaaag tgcaacatca tatggcacc actaaagatg agtttgactg caaagcctgg	2880
gcttatttct ctgatgttga cctggaaaaa gatgtgcact caggcctgat tggaccctt	2940
ctgggtctgcc acactaacac actgaaccct gctcatggga gacaagtac agtacaggaa	3000
tttgctctgt ttttcacat ctttgatgag accaaaagct ggtacttca tgaaaatag	3060

ES 2 776 195 T3

gaaagaaact gcagggctcc ctgcaatata cagatggaag atcccacttt taaagagaat 3120
 tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct 3180
 caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatgggca gcaatgaaaa catccattct 3240
 attcatttca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg 3300
 tacaatctct atccaggtgt ttttgagaca gtggaatgt taccatcaa agctggaatt 3360
 tggcgggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac actttttctg 3420
 gtgtacagca ataagtgtca gactcccctg ggaatggctt ctggacacat tagagatttt 3480
 cagattacag cttcaggaca atatggacag tgggcccaca agctggccag acttcattat 3540
 tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagccctttt cttggatcaa ggtggatctg 3600
 ttggcaccaa tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gttctccagc 3660
 ctctacatct ctccagttat catcatgtat agtcttgatg ggaagaagtg gcagacttat 3720
 cgaggaaatt ccaactggaac cttaatggtc ttctttggca atgtggattc atctgggata 3780
 aacacacaata tttttaacct tccaattatt gctcgataca tccgtttgca cccaactcat 3840
 tatagcattc gcagcactct tcgcatggag ttgatgggct gtgatttaa tagttgcagc 3900
 atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcacactac 3960
 tttaccaata tgtttgccac ctggtctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg 4020
 agtaatgctt ggagacctca ggtgaataat ccaaaagagt ggctgcaagt ggactccag 4080
 aagacaatga aagtcacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgct taccagcatg 4140
 tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagtggac tctctttttt 4200
 cagaatggca aagtaaagggt ttttcagggga aatcaagact ccttcacacc tgtggtgaac 4260
 tctctagacc caccgttact gactcgctac ctctgaattc acccccagag ttgggtgcac 4320
 cagattgccc tgaggatgga ggttctgggc tgcgaggcac aggacctcta cgacaaaact 4380
 cacacatgcc caccgtgccc agctocagaa ctctggtggc gaccgtcagt ctctctctc 4440
 cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggacce ctgaggtcac atgcgtggtg 4500
 gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag 4560
 gtgcataatg ccaagacaaa gccgogggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc 4620
 agcgtctca ccgtctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc 4680
 tccaacaaag cctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 4740
 cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc 4800
 agcctgacct gcctggtcaa aggtttctat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc 4860
 aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgttgactc cgacggtcc 4920
 ttctctctct acagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtctc 4980
 tcatgctccg tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 5040
 tctccgggta aa 5052

<210> 2

5 <211> 1684

<212> PRT

ES 2 776 195 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> FVIII Fc de dominio B delecionado

5

<400> 2

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile
                180                              185           190

```

ES 2 776 195 T3

Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr
 195 200 205

Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly
 210 215 220

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 225 230 235 240

Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr
 245 250 255

Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val
 260 265 270

Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile
 275 280 285

Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser
 290 295 300

Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met
 305 310 315 320

Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His
 325 330 335

Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro
 340 345 350

Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp
 355 360 365

Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asp Asn Ser
 370 375 380

Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr
 385 390 395 400

Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro
 405 410 415

Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn
 420 425 430

Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met
 435 440 445

ES 2 776 195 T3

Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu
450 455 460

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

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
485 490 495

His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
500 505 510

Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
515 520 525

Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
530 535 540

Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
545 550 555 560

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

Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
580 585 590

Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
595 600 605

Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
610 615 620

Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
625 630 635 640

Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
645 650 655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
660 665 670

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

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

ES 2 776 195 T3

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

ES 2 776 195 T3

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
945 950 955 960

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
965 970 975

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
980 985 990

Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
995 1000 1005

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn
1010 1015 1020

Cys Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys
1025 1030 1035

Glu Asn Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr
1040 1045 1050

Leu Pro Gly Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr
1055 1060 1065

Leu Leu Ser Met Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe
1070 1075 1080

Ser Gly His Val Phe Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met
1085 1090 1095

Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met
1100 1105 1110

Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly
1115 1120 1125

Glu His Leu His Ala Gly Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser
1130 1135 1140

Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg
1145 1150 1155

Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro
1160 1165 1170

Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser
1175 1180 1185

ES 2 776 195 T3

Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro
 1190 1195 1200

Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe
 1205 1210 1215

Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp
 1220 1225 1230

Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu
 1235 1240 1245

Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn
 1250 1255 1260

Ile Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro
 1265 1270 1275

Thr His Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly
 1280 1285 1290

Cys Asp Leu Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys
 1295 1300 1305

Ala Ile Ser Asp Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn
 1310 1315 1320

Met Phe Ala Thr Trp Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln
 1325 1330 1335

Gly Arg Ser Asn Ala Trp Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu
 1340 1345 1350

Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val
 1355 1360 1365

Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys
 1370 1375 1380

Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu
 1385 1390 1395

Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp
 1400 1405 1410

Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr
 1415 1420 1425

ES 2 776 195 T3

Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala
 1430 1435 1440

Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp
 1445 1450 1455

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly
 1460 1465 1470

Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 1475 1480 1485

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 1490 1495 1500

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
 1505 1510 1515

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr
 1520 1525 1530

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 1535 1540 1545

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 1550 1555 1560

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 1565 1570 1575

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp
 1580 1585 1590

Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly
 1595 1600 1605

Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
 1610 1615 1620

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 1625 1630 1635

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
 1640 1645 1650

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

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

Lys

ES 2 776 195 T3

<210> 3

<211> 741

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Porción de Fc

<400> 3

10

```

atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt      60
gacaaaactc acacatgccc accgtgccca gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc      120
ttctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcgatgatct cccggacccc tgaggtcaca      180
tgcgtaggtg tggacgtgag ccacgaagac cctgaggtca agttcaactg gtacgtggac      240
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac      300
cgtgtgggtc gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag      360
tgcaaggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      420
ggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag      480
aaccaggtca goctgacctg cctggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag      540
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc      600
gacggctcct tcttctcta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcagcagggg      660
aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc      720
ctctccctgt ctccggtaa a      741
    
```

<210> 4

<211> 247

15

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Porción de Fc

20

<400> 4

ES 2 776 195 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 5

5 <211> 7734

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

ES 2 776 195 T3

<220>

<223> FVIII Fc de longitud completa

<400> 5

5

```

atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc      60
accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc     120
ggtagagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac     180
acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc     240
gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggtttat     300
gatacagtggt tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt     360
gggtatcctt actggaaagc ttctgagggg gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg     420
gagaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg     480
aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat     540
gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa     600
gggagtctgg ccaaggaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta     660
tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaagaact ccttgatgca ggatagggat     720
gtgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggctct     780
ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgatg tggaatgggc     840
accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaacctat     900
cgccaggcgt ccttgaaaat ctgcacaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg     960
gacctgggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa    1020
gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa    1080
gaagcgggaag actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat    1140
gatgacaact ctccttcctt tatccaaatt cgctcagttg ocaagaagca tcctaaaact    1200
tggttacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc    1260
ccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg    1320
aagtacaaaa aagtcggatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct    1380
attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg    1440
ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact    1500
gatgtccgtc ctttgtatc aaggagatta caaaagggtg taaaacattt gaaggatttt    1560
ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca    1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgtaa tatggagaga    1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgct acaaagaatc tgtagatcaa    1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgttttctgt atttgatgag    1800

```

ES 2 776 195 T3

aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttcc tcccacatcc agctggagtg 1860
cagcttgagg atccagagtt ccaagcctcc aacatcatgc acagcatcaa tggctatggt 1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgtttg catgaggtgg catactggta cattctaagc 1980
attggagcac agactgactt octttctgtc ttcttctctg gatatacctt caaacacaaa 2040
atggtctatg aagacacact caccttattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg 2100
atggaaaacc caggtctatg gattctgggg tgccacaact cagactttcg gaacagaggc 2160
atgaccgcct tactgaaggt ttctagtgtg gacaagaaca ctggtgatta ttacgaggac 2220
agttatgaag atatttcagc atacttgotg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc 2280
ttctcccaga attcaagaca ccctagcact aggcaaaagc aatttaatgc caccacaatt 2340
ccagaaaatg acatagagaa gactgacctt tggtttgac acagaacacc tatgcctaaa 2400
atacaaaatg tctcctctag tgatttggtg atgctcttgc gacagagtcc tactccacat 2460
gggctatcct tatctgatct ccaagaagcc aaatatgaga ctttttctga tgatccatca 2520
cctggagcaa tagacagtaa taacagcctg tctgaaatga cacacttcag gccacagctc 2580
catcacagtg gggacatggt atttaccocct gagtcaggcc tccaattaag attaatgag 2640
aaactgggga caactgcagc aacagagttg aagaaacttg atttcaaagt ttctagtaca 2700
tcaaataatc tgatttcaac aattccatca gacaatttg cagcaggtac tgataataca 2760
agttccttag gacccccagc tatgccagtt cattatgata gtcaattaga taccactcta 2820
tttggcaaaa agtcatctcc octtactgag tctgggtggc ctctgagctt gagtgaagaa 2880
aataatgatt caaagttggt agaatcaggt ttaatgaata gccaaagaaag tcatgggga 2940
aaaaatgtat cgtcaacaga gagtggtagg ttattttaaag ggaaaagagc tcatggacct 3000
gctttgttga ctaaagataa tgccttattc aaagttagca tctctttggt aaagacaaac 3060
aaaacttcca ataattcagc aactaataga aagactcaca ttgatggccc atcattatta 3120
attgagaata gtccatcagt ctggcaaaat atattagaaa gtgacactga gtttaaaaaa 3180
gtgacacctt tgattcatga cagaatgctt atggacaaaa atgctacagc tttgaggcta 3240
aatcatatgt caaataaaac tacttcatca aaaaacatgg aaatggtcca acagaaaaaa 3300
gagggcccca ttccaccaga tgcacaaaat ccagatatgt cgttctttaa gatgctattc 3360
ttgccagaat cagcaaggtg gatacaaagg actcatggaa agaactctct gaactctggg 3420
caaggcccca gtccaaagca attagatccc 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

ES 2 776 195 T3

gaaacattaa tccaagagaa thtagttttg cctcagatac atacagtgac tggcactaag 3720
 aatttcatga agaacctttt ctactgagc actaggcaaa atgtagaagg ttcatatgac 3780
 ggggcatatg ctccagtaact tcaagatfff agtgcattaa atgattcaac aaatagaaca 3840
 aagaaacaca cagctcattt ctcaaaaaaa ggggaggaag aaaacttggg aggcttggga 3900
 aatcaaacca agcaaattgt agagaaatat gcatgcacca caaggatata tcctaataca 3960
 agccagcaga attttgtcac gcaacgtagt aagagagctt tgaacaatt cagactccca 4020
 ctagaagaaa cagaacttga aaaaaggata attgtggatg acacctcaac ccagtggtec 4080
 aaaaacatga aacatttgac cccgagcacc ctcacacaga tagactaca tgagaaggag 4140
 aaaggggcca ttactcagtc tcccttatca gattgcctta cgaggagtca tagcatccct 4200
 caagcaata gatctccatt acccattgca aaggtatcat catttccatc tattagacct 4260
 atatatctga ccagggtcct attccaagac aactcttctc atcttcagc agcatcttat 4320
 agaaagaaag attctggggt ccaagaaagc agtcatttct tacaaggagc caaaaaaat 4380
 aacctttctt tagccattct aaccttggag atgactggtg atcaagaga ggttggctcc 4440
 ctggggacaa gtgccacaaa ttcagtcaca tacaagaaag ttgagaacac tgttctcccg 4500
 aaaccagact tgcccaaac atctggcaaa gttgaattgc ttccaaaagt tcacatttat 4560
 cagaaggacc tattccctac ggaaactagc aatgggtctc ctggccatct ggatctcgtg 4620
 gaaggagacc ttcttcaggg aacagagggg gcgattaagt ggaatgaagc aaacagacct 4680
 ggaaaagttc cctttctgag agtagcaaca gaaagctctg caaagactcc ctccaagcta 4740
 ttggatcctc ttgcttggga taaccactat ggtactcaga taccaaaaga agagtggaaa 4800
 tccaagaga agtcaccaga aaaaacagct ttaagaaaa aggataccat tttgtccctg 4860
 aacgcttgtg aaagcaatca tgcaatagca gcaataaatg agggacaaaa taagcccga 4920
 atagaagtca cctgggcaaa gcaaggtagg actgaaaggc tgtgctctca aaaccacca 4980
 gtcttgaaac gccatcaacg ggaaataact cgtactactc ttcagtcaga tcaagaggaa 5040
 attgactatg atgataccat atcagttgaa atgaagaagc aagatfffga catttatgat 5100
 gaggatgaaa atcagagccc ccgagcttt caaaagaaaa cacgacacta ttttattgct 5160
 gcagtggaga ggctctggga ttatgggatg agtagctccc cacatgttct aagaaacagg 5220
 gctcagagtg gcagtgtccc tcagttcaag aaagttgfff tccaggaatt tactgatggc 5280
 tcctttactc agcccttata ccgtggagaa ctaaataaac atttgggact cctggggcca 5340
 tatataagag cagaagtga agataatata atggtaactt tcagaaatca ggcctctcgt 5400
 ccctattcct tctattctag ccttatttct tatgaggaag atcagaggca aggagcagaa 5460
 cctagaaaaa actttgtcaa gcctaataaa accaaaactt acttttggaa agtgcacat 5520
 catatggcac ccactaaaga tgagtttgac tgcaaacctt gggcttattt ctctgatgtt 5580

ES 2 776 195 T3

gacctgaaa aagatgtgca ctcaggcctg attggacccc ttctggtctg ccacactaac 5640
aactgaacc ctgctcatgg gagacaagtg acagtacagg aatttgctct gtttttcacc 5700
atctttgatg agacccaaaag ctggtacttc actgaaaata tggaaagaaa ctgcagggtc 5760
ccctgcaata tccagatgga agatcccact tttaaagaga attatcgctt ccatgcaatc 5820
aatggctaca taatggatac actacctggc ttagtaatgg ctcaggatca aaggattcga 5880
tggtatctgc tcagcatggg cagcaatgaa aacatccatt ctattcattt cagtggacat 5940
gtgttcactg tacgaaaaaa agaggagtat aaaatggcac tgtacaatct ctatccaggt 6000
gtttttgaga cagtggaaat gttaccatcc aaagctggaa tttggcgggt ggaatgcctt 6060
attggcgagc atctacatgc tgggatgagc acactttttc tgggtgtacag caataagtgt 6120
cagactcccc tgggaatggc ttctggacac attagagatt ttcagattac agcttcagga 6180
caatatggac agtgggcccc aaagctggcc agacttcatt attccggatc aatcaatgcc 6240
tggagcacca aggagccctt ttcttgatc aaggtggatc tgttggcacc aatgattatt 6300
cacggcatca agaccaggg tgcccgtcag aagttctcca gcctctacat ctctcagttt 6360
atcatcatgt atagtcttga tgggaagaag tggcagactt atcgaggaaa ttocactgga 6420
accttaatgg tcttctttgg caatgtggat tcatctggga taaaacacaa tatttttaac 6480
cctccaatta ttgctcgata catccgtttg cacccaactc attatagcat tcgcagcact 6540
cttcgcatgg agttgatggg ctgtgattta aatagttgca gcatgccatt gggaatggag 6600
agtaaaqcaa tatcagatgc acagattact gcttcatcct actttaccaa tatgtttgcc 6660
acctggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaagga ggagtaatgc ctggagacct 6720
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttctc 6840
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtg gactctctttt ttcagaatgg caaagtaaaag 6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctccttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgta 6960
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 7080
ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttctctc tcccccaaa acccaaggac 7140
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 7200
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 7260
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg tacctgtgtg tcagcgtcct caccgtcctg 7320
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctcca 7380
gccccatcg agaaaacat ctccaaagcc 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 ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 7680
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 7734

ES 2 776 195 T3

<210> 6

<211> 2578

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> FVIII Fc de longitud completa

<400> 6

10

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 776 195 T3

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

ES 2 776 195 T3

420	425	430																			
Asn	Gly	Pro	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val	Arg	Phe	Met						
		435					440					445									
Ala	Tyr	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala	Ile	Gln	His	Glu						
	450					455					460										
Ser	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Val	Gly	Asp	Thr	Leu						
465					470					475					480						
Leu	Ile	Ile	Phe	Lys	Asn	Gln	Ala	Ser	Arg	Pro	Tyr	Asn	Ile	Tyr	Pro						
				485					490					495							
His	Gly	Ile	Thr	Asp	Val	Arg	Pro	Leu	Tyr	Ser	Arg	Arg	Leu	Pro	Lys						
			500					505					510								
Gly	Val	Lys	His	Leu	Lys	Asp	Phe	Pro	Ile	Leu	Pro	Gly	Glu	Ile	Phe						
		515					520					525									
Lys	Tyr	Lys	Trp	Thr	Val	Thr	Val	Glu	Asp	Gly	Pro	Thr	Lys	Ser	Asp						
	530					535					540										
Pro	Arg	Cys	Leu	Thr	Arg	Tyr	Tyr	Ser	Ser	Phe	Val	Asn	Met	Glu	Arg						
545					550					555					560						
Asp	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ile	Gly	Pro	Leu	Leu	Ile	Cys	Tyr	Lys	Glu						
				565					570					575							
Ser	Val	Asp	Gln	Arg	Gly	Asn	Gln	Ile	Met	Ser	Asp	Lys	Arg	Asn	Val						
			580					585					590								
Ile	Leu	Phe	Ser	Val	Phe	Asp	Glu	Asn	Arg	Ser	Trp	Tyr	Leu	Thr	Glu						
		595					600					605									
Asn	Ile	Gln	Arg	Phe	Leu	Pro	Asn	Pro	Ala	Gly	Val	Gln	Leu	Glu	Asp						
	610					615					620										
Pro	Glu	Phe	Gln	Ala	Ser	Asn	Ile	Met	His	Ser	Ile	Asn	Gly	Tyr	Val						
625					630					635					640						
Phe	Asp	Ser	Leu	Gln	Leu	Ser	Val	Cys	Leu	His	Glu	Val	Ala	Tyr	Trp						
				645					650					655							
Tyr	Ile	Leu	Ser	Ile	Gly	Ala	Gln	Thr	Asp	Phe	Leu	Ser	Val	Phe	Phe						
			660					665						670							

ES 2 776 195 T3

Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
675 680 685

Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
690 695 700

Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
705 710 715 720

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 776 195 T3

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

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

Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965 970 975

Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
 980 985 990

Lys Gly Lys Arg Ala His Gly Pro Ala Leu Leu Thr Lys Asp Asn Ala
 995 1000 1005

Leu Phe Lys Val Ser Ile Ser Leu Leu Lys Thr Asn Lys Thr Ser
 1010 1015 1020

Asn Asn Ser Ala Thr Asn Arg Lys Thr His Ile Asp Gly Pro Ser
 1025 1030 1035

Leu Leu Ile Glu Asn Ser Pro Ser Val Trp Gln Asn Ile Leu Glu
 1040 1045 1050

Ser Asp Thr Glu Phe Lys Lys Val Thr Pro Leu Ile His Asp Arg
 1055 1060 1065

Met Leu Met Asp Lys Asn Ala Thr Ala Leu Arg Leu Asn His Met
 1070 1075 1080

Ser Asn Lys Thr Thr Ser Ser Lys Asn Met Glu Met Val Gln Gln
 1085 1090 1095

Lys Lys Glu Gly Pro Ile Pro Pro Asp Ala Gln Asn Pro Asp Met
 1100 1105 1110

Ser Phe Phe Lys Met Leu Phe Leu Pro Glu Ser Ala Arg Trp Ile
 1115 1120 1125

Gln Arg Thr His Gly Lys Asn Ser Leu Asn Ser Gly Gln Gly Pro
 1130 1135 1140

Ser Pro Lys Gln Leu Val Ser Leu Gly Pro Glu Lys Ser Val Glu
 1145 1150 1155

Gly Gln Asn Phe Leu Ser Glu Lys Asn Lys Val Val Val Gly Lys
 1160 1165 1170

ES 2 776 195 T3

Gly Glu Phe Thr Lys Asp Val Gly Leu Lys Glu Met Val Phe Pro
 1175 1180 1185

Ser Ser Arg Asn Leu Phe Leu Thr Asn Leu Asp Asn Leu His Glu
 1190 1195 1200

Asn Asn Thr His Asn Gln Glu Lys Lys Ile Gln Glu Glu Ile Glu
 1205 1210 1215

Lys Lys Glu Thr Leu Ile Gln Glu Asn Val Val Leu Pro Gln Ile
 1220 1225 1230

His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu
 1235 1240 1245

Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr
 1250 1255 1260

Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn
 1265 1270 1275

Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu
 1280 1285 1290

Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu
 1295 1300 1305

Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln
 1310 1315 1320

Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg
 1325 1330 1335

Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp
 1340 1345 1350

Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro
 1355 1360 1365

Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala
 1370 1375 1380

Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser
 1385 1390 1395

Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser

ES 2 776 195 T3

1400						1405									1410
Ser	Phe	Pro	Ser	Ile	Arg	Pro	Ile	Tyr	Leu	Thr	Arg	Val	Leu	Phe	
1415						1420					1425				
Gln	Asp	Asn	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ala	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Lys	
1430						1435					1440				
Asp	Ser	Gly	Val	Gln	Glu	Ser	Ser	His	Phe	Leu	Gln	Gly	Ala	Lys	
1445						1450					1455				
Lys	Asn	Asn	Leu	Ser	Leu	Ala	Ile	Leu	Thr	Leu	Glu	Met	Thr	Gly	
1460						1465					1470				
Asp	Gln	Arg	Glu	Val	Gly	Ser	Leu	Gly	Thr	Ser	Ala	Thr	Asn	Ser	
1475						1480					1485				
Val	Thr	Tyr	Lys	Lys	Val	Glu	Asn	Thr	Val	Leu	Pro	Lys	Pro	Asp	
1490						1495					1500				
Leu	Pro	Lys	Thr	Ser	Gly	Lys	Val	Glu	Leu	Leu	Pro	Lys	Val	His	
1505						1510					1515				
Ile	Tyr	Gln	Lys	Asp	Leu	Phe	Pro	Thr	Glu	Thr	Ser	Asn	Gly	Ser	
1520						1525					1530				
Pro	Gly	His	Leu	Asp	Leu	Val	Glu	Gly	Ser	Leu	Leu	Gln	Gly	Thr	
1535						1540					1545				
Glu	Gly	Ala	Ile	Lys	Trp	Asn	Glu	Ala	Asn	Arg	Pro	Gly	Lys	Val	
1550						1555					1560				
Pro	Phe	Leu	Arg	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Pro	Ser	
1565						1570					1575				
Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Leu	Ala	Trp	Asp	Asn	His	Tyr	Gly	Thr	Gln	
1580						1585					1590				
Ile	Pro	Lys	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Gln	Glu	Lys	Ser	Pro	Glu	Lys	
1595						1600					1605				
Thr	Ala	Phe	Lys	Lys	Lys	Asp	Thr	Ile	Leu	Ser	Leu	Asn	Ala	Cys	
1610						1615					1620				
Glu	Ser	Asn	His	Ala	Ile	Ala	Ala	Ile	Asn	Glu	Gly	Gln	Asn	Lys	
1625						1630					1635				

ES 2 776 195 T3

Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
 1640 1645 1650

Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu
 1655 1660 1665

Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
 1670 1675 1680

Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile
 1685 1690 1695

Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
 1700 1705 1710

Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
 1715 1720 1725

Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
 1730 1735 1740

Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 1745 1750 1755

Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu
 1760 1765 1770

His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
 1775 1780 1785

Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
 1790 1795 1800

Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 1805 1810 1815

Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
 1820 1825 1830

Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
 1835 1840 1845

Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
 1850 1855 1860

Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
 1865 1870 1875

ES 2 776 195 T3

Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 1880 1885 1890
 Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
 1895 1900 1905
 Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1910 1915 1920
 Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 1925 1930 1935
 Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
 1940 1945 1950
 Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1955 1960 1965
 Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
 1970 1975 1980
 Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
 1985 1990 1995
 Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
 2000 2005 2010
 Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
 2015 2020 2025
 Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
 2030 2035 2040
 Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 2045 2050 2055
 Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
 2060 2065 2070
 Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
 2075 2080 2085
 Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
 2090 2095 2100
 Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 2105 2110 2115

ES 2 776 195 T3

Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 2120 2125 2130

Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 2135 2140 2145

Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2150 2155 2160

Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg
 2165 2170 2175

Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu Asn Ser Cys
 2180 2185 2190

Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp Ala Gln
 2195 2200 2205

Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp Ser
 2210 2215 2220

Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp
 2225 2230 2235

Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe
 2240 2245 2250

Gln Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys
 2255 2260 2265

Ser Leu Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser
 2270 2275 2280

Ser Gln Asp Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys
 2285 2290 2295

Val Lys Val Phe Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val
 2300 2305 2310

Asn Ser Leu Asp Pro Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His
 2315 2320 2325

Pro Gln Ser Trp Val His Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu
 2330 2335 2340

Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu Tyr Asp Lys Thr His Thr Cys Pro

ES 2 776 195 T3

2345		2350		2355
Pro Cys	Pro Ala	Pro Glu	Leu	Leu Gly Gly
2360			2365	Pro Ser Val Phe Leu
				2370
Phe Pro	Pro Lys	Pro Lys	Asp	Thr Leu Met Ile
2375			2380	Ser Arg Thr Pro
				2385
Glu Val	Thr Cys	Val Val	Val	Asp Val Ser His
2390			2395	Glu Asp Pro Glu
				2400
Val Lys	Phe Asn	Trp Tyr	Val	Asp Gly Val Glu
2405			2410	Val His Asn Ala
				2415
Lys Thr	Lys Pro	Arg Glu	Glu	Gln Tyr Asn Ser
2420			2425	Thr Tyr Arg Val
				2430
Val Ser	Val Leu	Thr Val	Leu	His Gln Asp Trp
2435			2440	Leu Asn Gly Lys
				2445
Glu Tyr	Lys Cys	Lys Val	Ser	Asn Lys Ala Leu
2450			2455	Pro Ala Pro Ile
				2460
Glu Lys	Thr Ile	Ser Lys	Ala	Lys Gly Gln Pro
2465			2470	Arg Glu Pro Gln
				2475
Val Tyr	Thr Leu	Pro Pro	Ser	Arg Asp Glu Leu
2480			2485	Thr Lys Asn Gln
				2490
Val Ser	Leu Thr	Cys Leu	Val	Lys Gly Phe Tyr
2495			2500	Pro Ser Asp Ile
				2505
Ala Val	Glu Trp	Glu Ser	Asn	Gly Gln Pro Glu
2510			2515	Asn Asn Tyr Lys
				2520
Thr Thr	Pro Pro	Val Leu	Asp	Ser Asp Gly Ser
2525			2530	Phe Phe Leu Tyr
				2535
Ser Lys	Leu Thr	Val Asp	Lys	Ser Arg Trp Gln
2540			2545	Gln Gln Gly Asn Val
				2550
Phe Ser	Cys Ser	Val Met	His	Glu Ala Leu His
2555			2560	Asn His Tyr Thr
				2565
Gln Lys	Ser Leu	Ser Leu	Ser	Pro Gly Lys
2570			2575	

<210> 7

<211> 11

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

ES 2 776 195 T3

<220>

<223> Núcleo de péptido de unión a albúmina

<400> 7

5

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

<210> 8

<211> 32

10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido CTP

15

<400> 8

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

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

20

<210> 9

<211> 28

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Péptido CTP

<400> 9

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

30

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

ES 2 776 195 T3

<210> 10

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5

<220>

<223> Péptido PAS

<400> 10

10

```
Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro Ala Ser Pro Ala Ala Pro Ala Pro
1           5           10           15
Ser Ala Pro Ala
                20
```

<210> 11

15

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

20

<223> Péptido PAS

<400> 11

```
Ala Ala Pro Ala Ser Pro Ala Pro Ala Ala Pro Ser Ala Pro Ala Pro
1           5           10           15
Ala Ala Pro Ser
                20
```

25

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

30

<220>

<223> Péptido PAS

ES 2 776 195 T3

<400> 12

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

Ser Pro Ser Ser
20

5 <210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> Péptido PAS

<400> 13

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

15 Ser Pro Ser

<210> 14

<211> 20

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido PAS

25 <400> 14

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

Ser Ser Pro Ala
20

<210> 15

30 <211> 24

ES 2 776 195 T3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

5 <223> Péptido PAS

<400> 15

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

Ala Ala Pro Ser Ala Pro Pro Ala
20

10

<210> 16

<211> 20

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Péptido PAS

<400> 16

20

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

Ser Ala Ala Ala
20

<210> 17

<211> 21

25 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> fragmento del dominio del factor VIII B

30

<400> 17

ES 2 776 195 T3

Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
1 5 10 15
Lys Arg His Gln Arg
20

<210> 18

5 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

10 <223> Marca His

<400> 18

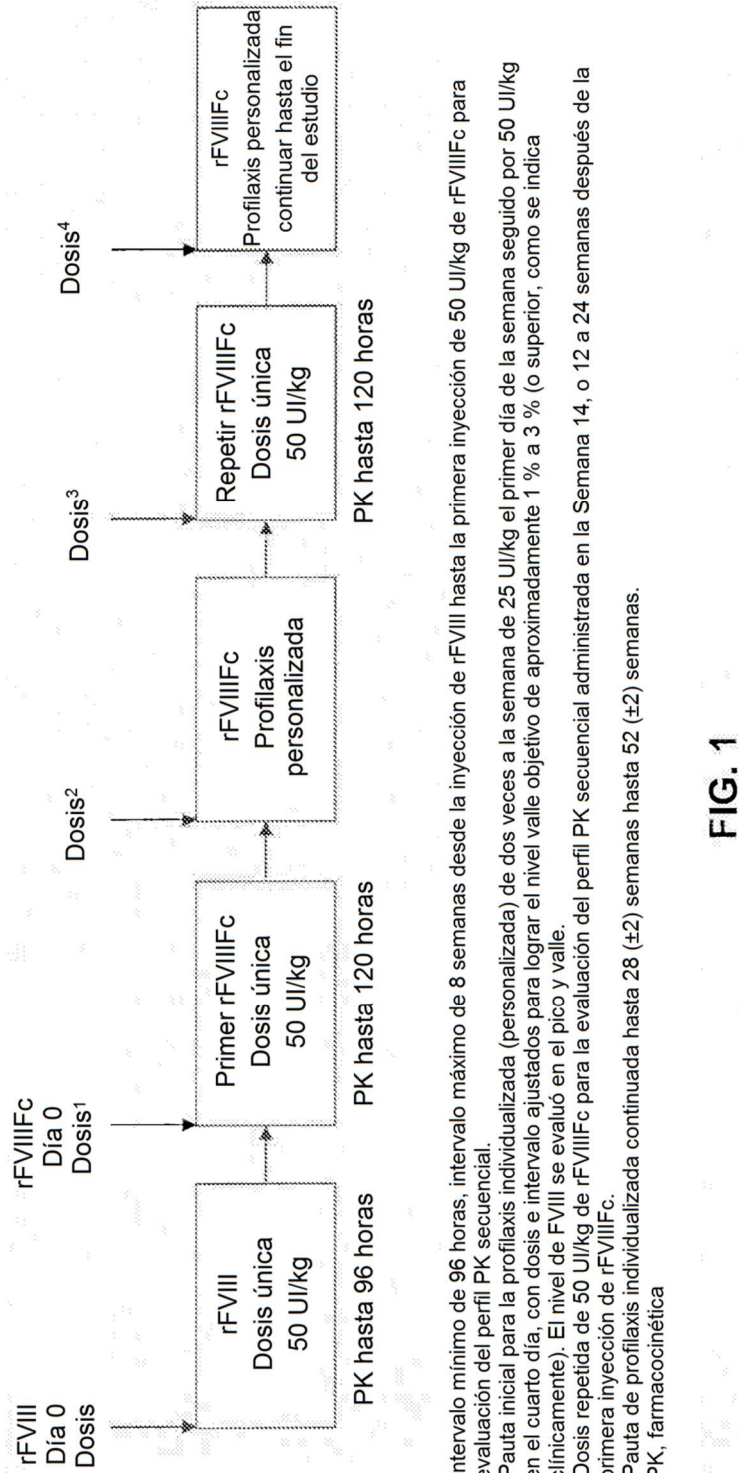
His His His His His His
1 5

15

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:
 - (a) 50 UI/mL a 2500 UI/mL de un polipéptido rFVIII Fc;
 - (b) 10 mg/mL a 25 mg/mL de sacarosa;
 - 5 (c) 8,8 mg/mL a 14,6 mg/mL de cloruro sódico (NaCl);
 - (d) 0,75 mg/mL a 2,25 mg/mL de L-histidina;
 - (e) 0,75 mg/mL a 1,5 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y
 - (f) 0,08 mg/mL a 0,25 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.
2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, que comprende:
 - 10 (a) 13 mg/mL a aproximadamente 20 mg/mL de sacarosa, o
 - (b) 13,3 mg/mL de sacarosa o aproximadamente 20,0 mg/mL de sacarosa.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 o 2, que comprende:
 - (a) 10 mg/mL a 13 mg/mL de NaCl, o
 - (b) 12,0 mg/mL de NaCl.
- 15 4. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende:
 - (a) 1,03 mg/mL de L-histidina, o
 - (b) 1,55 mg/mL de L-histidina.
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:
 - (a) 0,8 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado, o
 - 20 (b) 1,18 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado.
6. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:
 - (a) 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80, o
 - (b) 0,20 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.
7. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL del polipéptido rFVIII Fc.
 - 25 (a) 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL del polipéptido rFVIII Fc;
 - (b) 13,3 mg/mL de sacarosa;
 - (c) 12,0 mg/mL de NaCl;
 - (d) 1,03 mg/mL de L-histidina;
 - 30 (e) 0,8 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y
 - (f) 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.
8. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende:
 - (a) aproximadamente 83 UI/mL, aproximadamente 167 UI/mL, aproximadamente 250 UI/mL, aproximadamente 333 UI/mL, aproximadamente 500 UI/mL, aproximadamente 667 UI/mL, aproximadamente 1000 UI/mL, aproximadamente 1333 UI/mL, aproximadamente 1667 UI/mL, o aproximadamente 2000 UI/mL del polipéptido rFVIII Fc;
 - (b) aproximadamente 13,3 mg/mL de sacarosa;
 - (c) aproximadamente 12,0 mg/mL de NaCl;
 - (d) aproximadamente 1,03 mg/mL de L-histidina;
 - 35 (e) aproximadamente 0,8 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y
 - (f) aproximadamente 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, que comprende aproximadamente 83 UI/mL, aproximadamente 167 UI/mL, aproximadamente 250 UI/mL, aproximadamente 333 UI/mL, aproximadamente 500 UI/mL, aproximadamente 667 UI/mL, aproximadamente 1000 UI/mL, o aproximadamente 2000 UI/mL del polipéptido rFVIII Fc.
- 40 10. Un kit farmacéutico que comprende:

- (a) un primer recipiente que comprende un polvo liofilizado, en donde el polvo comprende
- (i) 250 UI, 500 UI, 750 UI, 1000 UI, 1500 UI, 2000 UI, 3000 UI, 4000 UI, 5000 UI, o 6000 UI de un polipéptido rFVIII^hFc;
 - (ii) 40 mg de sacarosa;
 - 5 (iii) 36 mg de cloruro sódico;
 - (iv) 3,1 mg de L-histidina;
 - (v) 2,40 mg de cloruro de calcio dihidratado; y
 - (vi) 0,40 mg de polisorbato 20 o polisorbato 80; y
- (b) un segundo recipiente que comprende agua esterilizada para inyecciones a un volumen suficiente para producir, cuando se combina con el polvo liofilizado del primer recipiente, una disolución que comprende:
- 10 (i) 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, 1000 UI/mL, 1333 UI/mL, 1667 UI/mL, o 2000 UI/mL del polipéptido rFVIII^hFc, respectivamente;
 - (ii) 13,3 mg/mL de sacarosa;
 - (iii) 12,0 mg/mL de NaCl;
 - 15 (iv) 1,03 mg/mL de L-histidina;
 - (v) 0,80 mg/mL de cloruro de calcio dihidratado; y
 - (vi) 0,13 mg/mL de polisorbato 20 o polisorbato 80.
11. El kit farmacéutico de la reivindicación 10, en donde el polvo liofilizado comprende 250 UI, 500 UI, 750 UI, 1000 UI, 1500 UI, 2000 UI, o 3000 UI de un polipéptido rFVIII^hFc, y en donde la disolución comprende 83 UI/mL, 167 UI/mL, 250 UI/mL, 333 UI/mL, 500 UI/mL, 667 UI/mL, o 1000 UI/mL del polipéptido rFVIII^hFc, respectivamente.
- 20 12. El kit farmacéutico de la reivindicación 10 o 11, en donde el primer recipiente es un vial de vidrio que comprende un tapón de goma.
13. El kit farmacéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, en donde el segundo recipiente es un cuerpo de jeringa, y en donde el cuerpo de jeringa está asociado con un émbolo.
- 25 14. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como un medicamento.
15. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso en reducir o disminuir el uno o más episodios hemorrágicos o la frecuencia de los episodios hemorrágicos, o para su uso en el tratamiento o la prevención de una afección hemorrágica, en un sujeto en necesidad de la misma.
- 30 16. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 15, en donde reducir o disminuir la frecuencia de los episodios hemorrágicos es reducir una tasa anualizada de sangrado en un sujeto en necesidad de la misma.
17. La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 15 o la reivindicación 16, en donde el sujeto tiene la afección hemorrágica hemofilia.
18. La composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17, en donde la composición farmacéutica es adecuada para uso intravenoso o subcutáneo.
- 35 19. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el kit farmacéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, o la composición farmacéutica para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el polipéptido rFVIII^hFc comprende una primera subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % o 95 % idéntica a los aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO: 2, y una segunda subunidad que comprende una secuencia de aminoácidos al menos 90 % a 95 % idéntica a los aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 4.
- 40 20. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, el kit farmacéutico de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, o la composición farmacéutica para su uso de una cualquiera de las reivindicaciones 15 a 18, en donde el polipéptido rFVIII^hFc comprende una primera subunidad que comprende los aminoácidos 20 a 1684 de SEQ ID NO: 2, y una segunda subunidad que comprende los aminoácidos 21 a 247 de SEQ ID NO: 4.



1. Intervalo mínimo de 96 horas, intervalo máximo de 8 semanas desde la inyección de rFVIII hasta la primera inyección de 50 UI/kg de rFVIII Fc para evaluación del perfil PK secuencial.
 2. Pauta inicial para la profilaxis individualizada (personalizada) de dos veces a la semana de 25 UI/kg el primer día de la semana seguido por 50 UI/kg en el cuarto día, con dosis e intervalo ajustados para lograr el nivel valle objetivo de aproximadamente 1 % a 3 % (o superior, como se indica clínicamente). El nivel de FVIII se evaluó en el pico y valle.
 3. Dosis repetida de 50 UI/kg de rFVIII Fc para la evaluación del perfil PK secuencial administrada en la Semana 14, o 12 a 24 semanas después de la primera inyección de rFVIII Fc.
 4. Pauta de profilaxis individualizada continuada hasta 28 (± 2) semanas hasta 52 (± 2) semanas.
- PK, farmacocinética

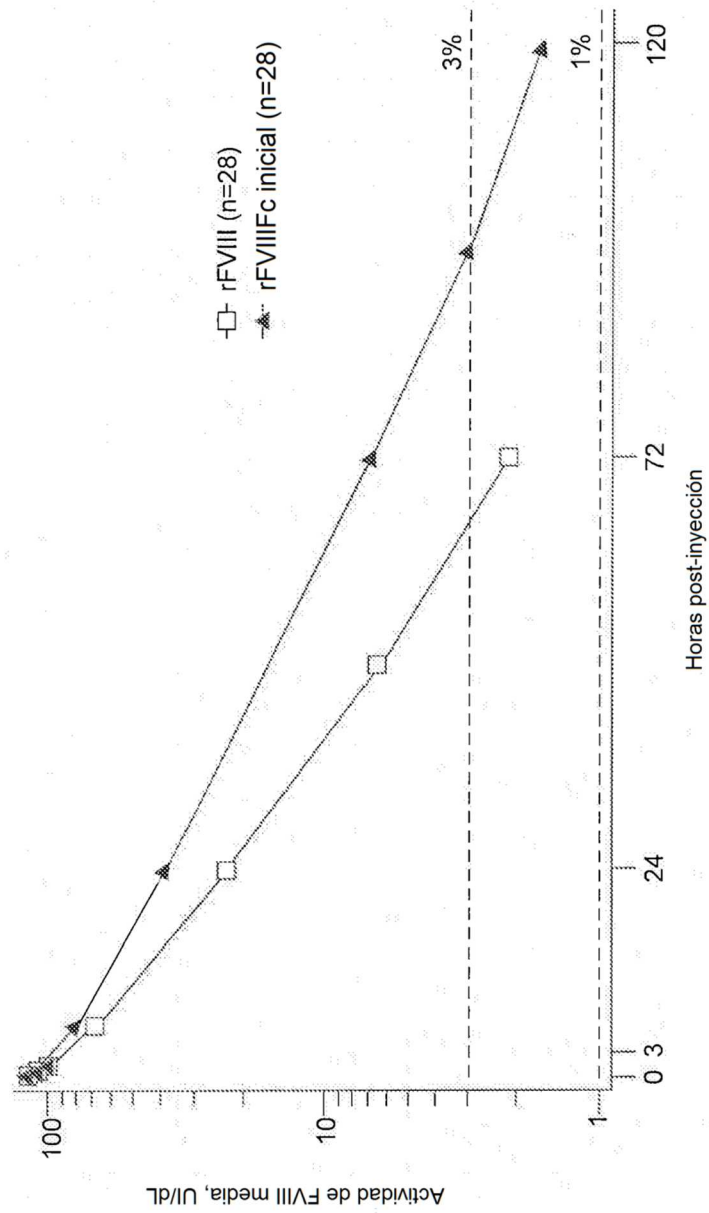


FIG. 2