



No. 14-011134- -00000-0000

Fecha: 2014-01-21 16:21:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS
DEL FACTOR VIII, Y SUS MÉTODOS DE USO”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 38/37**

71. SOLICITANTE **BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.**

DOMICILIO WALTHAM, ESTADO DE
MASSACHUSETTS, ESTADOS UNIDOS
DE AMÉRICA.

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C. **21 ENE 2014**



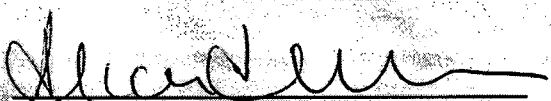
No. 14-011134- -00000-0000

Fecha: 2014-01-21 16:21:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR ión
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/US2012/045784	Fecha 06/07/12
Publicación Internacional No.		WO 2013/009627 A3	Fecha 17/01/13
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS DEL FACTOR VIII, Y SUS MÉTODOS DE USO"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 38/37			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
4. BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN		9 Fourth Avenue, Waltham, Massachusetts 02451, Estados Unidos de América.	
CIUDAD		Waltham	
DEPARTAMENTO/ESTADO		Massachusetts	
PAÍS DE RESIDENCIA		Estados Unidos de América	
No. TELÉFONO		3264270	
E-MAIL		notificacionespatentes@lloredacamacho.com	
NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN		Estados Unidos de América.	
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. DUMONT	Jennifer A.	Estados Unidos de América	
2. LOW	Susan	Reino Unido	
3. BITONTI	Alan, J.	Estados Unidos de América	
4. PIERCE	Glenn	Estados Unidos de América	
5. LUK	Alvin	Estados Unidos de América	
6. JIANG	Haiyan	Estados Unidos de América	
7. MCKINNEY	Byron	Estados Unidos de América	
8. OTTMER	Matt	Estados Unidos de América	
9. SOMMER	Jurg	Estados Unidos de América	
10. NUGENT	Karen	Reino Unido	
11. LI	Lian	China	
12. PETERS	Robert	Estados Unidos de América	
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Estados Unidos de América	Massachusetts	Groton	1. 37 Fawn Terrace Lane, Groton, Massachusetts 01450, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Pepperill	2. 86 Brookline Street, Pepperill, Massachusetts 01463, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Acton	3. 32 Carlton Drive, Acton, Massachusetts 01720, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	California	Rancho Santa Fe	4. PO Box 675486, Rancho Santa Fe, California 92067, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Boston	5. 101 Canal Street N907, Boston, Massachusetts 02114-1897, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Belmont	6. 3 Bayberry Lane, Belmont, Massachusetts 02478, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	California	San Diego	7. 7234 Shoreline Drive #156, San Diego, California 92122, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Newton	8. 112 Gibbs Street, Newton, Massachusetts 02459, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Wayland	9. 30 Hampshire Road, Wayland, Massachusetts 01778, Estados Unidos de América.
Reino Unido		Princes Risborough	10. Owlswick Farmhouse, Buckinghamshire Owlswick, Princes Risborough, HP279RH, Reino Unido.
Estados Unidos de América	Massachusetts	Lexington	11. 10 Carol Lane, Lexington, Massachusetts 02420, Estados Unidos de América.
Estados Unidos de América	Massachusetts	West Roxbury	12. 51 New Filed Street, West Roxbury, Massachusetts 02132, Estados Unidos de América.
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P .53.215
DIRECCIÓN		Calle 72 No 5-83 Piso 5to	
CIUDAD		Bogotá	
PAÍS		Colombia	
No. TELÉFONO		3264270	
E-MAIL		notificacionespatentes@lloredacamacho.com	
No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA			

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/506,015	11/07/08
2. Estados Unidos de América		US	61/522,647	11/08/11
3. Estados Unidos de América		US	61/541,561	11/09/30
4. Estados Unidos de América		US	61/569,158	11/12/09
5. Estados Unidos de América		US	61/586,443	12/01/13
6. Estados Unidos de América		US	61/622,789	12/04/11
7. Estados Unidos de América		US	61/657,641	12/06/08
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-006052	Fecha 20-01-2014	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)				
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P.53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica		Documentación Jurídica		
Solicitud Internacional en castellano				
1. ☒ Descripción N° de folios:		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 264		10. ☒ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 29		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

VER ANEXO CD

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA <i>RELACIÓN DE ANEXOS</i>		
Dependencia: 2020	Fecha: 2014 / 01 / 21 AAAA MM DD 2014	Recorrido:	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicator:	Planilla:		

PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA
RELACIÓN DE ANEXOS

Dependencia:

2020

Fecha: 2014, 01, 21,

AAAA	MM	DD
1	1	1
2	2	2
3	3	3
4	4	4
5	5	5
6	6	6
7	7	7
8	8	8
9	9	9
10	10	10
11	11	11
12	12	12
13	13	13
14	14	14
15	15	15
16	16	16
17	17	17
18	18	18
19	19	19
20	20	20
21	21	21
22	22	22
23	23	23
24	24	24
25	25	25
26	26	26
27	27	27
28	28	28
29	29	29
30	30	30
31	31	31
32	32	32
33	33	33
34	34	34
35	35	35
36	36	36
37	37	37
38	38	38
39	39	39
40	40	40
41	41	41
42	42	42
43	43	43
44	44	44
45	45	45
46	46	46
47	47	47
48	48	48
49	49	49
50	50	50
51	51	51
52	52	52
53	53	53
54	54	54
55	55	55
56	56	56
57	57	57
58	58	58
59	59	59
60	60	60
61	61	61
62	62	62
63	63	63
64	64	64
65	65	65
66	66	66
67	67	67
68	68	68
69	69	69
70	70	70
71	71	71
72	72	72
73	73	73
74	74	74
75	75	75
76	76	76
77	77	77
78	78	78
79	79	79
80	80	80
81	81	81
82	82	82
83	83	83
84	84	84
85	85	85
86	86	86
87	87	87
88	88	88
89	89	89
90	90	90
91	91	91
92	92	92
93	93	93
94	94	94
95	95	95
96	96	96
97	97	97
98	98	98
99	99	99
100	100	100

2014

Recorrido:

Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐

Radicador:

Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-11134	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Observaciones:

Observaciones:
Folio # 3 es C.D.
el CD ANEXO contienen un total de 11 Archivos:
11 Archivos en formato PDF los cuales
fueron procesados.

Nenny.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 006052

Bogotá D.C., Enero 20 de 2014 - 16:40:20

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

***** Soporte del Pago *****

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
RECIBO DE CA	999999999	5545	20/01/2014		3.971.000.00

***** Conceptos Pagados *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-011134- -00000-0000

Fecha: 2014-01-21 16:21:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Enero 20 de 2014 - 16:40:21

601

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-011134- -00000-0000

Fecha: 2014-01-21 16:21:12 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
- Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

- ☒ Indicación que se solicita una PCT
- ☒ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☒ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☒ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
- Completa ☒ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita Diseño industrial
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas
- Completa ☐ Incompleta ☐

POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS DEL FACTOR VIII, Y SUS MÉTODOS DE USO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos de administrar el Factor VIII (FVII procesado, FVII de cadena simple, o una combinación de ellos); métodos de administrar Factor VIII que comprende polipéptidos quiméricos e híbridos; Factor VIII que comprende polipéptidos quiméricos e híbridos; polinucleótidos que codifican tales polipéptidos quiméricos e híbridos; células que comprenden tales polinucleótidos; y métodos de producir tales polipéptidos quiméricos e híbridos que usan tales células.

SECTOR: Industria farmacéutica, composiciones y métodos para la administración de polipeptidos quiméricos e híbridos del factor VIII, útil en el tratamiento de la hemofilia A.

POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS DEL FACTOR VIII, Y SUS MÉTODOS DE USO

Campo de la Invención

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

Antecedentes de la técnica

La hemofilia A es un trastorno de sangrado ligado a X causado por mutaciones y/o supresiones en el gen del Factor VIII (FVIII) que produce una deficiencia de la actividad de FVIII (Peyvandi, F. *et al. Haemophilia* 12:82-89 (2006)). La enfermedad se caracteriza por hemorragia espontánea y excesivo sangrado después de la trauma. Con el tiempo, el sangrado repetido en los músculos y articulaciones, que a menudo comienza en la niñez temprana, produce la artropatía hemofílica y daño articular irreversible. Este daño es progresivo y puede llevar a movilidad de articulaciones gravemente limitada, atrofia muscular y dolor crónico (Rodríguez-Merchan, E.C., *Semin. Thromb. Hemost.* 29:87-96 (2003), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

El dominio A2 es necesario para la actividad procoagulante de la molécula del Factor VIII. Los estudios muestran que el factor VIII porcino tiene actividad procoagulante seis veces mayor que el Factor VIII humano (Lollar, P., y E. T. Parker, *J. Biol. Chem.* 266:12481-12486 (1991)), y que la diferencia en la actividad coagulante entre el factor VIII humano y porcino parece estar basada en una diferencia de secuencia de los aminoácidos entre uno o más residuos de los dominios A2 humanos y porcinos (Lollar, P., *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267:23652-23657 (1992)), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

El tratamiento de la hemofilia A es por la terapia de reemplazo dirigida a la restauración de la actividad del 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), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Existen productos del FVIII derivado de plasma y recombinante disponibles para tratar episodios de sangrado a demanda o para evitar la aparición de episodios de sangrado por tratamiento profiláctico. Sobre la base de la vida media corta de estos productos, por ejemplo, 8-12 horas, sin embargo, los regímenes de tratamiento requieren la administración de inyecciones intravenosas frecuentes. Tal administración frecuente es dolorosa e inconveniente.

La reducción de la mortalidad, prevención del daño articular y mejora de calidad de vida han sido importantes logros debido al desarrollo del FVIII derivado

de plasma y recombinante. La protección prolongada del sangrado puede representar otro avance clave en el tratamiento de pacientes de hemofilia A. Sin embargo, hasta la fecha, no se han desarrollado productos que permitan la protección hemostática prolongada. En consecuencia, aún se necesitan mejores métodos de tratar la hemofilia debido a la deficiencia del factor VIII que sean más tolerables, de acción más prolongada y más efectivos que las terapias actuales.

BREVE SÍNTESIS DE LA INVENCION

La presente invención proporciona métodos de administrar Factor VIII; métodos de administrar polipéptidos quiméricos que comprenden Factor VIII híbridos de tales polipéptidos quiméricos; polipéptidos quiméricos que comprenden Factor VIII híbridos de tales polipéptidos quiméricos; polinucleótidos que codifican tales polipéptidos quiméricos e híbridos; células que comprenden tales polinucleótidos; y métodos de producir tales polipéptidos quiméricos e híbridos usando tales células.

La presente invención proporciona un método de administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido quimérico del Factor VIII, por ejemplo, un polipéptido quimérico del Factor VIII-Fc, con un intervalo de dosis al menos aproximadamente uno y medio veces más largo que el intervalo de dosis requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sin la porción de Fc.

El intervalo de dosis 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 dosis necesario para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, la porción de Fc. El intervalo de dosis puede ser al menos aproximadamente uno y medio, 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 dosis requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, la porción de Fc. El intervalo de dosis puede ser aproximadamente cada cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, oatorce días o más.

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

La presente invención también proporciona un método de administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido quimérico del Factor VIII, por ejemplo, un polipéptido

quimérico del Factor VIII-Fc, para obtener un área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo (AUC) al menos aproximadamente una y un cuarto veces mayor que la AUC obtenida por una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII (un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sin la porción de Fc.

La presente invención también proporciona un método de administrar el Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido que comprende un Factor VIII y un Fc con un intervalo de dosis de aproximadamente cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, o catorce días o más.

Los métodos de la invención se pueden practicar en un sujeto que necesita un tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

El tratamiento a demanda incluye el tratamiento para un episodio de sangrado, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma cerebral (trauma cerebral), sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneana, hemorragia intraabdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado en sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, o sangrado en la vaina de iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, tratamiento perioperatorio, o tratamiento para cirugía. Tales cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

Para el tratamiento a demanda, el intervalo de dosis de dicho polipéptido quimérico 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.

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

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

El sujeto en los métodos de la invención es un sujeto humano. La determinación del intervalo de dosis y AUC se puede llevar a cabo en un sujeto único o en una población de sujetos.

El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) es un Factor VIII humano. El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede tener una supresión completa o parcial del dominio B.

El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos 90% o 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 4 a 2351 de la SEQ ID NO: 6). El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO: 6).

El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser al menos 90% o 95% idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO: 6). El Factor VIII (o porción del Factor VIII de un polipéptido quimérico) puede ser idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO: 6).

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

El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO: 2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO: 2). El polipéptido quimérico puede comprender una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO: 2) o idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO: 2).

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

El segundo polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4). El segundo polipéptido puede comprender o consistir esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

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

La invención también proporciona los anteriormente descritos polipéptidos quiméricos e híbridos mismos, polinucleótidos que los codifican, una célula embrionaria humana cultivada que comprende los polinucleótidos, y métodos de producir tales polipéptidos quiméricos e híbridos, y los polipéptidos producidos por tales métodos.

La presente invención también proporciona un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII que comprende una porción del Factor VIII y una segunda porción, donde la porción del Factor VIII es el Factor VIII procesado que comprende dos cadenas, una primera cadena que comprende una cadena pesada y una segunda cadena que comprende una cadena liviana, donde dicha primera cadena y dicha segunda cadena se asocian con un enlace metálico. Por ejemplo, al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

Además, la presente invención incluye un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, donde la porción del Factor VIII es el Factor VIII de cadena simple. En un aspecto, el Factor VIII de cadena simple puede contener un sitio de procesamiento intracelular intacto. En una forma de realización, al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, o aproximadamente 25% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple. En otra forma de realización, al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%,

aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, oaproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple. En otro aspecto, el FVII de cadena simple no contiene un sitio de procesamiento intracelular. Por ejemplo, el SCFVIII comprende una sustitución mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645, una sustitución mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648, o una sustitución mutación en las posiciones de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa. 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 formas de realización, la sustitución mutaciónes un aminoácido diferente de arginina, por ejemplo, alanina.

En algunas formas de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII a un nivel comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc, cuando la actividad del Factor VIII se mide in vitro por un ensayo cromogénico. En otras formas de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc. En aún otras formas de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc. En ciertas formas de realización, el Factor VIII de cadena simple en el polipéptido quimérico se inactiva con la Proteína C activada a un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado. En aún otras formas de realización, el Factor VIII de cadena simple del polipéptido quimérico tiene una tasa de interacción del Factor IXa comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado. En formas de realización adicional, el Factor VIII de cadena simple en el polipéptido quimérico se une al Factor de von Willebrand a un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

La presente invención también incluye una composición que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, donde al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%,

aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de dicho polipéptido comprende a porción del Factor VIII, que es el Factor VIII de cadena simple, y una segunda porción, donde dicho Factor VIII de cadena simple es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6). En una forma de realización, la segunda porción puede ser un Fc. En otra forma de realización, el polipéptido está en la forma de un híbrido que comprende a segundo polipéptido, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en un Fc. En otras formas de realización, el polipéptido tiene una vida media al menos 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 a un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII.

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

La presente invención también se dirige a un método de prevenir, disminuir o tratar un episodio de sangrado en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína del Factor VIII (FVIII) de acción prolongada, donde el sujeto expresa un alto nivel del Factor de von Willebrand (VWF) en plasma. En una forma de realización, se ha identificado que el sujeto expresa un alto nivel de VWF en plasma. La presente invención también se dirige a un método de prevenir, disminuir o tratar a episodio de sangrado en un sujeto que comprende: (a) identificar un sujeto que tiene altos niveles de VWF por la medición del nivel de VWF en la plasma de dicho sujeto, donde un nivel de VWF de al menos aproximadamente 100 IU/dL identifica el sujeto que tiene un alto nivel de VWF; y (b) administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína de FVIII de acción prolongada.

En una forma de realización, el sujeto es un ser humano. En otra forma de realización, el sujeto es un sujeto pediátrico. En otra forma de realización, el sujeto tiene hemofilia A.

En una forma de realización, el alto nivel de VWF es al menos aproximadamente 100 IU/dL. En otra forma de realización, el alto nivel de VWF está entre aproximadamente 100 IU/dL y aproximadamente 200 IU/dL. En otra forma de realización, el alto nivel de VWF es aproximadamente 110 IU/dL, aproximadamente 120 IU/dL, aproximadamente 130 IU/dL, aproximadamente 140 IU/dL, aproximadamente 150 IU/dL, aproximadamente 160 IU/dL,

aproximadamente 170 IU/dL, aproximadamente 180 IU/dL, aproximadamente 190 IU/dL, o aproximadamente 200 IU/dL.

En una forma de realización el sujeto tiene el serotipo sanguíneo A, B, o AB.

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

En una forma de realización, la cantidad efectiva de proteína de FVIII de acción prolongada que se administra es al menos aproximadamente 20 IU/kg, al menos aproximadamente 25 IU/kg, al menos aproximadamente 30 IU/kg, al menos aproximadamente 35 IU/kg, al menos aproximadamente 40 IU/kg, al menos aproximadamente 45 IU/kg, al menos aproximadamente 50 IU/kg, al menos aproximadamente 55 IU/kg, al menos aproximadamente 60 IU/kg, al menos aproximadamente 65 IU/kg, al menos aproximadamente 70 IU/kg, al menos aproximadamente 75 IU/kg, al menos aproximadamente 80 IU/kg, al menos aproximadamente 85 IU/kg, o al menos aproximadamente 90 IU/kg. En otra forma de realización, la cantidad efectiva es al menos aproximadamente 65 IU/kg a al menos aproximadamente 90 IU/kg. En otra forma de realización, la cantidad efectiva es 80 IU/kg.

En una forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada se administra cada 72 horas o más. En otra forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada se administra aproximadamente una vez por semana o más. En otra forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada se administra aproximadamente una vez cada 10 días, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 15 días, aproximadamente una vez cada 20 días, aproximadamente una vez cada tres semanas, aproximadamente una vez cada 25 días, aproximadamente una vez cada cuatro semanas, o aproximadamente una vez cada mes.

En una forma de realización, el FVIII de acción prolongada se administra a una dosis de 80 IU/kg una vez cada 72 horas. En una forma de realización adicional, el FVIII de acción prolongada se administra a una dosis de 80 IU/kg una vez cada 72 horas a un sujeto pediátrico.

En una forma de realización, la administración de la proteína de FVIII de acción prolongada resuelve más del 5-20%, más del 5-15%, más del 5-10%, más del 10-20%, o más del 10-15% de episodios de sangrado. En una forma de realización, el nivel mínimo del Factor VIII:C plasmático en los sujetos se mantiene por encima de 1-3 o 3-5 IU/dl. En una forma de realización, la administración previene un episodio de sangrado en el sujeto. En otra forma de realización, un episodio de sangrado es espontáneo. En otra forma de realización, la administración resuelve más de 80-100%, más de 80-90%, más de 85-90%, más de 90-100%, más de 90-95%, o más de 95-100% de episodios de sangrado.

En una forma de realización, la administración mantiene la homeostasis en la población de los sujetos que necesita una cirugía. En otra forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada se administra antes, durante o después de la cirugía. En otra forma de realización, la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular. En otra forma de realización, la cirugía es una cirugía de urgencia.

En una forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media más larga que un polipéptido que consiste en FVIII. En otra forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada está pegilada, hesilada, o polisialilada.

En una forma de realización, la proteína de FVIII de acción prolongada es una proteína quimérica que comprende a porción de FVIII y una segunda porción. En otra forma de realización, la segunda porción es una región de Fc, albúmina, secuencia PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal de 28 aminoácidos (CTP) de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de estas. En otra forma de realización, la segunda porción se fusiona al extremo amino-terminal o el extremo carboxi-terminal de la porción de FVIII. En otra forma de realización, la segunda porción se inserta entre dos aminoácidos en la porción de FVIII. En otra forma de realización, la proteína quimérica es un híbrido de monómero y dímero de FVIII-Fc. En otra forma de realización, la porción de FVIII es una cadena simple. En otra forma de realización, la porción de FVIII comprende una cadena pesada y una cadena liviana. En otra forma de realización, la porción de FVIII comprende el Factor VIII de

longitud completa, factor VIII maduro, o factor VIII con una supresión completa o parcial del dominio B. En otra forma de realización, la porción de FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6. En otra forma de realización, la porción de FVIII comprende aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6. En otra forma de realización, el polipéptido quimérico comprende una región que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6. En otra forma de realización, la segunda porción comprende aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6. En otra forma de realización, el FVIII de acción prolongada polipéptido se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

La invención también proporciona un método de tratar un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado, que comprende medir la vida media de FVIII-Fc en dicho sujeto, donde la vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc en un sujeto normal indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado, y administración de un polipéptido de FVIII-Fc en una cantidad efectiva y a un intervalo de dosis de al menos 3 días.

La invención también proporciona un método de tratar un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado, que comprende administrar un polipéptido de FVIII-Fc en una cantidad efectiva y con un intervalo de dosis de al menos 3 días a un sujeto, donde la vida media de FVIII-Fc en dicho sujeto es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

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

La invención también proporciona un método de tratar un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado, que comprende medir la vida

mediadeunFVIII de acción corta administrado a dicho sujeto, dondeunavida media que es al menosaproximadamente 1,2veces mayor que la vida mediadedichoFVIII de acción cortaen un sujetoque tiene niveles de VWF promedio indica que el sujetoes un candidato para la dosificación de intervalo prolongado, y administración de un polipéptido de FVIII-Fc de acción prolongadaen una cantidad efectivayen un intervalo de dosisdeal menos 3 días. En una forma de realización, la vida mediadelFVIII de acción cortaen dicho sujetoes al menosaproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9,2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 vecesmayor que la vida mediadeunFVIII de acción cortacuando se administra a un sujetoque tieneniveles promedio de VWF.

En una forma de realización, el sujetoes un ser humano. En otra forma de realización, el sujetoes un sujeto pediátrico. En otra forma de realización, el sujeto tienehemofilia A. En otra forma de realización, el sujetotiene elserotipo sanguíneo A, B, o AB.

En una forma de realización, el FVIII de acción prolongada-Fc se administraen una cantidad efectiva que esal menosaproximadamente 20 IU/kg, al menosaproximadamente 25 IU/kg, al menosaproximadamente 30 IU/kg, al menosaproximadamente 35 IU/kg, al menosaproximadamente 40 IU/kg, al menosaproximadamente 45 IU/kg, al menosaproximadamente 50 IU/kg, al menosaproximadamente 55 IU/kg, al menosaproximadamente 60 IU/kg, al menosaproximadamente 65 IU/kg, al menosaproximadamente 70 IU/kg, al menosaproximadamente 75 IU/kg, al menosaproximadamente 80 IU/kg, al menosaproximadamente 85 IU/kg, oal menosaproximadamente 90 IU/kg. En otra forma de realización, la cantidad efectiva esal menosaproximadamente 65 IU/kg to al menosaproximadamente 90 IU/kg.

En una forma de realización, la cantidad efectivadela proteína de FVIII-Fcse administraaproximadamenteuna vez cadasemana, aproximadamenteuna vez cada 10 días, aproximadamenteuna vez cadadossemanas, aproximadamenteuna vez cada 15 días, aproximadamenteuna vez cada 20 días, aproximadamenteuna vez cadatressemanas, aproximadamenteuna vez cada 25 días, aproximadamenteuna vez cadacuatrosemanas, oaproximadamenteuna vez cadames.

En una forma de realización, la administraciónresuelvemás de 5-20%, más de 5-15%, más de 5-10%, más de 10-20%, omás de 10-15% deepisodios de sangrado. En una forma de realización, el nivel mínimodelFactor VIII:C plasmáticoen los sujetos se mantiene por encima de 1-3 o 3-5 IU/dl.

En una forma de realización, la administraciónprevieneunepisodio de sangradoen el sujeto. En una forma de realización, el episodio de sangradoes espontáneo. En una forma de realización, la administraciónresuelvemás de 80-100%, más de 80-90%, más de 85-90%, más de 90-100%, más de 90-95%, omás de 95-100% deepisodios de sangrado. En una forma de realización, la

administración mantiene la homeostasis de la población de los sujetos que necesitan una cirugía. En una forma de realización, la proteína de FVIII-Fc se administra antes, durante o después de la cirugía. En una forma de realización, la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular. En una forma de realización, la cirugía es una cirugía de urgencia.

En una forma de realización, la proteína de FVIII-Fc tiene una vida media más larga que un polipéptido que consiste en FVIII. En una forma de realización, la proteína de FVIII-Fc está pegilada, hesilada, o polisialilada. En una forma de realización, la proteína de FVIII-Fc es un híbrido de monómero y dímero de FVIII-Fc. En una forma de realización, la porción de FVIII es una cadena simple. En una forma de realización, la porción de FVIII comprende una cadena pesada y una cadena liviana. En una forma de realización, la porción de FVIII comprende el Factor VIII de longitud completa, factor VIII maduro, o factor VIII con una supresión completa o parcial del dominio B. En una forma de realización, la porción de FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6. En una forma de realización, la porción de FVIII comprende aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6. En una forma de realización, la segunda porción del polipéptido quimérico comprende una región que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6. En una forma de realización, la segunda porción comprende aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6.

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

La invención también proporciona un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado con un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir los niveles de expresión del VWF plasmático, donde un nivel de expresión de VWF de al menos 100 IU/dL indica que el sujeto es un candidato para dosificación de intervalo prolongado usando un polipéptido de FVIII de acción prolongada. En una forma de realización, el nivel de expresión de VWF es al menos aproximadamente 110 IU/dL, aproximadamente 120 IU/dL, aproximadamente 130 IU/dL, aproximadamente 140 IU/dL, aproximadamente 150 IU/dL, aproximadamente 160 IU/dL, aproximadamente 170 IU/dL,

aproximadamente 180 IU/dL, aproximadamente 190 IU/dL, o aproximadamente 200 IU/dL.

La invención también proporciona un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la administración de un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir la vida media de FVIII-Fc en dicho sujeto, donde una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles de VWF promedio indica que el sujeto es un candidato para la administración de un polipéptido de FVIII de acción prolongada. En una forma de realización, la vida media de FVIII-Fc es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

La invención también proporciona un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la administración de un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir la vida media de FVIII de acción corta en dicho sujeto, donde una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII de acción corta cuando se administra a un sujeto que tiene niveles de VWF promedio indica que el sujeto es un candidato para la administración de un polipéptido de FVIII de acción prolongada. En una forma de realización, la vida media es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS/FIGURAS

FIG. 1. Representación esquemática del monómero rFVIII-Fc.

FIG. 2A-E. A-B. Análisis de SDS-PAGE no reductor y reductor de rFVIII-Fc (procesado o cadena simple). C. Estructura de rFVIII-Fc analizada por LC/UV y LC/MS. D. Cromatograma de corriente iónica total (TIC) (mapa LC/MS) de rFVIII-Fc después de la escisión de trombina. Los productos de digestión principales están indicados. E. El espectro de masa de deconvolución del dominio A2 de rFVIII-Fc y rBDDFVIII. Se indican los productos principales y sus masas cognadas, correspondientes a un dominio A2 escindido por trombina (S373 a R740) y dos productos truncados, S373 a Y729 y S373 a E720.

FIG. 3A-C. Caracterización bioquímica de rFVIII-Fc: A. Activación de Factor X en función de la concentración de vesícula de fosfolípidos; B. Activación de Factor X en función de la concentración de FX; C. Activación del Factor X en función de la concentración del Factor IXa.

FIG4.Activación del Factor X después de la escisión por la proteína C activada.

FIG. 5A-D. Perfiles de actividad de FVIII media del grupo observado ($\pm$ SE) versus tiempo, clasificados por nivel de dosis, agrupados por compuesto (ensayo de una etapa, 25 IU/kg (A) o 65 IU/kg (B)); y ensayo cromogénico, 25 IU/kg (C) o 65 IU/kg (D)) versus tiempo.

FIGS. 6A-B. Perfiles de actividad de FVIII media del grupo observado ($\pm$ SE) versus tiempo, agrupado por nivel de dosis y compuesto (ensayo de una etapa (A) o ensayo cromogénico (B)) versus time.

FIGS. 7(A)-(C). Eficacia *in vivo* de FVIII:Fc de cadena única en modelo de transección de vena caudal de ratón HemA. (A) Las dosis de rFVIII:Fc de cadena única se muestran como cuadrados y las dosis de rFVIII:Fc procesado se muestran como círculos. (B) Porcentaje de supervivencia después de la transección de la vena caudal de 4,6 μ g/kg, 1,38 μ g/kg, y 0,46 μ g/kg de rFVIII:Fc o rFVIII:Fc SC. (C) Porcentaje de no sangrantes después de la transección de la vena caudal de 4,6 μ g/kg (círculo negro o triángulo invertido), 1,38 μ g/kg (triángulo o rombo), y 0,46 μ g/kg (cuadrado y círculo gris) de rFVIII:Fc o rFVIII:Fc SC, respectivamente.

FIG. 8. Diseño del estudio. La Fig. 8 representa el diseño del estudio del estudio de fase 1/2a, que fue un diseño secuencia de escalamiento de dosis para evaluar la seguridad y PK de rFVIII:Fc en comparación con ADVATE[®] después de una dosis intravenosa única de 25 IU/kg (Cohorte A de dosis baja A) o 65 IU/kg (Cohorte B de dosis alta).

FIG. 9. Correlación de actividad de rFVIII en ensayos de una etapa (aPTT) y cromogénico. Correlación entre los resultados de coagulación de una etapa (aPTT) y cromogénico que miden actividad de FVIII (IU/mL) después de la inyección de ADVATE[®] (◆) y rFVIII:Fc (◻).

FIG. 10(A)-(B). Perfiles farmacocinéticos de actividad de FVIII plasmático medio del grupo para las cohortes de dosis baja y dosis alta. Las curvas de actividad de FVIII plasmático (ensayo de una etapa aPTT) versus tiempo después de una inyección intravenosa única de rFVIII:Fc o ADVATE[®] se muestran para (A) 25 IU/kg (cohorte de dosis baja, n=6); y (B) 65 IU/kg (cohorte de dosis alta), n=10 [ADVATE[®]]; n=9 [rFVIII:Fc]. Los resultados presentados son media del grupo $\pm$ error estándar de la media (SEM).

FIGS. 11(A)-(B). Efecto de los niveles de antígeno VWF sobre CI y $t_{1/2}$ de la actividad de FVIII después de la inyección de ADVATE[®] o rFVIII:Fc. Correlación entre niveles de antígeno de VWF y (A) el CI ajustado por peso de ADVATE[®] ($R^2=0,5415$ y $p=0,0012$) y rFVIII:Fc ($R^2=0,5492$ y $p=0,0016$); y (B) el $t_{1/2}$ de ADVATE[®] ($R^2=0,7923$ y $p<0,0001$) y rFVIII:Fc ($R^2=0,6403$ y $p=0,0003$). Cada punto representa un sujeto individual.

FIG. 12(A)-(B). Resultados de ROTEM® en sangre entera Ex Vivo para sujetos individuales después de la inyección de ADVATE® o rFVIII Fc. La sangre se extrajo de los sujetos antes y después del tratamiento en dosis de (A) 25 IU/kg ADVATE® y rFVIII Fc; y (B) 65 IU/kg ADVATE® y rFVIII Fc en puntos de tiempo especificados. Se determinó el tiempo de coagulación por NATEM iniciado con Ca^{++} en un instrumento ROTEM®. Los resultados presentados son media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de lecturas del canal por triplicado para cada muestra individual.

FIG. 13(A)-(B). Comparación de actividad en el ensayo de generación de trombina (TGA). (A) rFVIII Fc SC mostró un potencial de trombina endógeno reducido (ETP), y (B) un pico de trombina reducido en comparación con rFVIII Fc.

FIG. 14(A)-(C): Datos ROTEM in vitro. Los resultados de ROTEM (NATEM) (Media $\pm$ SD) para diversas concentraciones de XYNTHA, ADVATE y rFVIII Fc adicionadas en la sangre entera combinada de los ratones Hema sin exposición previa. (A). Tiempo de coagulación promedio (CT) (Fig. 14A), (B). tiempo de formación del coágulo (CFT), y (C). ángulo alfa.

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

FIG. 16(A)-(E): Evaluación en tiempo real de la interacción de rFVIII Fc y rFVIII Fc cadena simple (SC) con vWF, y la evolución en tiempo real de la liberación mediada por trombina de rFVIII Fc y rFVIII Fc de vWF. (A). SEI análisis de resonancia del plasmón superficial (SPR) de rFVIII Fc y afinidad de rFVIII Fc SC por vWF. Se ilustra la curva de unión y el modelo de interacción de ajuste 1:1. El eje x muestra el tiempo en segundos y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). (B). Sensogramas con referencia sustraída de la liberación mediada por trombina de rFVIII Fc activada, rFVIII Fc SC, y restos de Fc que carecen de rFVIII con dominio B suprimido (rBDD FVIII) a 25° C (parte superior) y 37° C (parte inferior). El eje x muestra el tiempo en segundos y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). Las curvas individuales indican la respuesta a diferentes concentraciones de α -trombina. La curva más superior es la respuesta a 0 U/mL de α -trombina, y cada curva posterior corre en orden para las concentraciones de α -trombina de 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,3, 2,5, 5, 10, y 20 U/mL. (C). Sensorgramas sustraídos la referencia doble de la fase de liberación mediada por trombina para rFVIII Fc, rFVIII Fc SC, y rBDD FVIII a 25° C (superior) y 37° C (inferior). El eje x muestra el tiempo en segundos y el eje y muestra en unidades de respuesta (RU). Las curvas individuales indican la respuesta a diferentes concentraciones de α -trombina. La curva más superior es la

respuesta a 0 U/mL de α -trombina, y cada línea posterior corre en orden de las concentraciones de α -trombina de 0,005, 0,01, 0,02, 0,04, 0,08, 0,16, 0,31, 0,63, 1,3, 2,5, 5,0, 10, y 20 U/mL. (D). Tasa de liberación mediada por trombina en función del tiempo para rFVIII_{FC}, rFVIII_{FC} SC, y rBDD FVIII_{lat} a 25° C (parte superior) y 37° C (parte inferior). El eje x muestra el tiempo en segundos y el eje y muestra la respuesta en unidades de respuesta (RU). Las curvas individuales indican la respuesta a diferentes concentraciones de α -trombina. La curva más superior es la respuesta a 20 U/mL α -trombina, y cada curva posterior corre en orden para las concentraciones de α -trombina de 10, 5, 2,5, 1,3, 0,63, 0,31, 0,16, 0,08, 0,04, 0,02, 0,01, y 0,005 U/mL. (E). La tasa de liberación mediada por trombina pico en función de la concentración de trombina para rFVIII_{FC}, rFVIII_{FC} SC, y rBDD FVIII_{lat} a 25° C (parte superior) y 37° C (parte inferior). La EC₅₀ es la concentración efectiva máxima media. El eje x es la concentración de α -trombina en U/mL y el eje y es la tasa de liberación máxima en RU/segundos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un método de tratar Hemofilia A con el Factor VIII (procesado, cadena simple, o una combinación de estos) usando un intervalo de dosis más largo y/o AUC mayor que sea posible con los productos del Factor VIII conocidos. La presente invención también proporciona mejores polipéptidos quiméricos del Factor VIII y métodos de producción.

El tratamiento de la hemofilia A es por terapia de reemplazo que se dirige a la restauración 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.* 344:1773-9 (2001), incorporado por referencia en la presente en su totalidad). Existen productos de FVIII derivados de plasma y recombinantes disponibles para tratar los episodios de sangrado a demanda para prevenir la aparición de episodios de sangrado por el tratamiento profiláctico. Sobre la base de la vida media corta de estos productos (8-12 horas) (White G.C., *et al.*, *Thromb. Haemost.* 77:660-7 (1997); Morfini, M., *Haemophilia* 9 (supl 1):94-99; discusión 100 (2003)), los regímenes de tratamiento requieren la administración intravenosa, comúnmente dos a tres veces por semana para la profilaxis y una a tres veces por día para el tratamiento a demanda (Manco-Johnson, M.J., *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 357:535-544 (2007)), cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Tal administración frecuente es dolorosa e inconveniente.

La presente invención proporciona un método de administrar Factor VIII a un sujeto humano que lo necesita (por ejemplo, paciente humano), que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido quimérico del Factor VIII, por ejemplo, un polipéptido quimérico del Factor VIII-Fc, o un híbrido de tal polipéptido con un intervalo de dosis al menos aproximadamente uno y medio veces más largo que el intervalo de dosis requerido para una

dosisequivalentededicho Factor VIII sinla porción no Factor VIII (un polipéptidoque consiste endicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sinla porción de Fc. La presente invención también se dirige a un método deaumentarel intervalo de dosisde la administración del Factor VIII en un sujeto que lo necesitaque comprende administrar el polipéptido quimérico del Factor VIII.

El intervalo de dosis puede ser al menosaproximadamenteuno y medio aseisveces más largo, uno y medio acincoveces más largo, uno y medio acuatroveces más largo, uno y medio atresveces más largo, ouno y medio adosveces más largo, que el intervalo de dosis requerido para una dosis equivalentededicho Factor VIII sinla porción no Factor VIII (un polipéptidoque consiste endicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sinla porción de Fc.El intervalo de dosis puede ser al menosaproximadamenteuno y medio, dos, dosymedio, tres, tresymedio, cuatro, cuatroymedio, cinco, cincoymedioo seisveces más largo que el intervalo de dosis requerido para una dosis equivalentededicho Factor VIII sinla porción no Factor VIII (un polipéptidoque consiste endicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sinla porción de Fc.El intervalo de dosis may be aproximadamentecadatres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, ocatorcedías o más.

El intervalo de dosis puede ser al menosaproximadamenteuno y medio a 5, uno y medio, 2, 3, 4, o 5 días o más.

La presente invención también proporciona un método de administrar Factor VIII a un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto a dosis terapéuticade un polipéptido quimérico del Factor VIII, por ejemplo, un polipéptido quimérico del Factor VIII-Fc,oun híbrido de tal polipéptidopara obtener un área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo (AUC) al menosaproximadamenteuna y un cuarto veces más dela AUC obtenida por una dosis equivalentededicho Factor VIII sinporción no Factor VIII (un polipéptidoque consiste endicha porción del Factor VIII), por ejemplo, sinla porción de Fc.La presente invención en consecuencia incluye un método deaumentar o extender la AUC de actividad del Factor VIII en un paciente humano que lo necesitaque comprende administrar el polipéptido quimérico del Factor VIII.

La presente invención también proporciona un método de administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto a dosis terapéuticade un polipéptidoque comprendea Factor VIII y unFcoun híbrido de tal polipéptidocon un intervalo de dosisde aproximadamentecadatres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, ocatorcedías o más.

Los métodos de la invención se pueden practicar en un sujeto que necesita tratamiento profilácticoootratamiento a demanda.

"Administración" como se usa en la presente, significa dar un polipéptido del Factor VIII farmacéuticamente aceptable de la invención a un sujeto por medio de

unavía farmacéuticamente aceptable. Las vías de administración pueden ser intravenosas, por ejemplo, inyección intravenosa e infusión intravenosa. Las vías de administración adicionales incluyen, por ejemplo, administración subcutánea, intramuscular, oral, nasal, y pulmonar. Los polipéptidos quiméricos y las proteínas del híbrido se pueden administrar como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

"Área bajo la curva de la concentración plasmática versus tiempo (AUC)", como se usa en la presente, es la misma del término de la técnica de farmacología y se basa en la tasa y grado de absorción del Factor VIII después de la administración. AUC se determina durante un período de tiempo especificado, tal como 12, 18, 24, 36, 48, o 72 horas, o durante infinito usando una extrapolación basada en la pendiente de la curva. A menos que se especifique de otro modo en la presente, se determina AUC para infinito. La determinación de la AUC se puede llevar a cabo en un solo sujeto, o en una población de sujetos para la cual se calcula el promedio.

Un "dominio B" del Factor VIII, como se usa en la presente, es el mismo dominio B conocido en la técnica que se define por la identidad de la secuencia de aminoácidos interna y los sitios de escisión proteolítica con trombina, por ejemplo, residuos Ser741-Arg1648 del Factor VIII humano de longitud completa. Los otros dominios del Factor VIII humano están definidos por los siguientes residuos de aminoácidos: A1, residuos Ala1-Arg372; A2, residuos Ser373-Arg740; A3, residuos Ser1690-Ile2032; C1, residuos Arg2033-Asn2172; C2, residuos Ser2173-Tyr2332. La secuencia A3-C1-C2 incluye los residuos Ser1690-Tyr2332. La secuencia restante, residuos Glu1649-Arg1689, usualmente se denomina como el péptido de activación del Factor VIII de cadena liviana. Las ubicaciones de los límites para todos los dominios, que incluyen los dominios B, para el factor VIII porcino, murino y canino también son conocidos en la técnica. En una forma de realización, el dominio B del Factor VIII está suprimido ("factor VIII con dominio B suprimido" o "BDD FVIII"). Un ejemplo de un BDD FVIII es REFACTO® (BDD FVIII recombinante), que tiene la misma secuencia que la porción del Factor VIII de la secuencia de la Tabla 2A(i) (aminoácidos 1 a 1457 o 20 a 1457 de la SEQ ID NO: 2). En otra forma de realización, el Factor VIII con dominio B suprimido contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto, que corresponde a Arginina en el residuo 754 de Factor VIII con dominio B suprimido, que corresponde a residuo de Arginina 773 de la SEQ ID NO: 2, o residuo 1648 de Factor VIII de longitud completa, que corresponde a residuo de Arginina 1667 de la SEQ ID NO: 6. Los números de residuo de la secuencia usados en la presente sin referencia a ninguno de los Números de SEQ ID corresponden a la secuencia del Factor VIII sin la secuencia del péptido señal (19 aminoácidos) a menos que se indique lo contrario. Por ejemplo, S743/Q1638 del Factor VIII de longitud

completa corresponde a S762/Q1657 de la SEQ ID NO: 6 debido a la secuencia del péptido señal de 19 aminoácidos. En otras formas de realización, el Factor VIII con dominio B suprimido 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 aminoácido correspondiente a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa. En algunas formas de realización, 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 formas de realización, la sustitución o mutación es un aminoácido diferente de arginina, por ejemplo, alanina.

Un "factor VIII con dominio B suprimido" puede tener las supresiones completas o parciales descritas en las Patentes U.S. Nros. 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, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En algunas formas de realización, una secuencia del factor VIII con dominio B suprimido de la presente invención comprende cualquiera de las supresiones descritas en la columna 4, línea 4 a columna 5, línea 28 y ejemplos 1-5 de Patente U.S. No. 6.316.226 (también en US 6.346.513). En algunas formas de realización, un factor VIII con dominio B suprimido de la presente invención tiene una supresión descrita en la columna 2, líneas 26-51 y ejemplos 5-8 de Patente U.S. No. 5.789.203 (también US 6.060.447, US 5.595.886, y US 6.228.620). En algunas formas de realización, un factor VIII con dominio B suprimido tiene una supresión descrita en la columna 1, líneas 25 a columna 2, línea 40 de la Patente U.S. No. 5.972.885; columna 6, líneas 1-22 y ejemplo 1 de Patente U.S. No. 6.048.720; columna 2, líneas 17-46 de Patente U.S. No. 5.543.502; columna 4, línea 22 a columna 5, línea 36 de Patente U.S. No. 5.171.844; columna 2, líneas 55-68, figure 2, y ejemplo 1 de la Patente U.S. No. 5.112.950; columna 2, línea 2 a la columna 19, línea 21 y tabla 2 de Patente U.S. No. 4.868.112; columna 2, línea 1 a columna 3, línea 19, columna 3, línea 40 a columna 4, línea 67, columna 7, línea 43 a la columna 8, línea 26, y columna 11, línea 5 a la columna 13, línea 39 de Patente U.S. No. 7.041.635; o columna 4, líneas 25-53, de Patente U.S. No. 6.458.563. En algunas formas de realización, un factor VIII con dominio B suprimido tiene una supresión de la mayor parte del dominio B, pero también contiene las secuencias amino terminal del dominio B que son esenciales para el procesamiento proteolítico *in vivo* del producto de traducción primario en dos cadenas del polipéptido (es decir, sitio de procesamiento intracelular), que se describe en WO 91/09122, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. En algunas formas de

realización, unfactor VIII con dominio B suprimidose construye con una supresión de aminoácidos 747-1638, i.e., prácticamente una supresión completa del dominio B. Hoebein R.C., *et al. J. Biol. Chem.* 265 (13): 7318-7323 (1990), incorporada en la presente por referencia en su totalidad. Unfactor VIII con dominio B suprimido también puede contener una supresión de aminoácidos 771-1666 o aminoácidos 868-1562 del factor VIII. Meulien P., *et al. Protein Eng.* 2(4): 301-6 (1988), incorporada en la presente por referencia en su totalidad. Las supresiones adicionales del dominio B que son parte de la invención incluyen, por ejemplo: supresión de aminoácidos 982 a 1562 o 760 a 1639 (Toole *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83:5939-5942 (1986)), 797 a 1562 (Eaton *et al., Biochemistry* 25:8343-8347 (1986)), 741 a 1646 (Kaufman (Solicitud publicada PCT No. WO 87/04187)), 747-1560 (Sarver *et al., DNA* 6:553-564 (1987)), 741 a 1648 (Pasek (PCT aplicación No. 88/00831)), 816 a 1598 o 741 a 1689 (Lagner (Behring Inst. Mitt. (1988) No 82:16-25, EP 295597)), cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Cada una de las supresiones anteriores se puede realizar en cualquier secuencia del Factor VIII.

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

El enlace metálico entre la cadena pesada y la cadena liviana puede ser cualquier metal conocido en la técnica. Por ejemplo, los metales útiles para la invención pueden ser un ion metálico divalente. Los metales que se pueden usar para asociar la cadena pesada y la cadena liviana incluyen, pero sin limitación, 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).

"Polipéptido quimérico" como se usa en la presente, significa un polipéptido que incluye en su interior al menos dos polipéptidos (o subsecuencias o péptidos) de diferentes fuentes. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, o más polipéptidos de diferentes fuentes, tal como diferentes genes, diferentes ADN codificantes animales u otras especies. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, uno o más ligadores que unen las diferentes subsecuencias. En consecuencia, las subsecuencias se pueden unir directamente o se pueden unir indirectamente, por

medio de ligadores, o ambos, dentro de un polipéptido quimérico único. Los polipéptidos quiméricos pueden incluir, por ejemplo, péptidos adicionales tales como secuencias señal y tal como 6His y FLAG que ayudan en la purificación y detección de proteínas. Además, los polipéptidos quiméricos pueden tener adiciones de aminoácidos o péptidos al extremo N- y/o C terminal.

En algunas formas de realización, el polipéptido quimérico comprende una porción del Factor VIII y una porción no Factor VIII. El ejemplo de porciones no Factor VIII incluyen, por ejemplo, Fc, XTEN, y albúmina, secuencia PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal de 28 aminoácidos (CTP) of human chorionic gonadotropin (hCG) with its 4 O-glycans), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, y moléculas pequeñas de unión a albúmina. Los ejemplos de polipéptidos quiméricos de la invención incluyen, por ejemplo, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-Fc, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-XTEN, y polipéptidos quiméricos del Factor VIII-albúmina, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-PAS, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-transferrina, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-CTP, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-PEG, polipéptidos quiméricos del Factor VIII-HES, polipéptidos quiméricos de Factor VIII-polipéptido de unión a albúmina, y polipéptidos quiméricos de Factor VIII-polipéptido de molécula pequeña de unión a albúmina.

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

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

Como se describió antes, los ejemplos de polipéptidos quiméricos incluyen el Factor VIII fusionado a uno o más polipéptidos XTEN. Schellenburger *et al.*, *Nat. Biotech.* 27:1186-90 (2009), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El polipéptido XTEN se puede fusionar al extremo N-terminal de FVIII o al

extremo C-terminal de FVIII. Un sitio de proteasa se puede incluir entre la porción de XTEN y la porción del Factor VIII para permitir tal procesamiento. Los polipéptidos XTEN incluyen, por ejemplo, los descritos en WO 2009/023270, WO 2010/091122, WO 2007/103515, US 2010/0189682, y US 2009/0092582, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Como se describió antes, los ejemplos de polipéptidos quiméricos también incluyen el Factor VIII fusionado a uno o más polipéptidos de albúmina, polipéptido de unión a albúminas, o moléculas pequeñas de unión a albúmina. En una forma de realización, la albúmina es albúmina humana. La albúmina o proteína de unión a albúmina se puede fusionar al extremo N-terminal del FVIII o al extremo C-terminal de FVIII o se inserta entre dos aminoácidos en el FVIII. Los ejemplos de albúmina, por ejemplo, sus fragmentos, que se pueden usar en la presente invención son conocidos, por ejemplo, Patente U.S. No. 7.592.010; Patente U.S. No. 6.686.179; y Schulte, *Thrombosis Res.* 124 Suppl. 2:S6-S8 (2009), cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Los polipéptidos de unión a albúmina pueden comprometer, sin limitación, dominios de unión a albúmina bacteriana, péptidos de unión a albúmina, o fragmentos de anticuerpo de unión a albúmina que se pueden unir a albúmina. El dominio 3 de la proteína G estreptocócica, descrito por Kraulis *et al.*, *FEBS Lett.* 378:190-194 (1996) y Linhult *et al.*, *Protein Sci.* 11:206-213 (2002) es un ejemplo de dominio de unión a albúmina bacteriano. Los ejemplos de péptidos de unión a albúmina incluyen una serie de péptidos que tienen la secuencia núcleo DICLPRWGCLW (SEQ ID NO:7). Ver, por ejemplo, Dennis *et al.*, *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 35035-35043 (2002). Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo de unión a albúmina se describen en Muller and 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), que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

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

Como se describió anteriormente, Los ejemplos de polipéptidos quiméricos también incluyen el Factor VIII fusionado a al menos una subunidad β del péptido C-terminal (CTP) de la gonadotropina coriónica humana o fragmento, variante, o derivado de este. El CTP se puede fusionar al Factor VIII en el extremo N-terminal del FVIII o al extremo C-terminal del FVIII o insertado entre

dos aminoácidos del FVIII. Se sabe que uno o más péptidos de CTP fusionados a o insertados en una proteína recombinante para aumentar la vida media *in vivo* de esta proteína. Ver, *por ejemplo*, Patente U.S. No. 5.712.122, incorporada por referencia en la presente en su totalidad. Los ejemplos de péptidos CTP incluyen DPRFQDSSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPIL (SEQ ID NO: 8) o SSSSKAPPSLPSPSRLPGPSDTPILPQ. (SEQ ID NO: 9). Ver, *por ejemplo*, Publicación de la solicitud de patente U.S. No. US 2009/0087411 A1, incorporada por referencia.

Como se describió anteriormente, los ejemplos de polipéptidos quiméricos también incluyen el Factor VIII fusionado a al menos una secuencia de PAS o fragmento, variante, o derivado de este. La secuencia PAS se puede fusionar al extremo N-terminal de FVIII o al extremo C-terminal de FVIII o insertado entre dos aminoácidos de FVIII. Un péptido de PAS o secuencia de PAS, como se usa en la presente, significa una secuencia de aminoácidos que comprende principalmente residuos de alanina y serina o que comprende principalmente residuos de alanina, serina, y prolina, la secuencia de aminoácidos que conforma una estructura espiral aleatoria en condiciones fisiológicas. Por consiguiente, la secuencia PAS es un bloque de construcción, un polímero de aminoácido, o un casete de secuencia que comprende, consiste esencialmente en alanina, serina, y prolina que se puede usar como parte del resto heterólogo de la proteína quimérica. Un polímero de aminoácido también puede formar la conformación de espiral aleatoria cuando se añaden residuos diferentes de alanina, serina, y prolina como constituyente menor en la secuencia PAS. Por “constituyente menor” se entiende que los aminoácidos diferentes de alanina, serina, y prolina se pueden añadir en la secuencia PAS en un grado determinado, *por ejemplo*, hasta aproximadamente 12%, es decir, aproximadamente 12 de 100 aminoácidos de la secuencia PAS, hasta aproximadamente 10%, hasta aproximadamente 9%, hasta aproximadamente 8%, aproximadamente 6%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, es decir, aproximadamente 2%, o 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 PAS forma una conformación espiral aleatoria y de este modo pueden mediar un aumento de la estabilidad *in vivo* y/o *in vitro* de una proteína recombinante de la invención y tiene actividad procoagulante.

Los ejemplos no limitantes de los péptidos de PAS incluyen ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 10), AAPASPAPAAPSAPAPAAPS (SEQ ID NO: 11), APSSPSPSAPSSPSPASPSS (SEQ ID NO: 12), APSSPSPSAPSSPSPASPS (SEQ ID NO: 13), SSPSAPSPSSPASPSPSSPA (SEQ ID NO: 14), AASPAAPSAPPAAASPAAPSAPPA (SEQ ID NO: 15),

ASAAAPAAASAAASAPSAAA (SEQ ID NO:16) o cualquiera de sus variantes, derivados, fragmentos o combinaciones. Los ejemplos adicionales de las secuencias PAS se conocen de, *por ejemplo*, publicación de la patente US No.2010/0292130 A1 y publicación de la solicitud de PCT No. WO 2008/155134 A1. patente presentada en Europa EP2173890,

Como se describió anteriormente, los ejemplos de polipéptidos quiméricos también incluyen el Factor VIII fusionado a al menos un péptido de transferrina o fragmento, variante, o derivado de este. Al menos un péptido de transferrina se puede fusionar al extremo N-terminal del FVIII al extremo C-terminal de FVIII o insertado entre dos aminoácidos en el FVIII. Cualquier transferrina se puede fusionar o insertar a una proteína de FVIII recombinante de la invención. A modo de ejemplo, la Tf humana tipo salvaje (Tf) es una proteína de 679 aminoácidos, de aproximadamente 75 KDa (sin tomar en cuenta la glicosilación), con dos dominios principales, N (aproximadamente 330 aminoácidos) y C (aproximadamente 340 aminoácidos), que parecen originarse de una duplicación del gen. Véase números de acceso GenBank NM001063, XM002793, M12530, XM039845, XM 039847 y S95936 (www.ncbi.nlm.nih.gov), los cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

La transferrina transporta hierro a través de la endocitosis mediada por el receptor de transferrina (TfR). Después de liberar el hierro en un compartimento endosómico y el complejo Tf-TfR se recicla en la superficie celular, la Tf se libera nuevamente en el espacio extracelular para el próximo ciclo del transporte de hierro. La Tf posee una vida media larga que está en exceso de 14-17 días (Li *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* 23:206-209 (2002)). Se han estudiado las proteínas de fusión de la transferrina para la extensión de la vida media, administración dirigida para las terapias de 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 describió anteriormente, los ejemplos de polipéptidos quiméricos también incluyen el Factor VIII fusionado a al menos uno de los restos de polietilenglicol (PEG).

El FVIII pegilado puede referirse a un conjugado formado entre el FVIII y al menos una molécula de polietilenglicol (PEG). PEG está disponible en el comercio en una gran variedad de pesos moleculares y rangos de peso molecular promedio. Los ejemplos típicos de PEG rangos de peso molecular promedio incluyen, pero sin limitación, 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 dalton. Estos pesos moleculares promedio se proporcionan solo como ejemplos y no significan limitación de ninguna manera.

Una proteína de FVIII recombinante de la invención se puede pegar para incluir restos de mono- o poli-(*por ejemplo*, 2-4) PEG. La PEGilación se puede llevar a cabo por cualquiera de las reacciones de PEGilación conocidas en la técnica. Los métodos para preparar un producto de proteína PEGilada generalmente incluirá (i) reaccionar un polipéptido con polietilenglicol (tal como éster reactivo o derivado de aldehído del PEG) en condiciones con lo cual el péptido de la invención se une a uno o más grupos de PEG; y (ii) obtener el producto de reacción. En general, las condiciones de reacción óptima para las reacciones se determinarán caso por caso sobre la base de los parámetros conocidos y el resultado deseado.

Existen numerosos métodos de unión a PEG disponibles 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 Patentes Europeas Nos. EP0401384, EP0154316, y EP0401384; y Publicaciones de Patente Internacional Nos. WO92/16221 y WO95/34326. A modo de 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 adicionalmente al polímero PEG. Ver Mei *et al.*, *Blood* 116:270-279 (2010) y Patente U.S. No. 7.632.921, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

Como se describió anteriormente, los ejemplos de polipéptidos quiméricos también incluyen el Factor VIII fusionado a al menos un polímero de hidroxietilalmidón (HES). HES es un derivado de amilopectina natural y se degrada con alfa amilasa en el cuerpo. HES exhibe propiedades biológicas ventajosas y se usa como agente de remplazo del volumen de sangre en la terapia de hemodilución en la clínica. Ver, *por ejemplo*, Sommermeyer *et al.*, *Krankenhauspharmazie* 8:271-278 (1987); y Weidler *et al.*, *Arzneim.-Forschung/Drug Res.* 41: 494-498 (1991).

HES se caracteriza principalmente por la distribución de peso molecular y el grado de sustitución. El HES tiene un peso molecular medio (media de peso) de 1 a 300 kD, de 2 a 200 kD, de 3 a 100 kD, o de 4 a 70 kD. La hidroxietilalmidón también puede exhibir un grado molar de sustitución de 0,1 a 3, de 0,1 a 2, de 0,1 a 0,9, o de 0,1 a 0,8, y una relación entre sustitución C2:C6 en el rango de 2 a 20 con respecto a los grupos de hidroxietilo. HES con un peso molecular medio de aproximadamente 130 kD es Voluven® de Fresenius. El

Voluven[®] es un coloide artificial empleado, *por ejemplo*, para el reemplazo del volumen usado en una indicación terapéutica para la terapia y profilaxis de hipovolemia. Existen numerosos métodos de unión a HES disponibles para los expertos en la técnica, *por ejemplo*, los mismos métodos de unión a PEG descritos anteriormente.

En algunas formas de realización, un polipéptido quimérico que comprende una porción del Factor VIII tiene un aumento de vida media ($t_{1/2}$) respecto de un polipéptido que consiste en la misma porción del Factor VIII sin la porción no del Factor VIII. Un polipéptido quimérico del Factor VIII con un aumento de $t_{1/2}$ se puede denominar en la presente como un Factor VIII de acción prolongada. Los polipéptidos quiméricos del Factor VIII de acción prolongada incluyen, *por ejemplo*, el Factor VIII fusionado al Fc (que incluyen, *por ejemplo*, los polipéptidos quiméricos del Factor VIII en la forma de un híbrido tal como un híbrido de monómero y dímero de FVIII-Fc; ver el Ejemplo 1, Fig. 1, y Tabla 2A; y Patentes US Nros. 7.404.956 y 7.348.004), Factor VIII fusionado a XTEN, y Factor VIII fusionado a albúmina.

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

"Factor VIII" como se usa en la presente, significa polipéptido del factor VIII funcional en su papel normal en la coagulación, a menos que se especifica de otro modo. En consecuencia, el término Factor VIII incluye las variantes de polipéptidos que son funcionales. Las proteínas del Factor pueden ser las proteínas del factor VIII humano, porcino, canino, y murino. Como se describió en la sección de Antecedentes de la técnica, se conocen secuencias de polipéptidos y polinucleótidos de longitud completa, que son diversos fragmentos funcionales, mutantes y versiones modificadas. Los ejemplos de las secuencias del Factor VIII humano se muestran como subsecuencias de la SEQ ID NOs: 2 o 6 (Tabla 2). Los polipéptidos del Factor VIII incluyen, *por ejemplo*, Factor VIII de longitud completa, Factor VIII de longitud completa menos Met en el extremo N-terminal, factor VIII maduro (menos la secuencia señal), factor VIII maduro con un Met adicional en el extremo N-terminal, y/o factor VIII con una supresión completa o parcial del dominio B. Las variantes del Factor VIII incluyen las supresiones del dominio B, sean supresiones parcial o completa.

Un gran número de variantes funcionales del factor VIII, como se describió anteriormente y a continuación. Además, se han identificado cientos de mutaciones no funcionales del factor VIII en los pacientes de hemofilia, y se ha determinado que el efecto de estas mutaciones sobre la función del factor VIII es debido más a que ellas se hallan dentro de la estructura tridimensional del factor

VIII que de la naturaleza de la sustitución (Cutler *et al.*, *Hum. Mutat.* 19:274-8 (2002)), incorporada en la presente por referencia en su totalidad. Además, las comparaciones entre el factor VIII de los seres humanos y otras especies han identificado residuos conservados que probablemente son necesarios para la función (Cameron *et al.*, *Thromb. Haemost.* 79:317-22 (1998); US 6.251.632), incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

El gen del Factor VIII humano se aisló y expresó en células de mamífero (Toole, J. J., *et al.*, *Nature* 312:342-347 (1984); Gitschier, J., *et al.*, *Nature* 312:326-330 (1984); Wood, W. I., *et al.*, *Nature* 312:330-337 (1984); Vehar, G. A., *et al.*, *Nature* 312:337-342 (1984); WO 87/04187; WO 88/08035; WO 88/03558; Patente U.S. No. 4.757.006), cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, y la secuencia de aminoácidos se dedujo del ADNc. Capon *et al.*, Patente U.S. No. 4.965.199, incorporada en la presente por referencia en su totalidad, describe un método de ADN recombinante para producir el factor VIII en las células huésped de mamífero y purificar el Factor VIII humano. Se ha informado la expresión del Factor VIII humano en las células CHO (ovario de hámster chino) y BHKC (células de riñón de hámster bebé). El Factor VIII humano se ha modificado para suprimir de parte o total del dominio B (Patentes U.S. Nos. 4.994.371 y 4.868.112, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad), y se ha realizado el reemplazo del dominio B de Factor VIII humano con el dominio B del factor V humano (Patente U.S. No. 5.004.803, incorporada en la presente por referencia en su totalidad). La secuencia de ADNc que codifica el Factor VIII humano y la secuencia de aminoácidos predicha se muestran en las SEQ ID NOs: 1 y 2, respectivamente, de la Publicación de la Solicitud US. No. 2005/0100990, incorporada en la presente por referencia en su totalidad.

La Patente U.S. No. 5.859.204, Lollar, J. S., incorporada en la presente por referencia en su totalidad, informa las mutantes funcionales del factor VIII que tienen antigenicidad reducida e inmunorreactividad reducida. La Patente U.S. No. 6.376.463, Lollar, J. S., incorporada en la presente por referencia en su totalidad, también informa las mutantes funcionales del factor VIII que tienen inmunorreactividad reducida. Publicación de la Solicitud US No. 2005/0100990, Saenko *et al.*, incorporada en la presente por referencia en su totalidad, informa mutaciones funcionales en el dominio A2 del factor VIII.

Numerosas moléculas del factor VIII funcional, que incluyen las supresiones del dominio B, se describen en las siguientes patentes US 6.316.226 y US 6.346.513, ambos asignados a Baxter; US 7.041.635 asignado a In2Gen; US 5.789.203, US 6.060.447, US 5.595.886, y US 6.228.620 asignado a Chiron; US 5.972.885 y US 6.048.720 asignado a Biovitrum, US 5.543.502 y US 5.610.278 asignado a Novo Nordisk; US 5.171.844 asignado a Immuno Ag; US 5.112.950

asignado a Transgene S.A.; US 4.868.112 asignado a Genetics Institute, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.

Se publica la secuencia del factor III porcino, (Toole, J. J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:5939-5942 (1986)), incorporada en la presente por referencia en su totalidad, y se ha informado la secuencia del ADNc porcino 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), incorporada en la presente por referencia en su totalidad). El factor VIII híbrido humano/porcino que tiene sustituciones de todos los dominios, todas las subunidades y las secuencias de aminoácidos específicas se describieron en la Patente U.S. No. 5.364.771 por Lollar y Runge, y en el WO 93/20093, incorporado en la presente por referencia en su totalidad. Más recientemente, se informaron las secuencias de nucleótidos y correspondientes aminoácidos de los dominios A1 y A2 del factor VIII porcino y un factor VIII quimérico con dominios A1 y/o A2 porcinos sustituidos por los correspondientes dominios humanos en WO 94/11503, incorporada en la presente por referencia en su totalidad. La Patente U.S. No. 5.859.204, Lollar, J. S., también describe el ADNc porcino y las secuencias de aminoácidos deducidas. La Patente U.S. No. 6.458.563, incorporada en la presente por referencia en su totalidad asignado a Emory describe un Factor VIII porcino con el dominio B suprimido.

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

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

"Dosis equivalente" como se usa en la presente, significa la misma dosis de actividad de Factor VIII que se expresa en Unidades Internacionales, que es

independiente del peso molecular del polipéptido en cuestión. Una Unidad Internacional (IU) de la actividad del factor VIII corresponde aproximadamente a la cantidad del factor VIII en un mililitro del plasma humano normal. Varios ensayos están disponibles para medir la actividad de Factor VIII, que incluyen el ensayo de sustrato cromogénico de la Farmacopea Europea y un ensayo de coagulación de la etapa.

"Fc" como se usa en la presente, significa compañeros de unión al receptor Fc neonatal funcional (FcRn), a menos que se especifica de otro modo. Un compañero de unión de FcRn es cualquier molécula que se puede unir específicamente por el receptor FcRn con transporte activo consecuente por el receptor receptor de FcRn del compañero de unión de FcRn. En consecuencia, el término Fc incluye cualquier variante de Fc de IgG que son funcionales. La región de la porción de Fc de IgG que se une al receptor de FcRn se ha descrito sobre la base de la cristalografía de rayos X (Burmeister *et al.*, *Nature* 372:379 (1994), incorporada en la presente por referencia en su totalidad). La mayor área de contacto del Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Todos los contactos Fc-FcRn son dentro de una cadena pesada de Ig única. Los compañeros de unión de FcRn incluyen, por ejemplo, IgG total, el fragmento Fc de IgG y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión de FcRn completa. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias realizadas a la numeración de aminoácido de las inmunoglobulinas o fragmentos o regiones de la inmunoglobulina, se basan en Kabat *et al.* 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, U. S. Department of Public Health, Bethesda; MD, incorporada en la presente por referencia en su totalidad. (El receptor de FcRn se ha aislado de varias especies de mamíferos 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), incorporada en la presente por referencia en su totalidad.) La Fc puede comprender los dominios CH2 y CH3 de una inmunoglobulina con o sin la región bisagra de la inmunoglobulina. Los ejemplos de las variantes de Fc se proporcionan en WO 2004/101740 y WO 2006/074199, incorporadas en la presente por referencia en su totalidad.

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

La Fc (o porción de Fc de un polipéptido quimérico) puede contener mutaciones que confieren aumento de vida media tal como M252Y, S254T, T256E, y combinaciones de estos, que se describe en Oganesyan *et al.*, *Mol. Immunol.* 46:1750 (2009), que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad; H433K, N434F, y combinaciones de esto, que se describe en Vaccaro *et al.*, *Nat.*

Biotechnol. 23:1283 (2005), que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad; las mutantes se describen en las páginas 1-2, párrafo [0012], y Ejemplos 9 y 10 de US 2009/0264627 A1, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad; y las mutantes descritas en la página 2, párrafos [0014] a [0021] de US 2009/0163699 A1, que se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

La Fc (porción de Fc de un polipéptido quimérico) también puede incluir, por ejemplo, las siguientes mutaciones: La región de Fc de IgG se puede modificar de acuerdo con procedimientos bien reconocidos tales como mutagénesis dirigida al sitio similares para producir IgG modificadas o fragmentos Fc o porciones de estas que se unirán con FcRn. Tales modificaciones incluyen, por ejemplo, modificaciones distantes de los sitios de contacto del FcRn así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que conservan o incluso aumentan la unión al FcRn. Por ejemplo, los siguientes residuos de aminoácidos únicos en Fc de IgG1 humana (Fc γ 1) se pueden sustituir sin pérdida significativa de la afinidad de unión de Fc para el FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A, T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, A330S, P331A, P331S, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, y K447A, donde por ejemplo P238A representa prolina tipo salvaje sustituida con alanina en el número de posición 238. Además de la alanina otros aminoácidos se pueden sustituir con los aminoácidos tipo salvaje en las posiciones especificadas anteriormente. Las mutaciones se pueden introducir individualmente en la Fc que da origen a más una decena de compañeros de unión del FcRn distintos de la Fc nativa. Adicionalmente, las combinaciones de dos, tres, o más de estas mutaciones individuales se pueden introducir juntas, dando origen a cientos de compañeros de unión de FcRn. Algunas de estas mutaciones pueden conferir nueva funcionalidad al compañero de unión de FcRn. Por ejemplo, una forma de realización incorpora N297A, eliminando un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la inmunogenicidad, de este modo aumenta la vida media circulante del compañero de unión de FcRn, y producir el compañero de unión de FcRn incapaz de unirse a Fc γ RI, Fc γ RIIA, Fc γ RIIB, y Fc γ RIIIA, sin comprometer la afinidad por FcRn (Routledge et al. 1995, *Transplantation* 60:847, que se incorpora en la presente por referencia en su

totalidad; Friend et al. 1999, Transplantation 68:1632, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad; Shields et al. 1995, J. Biol. Chem. 276:6591, que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Adicionalmente, al menos los receptores del Fc gamma humano parecen reconocer un sitio de unión sobre IgG dentro de la región de bisagra inferior, generalmente los aminoácidos 234-237. En consecuencia, otro ejemplo de nueva funcionalidad y potencial disminución de la inmunogenicidad puede surgir de las mutaciones en esta región, por ejemplo, por el reemplazo de aminoácidos 233-236 de IgG1 humana "ELLG" a la secuencia correspondiente de IgG2 "PVA" (con la supresión de aminoácido). Se ha mostrado que FcγRI, FcγRII, y FcγRIII que media diversas funciones efectoras no se unirán a IgG1 cuando se han introducido tales mutaciones (Ward y Ghetie, *Therapeutic Immunology* 2:77 (1995), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad; y Armour et al., *Eur. J. Immunol.* 29:2613 (1999), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad). Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad proveniente de las mutaciones descritas anteriormente la afinidad por FcRn puede aumentar más allá de la de tipo salvaje en algunos casos. Este aumento de afinidad puede reflejar un aumento de la tasa de "asociación", una disminución de la tasa de "disociación" o tanto un aumento de la tasa de "asociación" como una disminución de la tasa de "disociación". Se considera que las mutaciones imparten un aumento de afinidad por FcRn incluyen, por ejemplo, T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591 (2001), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad).

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

Polipéptidos y proteínas "híbridas", como se usan en la presente, significa una combinación de un polipéptido quimérico con un segundo polipéptido. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido de un híbrido se puede asociar entre sí por medio de las interacciones proteína-proteína, tales como las interacciones carga-carga o hidrofóbicas. El polipéptido quimérico y el segundo polipéptido de un híbrido se puede asociar entre sí por medio de disulfuro u otros enlaces covalentes. Los híbridos se describen en WO 2004/101740 y WO 2006/074199, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Ver también las Patentes U.S. Nros. 7.404.956 y 7.348.004, cada uno de los cuales se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El segundo

polipéptido puede ser una segunda copia del mismo polipéptido quimérico o puede ser un polipéptido quimérico no idéntico. Ver, por ejemplo, Figura 1, Ejemplo 1, y Tabla 2. En una forma de realización, el segundo polipéptido es un polipéptido que comprende una Fc. En otra forma de realización, el polipéptido quimérico es un polipéptido quimérico del Factor VIII-Fc y el segundo polipéptido consiste esencialmente en Fc, por ejemplo, el polipéptido híbrido del Ejemplo 1, que es una proteína de fusión recombinante rFVIII-Fc que consiste en una molécula única del FVIII humano con dominio B suprimido recombinante (BDD-rFVIII) fusionado al dominio de Fc dimérico de la IgG1 humana, sin secuencia ligadora interviniente. Este polipéptido híbrido se denomina en la presente como proteína de fusión de Fc monomérico de FVIII-Fc, híbrido monomérico de FVIII-Fc, híbrido FVIII-Fc monomérico y dímero-monómero FVIII-Fc. Ver Ejemplo 1, Fig. 1, y Tabla 2A. Los Ejemplos proporcionan datos preclínicos y clínicos para este polipéptido híbrido.

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

La Figura 1 es un esquema que muestra la estructura de un factor VIII con dominio B suprimido-polipéptido quimérico Fc, y su asociación con un segundo polipéptido que es un polipéptido de Fc. Para obtener este híbrido, la secuencia codificadora del FVIII con dominio B suprimido recombinante humano se obtuvo por la transcripción inversa-reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR) del poli A ARN hepático humano (Clontech) usando cebadores específicos de FVIII. La secuencia de FVIII incluye la secuencia señal nativa para el FVIII. La supresión del dominio B fue de la serina 743 (S743; 2287 pb) a glutamina 1638 (Q1638; 4969 pb) para una supresión total de 2682 pb. Luego, la secuencia codificadora para la Fc recombinante humana se obtuvo por RT-PCR a partir de una biblioteca de ADNc de leucocitos humanos (Clontech) usando cebadores específicos de Fc. Los cebadores se diseñaron de modo que la secuencia de FVIII con dominio B suprimido se fusionó directamente al extremo N-terminal de la secuencia Fc sin ligador interviniente. La secuencia de ADN de FVIII-Fc se clonó en el vector de expresión dial de mamífero pBUDCE4,1 (Invitrogen) bajo el control del promotor de CMV. Una segunda secuencia de Fc idéntica que incluye la secuencia señal de

Igk de ratón se obtuvo por RT-PCR y se clonó corriente abajo del segundo promotor, EF1 α , en el vector de expresión pBUDCE4,1.

El vector de expresión rFVIII Fc se transfectó en las células 293 de riñón embrionario humano (HEK293H; Invitrogen) usando reactivo de transfección Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Las líneas celulares clonales adecuadas se generaron por la selección con Zeocin (Invitrogen). Se usó la línea celular clonal, 3C4-22 para generar FVIII Fc para la caracterización *in vivo*. El FVIII Fc recombinante se produjo y purificó (McCue et al. 2009) en Biogen Idec (Cambridge, MA). Se esperaba que la estrategia de transfección descrita anteriormente produzca tres productos, es decir, híbridos de rFVIII Fc monoméricos, híbridos de rFVIII Fc dimericos y Fc dimericos. Sin embargo, no hubo esencialmente rFVIII Fc dimerico detectado en el medio acondicionado de estas células. Más bien, el medio acondicionado contenía Fc y rFVIII Fc monomérico. Es posible que el tamaño del rFVIII Fc dimerico fuera demasiado grande y evitó la secreción eficiente de la célula. Este resultado fue beneficioso ya que volvió menos complicada la purificación del monómero que si las tres proteínas hubieran estado presentes. El material usado en estos estudios presentó una actividad específica de aproximadamente 9000 IU/mg.

En una forma de realización, los polipéptidos de la invención se administran a un paciente que expresa alto nivel de factor de von Willebrand (VWF). "Sujeto" o "paciente" como se usa en la presente significa un individuo humano. Un sujeto puede ser un paciente que está actualmente sufriendo de un trastorno de sangrado o se espera que necesite tal tratamiento. "Sujeto" puede incluir un adulto o un sujeto pediátrico. El sujeto pediátrico puede ser un paciente pediátrico mejor de 12 años. El término "pediátrico" como se usa en la presente es la rama de la medicina que trata de la atención de lactantes y niños y el tratamiento de sus enfermedades. En una forma de realización, el sujeto es un paciente pediátrico que tiene un diagnóstico de hemofilia A severa. En ciertas formas de realización, los sujetos pediátricos se tratan con un polipéptido del Factor VIII de acción prolongada de la invención.

VWF es una proteína plasmática que tiene una estructura multimérica en que el peso molecular de las diversas formas varía entre aproximadamente 230 kDa para cada subunidad monomérica y hasta más de 20 millones de Da en las formas multiméricas de mayor peso molecular, de este modo se forma la proteína soluble conocida más grande. Su concentración plasmática es aproximadamente alrededor de 5-10 $\mu\text{g/ml}$ (Siedlecki et al., Blood, vol 88: 2939-2950 (1996)) y la forma plasmática de menor tamaño es la correspondiente al dímero, con un tamaño aproximado de 500 kDa.

VWF tiene un papel esencial para cumplir en la hemostasia primaria, es responsable de la adhesión de plaquetas a las superficies vasculares dañadas y en

consecuencia la formación del tapón plaquetario sobre el cual se desarrolla el mecanismo de formación del coágulo de fibrina. Se sugiere que los multímeros de peso molecular más alto soportan los mecanismos de adhesión plaquetario en el subendotelio con mayor eficiencia y la eficacia clínica de los concentrados de VWF se ha relacionado con la concentración de estos multímeros de peso molecular más alto (Metzner *et al.*, Haemophilia 4:25-32 (1998).

En consecuencia, los sujetos que expresan altos niveles de VWF pueden requerir dosificación de FVIII menos frecuente en comparación con un sujeto que expresa niveles de VWF más bajos o normales. El rango promedio de VWF en el plasma está entre aproximadamente 50 IU/dL y aproximadamente 200 IU/dL. En una forma de realización, el nivel promedio de VWF en el plasma es aproximadamente 50 IU/dL. En otra forma de realización, un nivel de VWF en el plasma de al menos aproximadamente 100 IU/dL se considera un nivel alto de VWF. En otra forma de realización, un alto nivel de VWF en plasma está entre aproximadamente 100 IU/dL y aproximadamente 200 IU/dL. En otra forma de realización a alto nivel de VWF en plasma es al menos aproximadamente 110 IU/dL, aproximadamente 120 IU/dL, aproximadamente 130 IU/dL, aproximadamente 140 IU/dL, aproximadamente 150 IU/dL, aproximadamente 160 IU/dL, aproximadamente 170 IU/dL, aproximadamente 180 IU/dL, aproximadamente 190 IU/dL, o aproximadamente 200 IU/dL.

En consecuencia, en una forma de realización, a los sujetos que expresan al menos aproximadamente 100 IU/dL de VWF plasmático se les administra un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención con un régimen de dosis de intervalo prolongado. En una forma de realización, el polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra con un intervalo de dosis de al menos aproximadamente 3 días. En otra forma de realización, el polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra con un intervalo de dosis de al menos aproximadamente una vez cada semana, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 15 días, aproximadamente una vez cada 20 días, aproximadamente una vez cada tres semanas, aproximadamente una vez cada 25 días, aproximadamente una vez cada cuatro semanas, o aproximadamente una vez cada mes.

En una forma de realización, los sujetos se identificaron previamente como portadores de altos niveles de VWF. En ciertas formas de realización, los sujetos que tienen un serotipo sanguíneo diferente de O (es decir, A, B, o AB) requieren dosificación menos frecuente de FVIII de acción prolongada porque el FVIII de acción prolongada tiene una vida media más larga en estos sujetos. En estos sujetos, el aumento de vida media se debe a sus elevados niveles de VWF.

Además, los datos farmacocinéticos, definidos como el estudio del tiempo de absorción, distribución, metabolismo, y excreción del fármaco, se pueden usar

como un identificador de los sujetos elegibles para intervalos de dosis más largos o más cortos usando un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención. La farmacocinética clínica es la aplicación de principios farmacocinéticos al manejo seguro y efectivo de los fármacos en un paciente individual. Los objetivos principales de la farmacocinética clínica incluyen aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad de la terapia farmacológica de un paciente. El desarrollo de correlaciones fuertes entre las concentraciones del fármaco y sus respuestas farmacológicas ha permitido a los médicos aplicar principios farmacocinéticos a las situaciones reales del paciente.

En consecuencia, en una forma de realización, la vida media de un polipéptido de FVIII-Fc de la invención se usa para identificar pacientes que expresan altos niveles de VWF. El rango de la vida media de FVIII-Fc está entre aproximadamente 10 y aproximadamente 40 horas, dependiente al menos en parte de los niveles de VWF también presentes. En promedio, sin embargo, la vida media de FVIII-Fc es aproximadamente 18 horas. En general, FVIII-Fc exhibe un aumento de la vida media de al menos aproximadamente 1,2 veces en los pacientes que tienen altos niveles de VWF en comparación con la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a los individuos que tienen niveles promedio de VWF. En una forma de realización, FVIII-Fc exhibe un aumento de la vida media de al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces en comparación con la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a los individuos que tienen niveles promedio de VWF. En una forma de realización, en los sujetos que expresan altos niveles de VWF, la vida media de FVIII-Fc está entre al menos aproximadamente 20 horas y aproximadamente 40 horas. En otra forma de realización, la vida media de FVIII-Fc es al menos aproximadamente 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas, 35 horas, 36 horas, 37 horas, 38 horas, 39 horas, o 40 horas. En una forma de realización, la vida media de FVIII-Fc está entre aproximadamente 20 y aproximadamente 27 horas en sujetos que tienen altos niveles de VWF. En consecuencia, en una forma de realización, un aumento de la vida media de FVIII-Fc en comparación con los valores promedio es indicadora de un sujeto que es elegible para un intervalo de dosis de dosis más largo con un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención.

En otra forma de realización, la vida media de un polipéptido de FVIII de acción corta se usa para identificar pacientes que expresan altos niveles de VWF. Como se usa en la presente, el término "FVIII de acción corta" se refiere a un polipéptido de FVIII en el que no se han añadido prolongadores de la vida media. En una forma de realización, los polipéptidos de FVIII de acción corta consisten en un FVIII de longitud completa o dominio B suprimido. Los ejemplos de polipéptidos de FVIII de acción corta son Advate® y ReFacto®.

Debido a que la vida media de FVIII de acción corta también varía de acuerdo con al menos en parte de los niveles de VWF, los polipéptidos de FVIII de acción corta también se pueden usar para identificar pacientes que son elegibles para un intervalo de dosis más prolongado de un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención. En una forma de realización, el FVIII de acción corta exhibe un aumento de vida media de al menos aproximadamente 1,2 veces en los individuos que expresan altos niveles de VWF en comparación con la vida media del FVIII de acción corta cuando se administra a los individuos que tienen niveles promedio de VWF. En otra forma de realización, el FVIII de acción corta exhibe un aumento de vida media de al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces en individuos que expresan altos niveles de VWF en comparación con la vida media del FVIII de acción corta cuando se administra a los individuos que tienen niveles promedio de VWF. En consecuencia, los individuos que demuestran un aumento de vida media de al menos aproximadamente 1,2 veces cuando se les administra un FVIII de acción corta son elegibles para un intervalo de dosis más largo con un polipéptido de FVIII de acción prolongada de la invención.

"Intervalo de dosis," como se usa en la presente, significa la dosis de tiempo que transcurre entre las dosis múltiples administradas a un sujeto. La comparación del intervalo de dosis se puede llevar a cabo en un sujeto solo o en una población de sujetos y luego se calcula el promedio obtenido en la población.

El intervalo de dosis cuando se administra un polipéptido quimérico del Factor VIII, por ejemplo, un polipéptido quimérico del Factor VIII-Fc (un polipéptido que comprende a Factor VIII o a híbrido) de la invención puede ser al menos aproximadamente uno y medio veces más largo que el intervalo de dosis requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII, por ejemplo, sin la porción de Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosis 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 dosis requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII, por ejemplo, sin la porción de Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosis puede ser al menos aproximadamente uno y medio, 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 dosis requerido para una dosis equivalente de dicho Factor VIII sin la porción no Factor VIII, por ejemplo, sin la porción de Fc (un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII). El intervalo de dosis puede ser aproximadamente cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, oatorcedías o más. El intervalo de dosis puede ser al menos aproximadamente uno y medio a 5,

uno y medio, 2, 3, 4, o 5 días o más. Para el tratamiento a demanda, el intervalo de dosis de dicho polipéptido quimérico híbrido 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.

En una forma de realización, la dosis efectiva es 25-80 IU/kg (25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, o 80 IU/kg) y el intervalo de dosis es una vez cada 3-5, 3-6, 3-7, 3, 4, 5, 6, 7, o 8 o más días, o tres veces por semana, o no más de tres veces por semana. En una forma de realización, la dosis efectiva es 80 IU/kg y el intervalo de dosis es una vez cada 3 días. En una forma de realización adicional, la dosis efectiva de 80 IU/kg dada con un intervalo de dosis de cada 3 días se administra a un sujeto pediátrico. En otra forma de realización, la dosis efectiva es 65 IU/kg y el intervalo de dosis es una vez por semana, o una vez cada 6-7 días. Las dosis se pueden administrar en forma repetida siempre que sean necesarias (por ejemplo, al menos 10, 20, 28, 30, 40, 50, 52, o 57 semanas, al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 años).

En ciertas formas de realización, la dosis efectiva para el tratamiento a demanda es 20-50 IU/Kg (20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, o 50 IU/kg). El tratamiento a demanda puede ser una dosificación de una vez o dosificación repetida. Para la dosificación repetida, el intervalo de dosis puede ser cada 12-24 horas, cada 24-36 horas, cada 24-48 horas, cada 36-48 horas, o cada 48-72 horas.

El "Factor VIII de acción prolongada" es un Factor VIII que tiene un aumento de vida media (también denominado en la presente como $t_{1/2}$, $t_{1/2}$ beta, vida media de eliminación y HL) respecto de un Factor VIII de referencia. El aumento de vida media de un factor VIII de acción prolongada puede ser debido a la fusión a uno o más polipéptidos no Factor VIII tales como, por ejemplo, Fc, XTEN o albúmina, secuencia PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal de 28 aminoácidos (CTP) de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de estas. El aumento de vida media puede ser debido a una o más modificaciones, tales como, por ejemplo, pegilación. Los ejemplos de polipéptidos del Factor VIII de acción prolongada incluyen, por ejemplo, polipéptidos quiméricos del Factor VIII que comprenden Fc, polipéptidos quiméricos del Factor VIII que comprende XTEN y polipéptidos quiméricos del Factor VIII que comprenden albúmina. Los ejemplos de

polipéptidos del Factor VIII de acción prolongada adicionales incluyen, por ejemplo, Factor VIII pegilado.

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

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

- un tiempo de permanencia medio (MRT) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14–41,3 horas;

- una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,22–5,19 mL/hora/kg o menos;

- un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 11–26,4 horas;

- una recuperación incremental (valor K) (actividad; observada) en dicho sujeto de aproximadamente 1,38–2,88 IU/dL por IU/kg;

- una V_{ss} (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 37,7–79,4 mL/kg; y

- una AUC/dosis en dicho sujeto de aproximadamente 19,2–81,7 IU·h/dL por IU/kg.

En algunas formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

- una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) mayor que 1,38 IU/dL por IU/kg;

- una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) de al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,85, o al menos aproximadamente 2,46 IU/dL por IU/kg.

- una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente $2,33 \pm 1,08$ mL/hora/kg o menos;

- una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 1,8–2,69 mL/hora/kg;

- una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 65% de la depuración de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;

- un tiempo de permanencia medio promedio (MRT) (actividad) en dicha población de pacientes de al menos aproximadamente $26,3 \pm 8,33$ horas;

- un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 25,9 – 26,5 horas;

un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,5 veces más largo que el MRT medio de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;

un $t_{1/2\beta}$ medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente $18,3 \pm 5,79$ horas;

un $t_{1/2\beta}$ medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 18 - 18,4 horas;

un $t_{1/2\beta}$ medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,5 veces más largo que el $t_{1/2\beta}$ medio de un polipéptido que comprende dicho Factor VIII sin modificación;

una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes que es aproximadamente $2,01 \pm 0,44$ IU/dL por IU/kg;

una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,85 - 2,46 IU/dL por IU/kg;

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

una V_{ss} media (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente $55,1 \pm 12,3$ mL/kg;

una V_{ss} media (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 45,3 - 56,1 mL/kg;

una AUC/dosis media (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente $49,9 \pm 18,2$ IU*h/dL por IU/kg;

una AUC/dosis media (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 44,8 - 57,6 IU*h/dL por IU/kg.

En otras formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

una C_{max_OBS} en dicho sujeto al que se administra el polipéptido quimérico es comparable a la C_{max_OBS} en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una C_{max_OBS} en dicho sujeto que es aproximadamente 60,5 IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 1$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 2$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 3$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 4$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 5$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 6$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 7$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 8$ IU/dL, aproximadamente $60,5 \pm 9$ IU/dL, o aproximadamente $60,5 \pm 10$ IU/dL que se mide

conun ensayo de una etapa (aPTT)cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max}_OBS en dicho sujetode aproximadamente 53,1 – 69 IU/dL que se mide conun ensayo de una etapa (aPTT)cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max}_OBS en dicho sujetode aproximadamente 119 IU/dL, aproximadamente 119 ± 1 IU/dL,aproximadamente 119 ± 2 IU/dL,aproximadamente 119 ± 3 IU/dL,aproximadamente 119 ± 4 IU/dL,aproximadamente 119 ± 5 IU/dL,aproximadamente 119 ± 6 IU/dL,aproximadamente 119 ± 7 IU/dL,aproximadamente 119 ± 8 IU/dL,aproximadamente 119 ± 9 IU/dL,aproximadamente 119 ± 10 IU/dL,aproximadamente 119 ± 11 IU/dL,aproximadamente 119 ± 12 IU/dL,aproximadamente 119 ± 13 IU/dL,aproximadamente 119 ± 14 IU/dL,aproximadamente 119 ± 15 IU/dL,aproximadamente 119 ± 16 IU/dL,aproximadamente 119 ± 17 IU/dL,oaproximadamente 119 ± 18 IU/dL,que se mide conun ensayo de una etapa (aPTT)cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max}_OBS en dicho sujetode aproximadamente 103 – 136 IU/dL que se mide conun ensayo de una etapa (aPTT)cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max}_OBS en dicho sujetode aproximadamente 76,5 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 1 IU/dL,aproximadamente 76,5 ± 2 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 3 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 4 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 5 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 6 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 7 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 8 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 9 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 10 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 11 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 12 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 13 IU/dL, aproximadamente 76,5 ± 14 IU/dL, oaproximadamente 76,5 ± 15IU/dL, que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico)cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max}_OBS en dicho sujetode aproximadamente 64,9 – 90,1 IU/dL que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico)cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max}_OBS en dicho sujetode aproximadamente 182 IU/dL, aproximadamente 182 ± 2 IU/dL, aproximadamente 182 ± 4 IU/dL,aproximadamente 182 ± 6 IU/dL,aproximadamente 182 ± 8 IU/dL,aproximadamente 182 ± 10 IU/dL,aproximadamente 182 ± 12 IU/dL,aproximadamente 182 ± 14 IU/dL,aproximadamente 182 ± 16 IU/dL,aproximadamente 182 ± 18 IU/dL,oaproximadamente 182 ± 20 IU/dL que se

mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico; o

una $C_{\max_OBS}$ en dicho sujeto de aproximadamente 146 – 227 IU/dL, aproximadamente 146 ± 5 IU/dL, aproximadamente 146 ± 10 IU/dL, aproximadamente 227 ± 5 IU/dL, o aproximadamente 146 ± 10 IU/dL que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico.

En ciertas formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto que es al menos 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,89, o 1,90 veces mayor que el $t_{1/2\beta}$ (actividad) en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 18,8 horas, $18,8 \pm 1$ horas, $18,8 \pm 1$ horas, $18,8 \pm 2$ horas, $18,8 \pm 3$ horas, $18,8 \pm 4$ horas, $18,8 \pm 5$ horas, $18,8 \pm 6$ horas, $18,8 \pm 7$ horas, $18,8 \pm 8$ horas, $18,8 \pm 9$ horas, $18,8 \pm 10$ horas, o $18,8 \pm 11$ horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14,3 – 24,5 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 16,7 horas, $16,7 \pm 1$ horas, $16,7 \pm 2$ horas, $16,7 \pm 3$ horas, $16,7 \pm 4$ horas, $16,7 \pm 5$ horas, $16,7 \pm 6$ horas, $16,7 \pm 7$ horas, $16,7 \pm 8$ horas, $16,7 \pm 9$ horas, $16,7 \pm 10$ horas, o $16,7 \pm 11$ horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 13,8 – 20,1 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 19,8 horas, $19,8 \pm 1$ horas, $19,8 \pm 2$ horas, $19,8 \pm 3$ horas, $19,8 \pm 4$ horas, $19,8 \pm 5$ horas, $19,8 \pm 6$ horas, $19,8 \pm 7$ horas, $19,8 \pm 8$ horas, $19,8 \pm 9$ horas, $19,8 \pm 10$ horas, o $19,8 \pm 11$ horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico); o

un $t_{1/2\beta}$ (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14,3 – 27,5 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico).

En ciertas formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto es 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,60, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, o 0,70 veces menor que la depuración en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,68 mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $1,68 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $1,68 \pm 0,7$ mL/hora/kg, que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,31 – 2,15 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 2,32 mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $2,32 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $2,32 \pm 0,7$ mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,64 – 3,29 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,49 mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $1,49 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $1,49 \pm 0,7$ mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,16 – 1,92 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,52 mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,1$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,2$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,3$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,4$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,5$ mL/hora/kg, $1,52 \pm 0,6$ mL/hora/kg, o $1,52 \pm 0,7$ mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico; o

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,05– 2,20 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico.

En algunas formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

a) MRT en dicho sujeto es al menos 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,89, 1,90, 1,91, 1,92, o 1,93 veces mayor que el MRT en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 27 horas, 27 ± 1 horas, 27 ± 2 horas, 27 ± 3 horas, 27 ± 4 horas, 27 ± 5 horas, 27 ± 6 horas, 27 ± 7 horas, 27 ± 8 horas, 27 ± 9 horas, o 27 ± 10 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 20,6 – 35,3 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 23,9 – 28,5 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 19,8 – 28,9 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico); o

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 20,5 – 39,6 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico).

En otras formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

una recuperación incremental en dicho sujeto que es comparable a la recuperación incremental en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,44 IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,1$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,2$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,3$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,4$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,5$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,6$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,7$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,8$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 0,9$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 1,0$ IU/dL por IU/kg, $2,44 \pm 1,1$ IU/dL por IU/kg, o $2,44 \pm 1,2$ IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,12 – 2,81 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 1,83 IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,1$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,2$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,3$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,4$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,5$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,6$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,7$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,8$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 0,9$ IU/dL por IU/kg, $1,83 \pm 1,0$ IU/dL por IU/kg, o $1,83 \pm 1,1$ IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 1,59 – 2,10 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 3,09 IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,1$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,2$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,3$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,4$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,5$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,6$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,7$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,8$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 0,9$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 1,0$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 1,1$ IU/dL por IU/kg, $3,09 \pm 1,2$ IU/dL por IU/kg, o $3,09 \pm 1,3$ IU/dL por IU/kg, que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,80 IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,1$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,2$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,3$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,4$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,5$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,6$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,7$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,8$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 0,9$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 1,0$ IU/dL por IU/kg, $2,80 \pm 1,1$ IU/dL por IU/kg, o $2,80 \pm 1,2$ IU/dL por IU/kg, que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,61-3,66 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico; o

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,24-3,50 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico.

En aún otras formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

una Vss (actividad) en dicho sujeto que es comparable a la Vss (actividad) en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 45,5 mL/kg, $45,5 \pm 1$ mL/kg, $45,5 \pm 2$ mL/kg, $45,5 \pm 3$ mL/kg, $45,5 \pm 4$ mL/kg, $45,5 \pm 5$ mL/kg, $45,5 \pm 6$

mL/kg, $45,5 \pm 7$ mL/kg, $45,5 \pm 8$ mL/kg, $45,5 \pm 9$ mL/kg, $45,5 \pm 10$ mL/kg, o $45,5 \pm 11$ mL/kg, que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $39,3 - 52,5$ mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $62,8$ mL/kg, $62,8 \pm 1$ mL/kg, $62,8 \pm 2$ mL/kg, $62,8 \pm 3$ mL/kg, $62,8 \pm 4$ mL/kg, $62,8 \pm 5$ mL/kg, $62,8 \pm 6$ mL/kg, $62,8 \pm 7$ mL/kg, $62,8 \pm 8$ mL/kg, $62,8 \pm 9$ mL/kg, $62,8 \pm 10$ mL/kg, $62,8 \pm 11$ mL/kg, $62,8 \pm 12$ mL/kg, $62,8 \pm 13$ mL/kg, $62,8 \pm 14$ mL/kg, $62,8 \pm 15$ mL/kg, o $62,8 \pm 16$ mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $55,2 - 71,5$ mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $35,9$ mL/kg, $35,9 \pm 1$ mL/kg, $35,9 \pm 2$ mL/kg, $35,9 \pm 3$ mL/kg, $35,9 \pm 4$ mL/kg, $35,9 \pm 5$ mL/kg, $35,9 \pm 6$ mL/kg, $35,9 \pm 7$ mL/kg, $35,9 \pm 8$ mL/kg, $35,9 \pm 9$ mL/kg, $35,9 \pm 10$ mL/kg, $35,9 \pm 11$ mL/kg, $35,9 \pm 12$ mL/kg, o $35,9 \pm 13$ mL/kg, que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $30,4 - 42,3$ mL/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $43,4$ mL/kg, $43,4 \pm 1$ mL/kg, $43,4 \pm 2$ mL/kg, $43,4 \pm 3$ mL/kg, $43,4 \pm 4$ mL/kg, $43,4 \pm 5$ mL/kg, $43,4 \pm 6$ mL/kg, $43,4 \pm 7$ mL/kg, $43,4 \pm 8$ mL/kg, $43,4 \pm 9$ mL/kg, $43,4 \pm 10$ mL/kg, $43,4 \pm 11$ mL/kg, $43,4 \pm 12$ mL/kg, $43,4 \pm 13$ mL/kg, $43,4 \pm 14$ mL/kg, $43,4 \pm 15$ mL/kg, o $43,4 \pm 16$ mL/kg, que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico; o

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente $38,2 - 49,2$ mL/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico.

En aún otras formas de realización, el factor VIII de acción prolongada tiene una o más de las siguientes propiedades cuando se administra a una población de paciente:

una AUC_{INF} en dicho sujeto que es al menos 1,45, 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,89, 1,90 veces

mayor que la AUC_{INF} en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1440 ± 316 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1160 - 1880 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1480 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 100 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 200 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 300 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 400 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 500 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 600 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 700 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 800 hr*IU/dL por IU/kg, 1480 ± 900 hr*IU/dL por IU/kg, o 1480 ± 1000 hr*IU/dL por IU/kg, que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 2910 ± 1320 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1980 - 3970 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 2800 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 100 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 200 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 300 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 400 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 500 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 600 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 700 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 800 hr*IU/dL por IU/kg, 2800 ± 900 hr*IU/dL por IU/kg, o 2800 ± 1000 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1660 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 100 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 200 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 300 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 400 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 500 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 600 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 700 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 800 hr*IU/dL por IU/kg, 1660 ± 900 hr*IU/dL por IU/kg, o 1660 ± 1000 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1300 - 2120 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 4280 hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 100hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 200hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 300hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 400hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 500hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 600hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 700hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 800hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 900hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 1000hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 1100hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 1200hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 1300hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 1400hr*IU/dL por IU/kg, 4280 $\pm$ 1500hr*IU/dL por IU/kg, o 4280 $\pm$ 1600hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico; o

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 2960 - 6190 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico.

"Tratamiento a demanda," como se usa en la presente, significa el tratamiento que tiene lugar durante un período de tiempo corto y en respuesta a una afección existente, tal como un episodio de sangrado, o una necesidad percibida tal como cirugía programada. Las afecciones que pueden requerir tratamiento a demanda incluyen, por ejemplo, un episodio de sangrado, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma cerebral, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado en sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, o sangrado en la vaina de iliopsoas. El sujeto puede necesitar profilaxis quirúrgica, tratamiento perioperatorio, o tratamiento para cirugía. Tales cirugías incluyen, por ejemplo, cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

En una forma de realización, tratamiento a demanda 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 única. En otra forma de realización, 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 episodios de sangrado son calificados

excelentes o buenos por los médicos después del tratamiento a demanda. En otras formas de realización, 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 episodios de sangrados son calificados como aceptable después del tratamiento a demanda.

"Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan en forma intercambiable y se refieren a un compuesto polimérico compuesto de residuos de aminoácidos ligados covalentemente.

"Polinucleótido" y "ácido nucleico" se usan en forma indistinta y se refieren a un compuesto polimérico compuesto de residuos nucleotídicos unidos de modo covalente. Los polinucleótidos pueden ser ADN, ADNc, ARN, de cadena simple o cadena doble, vectores, plásmidos, fago, o virus. Los polinucleótidos incluyen, por ejemplo, los de la Tabla 1, que codifican los polipéptidos de la Tabla 2 (ver Tabla 1). Los polinucleótidos también incluyen, por ejemplo, fragmentos de los polinucleótidos de la Tabla 1, por ejemplo, los que codifican fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 2, tales como el Factor VIII, Fc, secuencia señal, 6His y otros fragmentos de los polipéptidos de la Tabla 2.

"Tratamiento profiláctico," como se usa en la presente, significa la administración de un polipéptido del Factor VIII en dosis múltiples a un sujeto durante un período de tiempo para aumentar el nivel de actividad del Factor VIII en un plasma del sujeto. El nivel aumentado puede ser suficiente para disminuir la incidencia de sangrado espontáneo o para prevenir el sangrado, por ejemplo, en el caso de una lesión imprevista. Durante el tratamiento profiláctico, el nivel de proteína plasmática en el sujeto no puede caer por debajo del nivel inicial para este sujeto, o por debajo del nivel del Factor VIII que caracteriza a la hemofilia severa (<1 IU/dl [1%]).

En una forma de realización, el régimen de profilaxis está "adaptado" al paciente individual, por ejemplo, por la determinación de los datos PK para cada paciente y la administración del Factor VIII de la invención con un intervalo de dosis que mantiene un nivel mínimo de 1-3% de la actividad de FVIII. Los ajustes se pueden realizar cuando un sujeto experimenta episodios de sangrado inaceptables definidos como ≥ 2 episodios de sangrado espontáneos durante un período de dos meses renovable. En este caso, el ajuste se dirigirá a niveles mínimos de 3-5%. En otra forma de realización, el tratamiento profiláctico da como resultado la prevención y control del sangrado, control sostenido del sangrado, protección sostenida del sangrado, y/o beneficio sostenido. Profilaxis, por ejemplo, protección sostenida se puede demostrar por un aumento de AUC al último punto de tiempo medido (AUC-LAST) y reducción de la depuración, lo que produce aumento del $t_{1/2}$ terminal en comparación con FVIII de acción corta. La

profilaxis se puede demostrar por mejor Cmax, mejor Tmax, y/o mayor tiempo de permanencia medio versus FVIII de acción corta. En algunas formas de realización, la profilaxis produce ausencia de episodios de sangrado espontáneo dentro de aproximadamente 24, 36, 48, 72, o 96 horas (por ejemplo, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, o 96 horas), después de la inyección (por ejemplo, la última inyección). En ciertas formas de realización, la profilaxis produce más de 30% (por ejemplo, más de 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 96, 87, 88, 89, o 90%, por ejemplo, más de 50%), de reducción promedio de los episodios de sangrado anualizados con una dosis de una vez por semana (por ejemplo, a 65 IU/kg). "Dosis terapéutica" como se usa en la presente, significa una dosis que logra un objetivo terapéutico, que se describe en la presente. El cálculo de la dosis requerida del factor VIII se basa en el hallazgo empírico de que, en promedio, 1 IU de factor VIII por kg de peso corporal eleva la actividad del factor VIII de plasma en aproximadamente 2 IU/dL. La dosis requerida se determina usando la siguiente fórmula:

Unidades requeridas = peso corporal (kg) x aumento deseado del factor VIII (IU/dL o % de normal) x 0,5 (IU/kg por IU/dL)

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

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

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

Las variantes de los polinucleótidos pueden comprender, o alternativamente consistir en, una secuencia de nucleótidos que es al menos 85%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, la secuencia codificadora de nucleótidos de la SEQ ID NO:1, 3, o 5 (la porción del Factor VIII, la porción de Fc, en forma individual o en conjunto) o la cadena complementaria a esta, la secuencia codificadora de nucleótidos del factor VIII o Fc mutantes y recombinantes conocidos tales como los descritos en las publicaciones y patentes citadas en la presente o la cadena complementaria de estas, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de la SEQ ID NO:2, 4, o 6 (la porción del Factor VIII, la porción de Fc, en forma individual o en conjunto), y/o fragmentos del polinucleótido de cualquiera de estas moléculas de ácido nucleico (por ejemplo, los fragmentos descritos en la presente). Los polinucleótidos que hibridan a estas moléculas de ácido nucleico en condiciones de hibridación rigurosas o condiciones de rigurosidad baja también se incluye como variantes, como los polipéptidos codificados por estos polinucleótidos siempre que estos sean funcionales.

Las variantes de polipéptidos pueden comprender, o alternativamente consistir en, una secuencia de aminoácidos que es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% idéntica a, por ejemplo, la secuencia de polipéptidos mostrada en las SEQ ID NOS:2, 4, o 6 (la porción del Factor VIII, la porción de Fc, en forma individual o en conjunto), y/o fragmentos de polipéptidos de cualquiera de estos polipéptidos (por ejemplo, los fragmentos descritos en la presente).

Por ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos, por ejemplo, 95% "idéntico" a una secuencia de referencia de nucleótidos, se considera que la secuencia de nucleótidos del ácido nucleico es idéntica a la secuencia de referencia excepto que la secuencia de nucleótidos puede incluir hasta cinco mutaciones puntuales para cada 100 nucleótidos de la secuencia de nucleótidos de referencia. En otras palabras, para obtener un ácido nucleico que tiene una secuencia de nucleótidos al menos 95% idéntica a una secuencia de nucleótidos de referencia, hasta 5% de los nucleótidos de la secuencia de referenciase puede suprimir o sustituir con otro nucleótido, o numerosos nucleótidos hasta 5% de los nucleótidos totales en la secuencia de referenciase puede insertar en la secuencia de referencia. La secuencia incógnita puede ser, por ejemplo, la secuencia completa mostrada en la SEQ ID NO:1 o 3, el ORF (marco de lectura abierta), o cualquier fragmento especificado como se describe en la presente.

Como una cuestión práctica, si cualquier molécula de ácido nucleico o polipéptido particular es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a una secuencia de nucleótidos o polipéptido de la presente invención se puede determinar convencionalmente usando programas de computación conocidos. En una forma de realización, un método para determinar la mejor coincidencia total entre una secuencia incógnita (secuencia de referencia u original) y una presente secuencia, también denominada como alineamiento de

secuencia global, se puede determinar usando el programa de computación de FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag *et al.*, *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990), que se incorpora por referencia en la presente en su totalidad. En un alineamiento de secuencia las secuencias incógnita y presente son secuencias de ADN. Una secuencia de ARN se puede comparar por la conversión de U a T. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global está en por ciento de identidad. En otra forma de realización, los parámetros usados en un alineamiento FASTDB de las secuencias de ADN para calcular el porcentaje de identidad son: Matriz=Unitaria, k-tuple=4, Penalidad de apareamiento erróneo=1, Penalidad de unión=30, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Penalidad de brecha=5, Penalidad de tamaño de brecha 0,05, Tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de nucleótidos presente, que sea más corta.

Si la secuencia de la presente es más corta que la secuencia incógnita debido a las supresiones 5' o 3', no debido a las supresiones internas, se debe realizar una corrección manual a los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no toma en cuenta los truncamientos 5' y 3' de la secuencia de la presente cuando se calcula el porcentaje de identidad. Para las secuencias de la presente truncadas en los extremos 5' o 3', con respecto a la secuencia incógnita, el porcentaje de identidad se corrige por el cálculo de la cantidad de bases de la secuencia incógnita que son 5' y 3' de la secuencia de la presente, que no se aparean/alinean, como porcentaje de las bases totales de la secuencia incógnita. Se determina si un nucleótido se apareo/alinea por los resultados del alineamiento de secuencia FASTDB. Este porcentaje luego se resta del porcentaje de identidad, se calcula por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para obtener la puntuación de porcentaje de identidad final. Esta puntuación corregida es la que se usa para el fin de la presente invención. Solo las bases exteriores a las bases 5' y 3' de la secuencia de la presente, presentadas por el alineamiento FASTDB, que no se aparean/alinean con la secuencia incógnita, se calculan para los fines de ajustar anualmente la puntuación del porcentaje de identidad.

Por ejemplo, una secuencia de la presente de 90 bases se alinea con una secuencia incógnita de 100 bases para determinar el porcentaje de identidad. Las supresiones aparecen en el extremo 5' de la secuencia de la presente y en consecuencia, el alineamiento FASTDB no muestra un apareamiento/alineamiento de las primeras 10 bases del extremo 5'. Las 10 bases no apareadas representan 10% de la secuencia (número de bases de los extremos 5' y 3' no apareadas/número total de bases de la secuencia incógnita) de modo que 10% se sustrae de la puntuación del porcentaje de identidad calculado por el programa FASTDB. Si las restantes 90 bases se aparearon perfectamente

el porcentaje de identidad final debe ser 90%. En otro ejemplo, una secuencia de 90 bases de la presente se compara con una secuencia incógnita de 100 bases. Esta vez las supresiones son supresiones internas de modo que no existen bases sobre 5' o 3' de la secuencia de la presente que no se aparean/alineen con la incógnita. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Otra vez, solo las bases 5' y 3' de la secuencia de la presente que no se aparean/alinean con la secuencia incógnita se corrigen manualmente. No se realizan 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 incógnita de la presente invención, se considera que la secuencia de aminoácidos del polipéptido de la presente es idéntica a la secuencia incógnita excepto que la secuencia de polipéptidos de la presente puede incluir hasta cinco alteraciones de aminoácidos por cada 100 aminoácidos de la secuencia de aminoácidos incógnita. En otras palabras, para obtener un polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos al menos 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos incógnita, hasta 5% del residuo de aminoácidos de la secuencia de la presente se puede insertar, suprimir, (indel) o sustituir con otro aminoácido. Estas alteraciones de la secuencia de referencia pueden aparecer en las posiciones amino o carboxi terminal de la secuencia de aminoácidos de referencia o cualquier parte entre estas posiciones terminales, intercaladas en forma individual entre los residuos de la secuencia de referencia o en uno o más grupos contiguos dentro de la secuencia de referencia.

Como una cuestión práctica, si ningún polipéptido particular es al menos 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntico a, por ejemplo, las secuencias de aminoácidos de la SEQ ID NO:2 (la porción del Factor VIII, la porción de Fc, en forma individual o en conjunto) o 4, o una secuencia de polipéptidos del factor VIII o Fc conocido, se pueden determinar convencionalmente por medio de programas de computación conocidos. En una forma de realización, un método para determinar la mejor coincidencia global entre una secuencia incógnita (secuencia de referencia u original) y una secuencia de la presente, también denominado como alineamiento de secuencia global, se puede determinar usando el programa de computación FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245(1990), incorporado en la presente por referencia en su totalidad. En un alineamiento de secuencia las secuencias incógnita de la presente son tanto las secuencias de nucleótidos como las secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento de secuencia global está en porcentaje de identidad. En otra forma de realización, los parámetros usados en el alineamiento de aminoácidos de FASTDB son: Matriz=PAM 0, k-tuplo=2, Penalidad de apareamiento erróneo=1, Penalidad de unión=20, Longitud del grupo

de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Tamaño de ventana= longitud de secuencia, Penalidad de brecha=5, Penalidad de tamaño de brecha=0,05, Tamaño de ventana=500 o la longitud de la secuencia de aminoácidos del tema, la que sea la más corta.

Si la secuencia de la presente es más corta que la secuencia incógnita debido a las supresiones N- o C-terminales, no debido a las supresiones internas, se debe realizar una corrección manual a los resultados. Esto es debido a que el programa FASTDB no toma en cuenta los truncamientos N- y C-terminales de la secuencia de la presente cuando se calcula el porcentaje de identidad global. Para las secuencias de la presente truncadas en los extremos N- y C-terminales, con respecto a la secuencia incógnita, el porcentaje de identidad se corrige por el cálculo del número de residuos de la secuencia incógnita que son N- y C-terminales de la secuencia de la presente, que no se aparean/alinean con un correspondiente residuo de la presente, como porcentaje de bases totales de la secuencia incógnita. Se determina si un residuo se apareo/alinea por los resultados del alineamiento de secuencia FASTDB. Este porcentaje luego se sustrae del porcentaje de identidad, calculado por el programa FASTDB anterior usando los parámetros especificados, para llegar a una puntuación del porcentaje de identidad final. Esta puntuación del porcentaje de identidad final es la que se usa para los fines de la presente invención. Solo los residuos de los extremos N- y C-terminales de la secuencia de la presente, que no se aparean/alinean con la secuencia incógnita, se consideran para los fines de ajuste manual de la puntuación del porcentaje de identidad. Es decir, solo el residuo incógnita se ubica más lejos de los residuos N- y C-terminal de la secuencia de la presente.

Por ejemplo, una secuencia de la presente de 90 residuos de aminoácidos se alinea con una secuencia incógnita de 100 residuos para determinar el porcentaje de identidad. La supresión se produce en el extremo N-terminal de la secuencia de la presente y en consecuencia, el alineamiento FASTDB no muestra apareamiento/alineamiento de los primeros 10 residuos en el extremo N-terminal. Los 10 residuos no apareados representan el 10% de la secuencia (número de residuos en los extremos N- y C-terminales no apareados/número total de residuos de la secuencia incógnita) de modo que se sustrae 10% de la puntuación del porcentaje de identidad calculada por el programa FASTDB. Si los restantes 90 residuos se aparearon perfectamente el porcentaje de identidad final puede ser 90%. En otro ejemplo, una secuencia de la presente de 90 residuos se compara con una secuencia incógnita de 100 residuos. Esta vez las supresiones son internas de modo que no existen residuos en los extremos N- o C-terminales de la secuencia de la presente que no se aparean/alinean con la incógnita. En este caso el porcentaje de identidad calculado por FASTDB no se corrige manualmente. Otra vez, solo las posiciones de residuo fuera de los extremos N- y C-

terminales de la secuencia de la presente, como se presenta en el alineamiento FASTDB, que no están apareadas/alineadas con la secuencia incógnita se corrigen manualmente. No se realizan correcciones manuales para los fines de la presente invención.

Las variantes de polinucleótido pueden contener alteraciones en las regiones codificadoras, regiones no codificadoras, o ambas. En una forma de realización, las variantes de polinucleótidos contienen alteraciones que producen sustituciones silentes, adiciones, o supresiones, pero no alteran las propiedades o actividades del polipéptido codificado. En otra forma de realización, las variantes de nucleótidos se producen por las sustituciones silentes debido a la degeneración del código genético. En otras formas de realización, son las variantes en que 5-10, 1-5, o 1-2 aminoácidos están sustituidos, suprimidos o añadidos en cualquier combinación. Las variantes de polinucleótidos se pueden producir por una variedad de razones, por ejemplo, para optimizar la expresión del codón para un huésped particular (cambios de codón en el ARNm humano a otros, por ejemplo, un huésped bacteriano tal como *E. coli*).

Las variantes naturales se llaman "variantes alélicas" y se refieren a una de varias formas alternativas de un gen que ocupa un locus determinado en un cromosoma de un organismo (Genes II, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). Estas variantes alélicas pueden variar en el nivel de polinucleótido y/o polipéptido y se incluyen en la presente invención. De modo alternativo, las variantes no naturales se pueden producir por técnicas de mutagénesis o por síntesis directa.

Por medio de métodos conocidos de ingeniería genética y tecnología de ADN recombinante, se pueden generar variantes para mejorar o alterar las características de los polipéptidos. Por ejemplo, uno o más aminoácidos se pueden suprimir del extremo N-terminal o C-terminal de la proteína secretada sin pérdida sustancial de la función biológica. Ron *et al.*, *J. Biol. Chem.* 268: 2984-2988 (1993), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, informó variantes de la proteína KGF que tiene actividad de unión a heparina incluso después de suprimir 3, 8, o 27 residuos de aminoácidos amino-terminales. De modo similar, el interferón gamma exhibió hasta diez veces mayor actividad después de la supresión de 8-10 residuos de aminoácidos del extremo carboxi-terminal de esta proteína. (Dobeli *et al.*, *J. Biotechnology* 7:199-216 (1988), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad.)

Además, abundante evidencia demuestra que las variantes a menudo retienen actividad biológica similar a la de la proteína natural. Por ejemplo, Gaile y colaboradores (*J. Biol. Chem.* 268:22105-22111 (1993), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad) realizó el análisis mutacional exhaustivo de la citoquina humana IL-1a. Ellos usaron mutagénesis aleatoria para generar más

de 3.500 mutantes de IL-1a individuales que promediaron 2,5 cambios de aminoácidos por variante en la longitud completa de la molécula. Se examinaron múltiples variaciones en cada posible posición de aminoácido. Los investigadores hallaron que la "mayor parte de la molécula se puede alterar con poco efecto sobre la [actividad de unión o biológica]." (Ver Resumen). En efecto, solo 23 secuencias de aminoácidos únicas, de más de 3.500 secuencias de nucleótidos examinadas, produjeron una proteína que difirió significativamente en la actividad respecto del tipo salvaje.

Como se indicó antes, 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 lipídico, unión covalente de fosfatidilinositol, entrecruzamiento, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de entrecruzamientos covalentes, formación de cisteína, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, pegilación (Mei *et al.*, *Blood* 116:270-79 (2010), que se incorpora en la presente por referencia en su totalidad), procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfación, adición de aminoácidos mediada por la transferencia de ARN a proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación. En algunas formas de realización, el Factor VIII está modificado, por ejemplo, pegilado, en cualquier ubicación conveniente. En algunas formas de realización, el Factor VIII está pegilado en el aminoácido expuesto en la superficie del Factor VIII, por ejemplo, una cisteína expuesta en la superficie, que puede ser una cisteína manipulada genéticamente. Id. En algunas formas de realización, el Factor VIII modificado, por ejemplo, Factor VIII pegilado, es un factor VIII de acción prolongada.

"Volumen de distribución en estado estacionario (Vss)" como se usa en la presente, tiene el mismo significado que el término usado en farmacología, que es el espacio aparente (volumen) en que se distribuye un fármaco. V_{ss} = la cantidad de fármaco en el cuerpo dividida por la concentración plasmática en estado estacionario.

"Aproximadamente," como se usa en la presente para un rango, modifica ambos extremos del rango. En consecuencia, "aproximadamente 10-20" significa "aproximadamente 10 a aproximadamente 20".

El polipéptido quimérico usado en la presente puede comprender el Factor VIII procesado o Factor VIII de cadena simple o una combinación de estos. "Factor VIII procesado," como se usa en la presente significa el Factor VIII que se ha escindido en la Arginina 1648 (para el Factor VIII de longitud completa)

oArginina754 (para el Factor VIII con dominio B suprimido), es decir, sitio de procesamiento intracelular. Debido a la escisión en el sitio de procesamiento intracelular, el Factor VIII procesado comprende dos cadenas de polipéptidos, la primera cadena es una cadena pesada y la segunda cadena es una cadena liviana. Por ejemplo, la proteína de fusión del factor VIII procesado-Fc (es decir, cadena pesada y cadena liviana fusionadas a Fc) corren a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa sobre un SDS-PAGE no reductor, respectivamente, y 90 kDa y 105 kDa en un SDS-PAGE reductor, respectivamente. En consecuencia, en una forma de 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 del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado. En otra forma de 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 del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado. En una forma de realización particular, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado se purifica (o aísla) del polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple, y al menos aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

"Factor VIII de cadena simple", "Factor VIII SC" o "SCFVIII" como se usa en la presente significa el Factor VIII que no ha sido escindido en el sitio de Arginina (residuo 1648 para el Factor VIII de longitud completa (es decir, residuo 1667 de la SEQ ID NO: 6) o residuo 754 para el Factor VIII con dominio B suprimido (es decir, residuo 773 de la SEQ ID NO: 2). En consecuencia, el Factor VIII de cadena simple del polipéptido quimérico usado en la presente comprende una cadena simple. En una forma de realización, el Factor VIII de cadena simple contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto. En otra forma de realización, el Factor VIII de cadena simple 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 aminoácido correspondiente a Arginina 1645 y Arginina 1648 en Factor VIII de longitud completa. En otras formas de realización, el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente

aArginina 1645 es un aminoácido diferente del aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648. En ciertas formas de realización, la sustitución o mutaciones un aminoácido diferente de arginina, por ejemplo, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina, o taurina. La proteína de fusión del Factor VIII de cadena simple-Fc puede correr a aproximadamente 220 kDa en un SDS-PAGE no reductor y a aproximadamente 195 kDa en un SDS-PAGE reductor.

En una forma de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple se purifica (o aísla) del polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado, ya sea menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico usado en la presente es el Factor VIII de cadena simple. En otra forma de realización, al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, o aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, o aproximadamente 35% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple. En otras formas de realización, aproximadamente 1%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 15%, aproximadamente 10%-aproximadamente 20%, aproximadamente 15%-aproximadamente 25%, aproximadamente 20%-aproximadamente 30%, aproximadamente 25%-aproximadamente 35%, aproximadamente 30%-aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico usado en la presente es el Factor VIII de cadena simple. En una forma de realización particular, aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20% o aproximadamente 25%, %, aproximadamente 30%, o aproximadamente 35% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico usado en la presente es el Factor VIII de cadena simple. En otras formas de realización, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico usado en la presente es el Factor VIII de cadena simple. En algunas formas de realización, la relación del Factor VIII de cadena simple al factor VIII procesado del polipéptido quimérico es (a) aproximadamente 25% del

FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 75% del Factor VIII procesado; (b) aproximadamente 20% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 80% del Factor VIII procesado; (c) aproximadamente 15% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 85% del Factor VIII procesado; (d) aproximadamente 10% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 90% del Factor VIII procesado; (e) aproximadamente 5% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 95% del Factor VIII procesado; (f) aproximadamente 1% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 99% del Factor VIII procesado; (g) aproximadamente 100% del Factor VIII procesado, (h) aproximadamente 30% del Factor VIII de cadena simpleaproximadamente 70% % del Factor VIII procesado, (i) aproximadamente 35% del Factor VIII de cadena simpleaproximadamente 65% % del Factor VIII procesado, o (j) aproximadamente 40% del Factor VIII de cadena simpleaproximadamente 60% % del Factor VIII procesado.En otras formas de realización, la relación del FactorVIII de cadena simpleal factor VIII procesadodel polipéptido quiméricoes (a) aproximadamente 30% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente 70% del Factor VIII procesado; (b) aproximadamente40% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente60% del Factor VIII procesado; (c) aproximadamente50% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente50% del Factor VIII procesado; (d) aproximadamente60% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente40% del Factor VIII procesado; (e) aproximadamente70% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente30% del Factor VIII procesado; (f) aproximadamente80% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente20% del Factor VIII procesado; (g) aproximadamente90% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente10% del Factor VIII procesado; (h) aproximadamente95% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente5% del Factor VIII procesado;(i) aproximadamente99% del FactorVIII de cadena simpleaproximadamente1% del Factor VIII procesado; o (j) aproximadamente 100% del FactorVIII de cadena simple.

La porción del Factor VIII del polipéptidoquimérico usado en la presentetiene actividad de Factor VIII.La actividad de Factor VIIIse puede medir por cualquiera de los métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, uno de estos métodos puede ser un ensayo cromogénico. El mecanismo del ensayo cromogénico se basa en los principios de la cascada de coagulación sanguínea, donde el Factor VIII activado acelera la conversión del Factor X en el Factor Xa en presencia de Factor IX activado, fosfolípidos y iones calcio. La actividad del Factor Xa se evalúa por la hidrólisis de un sustrato de p-nitroanilida (pNA) específico para el Factor Xa. La tasa inicial de liberación de p-nitroanilina medida a 405 nM es directamenteproporcional a la actividad del Factor Xa y en consecuencia a laactividad del Factor VIII en la muestra. El ensayo cromogénico está recomendado

por el Subcomité de Factor VIII y Factor IX del Comité Científico y de Estandarización (SSC) de la Sociedad Internacional de Trombosis y Hemostasia (ISTH). Desde 1994, también se ha usado el ensayo cromogénico como método de referencia de la Farmacopea Europea para la asignación de potencia del concentrado de FVIII. En consecuencia, en una forma de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII comparable a un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde dicho Factor VIII procesado se fusiona a una de las dos porciones de Fc), cuando la actividad de Factor VIII se mide in vitro por un ensayo cromogénico.

En otra forma de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple de esta invención tiene una tasa de generación de Factor X comparable a un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc).

A fin de activar el Factor X a Factor Xa, el Factor IX activado (Factor IXa) hidroliza un enlace arginina-isoleucina del Factor X para formar el Factor Xa en presencia de Ca^{2+} , fosfolípidos de membrana, y un cofactor del Factor VIII. En consecuencia, la interacción del Factor VIII con el Factor IX es crítica en la vía de coagulación. En ciertas formas de realización, el polipéptido quimérico que comprende el factor VIII de cadena simple puede interactuar con el Factor IXa a una tasa comparable con un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc).

Además, el Factor VIII se une al Factor de von Willebrand mientras está inactivo en circulación. El Factor VIII se degrada rápidamente cuando no se une al vWF y se libera de vWF por la acción de la trombina. En algunas formas de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple se une al Factor de von Willebrand a un nivel comparable con un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc).

El Factor VIII se puede inactivar con la proteína C activada en presencia de calcio y fosfolípidos. La proteína C activada escinde la cadena pesada del Factor VIII después de la Arginina 336 del dominio A1, que altera el sitio de interacción del sustrato del Factor X y escinde después de Arginina 562 en el dominio A2, que

potencia la disociación del dominio A2 así como altera un sitio de interacción con el Factor IXa. Esta escisión también bisecciona el dominio A2 (43 kDa) y genera los dominios A2-N (18 kDa) y A2-C (25 kDa). En consecuencia, la proteína C activada puede catalizar múltiples sitios de escisión en la cadena pesada. En una forma de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple es inactivado por la Proteína C activada a un nivel comparable con un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc).

En otras formas de realización, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII *in vivo* comparable con un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc). En una forma de realización particular, el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple es capaz de proteger un ratón HemA a un nivel comparable a un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde dicho Factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc) en un modelo de transección de la vena caudal de ratón HemA.

El término "comparable" como se usa en la presente significa una tasa o nivel comparado resultante del uso del polipéptido quimérico que es igual a, sustancialmente igual, similar a la tasa o nivel de referencia. El término "similar" como se usa en la presente significa una tasa o nivel comparado que tiene una diferencia no mayor de 10% o no más de 15% de la tasa o nivel de referencia (por ejemplo, tasa de generación FXa por un polipéptido quimérico que consiste esencialmente en que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde dicho Factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc). El término "sustancialmente igual" significa una tasa o nivel comparado que tiene una diferencia de no más de 0,01%, 0,5% o 1% de la tasa o nivel de referencia.

La presente invención también incluye una composición que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, donde al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% del polipéptido quimérico comprende una porción del Factor VIII, que es el Factor VIII de cadena simple y una segunda porción. En otra forma de realización, aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente

50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, o aproximadamente 99% del polipéptido quimérico en la composiciónes el Factor VIII de cadena simple. En otras formas de realización, la segunda porción es una Fc, XTEN, o albúmina, secuencia PAS, transferrina, CTP (péptido C-terminal de 28 aminoácidos (CTP) de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o dos o más combinaciones de estas. En aún otras formas de realización, la composición de la presente invención comprende una combinación de un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII procesado y un polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple, (a) donde aproximadamente 30% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 70% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (b) donde aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 60% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (c) donde aproximadamente 50% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 50% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (d) donde aproximadamente 60% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (e) donde aproximadamente 70% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 30% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (f) donde aproximadamente 80% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 20% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (g) donde aproximadamente 90% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 10% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (h) donde aproximadamente 95% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 5% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; (i) donde aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple, y aproximadamente 1% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado; o (j)

donde aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple.

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

En otras formas de realización, la composición de la invención tiene una tasa de generación de Factor X comparable a una composición que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en o consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc). En aún otras formas de realización, la composición que comprende el factor VIII de cadena simple puede interactuar con el Factor IXa a una tasa comparable a una composición que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en o consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc). En formas de realización adicionales, el Factor VIII de cadena simple del polipéptido quimérico de la presente composición está inactivado por la Proteína C activada a un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico de una composición (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en o consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc). En una forma de realización particular, la composición que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a la composición que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en o consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde el factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc). En algunas formas de realización, la composición que comprende el Factor VIII de cadena simple de la invención es capaz de proteger el ratón HemA a un nivel comparable con la composición que comprende el Factor VIII procesado (por ejemplo, una composición que comprende un polipéptido quimérico, que consiste esencialmente en o consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde dicho Factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc) en el modelo de transección de la vena caudal de ratón HemA.

La presente invención además proporciona un método para tratar una afección de sangrado en un sujeto humano usando la composición de la invención. Un ejemplo de método comprende administrar al sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición farmacéutica/formulación que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, donde al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% del polipéptido quimérico comprende la porción del Factor VIII, que es el Factor VIII de cadena simple, y una segunda porción.

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

En algunas formas de realización, el tipo de sangrado asociado con la afección de sangrado se selecciona de hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma cerebral, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado en sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, y sangrado en la vaina de iliopsoas.

En otras formas de realización, el sujeto que sufre de la afección de sangrado necesita tratamiento para cirugía, que incluye, por ejemplo, profilaxis quirúrgica o tratamiento perioperatorio. En un ejemplo, la cirugía se selecciona de cirugía menor y cirugía mayor. Los ejemplos de procedimientos quirúrgicos incluyen extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, cirugía de reemplazo articular (por ejemplo, reemplazo total de rodilla, reemplazo de cadera, y similares), cirugía cardíaca, y cesárea.

En otro ejemplo, el sujeto se trata en forma concomitante con FIX. Debido a que los compuestos de la invención son capaces de activar FIXa, se pueden usar para preactivar el polipéptido FIXa antes de la administración del FIXa al sujeto.

Los métodos de la invención se pueden practicar en el sujeto que necesita tratamiento profiláctico o tratamiento a demanda.

La composición farmacéutica que comprende al menos 30% del Factor VIII de cadena simple se puede formular de cualquier forma apropiada de administración, que incluye, por ejemplo, administración tópica (por ejemplo, transdérmica u ocular), oral, bucal, nasal, vaginal, rectal o parenteral.

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

En un ejemplo, la formulación farmacéutica es una formulación líquida, por ejemplo, una solución acuosa, isotónica y regulada. En otro ejemplo, la composición farmacéutica tiene un pH que es fisiológico, o cercano a fisiológico. En otros ejemplos, la formulación acuosa tiene osmolaridad y salinidad fisiológica o cercana a fisiológica. Puede contener cloruro de sodio y/o acetato de sodio. En algunos ejemplos, la composición de la presente invención está liofilizada.

Habiendo descrito la presente invención en detalle, la misma se entenderá más claramente con referencia a los siguientes ejemplos, que se incluyen con la misma solo con fines ilustrativos y no se consideran limitación de la invención. Todas las patentes y publicaciones mencionadas en la presente se incorporan expresamente por referencia.

Ejemplos

Ejemplo 1

Clonación, expresión y purificación de rFVIII_{FC}

Todos los procedimientos de biología molecular se llevaron a cabo siguiendo técnicas estándares. La secuencia de codificación de FVIII humano (Número de acceso Genbank NM_000132), que incluye su secuencia de señal nativa, se obtuvo por reacciones de transcripción inversa de la cadena de la polimerasa (RT-PCR) de ARN polyA hepático humano. Debido al gran tamaño del FVIII, la secuencia de codificación se obtuvo en varias secciones de reacciones de RT-PCR separadas, y se reunió a través de una serie de reacciones de PCR, digestiones de restricción y ligaduras en un vector de clonación intermedio que contiene una región codificadora de FVIII (BDD) con el dominio B eliminado con una fusión de serina 743 (S743) a glutamina 1638 (Q1638), con la eliminación de 2682 bp del dominio B de FVIII de longitud completa. La secuencia de Fc IgG1 humana (por ej., número de acceso Genbank Y14735) se obtuvo por PCR desde una biblioteca de ADNc de leucocitos, y la cinta de expresión final se hizo de manera tal que la secuencia de FVIII BDD se fundiera directamente al extremo

terminal N de la secuencia de Fc (dominios de la bisagra, CH2 y CH3, que comienzan en D221 de la secuencia de IgG1, numeración de EU) sin enlaces intervinientes. Para la expresión de la cadena de Fc sola, se creó la secuencia de señal de cadena ligera (kappa) de Igk de ratón conoligonucleótidos sintéticos y se agregó a la secuencia codificadora de Fc por el uso de PCR para habilitar la secreción de este producto de proteína. Las secuencias de codificación de cadena de FVIII-Fc y Fc se clonaron en un vector de expresión dual, pBudCE4.1 (Invitrogen, Carlsbad, CA).

Se transfectaron células 293H de HEK (Invitrogen, Carlsbad, CA) con el plásmido pSYN-FVIII-013 por el uso de un reactivo de transfección de Lipofectamina (Invitrogen, Carlsbad, CA)), y una línea celular estable se seleccionó con zeocina. Se cultivaron células en cultivo de suspensión libre de suero, y proteína rFVIII-Fc purificada de medios de cosecha clarificados por el uso de un proceso de purificación de cuatro columnas, que incluye un paso de purificación de afinidad específica a FVIII (McCue J. *et al.*, *J. Chromatogr. A.*, 1216(45): 7824-30 (2009)), seguido por una combinación de columnas de intercambio de aniones y una columna de interacción hidrofóbica.

Ejemplo 2

Caracterización bioquímica

FVIII-Fc recombinante (rFVIII-Fc) procesado se sintetiza como dos cadenas de polipéptidos, una cadena que consiste en BDD-FVIII (fusión de S743-Q1638, 1438 aminoácidos) fundido al dominio Fc (dominios de la bisagra, CH2 y CH3) de IgG1 (226 aminoácidos, que se extienden de D221 a G456, numeración de EU), para una longitud total de cadena de 1664 aminoácidos, donde la otra cadena consiste en la misma región de Fc sola (226 aminoácidos). Si bien se esperaba que las células transfectadas con el plásmido de expresión dual FVIII-Fc/Fc secreten tres productos (dímero de FVIII-Fc, monómero de FVIII-Fc, y dímero de Fc), únicamente se detectaron el monómero de FVIII-Fc y el dímero de Fc en los medios condicionados. El FVIII-Fc purificado se analizó por análisis de SDS-PAGE no reductor y reductor (Figura 2A y B). Para el SDS-PAGE no reducido, se halló que las bandas migraban a aproximadamente 90 kDa y 130 kDa, consistente con los pesos moleculares predichos de la cadena pesada de FVIII-Fc (HC) y la fusión de cadena liviana-Fc dimérico (LCFc2) (Figura 2A, hilera 3). También se detectó una tercera banda a aproximadamente 220 kDa, consistente con el peso molecular predicho para el FVIII-Fc de cadena única (SC FVIII-Fc; HC+LCFc2), donde el residuo de arginina en la posición 754 (1648 con respecto a la secuencia de longitud completa) no se escinde durante la secreción. Para el análisis de SDS-PAGE reducido, se observó que bandas principales migraban a aproximadamente 25 kDa, 90 kDa, 105 kDa, y 195 kDa, consistentes con los pesos moleculares predichos para la cadena única de Fc, HC, LCFc, y SC FVIII-Fc (Figura 2B, hilera

3). La co-transfección con PC5 humano, un miembro de las proteasas del tipo de proproteína convertasa subtilisina/kexina (PCSK), dio lugar al procesamiento completo del producto de rFVIII^hFc (Figura 2A, B, hilera 2).

El análisis de densitometría de varias partidas de rFVIII^hFc luego de SDS-PAGE indicó una pureza mayor que el 98% de las bandas esperadas. También se utilizó cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para evaluar el grado de agregación presente, y se halló que todas las partidas tenían niveles agregados a 0,5% o menos.

La estructura de rFVIII^hFc se analizó en forma adicional por la escisión, reducción y análisis de la trombina por LC/UV y LC/MS. Los cuatro fragmentos del Factor VIII generados por la trombina (por escisiones en los tres residuos de arginina, en las posiciones 372, 740 y 795 (795 corresponde a 1689 con respecto a la secuencia de FVIII de longitud total), pueden detectarse por absorbancia UV (Figura 2C), correspondiente a los siguientes segmentos de la proteína: Fc (pico 1), Fc de cadena liviana (pico 2); el dominio de A1 de la cadena pesada (pico 3) y el dominio de A2 de la cadena pesada (pico 4). El enlace del dominio B de 14 aminoácidos y los péptidos relacionados con ~ 6 kDa a3 no se detectan por absorbancia UV debido a su tamaño pequeño.

El análisis de la digestión de trombina de rFVIII^hFc por HPLC/MS proporcionó información detallada adicional de los cuatro dominios principales así como también de los péptidos relacionados con ~6 kDa a3, y se comparó con REFACTO®, una proteínaBDD-FVIII recombinante derivada de CHO (rBDD FVIII), por el uso de los mismos métodos. Se pasaron muestras de FVIII a través de columnas de Detergent-OUTDTG-100X (GBioscience, Maryland Heights, MO) para la eliminación de Tween, completamente digerido con trombina, reducido y analizado por RP-HPLC-UV (POROS R1/10, Applied Biosystems) o RP-HPLC-MS (Agilent 1200 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 6210TOF) por el uso de gradientes de acetonitrilo en agua + ácido fórmico 0,1%. La secuencia de péptidos también se confirmó con el mapeo de péptidos LysC, analizado por RP-HPLC/MS (Thermo Finnigan LTQ-XL-ETD).

Según lo esperado, la cromatografía de corriente iónica total (TIC) de rFVIII^hFc (Figura 2D) parece similar al cromatograma de UV (Figura 2C). Cinco de los seis productos esperados pueden detectarse por LC/MS, que incluyen dos formas de la región ácida a3 generada a partir de los isoformas procesados y de cadena única, así como la trombina utilizada para la digestión. También se observó una forma truncada adicional de la región ácida de a3, que se describe en forma más completa a continuación. FVIII rBDD dio un cromatograma TIC similar, pero sin la cadena de Fc libre y con una masa diferente para LC comparada con el rFVIII^hFc LC-Fc, consistente con la falta de una región de Fc (datos no mostrados).

Debido a la heterogeneidad de la glicosilación sobre gran parte de la proteína, los espectros de masas desconvolutados para las regiones de A1, LC-Fc, y Fc son complejos y, por lo tanto, la identidad de todos los iones moleculares no se ha establecido. Sin embargo, se halló que la masa observada para los tres picos principales de la región de Fc coincidía con los isoformas G0, G1, y G2 hallados sobre las moléculas de IgG, correspondientes a los oligosacáridos biantenarios que terminan en 0, 1 o 2 residuos de galactosa. Los espectros de masas desconvolutados de los péptidos relacionados con a3 y el dominio de A2 proporcionan los datos más definitivos, dado que no existe heterogeneidad en las modificaciones postranslacionales en estas regiones, permitiendo la identificación precisa de las masas esperadas.

Se predice que el péptido del extremo terminal N de 6 kDa liberado de LC luego de la escisión de R1689 comprende la región ácida de a3 (aminoácidos E1649 a R1689) si deriva del isoformo procesado, y el dominio B de 14 aminoácidos truncados fundido a la región ácida de a3 si deriva del isoformo de cadena única. Se halló que tanto rFVIII Fc como rBDD FVIII contenían ambas formas de la región de a3, proporcional los niveles esperados basados en el análisis de SDS-PAGE. Además, ambas proteínas contenían una forma truncada de la región de a3 correspondiente a aminoácidos D1658-R1689, de acuerdo con lo que se ha informado con otros productos de FVIII, aunque esta se halló en mayor abundancia en rBDD FVIII que en rFVIII Fc.

El dominio de A2 contiene tres sitios de sulfatación potencial de tirosina, pero no contiene sitios de glicosilación que puedan dar lugar a una heterogeneidad compleja, y, por lo tanto, pueden calcularse las masas exactas de esta región. Además del pico principal esperado en el espectro de masas desconvolutado de rFVIII Fc correlacionadas con la masa de la secuencia de S373 a R740 (Figura 2E), se identificaron dos formas adicionales correspondientes a truncaciones conocidas de FVIII HC, correlacionadas con un dominio de A2 truncado en E720 y Y729. Estas formas truncadas informadas también se observaron directamente en el espectro desconvolutado de rBDD FVIII A2 (Figura 2E). Tanto rFVIII Fc como rBDD FVIII A2 contenían cantidades relativas similares de la forma truncada en Y729 mientras que el dominio de A2 de rBDD FVIII A2 contenía un nivel notablemente mayor de la forma truncada en E720 en comparación con la misma forma en rFVIII Fc (Figura 2E).

La secuencia principal de rFVIII Fc se confirmó por el mapeo de péptidos con digestiones de lisil endopeptidasa (Lys-C) seguido por detección espectrométrica UV y de masa. De los 99 péptidos teóricos producidos a partir de rFVIII Fc, se detectaron 81, correspondientes al 98% de la secuencia total. Las modificaciones postranslacionales de rFVIII Fc también se caracterizaron por este método. FVIII contiene 6 sitios de sulfatación potencial de tirosina,

correspondientes a las posiciones 346, 718, 719, 723, 1664, y 1680. Se hallaron péptidos completamente sulfatados correspondientes a estos seis sitios, con cantidades trazas de péptidos no sulfatados correspondientes a la posición 1680 de acuerdo con lo evaluado por la integración del cromatograma iónico total en los espectros de masas, y péptidos no sulfatados no detectables correspondientes a las otras posiciones. BDD FVIII también contiene 6 sitios potenciales de N-glicosilación, de los que cuatro se han informado como glicosilados en productos de FVIII recombinante. En forma consistente con esto, se halló que rFVIII Fc tenía los mismos 4 sitios glicosilados; se halló que N239 y N2118 contenían estructuras elevadas de manosa, mientras que se halló que N41 y N1810 tenían carbohidratos más complejos, similares a los hallados en rBDD FVIII. Se halló que la glicosilación enlazada con N de la región Fc igualaba los isoformas G0, G1, y G2 halladas con el mapa de trombina por LC/MS. Se ha informado que FVIII tiene sitios de O-glicosilación en Ser 741 y 743 que están parcialmente ocupados, y se halló que también este era el caso con rFVIII Fc.

El polipéptido rFVIII Fc producido sin enzimas con procesamiento cotransfectado exhibieron 15-25% de FVIII Fc de cadena única (SC FVIII Fc), que difiere de rFVIII Fc procesado por un enlace de péptido único entre R754 y E755 (R1648/E1649 con respecto al FVIII de longitud completa). Este isoformo se purificó y caracterizó en todos los ensayos bioquímicos descritos con anterioridad, y se halló que era comparable a rFVIII Fc de acuerdo con lo mostrado a continuación. Se halló que la actividad de FVIII Fc de cadena única purificado era similar a rFVIII Fc en un ensayo cromogénico así como también por los varios ensayos funcionales descritos a continuación.

Medición de la actividad de FVIII por ensayos cromogénicos y aPPT en una etapa

La actividad de FVIII se midió por un ensayo cromogénico de FVIII. Se halló que la actividad específica promedio de cuatro partidas separadas de rFVIII Fc era de 9762 ± 449 IU/mg por el ensayo cromogénico, correspondiente a 2148 ± 99 IU/nmol. Se halló que la actividad específica promedio de catorce partidas separadas de rFVIII Fc era de 8460 ± 699 IU/mg por el ensayo de aPTT, y 9348 ± 1353 IU/mg por el ensayo cromogénico, correspondiente a 1861 ± 154 y 2057 ± 298 IU/nmol, respectivamente. La actividad de FVIII FVIII:Fc de cadena única también se midió por el ensayo cromogénico y se comparó con el rFVIII:Fc completamente procesado o rFVIII:Fc DS (que contenía aproximadamente 25% de rFVIII:Fc de cadena única). Como muestra la Tabla 3A, el rFVIII Fc de cadena única no mostró diferencias significativas en la actividad de FVIII en comparación con la actividad del Factor VIII de FVIII Fc completamente procesado o rFVIII Fc DS por el ensayo cromogénico, tanto en la presencia como en la ausencia de Factor de von

Willebrand (VWF). La Tabla 3B muestra que la actividad complete de SCrFVIIIIFc, de acuerdo con lo medido por el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activado en una etapa (aPTT), se observó en ausencia de VWF.

TABLA _3A_Actividad de FVIII por ensayo cromogénico

Matriz	Muestra	Actividad Específica Cromogénica (IU/mg)	CV%*
plasma empobrecido con FVIII	rFVIIIIFcDS (NP 25%) (RECD-19189-09-013)	9066	2,49
	rFVIIIIFc de cadena única (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	8194	2,72
	rFVIIIIFc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular manipulada)	9577	8,34
plasma empobrecido con FVIII y vWF	rFVIIIIFcDS (NP 25%) (RECD-19189-09-013)	10801	8,92
	rFVIIIIFc de cadena única (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	9498	4,70
	rFVIIIIFc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular manipulada)	9569	4,54
Plasma empobrecido con suplementado con VWF humano	rFVIIIIFc	9982	4.3
	SC rFVIIIIFc	8984	4.6
	rFVIIIIFc completamente procesado	8275	8.2

*CV=coeficiente de variación

TABLA _3B_Actividad de FVIII por ensayo de aPTT

Matriz	Muestra	Actividad Específica	CV%
--------	---------	----------------------	-----

		(IU/mg) de coagulación (aPTT)	
plasma empobrecido con FVIII	rFVIII FcDS (NP 25%) (RECD-19189-09-013)	8210	5,88
	rFVIII Fc de cadena única (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	3108	6,57
	rFVIII Fc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular manipulada)	8683	3,57
plasma empobrecido con FVIII y vWF	rFVIII FcDS (NP 25%) (RECD-19189-09-013)	15621	6,47
	rFVIII Fc de cadena única (purificado a partir de RECD 19189-09-013)	13572	2,41
	rFVIII Fc completamente procesado (purificado a partir de una línea celular manipulada)	15170	10,42
Plasma empobrecido con suplementado con VWF humano	rFVIII Fc	7742	7.4
	SC rFVIII Fc	3133	4.9
	rFVIII Fc completamente procesado	8495	4.0

En un ensayo de coagulación de una etapa (APTT), SC rFVIII Fc demostró una reducción del 60% en la actividad cuando el plasma tiene un nivel normal de VWF, lo que sugiere el rol potencial del VWF en la activación de SC rFVIII Fc. Esta observación también se confirmó por la repetición de la adición de VWF humano al plasma empobrecido con FVIII/VWF (Tabla 3), donde la actividad coagulante de SC rFVIII Fc se redujo al mismo nivel que la del plasma deficiente de FVIII congénito.

Actividad en el complejo Xase

La actividad de FVIII también se midió en el contexto del complejo Xase, por la incubación de FIX activado y REFACTO® activado con trombina o proteína de rFVIII Fc sobre una superficie de fosfolípidos en presencia de calcio, y el

monitoreo de la conversión de FX a FXa de acuerdo con lo medido por la escisión de un sustrato cromogénico o fluorogénico, a partir del que se determinaron constantes de generación de FXa. Luego, este ensayo se modificó por la variación de un componente del ensayo mientras se mantenían los otros constantes con el fin de examinar las interacciones con cada componente individual.

La constante de generación de FXa se determinó como una función de la variación de las concentraciones de fosfolípidos para rFVIII Fc DS, rBDD FVIII, y rFVIII Fc de cadena única (Figura 3A), por el uso de vesículas de fosfolípidos sintéticos (25% de fosfatidil serina/75% de fosfatidil colina). Se halló que ambas proteínas tenían un perfil de actividad similar, con actividades de picos a aproximadamente 156 μ M de fosfolípidos.

Luego, la constante de generación de FXa se determinó como una función de la variación de concentraciones de FX, y de los valores calculados de Km y Vmax (Figura 3B). Se halló que los perfiles de actividad para rFVIII Fc DS, rBDD FVIII, y rFVIII Fc de cadena única eran similares, con Km y Vmax similares (Tabla 4). Finalmente, la constante de generación de FXa se determinó como una función de la variación de concentraciones de FIX (Figura 3C). Los perfiles de actividad parecían similares, con Kd y Vmax similares (Tabla 4). Se obtuvieron resultados Similares por el uso de plaquetas como una fuente de fosfolípidos (datos no publicados, junio del 2009).

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

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

TABLA 5. Interacciones de FIXa con proteínas

Fuente de Lípidos	Molécula	Km (nM)	Vmax (nM/min)
PS 25%-PC 75%	rFVIII Fc DS	2,8 $\pm$ 0,4	4,5 $\pm$ 0,3
	rBDD FVIII	2,5 $\pm$ 0,3	4,0 $\pm$ 1,0
	NP rFVIII Fc	2,3 $\pm$ 0,2	3,8 $\pm$ 0,4

Inactivación por APC

Una vez activa, FVIII se inactiva por la escisión de la proteína C activada (APC), así como también por la disociación del dominio de A2. rFVIII Fc y rBDD FVIII se activaron por trombina, luego se incubaron con APC durante tiempos diferentes y la actividad se determinó en un ensayo de generación de FXa (Figura 4). En ausencia de la activación de trombina, se detectó poca generación de FXa,

y esta aumentó significativamente con la digestión de trombina. El tratamiento con APC durante 90 minutos derivó en una reducción significativa en las constantes de generación de FXa, similares a las de las muestras no activadas, y estos resultados fueron similares para rFVIII^h DS, rBDD FVIII, y rFVIII^h de cadena única.

Afinidad para vWF

Las interacciones de FVIII con el factor de von Willebrand (vWF) se midieron por análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIAcore), con base en la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR), para determinar las cinéticas de la unión de rFVIII^h y rBDD FVIII hacia vWF (Tabla 6). Los parámetros de la constante cinética de Ka (constante de asociación) y Kd (constante de disociación), y la afinidad de KD (Kd/Ka), se determinaron para cada interacción de FVIII bajo condiciones idénticas. Se halló que rFVIII^h y rBDD FVIII tenían una afinidad de unión a nM baja (KD) para vWF, de 1,64±0,37 y 0,846±0,181 nM, respectivamente. Las proteínas tenían constantes de disociación similares, con una diferencia de dos veces en la constante de asociación que da lugar a una diferencia de dos veces en la afinidad.

TABLA 6. Análisis de unión biocore de proteínas FVIII a vWF

Analito	Ligando	N	Parámetros de la constante cinética		Constante de disociación/ Constante de asociación
			Constante de asociación (M ⁻¹ s ⁻¹)	Constante de disociación (s ⁻¹)	KD(M)
rFVIII ^h DS	h ^h Wf	5	7,92 ± 1,51x10 ⁵	1,25 ± 1,12x10 ⁻³	1,64 ± 0,37x10 ⁻⁹
NP rFVIII ^h	h ^h Wf	5	8,66 ± 1,10x10 ⁵	1,09 ± 0,09x10 ⁻³	1,28 ± 0,22x10 ⁻⁹
rBDD FVIII	h ^h Wf	5	13,7 ± 1,50x10 ⁵	1,14 ± 0,12x10 ⁻³	0,846 ± 0,181x10 ⁻⁹

De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 6, se halló que la afinidad de rFVIII^h:Fc DS o rFVIII^h de cadena única con vWF se encontraba en el rango bajo de nM, aproximadamente dos veces mayor que la de BDD FVIII sola. En concentraciones fisiológicas, esto daría lugar a una ligera reducción en el porcentaje de rFVIII^h (procesado o de cadena única) complejada con vWF en comparación con FVIII libre, sin embargo, estudios in vivo han indicado que la vida media de rFVIII^h se prolonga en forma significativa sobre la longitud completa o

BDD FVIII más allá de su afinidad ligeramente más baja y, por lo tanto, esto no parece comprometer la vida media de la molécula. Puede ser posible que la rFVIIIIFc libre se recicle en forma más eficiente a través de la vía de FcRn y, por lo tanto, esto puede contribuir a una mayor prolongación de la vida media.

Afinidad para vWF y la liberación mediada por trombina de vWF

El factor VIIIIFc recombinante con el dominio B eliminado (rFVIIIIFc) se expresó en células HEK293. Durante la biosíntesis en células HEK293, la mayor parte del rFVIIIIFc se procesa por proteólisis limitada para generar una cadena pesada de FVIII (HC) y una cadena liviana de FVIII (LC) a la que se une el resto Fc. Se presume que la disociación espontánea de la HC y LC contribuye a la pérdida de la actividad de FVIII en plasma y durante el almacenamiento de medicamentos de FVIII. La porción restante de la rFVIIIIFc biosintetizada, que no se procesa, forma un isomorfo de cadena única de rFVIIIIFc (SC rFVIIIIFc), que puede proporcionar una elaborabilidad y estabilidad aumentadas en comparación con la rFVIIIIFc procesada.

Este ejemplo describe un ensayo que compara la interacción de SC rFVIIIIFc con el factor de von Willebrand (vWF) en relación con la interacción de rFVIIIIFc con vWF. Las interacciones con vWF se midieron por un análisis de interacción biomolecular en tiempo real (BIAcore), con base en la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR), para determinar las cinéticas de la unión de rFVIIIIFc y SC rFVIIIIFc hacia vWF (Tabla 11 y Figura 16A). El vWF derivado de plasma humano libre de FVIII se inmovilizó por acoplamiento de amina sobre la superficie de un biosensor en niveles lo suficientemente bajos para prevenir la limitación del transporte de masa. rFVIIIIFc y SC rFVIIIIFc se inyectaron en forma secuencial en un modo de cinéticas de ciclo único en concentraciones que oscilan de 0,13 a 5,0 nM. Los datos de Sensorgram data se ajustaron a un modelo de interacción de 1:1.

Los parámetros de la constante cinética de Ka (constante de asociación) y Kd (constante de disociación), y la KD de afinidad (Kd/Ka), se determinaron para cada interacción de FVIII bajo condiciones idénticas. Se halló que ambos rFVIIIIFc y SCrFVIIIIFc tenían una afinidad de unión baja de nM (KD) para vWF, de 0,34±0,1 y 0,31±0,1 nM, respectivamente. Ambos isoformas también tenían constantes de asociación y constantes de disociación similares.

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

Analito	Ligando	N	Parámetros de la constante cinética		Constante de disociación/ Constante de asociación
			Constante	Constante de	KD(M)

			de asociación (M-1s-1)	disociación(s- 1)	
rFVIIIIFc	hVWF	6	2,6 ± 0,4x10 ⁵	8,9 ± 1,3x10 ⁻⁴	3,4 ± 0,1x10 ⁻¹⁰
SC rFVIIIIFc	hVWF	6	2,7 ± 0,1x10 ⁵	8,4 ± 0,4x10 ⁻⁴	3,1 ± 0,1x10 ⁻¹⁰

Luego, se midió la liberación mediada por trombina de rFVIIIIFc, SC rFVIIIIFc, y de FVIII con el dominio B eliminado carente de restos Fc (rBDD FVIII) a 25°C y 37°C. El vWF humano se inmovilizó por acoplamiento de amina en niveles similares sobre tres celdas de flujo sobre la superficie del biosensor. La celda de flujo restante actuó como un blanco con los propósitos de referencia. Las proteínas de rFVIIIIFc y SC rFVIIIIFc se capturaron por vWF y se dejaron disociar lentamente, y las concentraciones de rFVIIIIFc y SC rFVIIIIFc se ajustaron para obtener niveles de captura equimolar hacia el final de la fase de disociación. Se prepararon soluciones de trombina humana por la dilución serial en 2 veces y se aplicaron a concentraciones que oscilaban de 0,005 a 20 U/ml, lo que da lugar a la liberación proteolítica de las especies de FVIIIa de vWF. La liberación mediada por trombina de la rFVIIIIFc activada, SC rFVIIIIFc, y rBDD FVIII de vWF se monitoreó en tiempo real por el uso de un biosensor óptico basado en SPR (Figura 16B). Luego de la sustracción de la referencia en blanco (Figura 16C), se determinó la tasa de liberación como una función de la concentración de trombina (Figura 16D). La concentración efectiva máxima media de trombina (EC₅₀) para SC rFVIIIIFc fue de 12±1 U/ml en comparación con 3,9±0,3 U/ml para rFVIIIIFc a 25° C y fue de 15±1 U/ml para SC rFVIIIIFc en comparación con 4,8±0,2 U/ml para rFVIIIIFc a 37°C (Figura 16E). rFVIIIIFc tenía un valor de EC₅₀ de trombina similar en comparación con rBDD FVIII, con valores de 3,9±0,3 U/ml y 3,3±0,3 U/ml, respectivamente a 25°C y valores de 4,8±0,2 U/ml y 4,0±0,2 U/ml, respectivamente a 37°C. SC rFVIIIIFc tenía un valor de EC₅₀ de trombina que era aproximadamente 3 veces mayor que el de rFVIIIIFc. Bajo este empeoramiento de la liberación mediada por trombina de vWF puede yacer la reducción de la actividad específica para SC rFVIIIIFc observada en el ensayo de aPTT donde vWF está presente (Tabla 3B).

Ejemplo 3

Se diseñó un estudio de fase I/IIa, abierto, cruzado, con escala de dosis, de centros múltiples, y primero en seres humanos para evaluar la seguridad, tolerabilidad, y farmacocinética de una dosis única de rFVIIIIFc en sujetos con hemofilia A severa (definida como factor VIII [FVIII] endógeno <1 IU/dL [1%]). Se inscribió un total de aproximadamente 12 pacientes previamente tratados que se

dosificó con rFVIII Fc a 25 o 65 IU/kg. Luego de la observación (programada dentro de los 28 días anteriores a la primera dosis de [rFVIII] ADVATE®, el agente de comparación de referencia) y un mínimo de 4 días (96 horas) transcurridas sin tratamiento de FVIII antes de la primera inyección, aproximadamente 6 sujetos recibieron una dosis única de 25 IU/kg de ADVATE® seguido por un perfil de farmacocinética (PK) de 3 días (72 horas), luego se cruzan y reciben una dosis única y abierta de 25 IU/kg de rFVIII Fc durante un perfil de PK de 7 días (168 horas). Los primeros 3 sujetos se dosificaron en forma secuencial. Para los primeros tres (3) sujetos dosificados con 25 IU/kg de rFVIII Fc, cada sujeto experimentó una evaluación de inhibidores 14 días (336 horas) después de la inyección de rFVIII Fc. La dosificación del próximo sujeto (para los primeros tres sujetos únicamente) se llevó a cabo una vez que se completó la prueba de inhibidores. Luego de que el sujeto completara la evaluación de inhibidores de 14 días, los tres sujetos restantes en 25 IU/kg y los seis sujetos en 65 IU/kg comenzaron el enrolamiento en forma secuencial al menos separados en 1 día dentro de cada grupo de dosis.

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

Todos los sujetos se controlaron por un período de evaluación de seguridad durante 14 días (336 horas) y 28 días luego de la administración de rFVIII Fc 25 IU/kg o 65 IU/kg por seguridad. Todos los sujetos se sometieron a una muestra de farmacocinética antes y después de la dosificación junto con muestras de sangre para análisis de la actividad de FVIII en puntos de tiempo designados.

Los datos de farmacocinética para la prueba clínica de fase I/IIa demostraron los siguientes resultados para FVIII Fc. FVIII Fc tenía aproximadamente un aumento del 50% en la exposición sistémica (AUC_{INF}), aproximadamente una reducción del 50% en la depuración (Cl), y aproximadamente un aumento del 50-70% en la vida media de eliminación y en el MRT en comparación con ADVATE® (rFVIII de longitud completa). Además, FVIII Fc mostró valores aumentados de C168, TBLP1, TBLP3, y TBLP5 en comparación con ADVATE®.

AUC_{INF} Área bajo la curva de concentración-tiempo de cero al infinito

Beta HL	Vida media de fase de eliminación; también denominada $t_{1/2\beta}$
C168	Actividad de FVIII Fc estimada bajo el nivel de referencia a aproximadamente 168 h después de la dosis
CI	Depuración
MRT	Tiempo de residencia medio
TBLP1	Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII Fc se ha declinado a aproximadamente 1 IU/dL sobre el nivel de referencia
TBLP3	Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII Fc se ha declinado a aproximadamente 3 IU/dL sobre el nivel de referencia
TBLP5	Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII Fc se ha declinado a aproximadamente 5 IU/dL sobre el nivel de referencia

Ejemplo 4

Se ha creado una proteína de fusión del factor VIII-Fc recombinante con el dominio B eliminado (rFVIII Fc) como un intento por extender la vida media de FVIII. Las farmacocinéticas (PK) de rFVIII Fc se compararon a rFVIII en ratones con hemofilia A. Se ha descubierto que la vida media terminal fue dos más extensa para rFVIII Fc en comparación con rFVIII. Con el objetivo de confirmar que el mecanismo subyacente para la extensión de la vida media se debió a la protección de rFVIII Fc por FcRn, las PK se evaluaron en ratones transgénicos carentes de FcRn y de FcRn humano. Se administró una dosis intravenosa única (125 IU/kg) y la concentración de plasma se midió por el uso de un ensayo de actividad cromogénica. El Cmax fue similar entre rFVIII Fc y rFVIII (XYNTHA®) en ambas cepas de ratones. Sin embargo, si bien la vida media para rFVIII Fc fue comparable con la de rFVIII en los ratones carentes de FcRn, la vida media para rFVIII Fc se extendió a aproximadamente dos veces más que la vida media para rFVIII en los ratones transgénicos de hFcRn. Estos resultados confirman que FcRn media o es responsable por la vida media prolongada de rFVIII Fc en comparación con rFVIII. Dado que se ha demostrado que la hemostasis en sangre total medida por tromboelastometría de rotación (ROTEM®) está correlacionada con la eficacia de factores de coagulación en los modelos de sangrado de ratones con hemofilia así como también en aplicaciones clínicas, se busca evaluar la eficacia ex vivo de rFVIII Fc en los ratones con hemofilia A por el uso de ROTEM®. A los ratones con hemofilia A se les administró una dosis intravenosa única de 50 IU/kg de rFVIII Fc, XYNTHA® (FVIII) o ADVATE® (FVIII). 5 minutos después de la dosis, la formación de coágulos era similar con respecto al tiempo de coagulación (CT), al tiempo de formación de coágulos (CFT) y al ángulo α . Sin embargo, rFVIII Fc mostró un CT significativamente mejorado 72 y 96 horas después de la dosis, y el CFT y el

ángulo α también se mejoraron a las 96 horas en comparación con XYNTHA® (FVIII) y ADVATE® (FVIII), en forma consistente con la PK prolongada de rFVIII-Fc. Por lo tanto, la construcción de una fusión de Fc de FVIII produce una molécula con un mecanismo de acción definido que tiene una vida media aumentada y el potencial por proporcionar una protección prolongada del sangrado.

Ejemplo 5

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

En este Ejemplo, rFVIII-Fc es una proteína de fusión recombinante comprendida por una molécula única de FVIII humano recombinante con el dominio B eliminado (BDD-rFVIII) fundido al dominio Fc dimérico de IgG1 humana, sin secuencia de enlace interviniente. Este constructo de proteína también se denomina en la presente proteína híbrida heterodimérica rFVIII-Fc, proteína de fusión Fc monomérica FVIII-Fc, híbrido monómero FVIII-Fc, híbrido FVIII-Fc monomérico, y monómero-dímero FVIII-Fc. Véase el Ejemplo 1, Fig. 1, y la Tabla 2A.

Los estudios pre-clínicos con rFVIII-Fc han demostrado una prolongación de aproximadamente 2 veces de la vida media de la actividad de rFVIII en comparación con los productos de rFVIII comercialmente disponibles. El fundamento de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de una dosis única de rFVIII-Fc en formulación líquida congelada y proporcionar datos sobre la PK en sujetos con hemofilia A severa. Para este estudio, se encontraban disponibles 16 sujetos evaluables para la evaluación de PK. La administración única de dos dosis tanto de rFVIII-Fc como de ADVATE® en una dosis nominal de 25 (n=6) y 65 IU/kg de peso corporal (n=10) se infundió en forma intravenosa durante aproximadamente 10 minutos. Se obtuvieron muestras de sangre para evaluaciones de PK de plasma antes de la infusión, así como también hasta 10 días después de la dosis. La PK de la actividad de FVIII tanto para ADVATE® como para rFVIII-Fc se caracterizaron en este estudio por el uso de un método dependiente del modelo.

Objetivos

El objetivo principal de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de la administración única de dos dosis de rFVIII-Fc (25 y 65 IU/kg) en pacientes anteriormente tratados (PTP) con 12 años de edad y mayores con hemofilia A severa.

Los objetivos secundarios fueron determinar los parámetros de farmacocinéticas (PK) determinados por la actividad farmacodinámica (PD) de FVIII en el tiempo luego de una administración única de 25 o 65 IU/kg de rFVIII-Fc

en comparación con ADVATE® en ensayos de coagulación y cromogénicos en una etapa.

Diseño del estudio (véase el Ejemplo 3)

Se recolectaron muestras de sangre para Las evaluaciones de PK de la actividad de FVIII en la visita de observación (dentro de los 28 días anteriores a la dosificación de ADVATE®); el Día 0 (inyección de ADVATE®) pre-inyección y en 10 y 30 minutos y 1, 3, 6, y 9 horas después de la inyección; el Día 1 24 horas después de la inyección de ADVATE®; el Día 2 48 horas después de la inyección de ADVATE®; el Día 3 a 72 horas después de la inyección de ADVATE®; y el Día 4 a 96 horas después de la inyección de una dosis elevada de ADVATE®(Únicamente cohorte B).

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

Modelo y cálculos de farmacocinética

Abreviaturas

TBLP1 = Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII ha declinado a aproximadamente 1 IU/dL sobre el nivel de referencia.

TBLP3 = Tiempo posterior a la dosis predicho por el modelo cuando la actividad de FVIII ha declinado a aproximadamente 3 IU/dL sobre el nivel de referencia

$$KV_M = C_{max_M} / Dosis\ Real\ (IU/kg)$$

$$KV_OB = C_{max_OB} / Dosis\ Real\ (IU/kg)$$

$IVR_M = 100 \times C_{max_M} \times Volumen\ de\ Plasma\ (dL) / Dosis\ Total\ en\ IU;$
donde el volumen en plasma en ml = $(23,7 \times Alt\ en\ cm) + (9,0 \times Pe\ en\ kg) - 1709$.

$IVR_OB = 100 \times C_{max_OB} \times Volumen\ de\ Plasma\ (dL) / Dosis\ Total\ en\ IU;$
donde el volumen en plasma en ml = $(23,7 \times Alt\ en\ cm) + (9,0 \times Pe\ en\ kg) - 1709$.

Resultados

Farmacocinéticas de dosis única (ensayo en una etapa)

La actividad de FVIII observada aumentó drásticamente luego de la breve infusión IV de ADVATE® o rFVIII Fc, con valores de C_{max} predichos por el modelo ($\pm$ SD) medios de $56,6 \pm 4,74$ y $121 \pm 28,2$ IU/dL para ADVATE® y $55,6 \pm 8,18$ y $108 \pm 16,9$ IU/dL para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Todos los pacientes tratados con ADVATE® y rFVIII Fc tuvieron aumentos relacionados con la dosis en la actividad de FVIII. El aumento observado tanto en C_{max} como en AUC_{INF} fue ligeramente menor que el proporcional a la dosis sobre el rango de dosis evaluado.

Luego del final de la infusión, la declinación de la actividad del FVIII observada exhibió características de reducción monoexponenciales hasta alcanzarse el nivel de referencia. La constante de declinación en la actividad de FVIII fue más lenta para rFVIII Fc que para ADVATE® con valores de vida media de eliminación predichos por el modelo ($\pm$ SD) medios de $11,9 \pm 2,98$ y $10,4 \pm 3,03$ hr para ADVATE® y $18,0 \pm 3,88$ y $18,4 \pm 6,99$ hr para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de la vida media de eliminación parecían ser independientes de la dosis sobre el rango de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

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

En forma similar a la vida media de eliminación, el MRT se prolongó para rFVIII Fc con relación a ADVATE®. Los valores de MRT predichos por el modelo ($\pm$ SD) medios fueron de $17,1 \pm 4,29$ y $14,9 \pm 4,38$ hr para ADVATE® y $25,9 \pm 5,60$ y $26,5 \pm 10,1$ hr para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores del MRT parecían ser independientes de la dosis sobre el rango de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

Además, se determinaron los valores de la PK principal para CL y V. Los valores de CL para rFVIII Fc únicamente daban cuenta de ~ 66% de aquellos observados para ADVATE® en dosis equivalentes. Los valores de CL predichos por el modelo ($\pm$ SD) medios fueron de $2,70 \pm 0,729$ y $4,08 \pm 1,69$ ml/hr/kg para ADVATE® y $1,80 \pm 0,409$ y $2,69 \pm 1,25$ ml/hr/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de V fueron comparables entre ADVATE® y rFVIII Fc con valores de V predichos por el modelo ($\pm$ SD) medios

de $43,9 \pm 4,27$ y $56,1 \pm 13,4$ ml/kg para ADVATE® y $45,3 \pm 7,23$ y $61,6 \pm 10,6$ ml/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Se observaron ligeros aumentos en los valores medios de CL y V con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc; sin embargo, el aumento en las desviaciones estándares en la dosis de 65 IU/kg acoplada con niveles de dosis limitados son un factor de confusión sobre la evaluación de la dependencia de dosis de estos parámetros. Por ejemplo, el valor de CL medio geométrico del CV% para el grupo de tratamiento rFVIII Fc aumentó de 23,0% (25 IU/kg) a 48,6% (65 IU/kg).

Además de los parámetros de PK principal, se determinaron los parámetros de PK secundaria (por ej., valores de K, IVR, etc.) para evaluar la duración del efecto de FVIII. La evidencia de la diferencia de PK también se observó con la demostración de rFVIII Fc de valores aumentados de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® en dosis equivalentes. Los valores de IVR y K para ADVATE® y rFVIII Fc parecían ser comparables. Se observó un ligero aumento en los valores de TBLP1 y TBLP3 con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc. En contraste, se observaron ligeras disminuciones en los valores medios de IVR y K con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc. De acuerdo con lo anteriormente indicado, una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros resulta confundida por los niveles de dosis limitadas.

Los TBLP1 observados ($\pm$ SD) medios fueron de $2,88 \pm 0,733$ y $2,93 \pm 0,848$ IU/dL por IU/kg para ADVATE® y $4,28 \pm 0,873$ y $5,16 \pm 2,02$ IU/dL por IU/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los TBLP3 observados ($\pm$ SD) medios fueron de $2,06 \pm 0,527$ y $2,26 \pm 0,666$ IU/dL por IU/kg para ADVATE® y $3,09 \pm 0,623$ y $3,93 \pm 1,59$ IU/dL por IU/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente.

Los valores de IVR y K medios calculados por el uso de los valores Cmax observados (sustraídos con valores de referencia y fármacos residuales dentro del modelo) eran generalmente mayores que los valores determinados por el uso de valores Cmax predichos por el modelo; consistentes con ligeras sub-estimaciones de la actividad del pico observado por el uso del modelo de un compartimiento. Los valores de K observados ($\pm$ SD) medios fueron de $2,57 \pm 0,198$ y $2,13 \pm 0,598$ IU/dL por IU/kg para ADVATE® y $2,46 \pm 0,330$ y $1,85 \pm 0,332$ IU/dL por IU/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de IR observados ($\pm$ SD) medios fueron de $94,1 \pm 15,6$ y $85,8 \pm 16,5$ % para ADVATE® y $89,5 \pm 11,9$ y $74,8 \pm 6,72$ % para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente.

Farmacocinética de dosis única (ensayo cromogénico)

La actividad de FVIII observada aumentó drásticamente luego de la breve infusión IV de ADVATE® o rFVIII Fc, con valores de Cmax predichos por el modelo ($\pm$ SD) medios de $70,2 \pm 9,60$ y $157 \pm 38,6$ IU/dL para ADVATE® y $70,3 \pm 10,0$ y

158 ± 34,7 IU/dL para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente.

Todos los pacientes tratados con ADVATE® y rFVIII Fc tuvieron aumentos relacionados con la dosis en la actividad de FVIII. El aumento observado tanto en C_{max} como en AUC_{INF} fue ligeramente menor que el proporcional a la dosis sobre el rango de dosis evaluado.

Luego del final de la infusión, la declinación de la actividad del FVIII observada exhibió características de reducción monoexponenciales hasta alcanzarse el nivel de referencia. La constante de declinación en la actividad de FVIII fue más lenta para rFVIII Fc que para ADVATE® con valores de vida media de eliminación predichos por el modelo (±SD) medios de 10,7 ± 1,98 y 10,3 ± 3,27 hr para ADVATE® y 16,2 ± 2,92 t 19,0 ± 7,94 hr para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de la vida media de eliminación parecían ser independientes de la dosis sobre el rango de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

La exposición sistémica total del FVIII (evaluada por AUC_{INF}) fue ~ 53% y 84% mayor luego de la administración de rFVIII Fc que de ADVATE® en niveles de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de AUC_{INF} predichos por el modelo (±SD) medios fueron de 1080 ± 236 y 2320 ± 784 hr*IU/dL para ADVATE® y 1650 ± 408 y 4280 ± 1860 hr*IU/dL para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente.

En forma similar a la vida media de eliminación, el MRT se prolongó para rFVIII Fc con relación a ADVATE®. Los valores de MRT predichos por el modelo (±SD) medios fueron de 15,3 ± 2,86 y 14,8 ± 4,72 hr para ADVATE® y 23,4 ± 4,22 y 27,3 ± 11,4 hr para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores del MRT parecían ser independientes de la dosis sobre el rango de dosis evaluado para ambos productos de FVIII.

Además, se determinaron los valores de la PK principal para CL y V. Los valores de CL para rFVIII Fc únicamente daban cuenta de ~ 58-66% de aquellos observados para ADVATE® en dosis equivalentes. Los valores de CL predichos por el modelo (±SD) medios fueron de 2,39 ± 0,527 y 3,21 ± 1,40 ml/hr/kg para ADVATE® y 1,57 ± 0,349 y 1,86 ± 0,970 ml/hr/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de V fueron comparables entre ADVATE® y rFVIII Fc con valores de V predichos por el modelo (±SD) medios de 35,8 ± 5,52 y 43,6 ± 11,2 ml/kg para ADVATE® y 35,9 ± 6,65 y 42,7 ± 8,91 ml/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los aumentos en los valores de CL y V medios se observaron con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc; sin embargo, el aumento en desviaciones estándares en la dosis de 65 IU/kg acoplada con niveles de dosis limitados fueron

un factor de confusión para la evaluación de la dependencia de dosis de estos parámetros.

Además de los parámetros de PK principal, se determinaron los parámetros de PK secundaria (por ej., valores de K, IVR, etc.) para evaluar la duración del efecto de FVIII. La evidencia de la diferencia de PK también se observó con la demostración de rFVIII Fc de valores aumentados de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® en dosis equivalentes. Los valores de IVR y K para ADVATE® y rFVIII Fc parecían ser comparables.

Se observó un ligero aumento en los valores de TBLP1 y TBLP3 con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc. En contraste, se observaron ligeras disminuciones en los valores medios de IVR y K con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc. De acuerdo con lo anteriormente indicado, una evaluación de la dependencia de la dosis de estos parámetros resulta confundida por los niveles de dosis limitadas.

Los TBLP1 observados ($\pm$ SD) medios fueron de $2,70 \pm 0,511$ y $3,09 \pm 0,978$ IU/dL por IU/kg para ADVATE® y $4,06 \pm 0,798$ y $5,66 \pm 2,38$ IU/dL por IU/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente, los TBLP3 observados ($\pm$ SD) medios fueron de $1,98 \pm 0,377$ y $2,39 \pm 0,718$ IU/dL por IU/kg para ADVATE® y $3,04 \pm 0,598$ y $4,44 \pm 1,84$ IU/dL por IU/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente.

Los valores de IVR y K medios calculados por el uso de los valores C_{max} observados (sustraídos con valores de referencia y fármacos residuales dentro del modelo) eran generalmente mayores que los valores determinados por el uso de valores C_{max} predichos por el modelo; consistentes con ligeras sub-estimaciones de la actividad del pico observado por el uso del modelo de un compartimiento. Los valores de K observados ($\pm$ SD) medios fueron de $3,08 \pm 0,429$ y $2,85 \pm 0,721$ IU/dL por IU/kg para ADVATE® y $3,12 \pm 0,451$ y $2,92 \pm 0,985$ IU/dL por IU/kg para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente. Los valores de IR observados ($\pm$ SD) medios fueron de $112 \pm 14,5$ y $116 \pm 26,9$ % para ADVATE® y $113 \pm 16,3$ y $117 \pm 33,6$ % para rFVIII Fc para los grupos de dosis de 25 y 65 IU/kg, respectivamente.

Conclusiones

Todos los pacientes tratados con ADVATE® y rFVIII Fc tenían aumentos relacionados con la dosis comparables en C_{max} y AUC_{INF} sobre el rango de dosis evaluado. Los niveles del plasma del pico de la actividad de ADVATE® y rFVIII Fc en generalmente se observaron dentro de la primera hora luego del final de la infusión y permanecieron detectables durante varias días posteriores a la dosificación. Luego del final de la infusión, la declinación en la actividad del FVIII corregida por el valor de referencia exhibió una reducción monoexponencial hasta alcanzarse el valor de referencia para ambos productos. Los valores de parámetro

para la vida media de eliminación y MRT parecían ser independientes de la dosis sobre el rango de dosis evaluado para ambos productos de FVIII. Se observaron ligeros aumentos en los valores medios de CL y V con dosis crecientes de ADVATE® y rFVIII Fc; sin embargo, el aumento en la variabilidad intrasujetos en la dosis de 65 IU/kg acoplada con niveles de dosis limitados fueron un factor de confusión para la evaluación de la dependencia de dosis de estos parámetros.

La comparación de la PK de la actividad de rFVIII Fc y ADVATE® reveló un aumento de aproximadamente 48-61% (Ensayo de Una Etapa) o 53-84% (Ensayo Cromogénico) en la exposición sistémica, una reducción de aproximadamente 30-40% en la depuración, y un aumento de aproximadamente 50-80% tanto en la vida media de eliminación como en el MRT para rFVIII Fc con relación a ADVATE® en dosis comparables. La evidencia de la diferencia de la PK también se observó con rFVIII Fc por la demostración de valores aumentados de TBLP1 y TBLP3 en comparación con ADVATE® en dosis equivalentes. Los valores de IVR y K para ADVATE® y rFVIII Fc parecían ser comparables.

Los parámetros de la PK obtenidos de los resultados del Ensayo Cromogénico en general son acordes con aquellos del Ensayo de Una Etapa, con excepción de que el Ensayo Cromogénico dio una estimación mayor de los parámetros de exposición (por ej., C_{max}, AUC_{INF}, etc.).

Con las mejoras observadas en la PK, rFVIII Fc puede proporcionar una protección prolongada del sangrado, permitiendo una menor frecuencia de inyecciones para individuos con Hemofilia A.

Ejemplo 6

Sobre la base del análisis de la PK provisoria PK del estudio primero en seres humanos de rFVIII:Fc (Ejemplo 3), se diseñó el estudio A-LONG. A-LONG es una evaluación abierta, con centros múltiples de la evaluación de la seguridad, farmacocinética, y eficacia de la fusión del Factor VIII Fc recombinante (FVIII:Fc) en la prevención y tratamiento del sangrado en sujetos anteriormente tratados con hemofilia A severa (definida como factor VIII [FVIII] endógeno <1 IU/dL [1%]).

Aproximadamente se enrolarán 106 sujetos en uno de tres regímenes: un régimen de profilaxis personalizado (rama 1), un régimen de dosificación semanal (rama 2), y un régimen a pedido (rama 3).

Rama 1: régimen de profilaxis personalizado

La rama 1 incluirá un grupo general y un subgrupo PK. Aproximadamente se enrolarán 66 sujetos. El régimen inicial será de dos veces a la semana en una dosis de 25 IU/kg el primer día, seguido por 50 IU/kg el cuarto día de la semana. Se administrará a los sujetos rFVIII Fc semanalmente en este régimen de profilaxis hasta que los resultados de la PK para rFVIII Fc se encuentren disponibles. Con base en estos resultados, se establecerá un régimen de profilaxis personalizado para cada individuo, donde se determinarán la dosis y el intervalo para mantener

un nivel mínimo de 1-3% de la actividad de FVIII. Luego, se administrará a cada sujeto su régimen de profilaxis personalizado en forma individual a lo largo del estudio.

Se monitoreará a los sujetos a través del estudio y se llevarán a cabo ajustes de las dosis en curso y de los intervalos. Los ajustes sólo se llevarán a cabo cuando un sujeto experimente episodios de sangrado no aceptables definidos como episodios de sangrado espontáneo ≥ 2 durante un período de dos meses consecutivos. En este caso, el ajuste se focalizará en niveles mínimos de 3-5%.

Rama 2: régimen de dosificación semanal

Aproximadamente se enrolarán/aleatorizarán 20 sujetos que se someterán a un perfil de PK abreviada de rFVIIIIFc de acuerdo con lo presentado a continuación: lavado de al menos 96 horas; una dosis única de 65 IU/kg de rFVIIIIFc; Muestreo abreviado que comienza sobre rFVIIIIFc el Día 0, que incluye pre-inyección y 10 (± 2) minutos, 3 horas (± 15 minutos), 72 (± 2) horas [Día 3], y 96 (± 2) horas [Día 4] a partir del comienzo de la inyección. Luego del perfil de PK abreviada, se administrará a los sujetos una dosis fija de 65 IU/kg de rFVIIIIFc cada 7 días al menos durante 28 semanas y hasta 52 semanas.

Rama 3: régimen a pedido

Se evaluarán en este estudio un mínimo de 10 cirugías mayores en al menos 5 sujetos. La cirugía mayor se define como cualquier procedimiento quirúrgico (electivo o emergente) que involucra anestesia general y/o asistencia respiratoria donde una cavidad mayor del cuerpo se penetra y expone, o para la que se produce una anulación sustancial de las funciones físicas o fisiológicas (por ej., laparotomía, toracotomía, craneotomía, reemplazo de articulaciones, y amputación de miembros).

Para la profilaxis durante la cirugía, los sujetos se tratarán con 20 a 50 IU/kg de rFVIIIIFc cada 12 a 24 horas. Antes de la cirugía, el médico revisará el perfil de PK de rFVIIIIFc del sujeto y evaluará el régimen de dosis del reemplazo del Factor VIII generalmente requerido para el tipo de cirugía planeada y el estado clínico del sujeto. La recomendación para la dosificación adecuada de rFVIIIIFc en el período de tratamiento quirúrgico, que incluye cualquier tiempo de rehabilitación, tomará estos factores en consideración.

Los objetivos principales de este estudio son (a) evaluar la seguridad y tolerabilidad de rFVIIIIFc administrado en regímenes de profilaxis, a pedido, y de tratamiento quirúrgico; y (b) evaluar la eficacia de rFVIIIIFc administrado en regímenes de profilaxis, a pedido, y de tratamiento quirúrgico. Los objetivos secundarios de este estudio son (a) caracterizar el perfil de PK de rFVIIIIFc y comparar la PK de FVIIIIFc con el producto actualmente comercializado,

ADVATE®; (b) evaluar las respuestas individuales con FVIII Fc; y (c) evaluar el consumo de FVIII Fc.

Objetivos principales

- Evaluar la seguridad y tolerabilidad de rFVIII Fc administrado en regímenes de profilaxis, semanalmente, a pedido, y de tratamiento quirúrgico
- Evaluar la eficacia de rFVIII Fc administrado en regímenes de profilaxis personalizados, a pedido, y de tratamiento quirúrgico

Objetivos secundarios

- Caracterizar el perfil de PK de rFVIII Fc y comparar la PK de rFVIII Fc con el producto actualmente comercializado, ADVATE®
- Evaluar las respuestas individuales con rFVIII Fc
- Caracterizar el rango de dosis y los cronogramas requeridos para prevenir adecuadamente el sangrado en un régimen de profilaxis; mantener la homeostasis en un ajuste quirúrgico; o tratar episodios de sangrado en un tratamiento semanal a pedido, o en un ajuste de profilaxis
- Evaluar el consumo de rFVIII Fc (por ej., consumo de rFVIII Fc anualizado total por sujeto)

Ejemplo 7

Evaluación clínica de ROTEM®

En el estudio del Ejemplo 7, además de la medición de la actividad de FVIII en plasma por el ensayo de tiempo de tromboplastina parcial activada en una etapa (aPTT), también se ha explorado la tromboelastometría rotacional de sangre total (ROTEM®) para evaluar la mejora en la hemostasis global por rFVIII Fc y ADVATE® en 2 sujetos, específicamente, 1 en el cohorte de dosis baja y 1 en el cohorte de dosis alta.

rFVIII Fc y ADVATE® parecen ser similarmente activos en la formación de coágulos cuando se enriquecen en la sangre del sujeto antes del tratamiento con rFVIII Fc. El tiempo de coagulación (CT) fue lineal con respecto a la dosis de rFVIII Fc y ADVATE® en el rango de aproximadamente 1% a 100% de normalidad, y la respuesta de dosis fue comparable entre rFVIII Fc y ADVATE® en el mismo sujeto.

Luego de la dosificación con ADVATE® y, posteriormente, rFVIII Fc, se muestreó sangre total citrada en varios puntos de tiempo y la formación de coágulos luego de la recalcificación se monitoreó por ROTEM®. Independientemente del CT del valor de referencia variable debido a los niveles de FVIII residual anteriores a la dosificación de ADVATE® o rFVIII Fc, ambos productos corrigieron efectivamente el CT a niveles comparables 30 minutos después de la inyección. Además, la mejora en el CT se sostuvo en mejor forma a las 3 horas y después de la inyección de 25 IU/kg de rFVIII Fc con relación a

ADVATE® en el sujeto dosificado con esta dosis baja. Sin embargo, la mejora diferencia de rFVIII Fc versus ADVATE® fue mucho menos apreciable en la dosis de 65 IU/kg.

Ejemplo 8

Se utilizaron ratones con HemA para estudios del corte de la cola. En primer lugar, los ratones se anestesiaron y luego se inyectaron con 4,6 µg/kg, 1,38 µg/kg, o 0,46 µg/kg de rFVIII Fc procesado (Principio Activo, que contiene aproximadamente 75%-85% de rFVIII Fc procesado) y rFVIII Fc purificado de cadena única. Luego de la inyección, la cola se cortó desde la punta y se colocó inmediatamente en un tubo para recolectar sangre. El porcentaje de protección tras la supervivencia se midió para rFVIII Fc procesado (principio activo) y FVIII Fc de cadena única de acuerdo con lo mostrado en la Tabla 7 y la Figura 7.

TABLA 7.Eficacia in vivo de rFVIII:Fc DS y rFVIII Fc de cadena única

Dosis (µg/kg)		4,6	1,38	0,46
% de	FVIII Fc DS	93	52	19
Protección tras la supervivencia	rFVIII Fc de cadena única	93	64	14

De acuerdo con lo mostrado en la Tabla 7 y la Figura 7, la protección tras la supervivencia por rFVIII Fc de cadena única es comparable al rFVIII Fc procesado (DS).

Actividad de coagulación por ROTEM in vitro

La potencia de coagulación de rFVIII Fc se exploró en forma adicional en Tromboelastometría Rotacional (ROTEM) de sangre completa sobre un rango de concentraciones, y se comparó tanto con rBDD FVIII (Xyntha) como con FVIII recombinante de longitud completa (rII FVIII; Advate). Para la ROTEM in vitro, proteínas de rFVIII se enriquecieron por triplicado en sangre citrada mezclada recolectada de la vena cava de 5-6 ratones HemA macho a la concentración final de 0, 0,1, 1, 10, y 100% del nivel normal de FVIII en plasma. La coagulación se inició por la adición de CaCl₂ (NATEM) y el tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulos (CFT), el ángulo alfa y la firmeza máxima del coágulo (MCF) se registraron en el sistema ROTEM (Pentapharm GmbH, Munich, Alemania). El tiempo de coagulación (CT), el tiempo de formación de coágulos (CFT), y el ángulo alfa para las tres proteínas enriquecidas en sangre de ratón con HemA en dosis escalonadas de 0,1 – 100% de niveles normales de FVIII se muestran en la Figura 14. En el amplio rango de 0,1 a 100% de normalidad, el CT y CFT son comparables entre rFVIII Fc, rBDD FVIII y rII FVIII. El ángulo alfa es sólo significativamente diferente (p<0,05) entre rFVIII Fc y rBDD FVIII al 10%.

Actividad de coagulación por ROTEM ex vivo

La farmacodinámica de rFVIII_{FC}, de acuerdo con lo medido por ROTEM, se comparó con rBDD FVIII y rFIFVIII luego de una inyección intravenosa única en ratones con Hemofilia A. Para la ROTEM ex vivo, se inyectaron en forma intravenosa ratones machos con HemA con una dosis única de 50 IU/kg de rFVIII_{FC}, ADVATE[®], o XYNTHA[®], y se sacrificaron 5 ratones en cada punto de tiempo (5 minutos, 24, 48, 72 y 96 horas después de la dosificación). La sangre total citrada individual recolectada a partir de la vena cava se analizó inmediatamente por NATEM en el sistema ROTEM y los parámetros se midieron de acuerdo con lo presentado con anterioridad. El CT, CFT, y el ángulo alfa se determinaron para muestras tomadas de 5 minutos a 96 horas después de la dosificación, y se muestran en la Figura 15. A los 5 minutos todas son similarmente efectivas, lo que da lugar a CT, CFT y ángulo alfa similares (Figura 15A – C). Sin embargo, rFVIII_{FC} demostró un CT significativamente mejorado ($p < 0,05$) a las 72 y 96 horas, CFT y ángulo alfa a las 96 horas (Figuras 15A – C) con relación a rBDD FVIII y rFIFVIII.

Ejemplo 9

El factor VIII_{FC} recombinante (rFVIII_{FC}) está comprendido por una proteína rFVIII con el dominio B eliminado (BDD) genéticamente fundida al dominio Fc de la inmunoglobulina G1 humana (IgG1). Antes de la secreción de células HEK 293, la mayor parte de la rFVIII_{FC} se procesa en una cadena pesada (HC) y en una cadena liviana (LC+Fc) de FVIII. En la circulación, rFVIII_{FC} se compleja con factor de von Willebrand (VWF) y se libera tras la activación en una manera tal que es indistinguible del FVIII nativo. Se presume que la disociación espontánea de la HC y LC contribuye a la pérdida de la actividad de FVIII en plasma y durante el almacenamiento de medicamentos de FVIII. En la presente, se describe un isomorfo no procesado de cadena única de rFVIII_{FC} (SC rFVIII_{FC}), que puede proporcionar una elaborabilidad superior y estabilidad aumentada en comparación con el FVIII nativo.

SC rFVIII_{FC} se purificó a partir de rFVIII_{FC}, que contiene una fracción del isoformo no procesado. En comparación con rFVIII_{FC}, SC rFVIII_{FC} mostró una actividad cromogénica equivalente pero una actividad reducida aproximadamente en un 60% por el ensayo de una etapa (aPTT), (Tabla 3A-B). El ensayo de generación de trombina (TGA) se llevó a cabo por el uso de un trombograma automático calibrado (de Thrombinoscope[®]). En un ensayo de generación de trombina (TGA), SC rFVIII_{FC} también mostró un potencial de trombina reducido (Figura 13A), y la trombina del pico (Figura 13B) en comparación con rFVIII_{FC}. Sin embargo, de acuerdo con lo mostrado en la Tabla 3B, la actividad completa de SC rFVIII_{FC} por aPTT se observó en la ausencia de vWF, sugiriendo que la liberación de vWF puede retrasarse debido a la unión covalente de la región acídica a3 a la HC luego de la escisión de Arg 1680 en SC rFVIII_{FC}, en contraste con la liberación

de a3 y la disociación de FVIII completamente procesado. La disociación retrasada de vWF puede explicar la actividad reducida observada en la ensayo de aPTT y TGA, mientras que la actividad completa se observó en el ensayo cromogénico de dos etapas. Una constante de activación reducida en presencia de vWF se confirmó en un ensayo de sustrato cromogénico con trombina limitante como activador de FVIII.

La función in vivo de SC rFVIII-Fc se evaluó en el modelo de transección de la vena de la cola (TVT) de ratones con HemA. Los ratones machos con HemA se trataron con dosis indicadas del medicamento de rFVIII-Fc o SC rFVIII-Fc 48 horas antes de la TVT. El re-sangrado de la cola y la supervivencia se monitorearon cada hora hasta 12 horas después de la TVT llevándose a cabo la observación final 24 horas después de la TVT. SC rFVIII-Fc y rFVIII-Fc demostraron eficacias in vivo equivalentes en este modelo, con un ED50 de 1,17 µg/kg y 1,23 µg /kg respectivamente cuando se llevó a cabo la TVT 48 horas después de la infusión (Figura 7(A)). Se observaron curvas de supervivencia 24 horas después de la TVT comparables ($p \geq 0,65$) (Figura 7(B)) y constantes de re-sangrado (Figura 7(C)) en ratones con HemA para SC rFVIII-Fc y rFVIII-Fc en cada nivel de dosis ensayado, lo que indica que cada SC rFVIII-Fc fue igualmente efectiva que rFVIII-Fc independientemente de su menor actividad aparente de aPTT. Por lo tanto, la activación in vitro retrasada de SC rFVIII-Fc en presencia de vWF no parece tener un impacto significativo en su eficacia in vivo. Así, SC rFVIII-Fc representa un isoformo novedoso y eficaz de rFVIII-Fc con aplicaciones clínicas potenciales. Se requerirán estudios adicionales para demostrar la estabilidad aumentada del producto en el contexto de esta proteína de fusión Fc.

Ejemplo 10

Los productos corrientes del factor VIII (FVIII) muestran una vida media ($t_{1/2}$) de aproximadamente 8-12 horas, y requieren inyecciones intravenosas frecuentes para la profilaxis y el tratamiento de pacientes con hemofilia A. rFVIII-Fc es una proteína de fusión recombinante compuesta por una molécula única de FVIII covalentemente unida al dominio Fc de IgG₁ humana para extender la vida media de rFVIII circulante. Este estudio primero en seres humanos en sujetos masculinos anteriormente tratados con hemofilia A severa investigó la seguridad y farmacocinética de rFVIII-Fc. Dieciséis sujetos recibieron una dosis única de ADVATE[®] de 25 o 65 IU/kg seguido por una dosis igual de rFVIII-Fc. La mayoría de los eventos adversos no estaban relacionados con el fármaco del estudio. Ninguno de los sujetos del estudio desarrolló anticuerpos anti-FVIII-Fc o inhibidores. A través de los niveles de dosis, en comparación con ADVATE[®], rFVIII-Fc mostró una $t_{1/2}$ de eliminación y un tiempo de residencia medio 1,54 a 1,71 veces más extenso, una depuración 1,49 a 1,56 veces menor, y una exposición sistémica total 1,48 a 1,56 veces mayor. ADVATE[®] y rFVIII-Fc tenían concentraciones del

plasma del pico dependiente de la dosis y recuperaciones comparables. El tiempo a la actividad de 1% de FVIII superior al valor de referencia fue de aproximadamente 1,53 a 1,68 veces mayor que ADVATE® a través de los niveles de dosis. Por lo tanto, rFVIII-Fc puede ofrecer un enfoque terapéutico viable para lograr una protección hemostática prolongada y una dosificación menos frecuente en pacientes con hemofilia A.

La hemofilia A es un trastorno de sangrado hereditario que da lugar a un sangrado frecuente espontáneo y traumático en las articulaciones y tejidos blandos. Mannucci PM, Tuddenham EGD, *N Engl J Med*, 344:1773-1779 (2001). Cuando se trata en forma no adecuada, este sangrado deriva en artropatía crónica, discapacidad y riesgo de muerte aumentado. Soucie JM *et al.*, *Blood*. 96(2):437-442 (2000).

Los productos de FVIII derivada de plasma (pdFVIII) y de FVIII humana recombinante (rFVIII) se utilizan para el tratamiento (terapia a pedido) y prevención (terapia de profilaxis) de episodios de sangrado. Se desarrolló rFVIII para reducir el riesgo de transmisión de patógenos transmitidos en la sangre luego de la contaminación generalizada de productos de plasma con los virus del VIH y la hepatitis, y para asegurar un suministro adecuado del producto de FVIII. Sin embargo, la protección hemostática con productos corrientes de FVIII está temporalmente limitada debido a una vida media ($t_{1/2}$) breve de aproximadamente 8-12 horas, y requiere inyecciones profilácticas tres veces a la semana o día por medio en la mayoría de los pacientes con el fin de mantener los niveles de FVIII sobre el 1%, un nivel que se ha establecido como protección contra la mayoría de los episodios de sangrado espontáneos. Manco-Johnson *et al.*, *New Engl J Med*. 357(6):535-44 (2007).

Numerosos estudios han demostrado que, incluso en dosis altas, la terapia a pedido no es efectiva en la prevención de la artropatía. Aledort L. *et al.*, *J Intern Med*. 236:391-399 (1994); Petrini P. *et al.*, *Am J Pediatr Hematol Oncol*. 13:280-287 (1991). Los beneficios de la terapia profiláctica se han demostrado en numerosos estudios clínicos^{4, 6-15} y Manco-Johnson *et al.*, *supra*, establecieron que los niños que comenzaron con profilaxis principal, luego de su primer sangrado en las articulaciones presentaban sangrados significativamente menores en cantidad y menor daño en las articulaciones que los niños tratados a pedido.

En comparación con el tratamiento a pedido, la terapia profiláctica también reduce la discapacidad, la tasa de hospitalización, y el tiempo sustraído a la escuela o el trabajo;^{6,16} y mejora la calidad de vida de los pacientes y sus familias.¹⁷ Sin embargo, la terapia profiláctica a menudo requiere el uso de dispositivos de acceso a la vena central en niños, y sus consiguientes riesgos de infección, sepsis, y trombosis. Además, independientemente de los beneficios, la

aceptación y la conformidad, la profilaxis disminuye con la edad, en parte debido a la inconveniencia e invasividad.^{18,19} Así, un producto rFVIII con una $t_{1/2}$ en plasma prolongada sería potencialmente beneficiosa. Lillicrap D., *Current Opinion in Hematology* 17:393-397 (2010).

rFVIII-Fc es una proteína de fusión recombinante compuesta por una molécula única de rFVIII con el dominio B eliminado covalentemente unida al dominio Fc de IgG₁ humana. Las ventajas potenciales de las proteínas de fusión Fc incluyen mejor tolerabilidad y protección hemostática prolongada, y el dominio Fc representa una molécula natural sin toxicidad inherente conocida.^{21,22} La unión al dominio Fc de IgG₁ permite la unión al receptor Fc neonatal (FcRn), que se expresa en numerosos tipos celulares, que incluyen células endoteliales. La expresión de FcRn permanece estable a través de la vida y es responsable de la protección de las proteínas de fusión de IgG₁ y Fc de la degradación lisosomal, prolongando así la $t_{1/2}$ de la proteína.^{21,23} Numerosas proteínas dentro de la circulación se internalizan en las células que revisten la vasculatura vía pinocitosis no específica y se trafican a vías de degradación endosomales y lisosomales.

Las proteínas de Fc interactúan con FcRn, residente dentro de los endosomas. Los endosomas que contienen FcRn dirigen las proteínas de fusión de Fc nuevamente a la membrana del plasma, liberándolas dentro de la circulación en una manera dependiente del pH,²⁴ evitando así la degradación lisosomal. Este enfoque de reciclaje se ha utilizado exitosamente para la extensión de la $t_{1/2}$ de los productos biológicos terapéuticos; se ha aprobado un número de fármacos basados en la fusión de Fc para uso clínico (por ej., etanercept, romiplostim) y otros se encuentran en desarrollo.^{25,26}

Los datos pre-clínicos para rFVIII-Fc indican que FVIII puede rescatarse de la degradación por vía de protección natural mediada por FcRn, extendiendo así la $t_{1/2}$. En ratones y perros con hemofilia A, la $t_{1/2}$ en plasma terminal para rFVIII-Fc era aproximadamente 2 veces más extensa que con rFVIII.^{27,28} Con base en estos datos, se llevó a cabo un estudio clínico primero en seres humanos para investigar la seguridad y PK de una proteína de fusión de rFVIII-Fc de larga duración en sujetos con hemofilia A.

Diseño del estudio: Este estudio abierto, de dosis crecientes, múltiples centros, de Fase 1/2a en pacientes anteriormente tratados con hemofilia A severa investigó la seguridad de rFVIII-Fc y su farmacocinética (PK) en comparación con ADVATE® (factor antihemofílico [recombinante], método de plasma/libre de albúmina, octocog alfa, Baxter Healthcare). Este estudio se llevó a cabo de acuerdo con las Directrices de CFR e ICH de los Estados Unidos sobre Buenas Prácticas Clínicas. Antes de cualquier prueba, se obtuvo la aprobación de las Juntas de Revisión Institucional participantes y los consentimientos informados por escrito de todos los sujetos. El diseño del estudio fue secuencial; se administró

una dosis única de ADVATE® de 25 o 65 IU/kg seguido por una dosis igual de rFVIII Fc (FIG. 8). Ambos fármacos se inyectaron en forma intravenosa durante aproximadamente 10 minutos. Se esperaba que los dos niveles de dosis encuadren los rangos de dosis terapéuticas típicas. Los sujetos se observaron durante 28 días luego de recibir rFVIII Fc mediante análisis de seguridad, que incluyen ensayos para anticuerpos anti-FVIII e inhibidores 14 y 28 días después de la inyección. La actividad de FVIII en plasma se midió en sujetos antes de la inyección, 10 y 30 minutos, 1, 3, 6, 9, 24, 48, 72, 96, 120, y 168 horas (7 días) después de la inyección de rFVIII Fc, con muestras adicionales a 192, 216, y 240 horas (10 días) para sujetos dosificados con 65 IU/kg de rFVIII Fc. La actividad de FVIII en plasma se midió en los mismos puntos de tiempo después del tratamiento de ADVATE®, durante 72 horas para el grupo de 25 IU/kg y 96 horas para el grupo de 65 IU/kg.

Sujetos: los sujetos masculinos tenían al menos 12 años de edad y hemofilia A severa (definida como un nivel de actividad de FVIII < 1%) y tenían al menos 100 días de exposición anterior documentada a concentrados de FVIII (pdFVIII o rFVIII). Se excluyeron los sujetos con hipersensibilidad conocida a proteínas de ratón o hámster, historial de inhibidores o títulos inhibidores detectables en la observación, o que estuvieran tomando cualquier medicación que puede afectar la hemostasis o fármacos inmunosupresores sistémicos, o que hayan experimentado una infección bacteriana o viral activa (que no sea hepatitis o VIH) en un plazo dentro de los 30 días de observación. El genotipo del sujeto, de conocerse, se registró durante el ingreso al estudio.

Producto de tratamiento: los transgenes rFVIII Fc y Fc humanos se transfectaron en forma estable en células HEK293 y la línea celular se ensayó en forma extensiva con propósitos de estabilidad, esterilidad, y contaminación viral para asegurar la seguridad. El medicamento purificado está compuesto por una FVIII monomérica con el dominio B eliminado covalentemente unida a través de su extremo terminal de carboxi al extremo terminal de N de un monómero de Fc, que forma un enlace de disulfuro con un segundo monómero de Fc durante la síntesis y secreción de las células. rFVIII Fc se purificó por cromatografía y nanofiltración, y era completamente activo en ensayos de coagulación de una etapa y cromogénicos con relación a las preparaciones de rFVIII comercialmente disponibles. Se suministró como un líquido congelado que contenía 1000 IU por 2 ml de solución y formuló con L-histidina (pH 7), cloruro de sodio, cloruro de calcio, sacarosa, manitol, y Polisorbato 20. Para inyección, el producto se diluyó con solución salina (NaCl 0,9%).

Medidas de resultado: el objetivo principal de este estudio fue la seguridad, evaluada a través de los exámenes físicos, el informe de los eventos adversos emergentes de los tratamientos (AE), el desarrollo de anticuerpos, y el monitoreo

de laboratorio a través del tiempo. Los objetivos secundarios incluyeron parámetros derivados de análisis de PK. Las evaluaciones de laboratorio incluyeron tiempo de protrombina, tiempo tromboplastina parcial activada (aPTT), proporción internacional normalizada, niveles de D-dímero, antígeno del factor de von Willebrand factor (vWF), hematología estándar y ensayos químicos de la sangre, y urinálisis.

La actividad de FVIII se midió por el ensayo de coagulación de una etapa (aPTT) en un analizador BCS-XP de Siemens por el uso de reactivos comerciales (Dade Actin FSL) con calibración contra un plasma de referencia normal (Precision Biologics CRYOcheck™) rastreable al 5to Estándar Internacional (IS) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) para plasma humano. Además del ensayo de aPTT, la actividad de FVIII se midió por un ensayo de sustrato cromogénico²⁹ por el uso de un kit comercialmente disponible (Aniara BIOPHEN FVIII:C) conforme con las recomendaciones de la Farmacopea Europea. El ensayo cromogénico se calibró contra el plasma de referencia humano normal (Instrumentation Laboratories ORKE45), que también tenía una potencia asignada contra el estándar de plasma humano del 5to IS de la OMS.

El límite de cuantificación (LLOQ) para los ensayos de una etapa y cromogénicos fue de 0,5 IU/dL y 0,4 IU/dL, respectivamente. Los inhibidores de FVIII se midieron por el ensayo de Bethesda modificado por *Nijmegen y en un nivel menor que 0,6 BU/ml se consideraron negativos. Se evaluaron los anticuerpos anti-rFVIIIIFc por el uso de un inmunoensayo electroquimiluminescente de puenteo específico que utiliza biotina y rFVIIIIFc sulfo-etiquetada. Se determinó que la sensibilidad del ensayo era de 89 ng/ml por el uso de un anticuerpo monoclonal FVIII anti-humano como un control subrogado. La tromboelastometría exploratoria de sangre total (ROTEM®) se llevó a cabo en dos sujetos, uno de cada nivel de dosis, en varios puntos de tiempo para evaluar la mejora en la hemostasis global luego de la inyección con ADVATE® y rFVIIIIFc.

Análisis de farmacocinética: un modelo de disposición de un comportamiento definido por el usuario que estima automáticamente el nivel endógeno de FVIII y la reducción residual subsecuente, se utilizó en WinNonLin para un análisis de los datos de actividad-versus-tiempo de el FVIII en plasma de un sujeto individual luego de una administración única de ADVATE® o rFVIIIIFc. Los tiempos de muestreo reales, las dosis, y la duración de la inyección se utilizaron para el cálculo de parámetros que incluyen la actividad máxima (C_{max}), el t_{1/2}, la depuración (CL), el volumen de distribución en estado fijo (V_{ss}), el área bajo la curva (tiempo cero extrapolado al infinito [AUC_{INF}]), el tiempo de residencia medio (MRT), y la recuperación incremental.

Simulación de Monte Carlo del Perfil de Actividad-Versus-Tiempo de rFVIIIIFc— A los perfiles de actividad-tiempo del constructo de FVIII luego de regímenes de

dosificación de 25 IU/kg o 65 IU/kg, se llevó a cabo una simulación de Monte Carlo por el uso del modelo de PK de la población de ADVATE® y rFVIII Fc. Los estimados medios de parámetros del modelo (CL, volumen de distribución) en la población ensayada, la varianza intra-individuo, y la variabilidad residual se estimaron con base en los datos de actividad del ensayo de coagulación (aPTT) de una etapa de ADVATE® y rFVIII Fc de 16 sujetos en este estudio de Fase 1/2a. Se simularon quinientos sujetos con 15 puntos de muestreo para cada sujeto para cada régimen de dosificación. Se estimó el porcentaje de la población con actividad de FVIII mayor o igual que 1% y 3% en diferentes tiempos luego de diferentes regímenes de dosificación de ADVATE® o rFVIII Fc.

Análisis estadístico – los parámetros de PK seleccionados para rFVIII Fc y ADVATE® se compararon por el uso de un análisis de un modelo de varianza. Los parámetros de PK se transformaron por log para estos análisis y estimados medios, diferencias medias, e intervalos de confianza sobre la escala de log se transformaron para obtener estimados para medias geométricas, proporciones de medias geométricas (GMR), e intervalos de confianza, respectivamente, sobre la escala original. La GMR es la media geométrica de la proporción intra-sujeto del valor del parámetro de PK de rFVIII Fc al valor del parámetro de PK de ADVATE®.

Resultados

Disposición de sujetos- se enrolaron diecinueve sujetos en el estudio; 16 se sometieron a evaluación de PK para ADVATE® y rFVIII Fc. Un sujeto se auto-administró su producto anterior previo a la finalización del período de lavado luego de la dosis con ADVATE® y, por lo tanto, se excluyó del análisis de PK, pero se incluyó en el análisis de seguridad. Tres sujetos se discontinuaron del estudio antes de recibir cualquier fármaco de estudio: uno abandonó en forma voluntaria; un segundo fue retirado por el Investigador por disconformidad; y uno se retiró a pedido del Patrocinador debido a la finalización del enrolamiento del estudio. De los sujetos dosificados, seis sujetos recibieron 25 IU/kg y 10 sujetos recibieron 65 IU/kg de ADVATE® y rFVIII Fc. La edad media fue de 40,3 años (23 a 61 años). La identificación genotípica se recolectó para siete sujetos; la inversión de intrón 22 se informó en seis sujetos; y un defecto de cambio de marco se informó en un sujeto. El genotipo fue desconocido para nueve sujetos. Trece sujetos tenían anticuerpos de hepatitis C, cuatro de los que también eran HIV positivos.

Seguridad – se informaron 44 AE emergentes por el tratamiento por parte de 11 (69%) sujetos durante los períodos de tratamiento y seguimiento. Esto incluyó el día de la dosificación con Advate o rFVIII Fc a través de un período de observación posterior a la dosificación de 28 días. La mayoría de los eventos se consideraron leves y ninguno derivó en un retiro del estudio. Un evento, disgeusia, se produjo en forma transitoria en un sujeto mientras recibía una dosis de 65 IU/kg de rFVIII Fc y se consideró relacionado con rFVIII Fc.

Un sujeto experimentó un ataque de ansiedad luego de recibir la dosis de 65 IU/kg de rFVIII Fc que dio lugar a 21 AE, de los que 19 se consideraron leves, y dos (jaqueca y fobia) se consideraron moderados. Ninguno se juzgó relacionado con rFVIII Fc por parte del Investigador.

No se informaron episodios de sangrado serios. No se detectó evidencia de reacciones alérgicas a la inyección. Todas las muestras de plasma probadas dieron resultados negativos para inhibidores de FVIII y anticuerpos anti-rFVIII Fc. No se observaron signos de reacciones del sitio de inyección. No se informaron cambios clínicamente significativos en los valores de laboratorio anormales.

Farmacocinética: Correlación entre aPTT y la Actividad Cromogénica para rFVIII Fc en Plasma - las actividades de ADVATE® y rFVIII Fc se determinaron en los mismos ensayos por el uso de reactivos comercialmente disponibles y calibración contra estándares de plasma humano normal. Se observó una fuerte correlación entre los resultados obtenidos por el ensayo de coagulación de una etapa y el ensayo cromogénico en muestras que tenían una actividad superior al LLOQ. Se observaron coeficientes de correlación (Pearson R^2) de 0,94 y 0,95 entre los dos resultados de ensayo para 151 muestras luego de la dosificación de ADVATE® y 185 muestras luego de la dosificación de rFVIII Fc, respectivamente. En comparación con los resultados de aPTT, las actividades de FVIII cromogénicas fueron, en promedio, 21% mayores para ADVATE® y 32% mayores para rFVIII Fc, no estadísticamente significativas (Figura 9). Esta observación llevó a una estimación ligeramente mayor de los parámetros de exposición por la evaluación cromogénica para ambos fármacos. Las recuperaciones superiores de FVIII aparentes por el ensayo cromogénico son típicas para los productos de FVIII recombinante ensayados en pruebas clínicas, y son acordes con la mayoría de los otros productos de FVIII comercializados.³⁰⁻³²

Farmacocinética mejorada para rFVIII Fc – los estimados de PK principal se derivaron de los datos de la actividad de ensayo de coagulación de una etapa (aPTT). En sujetos que recibieron 25 o 65 IU/kg de ADVATE® seguido por una dosis igual de rFVIII Fc, la actividad de FVIII en plasma se elevó drásticamente y alcanzó C_{max} dentro de la primera hora luego de la dosificación. La declinación subsecuente de la actividad de FVIII observada exhibió características de reducción monoexponenciales hasta alcanzarse la actividad de FVIII del valor de referencia (Figura 10). La C_{max} aumentó en forma proporcional a la dosis, pero fue comparable entre dosis iguales de ADVATE® y rFVIII Fc (Tabla 8). La exposición total (AUC_{INF}) también aumentó en forma proporcional a la dosis. Sin embargo, el AUC_{INF} de rFVIII Fc fue 1,48 y 1,56 veces mayor que el de ADVATE® a 25 IU/kg ($p=0,002$) y 65 IU/kg ($p<0,001$), respectivamente (Tabla 8).

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

Parámetro	Dosis: 25 IU/kg (N=6)			Dosis: 65 IU/kg (N=9)		
	ADVATE®	rFVIII Fc	Prop.	ADVATE®	rFVIII Fc	Prop.
	Media	Media	Media	Media	Media	Media
	Geom.	Geom.	Geom.	Geom.	Geom.	Geom.
	[CI 95%]	[CI 95%]	[CI 95%]	[CI 95%]	[CI 95%]	[CI 95%]
			(valor de p)			(valor de p)
C _{max} _OBS (IU/dL)	63,6	60,5	0,952			0,895
	[59,1,	[53,1,	[0,819,			[0,795,
	68,3]	69,0]	1,11]			1,01]
			(p =	133	119	(p =
			0,440)	[105, 168]	[103, 136]	0,061)

AUC _{INF} (hr*IU/d L)	994 [723, 1370]	1480 [1160, 1880]	1,48 [1,26, 1,76] (p = 0,002)	1800 [1350, 2400]	2800 [1980, 3970]	1,56 [1,33, 1,83] (p < 0,001)
t _{1/2} (hr)	12,2 [9,14, 16,3]	18,8 [14,8, 23,8]	1,54 [1,40,1,6 9] (p < 0,001)	11,0 [8,76, 13,9]	18,8 [14,3, 24,5]	1,70 [1,54, 1,89] (p < 0,001)
MRT (hr)	17,5 [13,1, 23,4]	27,0 [21,3, 34,2]	1,54 [1,40,1,6 9] (p < 0,001)	15,8 [12,6, 19,9]	27,0 [20,6, 35,3]	1,71 [1,54, 1,89] (p < 0,001)
CL (ml/hr/kg)	2,49 [1,80, 3,45]	1,68 [1,31, 2,15]	0,673 [0,569, 0,796] (p = 0,002)	3,61 [2,71, 4,83]	2,32 [1,64, 3,29]	0,642 [0,547, 0,753] (p < 0,001)
V _{ss} (ml/kg)	43,9 [39,3, 49,0]	45,4 [39,3, 52,5]	1,04 [0,947,1, 13] (p = 0,357)	57,4 [48,3, 68,3]	62,8 [55,2, 71,5]	1,09 [0,976,1,2 2] (p = 0,107)
Recuperación Incremental (IU/dL por IU/kg)	2,56 [2,36, 2,78]	2,44 [2,12, 2,81]	0,952 [0,819,1, 11] (p = 0,444)	2,04 [1,61, 2,59]	1,83 [1,59, 2,10]	0,894 [0,795,1,0 1] (p = 0,060)

CI = Intervalo de Confidencia; Media Geom. = Media Geométrica; OBS = observado. Medias estimadas, CI 95% para medias, y diferencias medias se transformaron para obtener medias geométricas estimadas, CI 95% para medias geométricas, y proporciones de medias geométricas, respectivamente.

La $t_{1/2}$, MRT, CL, y V_{ss} parecían ser independientes de la dosis (Tabla 8). La $t_{1/2}$ de la media geométrica de rFVIII Fc fue de 18,8 horas para los grupos de dosis de 25 IU/kg y 65 IU/kg. Esta representa una mejora de 1,54 y 1,70 veces la de ADVATE[®] (12,2 horas y 11,0 horas) en dosis equivalentes ($p<0.001$), respectivamente (Tabla 8). La misma mejora intra-sujeto se observó en el MRT de rFVIII Fc (27,0 horas para ambos grupos de dosis) en comparación con ADVATE[®] (17,5 horas para la dosis de 25 IU/kg y 15,8 horas para la dosis de 65 IU/kg) ($p<0,001$). En forma consistente con la mejora en la $t_{1/2}$ y MRT se observó una reducción correspondiente de 1,49 y 1,56 veces en la CL intra-sujeto en dosis de 25 IU/kg ($p=0,002$) y 65 IU/kg ($p<0,001$), respectivamente. No se observaron diferencias significativas en V_{ss} ni en la recuperación incremental entre ADVATE[®] y rFVIII Fc. Por lo tanto, dentro de cada sujeto, rFVIII Fc demostró un perfil de PK mejorado en comparación con ADVATE[®]. También se observó que los pacientes con vidas medias más breves con ADVATE[®] tenían vidas medias más breves con rFVIII Fc, y que los pacientes con vidas medias más extensas con ADVATE[®] tenían vidas medias más extensas con rFVIII Fc.

El perfil de PK mejorado de rFVIII Fc dio lugar a un aumento en el tiempo posterior a la dosificación a la actividad de FVIII 1% que fue 1,53 y 1,68 veces más extenso respectivamente, que con ADVATE[®] en 25 IU/kg ($p<0,001$) y 65 IU/kg ($p<0,001$) (datos no mostrados), lo que sugiere un duración terapéutica potencialmente más extensa para rFVIII Fc.

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

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

Parámetro	Dosis: 25 IU/kg (N=6)			Dosis: 65 IU/kg (N=9)		
	ADVATE [®]	rFVIII Fc	Prop.	ADVATE [®]	rFVIII Fc	Prop.
	Media Geom. [CI 95%]	Media Geom. [CI 95%]	Media Geom. [CI 95%] (valor de p)	Media Geom. [CI 95%]	Media Geom. [CI 95%]	Media Geom. [CI 95%] (valor de p)
C_{max_OB}	75,5		1,01	175	182	1,04
S	[65,5,	76,5	[0,940,	[143,	[146,	[0,900,
(IU/dL)	87,1]	[64,9, 90,1]	1,09]	215]	227]	1,20]

			(p = 0,686)			(p = 0,571)
AUC _{INF} (hr*IU/dL)	1060 [822, 1360]	1660 [1300, 2120]	1,57 [1,38, 1,80] (p < 0,001)	2270 [1670, 3070]	4280 [2960, 6190]	1,89 [1,61, 2,21] (p < 0,001)
t _{1/2} (hr)	10,5 [8,49, 12,9]	16,7 [13,8, 20,1]	1,59 [1,35, 1,87] (p < 0,001)	10,8 [8,16, 14,2]	19,8 [14,3, 27,5]	1,84 [1,60, 2,12] (p < 0,001)
MRT (hr)	15,0 [12,2, 18,6]	23,9 [19,8, 28,9]	1,59 [1,35, 1,87] (p < 0,001)	15,4 [11,7, 20,4]	28,5 [20,5, 39,6]	1,85 [1,61, 2,12] (p < 0,001)
CL (ml/hora/kg)	2,35 [1,80, 3,06]	1,49 [1,16, 1,92]	0,636 [0,557, 0,727] (p < 0,001)	2,87 [2,12, 3,89]	1,52 [1,05, 2,20]	0,530 [0,453, 0,620] (p < 0,001)
V _{ss} (ml/kg)	35,5 [30,5, 41,3]	35,9 [30,4, 42,3]	1,01 [0,898, 1,14] (p = 0,822)	44,5 [36,7, 54,1]	43,4 [38,2, 49,4]	0,975 [0,863, 1,10] (p = 0,653)
Recuperación Incremental (IU/dL por IU/kg)	3,05 [2,62, 3,54]	3,09 [2,61, 3,66]	1,01 [0,940, 1,09] (p = 0,679)	2,70 [2,20, 3,31]	2,80 [2,24, 3,50]	1,04 [0,900, 1,20] (p = 0,571)

CI = Intervalo de Confidencia; Media Geom. = Media Geométrica; OBS = observado. Medias estimadas, CI 95% para medias, y diferencias medias se transformaron para obtener medias geométricas estimadas, CI 95% para medias geométricas, y proporciones de medias geométricas, respectivamente.

Correlación entre el factor von Willebrand y la disposición de rFVIII Fc

– Dado que la mayor parte de la FVIII en circulación está en complejo con VWF³³ y que el estudio de asociación abarcativa de la asociación de genomas ha identificado que los determinantes genéticos de los niveles de FVIII son principalmente dependientes de los niveles del VWF,³⁴ se ha examinado la asociación entre VWF y rFVIII Fc. Se observó una fuerte correlación entre los niveles de VWF y CL y $t_{1/2}$ para rFVIII Fc y ADVATE[®]. De acuerdo con lo mostrado en la Figura 10, a medida que aumentó el nivel de VWF, disminuyó la CL de rFVIII Fc ($p=0,0016$) y de ADVATE[®] ($p=0,0012$).

La relación opuesta se observó entre el nivel de VWF y $t_{1/2}$. A medida que aumentó el nivel de VWF, aumentó la $t_{1/2}$ de rFVIII Fc ($p=0,0003$) y de ADVATE[®] ($p<0,0001$). Esta correlación sugiere que el resto Fc de rFVIII Fc no altera el rol del VWF en la protección de FVIII de la depuración.

Efectos de PK prolongada de rFVIII Fc sobre ROTEM[®] de sangre total - antes de la administración del fármaco de estudio, la sangre de un sujeto en cada grupo de dosis se enriqueció con una dosis igual de rFVIII Fc o ADVATE[®] y se analizó por ROTEM[®] de sangre total. El tiempo de coagulación (CT) fue lineal con respecto a la dosis en el rango de aproximadamente 1% a 100% de normalidad, y la respuesta de dosis fue comparable entre rFVIII Fc y ADVATE[®] en el mismo sujeto (datos no mostrados), lo que indica una potencia comparable de rFVIII Fc y ADVATE[®] en la formación de coágulos.

Independientemente del CT del valor de referencia variable debido a los niveles de FVIII residual anteriores a la administración de ADVATE[®] o rFVIII Fc, ambos productos corrigieron efectivamente el CT a niveles comparables 30 minutos después de la dosificación (Figura 12). La mejora en el CT se sostuvo en mejor forma por rFVIII Fc que por ADVATE[®] 3 horas después de una dosis de 25 IU/kg (Figura 12A) y 24 horas después de una dosis de 65 IU/kg (Figura 12B).

rFVIII Fc se toleró en forma adecuada por los sujetos en ambas dosis. No se observaron cambios clínicamente significativos en los parámetros de hematología, química de la sangre, o urinálisis. La mayoría de las AE fueron leves, no relacionadas con rFVIII Fc, y se resolvieron sin secuelas. No se produjeron AE serios ni muertes durante el estudio, y ningún sujeto en ninguna dosis desarrolló anticuerpos neutralizantes o de unión a rFVIII Fc.

rFVIII Fc demostró un perfil de PK de actividad de FVIII significativamente mejorado con relación a ADVATE[®], donde $t_{1/2}$ y MRT a través de los niveles de dosis son 1,54 a 1,71 veces más extensos, de acuerdo con lo medido por el ensayo de coagulación de una etapa (aPTT) y 1,59 a 1,84 veces más extenso por el ensayo cromogénico de dos etapas. La actividad prolongada de rFVIII Fc predice una posible actividad prolongada, lo que permite un régimen de dosificación menos frecuente en el tratamiento profiláctico de pacientes con Hemofilia A.

Con la adopción de los parámetros de PK derivados de este estudio, la simulación de Monte Carlo predice que un mayor porcentaje de pacientes que reciben rFVIII Fc sostendrán niveles de FVIII superiores a 1% o 3% en comparación con los pacientes que reciban dosis iguales de ADVATE® (Tabla 10). Por ejemplo, en una dosis de 25 IU/kg, se predice que 12,2% de pacientes de ADVATE® versus 71,2% de pacientes de rFVIII Fc tienen niveles mínimos de FVIII sobre 1% el Día 4; en una dosis de 65 IU/kg, se predice que 11,0% de pacientes de ADVATE® versus 66,4% de pacientes de rFVIII Fc tienen niveles de FVIII sobre 3% el Día 4. Se planean pruebas clínicas en mayores números de pacientes para confirmar los resultados de este estudio de Fase 1/2a y de las predicciones de la simulación de Monte Carlo.

Tabla 10. Porcentaje predicho de sujetos que logran niveles mínimos de FVIII sobre 1% y 3% de normalidad en un régimen de dosificación especificado de ADVATE® o rFVIII Fc

Punto de tiempo luego de la dosificación (Día)	ADVATE®		rFVIII Fc	
	25 IU/kg	65 IU/kg	25 IU/kg	65 IU/kg
	Porcentaje de Sujetos con Niveles Mínimos de FVIII sobre 1%			
3	40,0	67,8	92,6	99,0
4	12,2	31,0	71,2	90,0
5	4,20	13,6	39,4	71,6
7	0,200	1,40	7,80	26,4
	Porcentaje de Sujetos con Niveles Mínimos de FVIII sobre 3%			
3	10,6	34,6	62,2	91,0
4	1,60	11,0	25,4	66,4
5	0,200	3,20	7,00	36,2
7	0	0,200	0,400	6,60

Independientemente del éxito de la tecnología de fusión de Fc en la prolongación de la $t_{1/2}$ circulante para una variedad de terapéuticos de proteína, rFVIII se consideró demasiado extenso para producir exitosamente fusiones Fc diméricas. Se ha creado así una proteína de fusión Fc monomérica a través de la que una molécula efectora única se unió en forma covalente a una Fc dimérica, permitiendo la unión a FcRn intracelular y el reciclaje subsecuente.^{21,22} Los ensayos de coagulación *in vitro* no demuestran pérdidas de la actividad específica de rFVIII Fc, en comparación con el FVIII con el dominio B eliminado o nativo, por ensayos de coagulación o cromogénicos, por el uso de reactivos comercialmente disponibles y estándares de referencia de FVIII comúnmente utilizados (JAD, TL,

SCL, et al., manuscrito presentado en agosto del 2011). Además, estos resultados indican que rFVIII Fc puede ensayarse en forma confiable en un ajuste clínico por el ensayo de una etapa o el método cromogénico.

En resumen, esta prueba clínica de Fase 1/2a es la primera prueba para demostrar la seguridad y la $t_{1/2}$ prolongada de rFVIII Fc en pacientes con hemofilia A severa. Un estudio pivotal de Fase 3 se encuentra en curso con rFVIII Fc para establecer regímenes de dosificación de profilaxis efectiva para individuos con hemofilia A.

Ejemplo 11

Un isoformo de cadena única (SC), novedoso, del factor VIII (FVIII), resultante de la proteólisis incompleta en el residuo R1648 durante la biosíntesis, puede proporcionar una elaborabilidad y estabilidad superiores con relación a FVIII nativo. Una molécula del factor VIII única recombinante con el dominio B eliminado fundida a un dominio Fc de inmunoglobulina (rFVIII Fc) y su contraparte de SC purificada SC (SC-rFVIII Fc) exhibieron una actividad específica similar en ensayos de coagulación de una etapa por el uso de plasma empobrecido del factor de von Willebrand (VWF), pero SC-rFVIII Fc exhibió una actividad específica menor en presencia de VWF. Este estudio se llevó a cabo para determinar si rFVIII Fc, SC-rFVIII Fc y rBDD-FVIII (XYNTHA[®], REFACTO AF[®]) unidos a VWF difieren con respecto a la liberación proteolítica de VWF mediada por trombina.

Se capturaron cantidades equimolares de rFVIII Fc, SC-rFVIII Fc, y rBDD-FVIII en un chip biosensor óptico sobre el que se había inmovilizado VWF humano por acoplamiento de amina. Se infundió α -trombina humana en un rango de concentraciones sobre la superficie del chip, y las constantes de liberación de FVIII de VWF inmovilizado VWF se monitorearon en tiempo real. La concentración efectiva máxima media (EC_{50}) de α -trombina se determinó para cada especie de FVIII.

Los valores de EC_{50} de α -trombina para rFVIII Fc y rBDD-FVIII eran comparable ($3,7 \pm 0,2$ U/ml y $3,2 \pm 0,3$ U/ml, respectivamente), mientras que el valor de EC_{50} para SC-rFVIII Fc era mayor en más de 3 veces ($11,7 \pm 0,9$ U/ml). Este hallazgo de que SC-rFVIII Fc se libera más lentamente de VWF que cualquiera de rFVIII Fc o rBDD-FVIII es consistente con un hallazgo anteriormente observado con respecto a las actividades de rFVIII Fc y SC-rFVIII Fc en un ensayo de coagulación de una etapa (aPTT) donde SC-rFVIII Fc tenía una actividad aparente menor únicamente cuando VWF estaba presente en la muestra de plasma de ensayo. Sin embargo, todas las muestras poseían actividades equivalentes en un modelo de sangrado de ratón, lo que indica que la responsividad de las preparaciones de FVIII a la trombina en la liberación de FVIII del VWF no está correlacionada con la eficacia *in vivo*.

TABLA1: Secuencias de polinucleótidos

a. B-Domain Deleted FVIII_{FC}

(i)Secuencia de ADN FVIII_{FC} con dominio suprimido (péptido señal FVIII subrayado, región Fc en negrita) (SEQ ID NO:1, que codifica la SEQ ID NO:2)

A.FVIII_{FC} con dominio B suprimido

661 A TGCAAATAGA GCTCTCCACC TGCTTCTTTC
721 TGTGCCTTTT GCGATTCTGC TTTAGTGCCA CCAGAAGATA
CTACCTGGGT GCAGTGAAC
781 TGTCATGGGA CTATATGCAA AGTGATCTCG GTGAGCTGCC
TGTGGACGCA AGATTTCTC
841 CTAGAGTGCC AAAATCTTTT CCATTCAACA CCTCAGTCGT
GTACAAAAAG ACTCTGTTTG
901 TAGAATTCAC GGATCACCTT TTCAACATCG CTAAGCCAAG
GCCACCCTGG ATGGGTCTGC
961 TAGGTCCTAC CATCCAGGCT GAGGTTTATG ATACAGTGGT
CATTACACTT AGAACATGG
1021 CTTCCCATCC TGTCAGTCTT CATGCTGTTG GTGTATCCTA
CTGGAAAGCT TCTGAGGGAG
1081 CTGAATATGA TGATCAGACC AGTCAAAGGG AGAAAGAAGA
TGATAAAGTC TTCCCTGGTG
1141 GAAGCCATAC ATATGTCTGG CAGGTCCTGA AAGAGAATGG
TCCAATGGCC TCTGACCCAC
1201 TGTGCCTTAC CTA^{CT}CATAT CTTTCTCATG TGGACCTGGT
AAAAGACTTG AATTCAGGCC
1261 TCATTGGAGC CCTACTAGTA TGTAGAGAAG GGAGTCTGGC
CAAGGAAAAG ACACAGACCT
1321 TGCACAAATT TATACTACTT TTTGCTGTAT TTGATGAAGG
GAAAAGTTGG CACTCAGAAA
1381 CAAAGAACTC CTTGATGCAG GATAGGGATG CTGCATCTGC
TCGGGCCTGG CCTAAAATGC
1441 ACACAGTCAA TGGTTATGTA AACAGGTCTC TGCCAGGTCT
GATTGGATGC CACAGGAAAT
1501 CAGTCTATTG GCATGTGATT GGAATGGGCA CCACTCCTGA
AGTGCACTCA ATATTCCTCG
1561 AAGGTCACAC ATTTCTTGTG AGGAACCATC GCCAGGCGTC
CTTGGAATC TCGCCAATAA
1621 CTTTCCTTAC TGCTCAAACA CTCTTGATGG ACCTTGGACA
GTTTCTACTG TTTTGTCTATA

1681	TCTCTTCCCA	CCAACATGAT	GGCATGGAAG	CTTATGTCAA
	AGTAGACAGC TGTCCAGAGG			
1741	AACCCCAACT	ACGAATGAAA	AATAATGAAG	AAGCGGAAGA
	CTATGATGAT GATCTTACTG			
1801	ATTCTGAAAT	GGATGTGGTC	AGGTTTGATG	ATGACAACTC
	TCCTTCCTTT ATCCAAATTC			
1861	GCTCAGTTGC	CAAGAAGCAT	CCTAAAACTT	GGGTACATTA
	CATTGCTGCT GAAGAGGAGG			
1921	ACTGGGACTA	TGCTCCCTTA	GTCCTCGCCC	CCGATGACAG
	AAGTTATAAA AGTCAATATT			
1981	TGAACAATGG	CCCTCAGCGG	ATTGGTAGGA	AGTACAAAAA
	AGTCCGATTT ATGGCATAACA			
2041	CAGATGAAAC	CTTTAAGACT	CGTGAAGCTA	TTCAGCATGA
	ATCAGGAATC TTGGGACCTT			
2101	TACTTTATGG	GGAAGTTGGA	GACACACTGT	TGATTATATT
	TAAGAATCAA GCAAGCAGAC			
2161	CATATAACAT	CTACCCTCAC	GGAATCACTG	ATGTCCGTCC
	TTTGTATTCA AGGAGATTAC			
2221	CAAAAGGTGT	AAAACATTTG	AAGGATTTTC	CAATTCTGCC
	AGGAGAAATA TTCAAATATA			
2281	AATGGACAGT	GA CTGTAGAA	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	ATACTGGTAC	ATTCTAAGCA	TTGGAGCACA
	GACTGACTTC CTTTCTGTCT			
2701	TCTTCTCTGG	ATATACCTTC	AAACACAAAA	TGGTCTATGA
	AGACACACTC ACCCTATTCC			
2761	CATTCTCAGG	AGAAACTGTC	TTCATGTCGA	TGGAAAACCC
	AGGTCTATGG ATTCTGGGGT			
2821	GCCACAACCTC	AGACTTTCGG	AACAGAGGCA	TGACCGCCTT
	ACTGAAGGTT TCTAGTTGTG			

2881	ACAAGAACAC	TGGTGATTAT	TACGAGGACA	GTTATGAAGA
	TATTTTCAGCA TACTTGCTGA			
2941	GTAAAAACAA	TGCCATTGAA	CCAAGAAGCT	TCTCTCAAAA
	CCCACCAGTC TTGAAACGCC			
3001	ATCAACGGGA	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA
	AGAGGAAATT GACTATGATG			
3061	ATACCATATC	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT
	TTATGATGAG GATGAAAATC			
3121	AGAGCCCCCG	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT
	TATTGCTGCA GTGGAGAGGC			
3181	TCTGGGATTA	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG
	AAACAGGGCT CAGAGTGGCA			
3241	GTGTCCCTCA	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC
	TGATGGCTCC TTTACTCAGC			
3301	CCTTATACCG	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT
	GGGGCCATAT ATAAGAGCAG			
3361	AAGTTGAAGA	TAATATCATG	GTAAC TTTC	GAAATCAGGC
	CTCTCGTCCC TATTCCTTCT			
3421	ATTCTAGCCT	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG
	AGCAGAACCT AGAAAAAACT			
3481	TTGTCAAGCC	TAATGAAACC	AAAAC TTACT	TTTGAAAGT
	GCAACATCAT ATGGCACCCA			
3541	CTAAAGATGA	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC
	TGATGTTGAC CTGGAAAAAG			
3601	ATGTGCACTC	AGGCCTGATT	GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA
	CACTAACACA CTGAACCCTG			
3661	CTCATGGGAG	ACAAGTGACA	GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT
	TTTCACCATC TTTGATGAGA			
3721	CCAAAAGCTG	GTA CTTC	GAAAATATGG	AAAGAAACTG
	CAGGGCTCCC TGCAATATCC			
3781	AGATGGAAGA	TCCCACTTTT	AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA
	TGCAATCAAT GGCTACATAA			
3841	TGGATACACT	ACCTGGCTTA	GTAATGGCTC	AGGATCAAAG
	GATTCGATGG TATCTGCTCA			
3901	GCATGGGCAG	CAATGAAAAC	ATCCATTCTA	TTCATTTTCTCAG
	TGGACATGTG TTCACTGTAC			
3961	GAAAAAAAGA	GGAGTATAAA	ATGGCACTGT	ACAATCTCTA
	TCCAGGTGTT TTTGAGACAG			
4021	TGGAAATGTT	ACCATCCAAA	GCTGGAATTT	GGCGGGTGGA
	ATGCCTTATT GGCGAGCATC			

4081	TACATGCTGG	GATGAGCACA	CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA
	TAAGTGTCAG	ACTCCCCTGG		
4141	GAATGGCTTC	TGGACACATT	AGAGATTTTC	AGATTACAGC
	TTCAGGACAA	TATGGACAGT		
4201	GGGCCCCAAA	GCTGGCCAGA	CTTCATTATT	CCGGATCAAT
	CAATGCCTGG	AGCACCAAGG		
4261	AGCCCTTTTC	TTGGATCAAG	GTGGATCTGT	TGGCACCAAT
	GATTATTCAC	GGCATCAAGA		
4321	CCCAGGGTGC	CCGTCAGAAG	TTCTCCAGCC	TCTACATCTC
	TCAGTTTATC	ATCATGTATA		
4381	GTCTTGATGG	GAAGAAGTGG	CAGACTTATC	GAGGAAATTC
	CACTGGAACC	TTAATGGTCT		
4441	TCTTTGGCAA	TGTGGATTCA	TCTGGGATAA	AACACAATAT
	TTTTAACCT	CCAATTATTG		
4501	CTCGATACAT	CCGTTTGCAC	CCAATCATT	ATAGCATTCG
	CAGCACTCTT	CGCATGGAGT		
4561	TGATGGGCTG	TGATTTAAAT	AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG
	AATGGAGAGT	AAAGCAATAT		
4621	CAGATGCACA	GATTACTGCT	TCATCCTACT	TTACCAATAT
	GTTTGCCACC	TGGTCTCCTT		
4681	CAAAGCTCG	ACTTCACCTC	CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG
	GAGACCTCAG	GTGAATAATC		
4741	CAAAGAGTG	GCTGCAAGTG	GACTTCCAGA	AGACAATGAA
	AGTCACAGGA	GTAACACTC		
4801	AGGGAGTAAA	ATCTCTGCTT	ACCAGCATGT	ATGTGAAGGA
	GTTCTCATC	TCCAGCAGTC		
4861	AAGATGGCCA	TCAGTGGACT	CTCTTTTTTC	AGAATGGCAA
	AGTAAAGGTT	TTTCAGGGAA		
4921	ATCAAGACTC	CTTCACACCT	GTGGTGAAC	CTCTAGACCC
	ACCGTTACTG	ACTCGCTACC		
4981	TTCGAATTCA	CCCCAGAGT	TGGGTGCACC	AGATTGCCCT
	GAGGATGGAG	GTTCTGGGCT		
5041	GCGAGGCACA	GGACCTCTAC	GACAAAATC	ACACATGCCC
	ACCGTGCCCA	GCTCCAGAAC		
5101	TCCTGGGCGG	ACCGTCAGTC	TTCCTCTTCC	CCCCAAAACC
	CAAGGACACC	CTCATGATCT		
5161	CCCGGACCCC	TGAGGTCACA	TGCGTGGTGG	TGGACGTGAG
	CCACGAAGAC	CCTGAGGTCA		
5221	AGTTCAACTG	GTACGTGGAC	GGCGTGGAGG	TGCATAATGC
	CAAGACAAAG	CCGCGGGAGG		

5281 AGCAGTACAA CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC
 CGTCCTGCAC CAGGACTGGC
5341 TGAATGGCAA GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC
 CCTCCCAGCC CCCATCGAGA
5401 AAACCATCTC CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA
 GGTGTACACC CTGCCCCCAT
5461 CCCGGGATGA GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG
 CCTGGTCAAA GGCTTCTATC
5521 CCAGCGACAT CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC
 GGAGAACAAC TACAAGACCA
5581 CGCCTCCCGT GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA
 CAGCAAGCTC ACCGTGGACA
5641 AGAGCAGGTG GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT
 GATGCATGAG GCTCTGCACA
5701 ACCACTACAC GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

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

7981 ATGGA GACAGACACA
8041 CTCCTGCTAT GGGTACTGCT GCTCTGGGTT CCAGGTTCCA
CTGGTGACAA AACTCACACA
8101 TGCCACCGT GCCCAGCACC TGAACCTCTG GGAGGACCGT
 CAGTCTTCCT CTTCCCCCA
8161 AAACCCAAGG ACACCCTCAT GATCTCCCGG ACCCCTGAGG
 TCACATGCGT GGTGGTGGAC
8221 GTGAGCCACG AAGACCCTGA GGTCAAGTTC AACTGGTACG
 TGGACGGCGT GGAGGTGCAT
8281 AATGCCAAGA CAAAGCCGCG GGAGGAGCAG TACAACAGCA
 CGTACCGTGT GGTCAGCGTC
8341 CTCACCGTCC TGCACCAGGA CTGGCTGAAT GGCAAGGAGT
 ACAAGTGCAA GGTCTCCAAC
8401 AAAGCCCTCC CAGCCCCCAT CGAGAAAACC ATCTCCAAAG
 CCAAAGGGCA GCCCCGAGAA
8461 CCACAGGTGT ACACCCTGCC CCCATCCCGC GATGAGCTGA
 CCAAGAACCA GGTCAGCCTG
8521 ACCTGCCTGG TCAAAGGCTT CTATCCCAGC GACATCGCCG
 TGGAGTGGGA GAGCAATGGG

8581 CAGCCGGAGA ACAACTACAA GACCACGCCT CCCGTGTTGG
 ACTCCGACGG CTCCTTCTTC
 8641 CTCTACAGCA AGCTCACCGT GGACAAGAGC AGGTGGCAGC
 AGGGGAACGT CTTCTCATGC
 8701 TCCGTGATGC ATGAGGCTCT GCACAACCAC TACACGCAGA
 AGAGCCTCTC CCTGTCTCCG
 8761 GGTAAG

B.FVIII_{FC} de longitud completa

(i) Secuencia de ADN de FVIII_{FC} de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado, región de F_{cn} negrita) (SEQ ID NO:5, que codifica la SEQ ID NO:6)

661 ATG CAAATAGAGC TCTCCACCTG
 721 CTTCTTTCTG TGCCTTTTGC GATTCTGCTT TAGTGCCACC
 AGAAGATACT ACCTGGGTGC
 781 AGTGGAAGCTG TCATGGGACT ATATGCAAAG TGATCTCGGT
 GAGCTGCCTG TGGACGCAAG
 841 ATTCCTCCT AGAGTGCCAA AATCTTTTCC ATTCAACACC
 TCAGTCGTGT AAAAAAGAC
 901 TCTGTTTGTA GAATTCACGG ATCACCTTTT CAACATCGCT
 AAGCCAAGGC CACCCTGGAT
 961 GGGTCTGCTA GGTCCTACCA TCCAGGCTGA GGTTTATGAT
 ACAGTGGTCA TTACACTTAA
 1021 GAACATGGCT TCCCATCCTG TCAGTCTTCA TGCTGTTGGT
 GTATCCTACT GGAAAGCTTC
 1081 TGAGGGAGCT GAATATGATG ATCAGACCAG TCAAAGGGAG
 AAAGAAGATG ATAAAGTCTT
 1141 CCCTGGTGGA AGCCATACAT ATGTCTGGCA GGTCCTGAAA
 GAGAATGGTC CAATGGCCTC
 1201 TGACCCACTG TGCCTTACCT ACTCATATCT TTCTCATGTG
 GACCTGGTAA AAGACTTGAA
 1261 TTCAGGCCTC ATTGGAGCCC TACTAGTATG TAGAGAAGGG
 AGTCTGGCCA AGGAAAAGAC
 1321 ACAGACCTTG CACAAATTTA TACTACTTTT TGCTGTATTT
 GATGAAGGGA AAAGTTGGCA
 1381 CTCAGAAACA AAGAACTCCT TGATGCAGGA TAGGGATGCT
 GCATCTGCTC GGGCCTGGCC
 1441 TAAAATGCAC ACAGTCAATG GTTATGTAAA CAGGTCTCTG
 CCAGGTCTGA TTGGATGCCA

1501	CAGGAAATCA	GTCTATTGGC	ATGTGATTGG	AATGGGCACC
	ACTCCTGAAG TGC ACTCAAT			
1561	ATTCCTCGAA	GGTCACACAT	TTCTTGTGAG	GAACCATCGC
	CAGGCGTCCT TGGAAATCTC-			
1621	GCCAATAACT	TTCCTTACTG	CTCAAACACT	CTTGATGGAC
	CTTGACAGT TTCTACTGTT			
1681	TTGTCATATC	TCTTCCCACC	AACATGATGG	CATGGAAGCT
	TATGTCAAAG TAGACAGCTG			
1741	TCCAGAGGAA	CCCCAACTAC	GAATGAAAAA	TAATGAAGAA
	GCGGAAGACT ATGATGATGA			
1801	TCTTACTGAT	TCTGAAATGG	ATGTGGTCAG	GTTTGATGAT
	GACAACTCTC CTTCCCTTTAT			
1861	CCAAATTCGC	TCAGTTGCCA	AGAAGCATCC	TAAAACTTGG
	GTACATTACA TTGCTGCTGA			
1921	AGAGGAGGAC	TGGGACTATG	CTCCCTTAGT	CCTCGCCCCC
	GATGACAGAA GTTATAAAAG			
1981	TCAATATTTG	AACAATGGCC	CTCAGCGGAT	TGGTAGGAAG
	TACAAAAAAG TCCGATTTAT			
2041	GGCATACACA	GATGAAACCT	TTAAGACTCG	TGAAGCTATT
	CAGCATGAAT CAGGAATCTT			
2101	GGGACCTTTA	CTTTATGGGG	AAGTTGGAGA	CACACTGTTG
	ATTATATTTA AGAATCAAGC			
2161	AAGCAGACCA	TATAACATCT	ACCCTCACGG	AATCACTGAT
	GTCCGTCCTT TGTATTCAAG			
2221	GAGATTACCA	AAAGGTGTAA	AACATTTGAA	GGATTTTCCA
	ATTCTGCCAG GAGAAATATT			
2281	CAAATATAAA	TGGACAGTGA	CTGTAGAAGA	TGGGCCAACT
	AAATCAGATC CTCGGTGCCT			
2341	GACCCGCTAT	TACTCTAGTT	TCGTTAATAT	GGAGAGAGAT
	CTAGCTTCAG GACTCATTGG			
2401	CCCTCTCCTC	ATCTGCTACA	AAGAATCTGT	AGATCAAAGA
	GGAAACCAGA TAATGTCAGA			
2461	CAAGAGGAAT	GTCATCCTGT	TTTCTGTATT	TGATGAGAAC
	CGAAGCTGGT ACCTCACAGA			
2521	GAATATACAA	CGCTTTCTCC	CCAATCCAGC	TGGAGTGCAG
	CTTGAGGATC CAGAGTTCCA			
2581	AGCCTCCAAC	ATCATGCACA	GCATCAATGG	CTATGTTTTT
	GATAGTTTGC AGTTGTCAGT			
2641	TTGTTTGCAT	GAGGTGGCAT	ACTGGTACAT	TCTAAGCATT
	GGAGCACAGA CTGACTTCCT			

2701	TTCTGTCTTC TTCTCTGGAT	ATACCTTCAA	ACACAAAATG
	GTCTATGAAG ACACACTCAC		
2761	CCTATTCCCA TTCTCAGGAG	AAACTGTCTT	CATGTGCGATG
	GAAAACCCAG GTCTATGGAT		
2821	TCTGGGGTGC CACAACCTCAG	ACTTTCGGAA	CAGAGGCATG
	ACCGCCTTAC TGAAGGTTTC		
2881	TAGTTGTGAC AAGAACACTG	GTGATTATTA	CGAGGACAGT
	TATGAAGATA TTTCAGCATA		
2941	CTTGCTGAGT AAAAACAATG	CCATTGAACC	AAGAAGCTTC
	TCCCAGAATT CAAGACACCC		
3001	TAGCACTAGG CAAAAGCAAT	TTAATGCCAC	CACAATTCCA
	GAAAATGACA TAGAGAAGAC		
3061	TGACCCTTGG TTTGCACACA	GAACACCTAT	GCCTAAAATA
	CAAAATGTCT CCTCTAGTGA		
3121	TTTGTTGATG CTCTTGCGAC	AGAGTCCTAC	TCCACATGGG
	CTATCCTTAT CTGATCTCCA		
3181	AGAAGCCAAA TATGAGACTT	TTTCTGATGA	TCCATCACCT
	GGAGCAATAG ACAGTAATAA		
3241	CAGCCTGTCT GAAATGACAC	ACTTCAGGCC	ACAGCTCCAT
	CACAGTGGGG ACATGGTATT		
3301	TACCCCTGAG TCAGGCCTCC	AATTAAGATT	AAATGAGAAA
	CTGGGGACAA CTGCAGCAAC		
3361	AGAGTTGAAG AAACCTTGATT	TCAAAGTTTC	TAGTACATCA
	AATAATCTGA TTTCAACAAT		
3421	TCCATCAGAC AATTTGGCAG	CAGGTACTGA	TAATACAAGT
	TCCTTAGGAC CCCCAAGTAT		
3481	GCCAGTTCAT TATGATAGTC	AATTAGATAC	CACTCTATTT
	GGCAAAAAGT CATCTCCCCT		
3541	TACTGAGTCT GGTGGACCTC	TGAGCTTGAG	TGAAGAAAAT
	AATGATTCAA AGTTGTTAGA		
3601	ATCAGGTTTA ATGAATAGCC	AAGAAAGTTC	ATGGGGAAAA
	AATGTATCGT CAACAGAGAG		
3661	TGGTAGGTTA TTAAAGGGA	AAAGAGCTCA	TGGACCTGCT
	TTGTTGACTA AAGATAATGC		
3721	CTTATTCAAA GTTAGCATCT	CTTTGTTAAA	GACAAACAAA
	ACTTCCAATA ATTCAGCAAC		
3781	TAATAGAAAG ACTCACATTG	ATGGCCCATC	ATTATTAATT
	GAGAATAGTC CATCAGTCTG		
3841	GCAAAATATA TTAGAAAGTG	ACACTGAGTT	TAAAAAAGTG
	ACACCTTTGA TTCATGACAG		

3901	AATGCTTATG	GACAAAAATG	CTACAGCTTT	GAGGCTAAAT
	CATATGTCAA	ATAAACTAC		
3961	TTCATCAAAA	AACATGGAAA	TGGTCCAACA	GAAAAAAGAG
	GGCCCCATTC	CACCAGATGC		
4021	ACAAAATCCA	GATATGTCGT	TCTTTAAGAT	GCTATTCTTG
	CCAGAATCAG	CAAGGTGGAT		
4081	ACAAAGGACT	CATGGAAAGA	ACTCTCTGAA	CTCTGGGCAA
	GGCCCCAGTC	CAAAGCAATT		
4141	AGTATCCTTA	GGACCAGAAA	AATCTGTGGA	AGGTCAGAAT
	TTCTTGTCTG	AGAAAAACAA		
4201	AGTGGTAGTA	GGAAAGGGTG	AATTTACAAA	GGACGTAGGA
	CTCAAAGAGA	TGGTTTTTCC		
4261	AAGCAGCAGA	AACCTATTTC	TTACTAACTT	GGATAATTTA
	CATGAAAATA	ATACACACAA		
4321	TCAAGAAAAA	AAAATTCAGG	AAGAAATAGA	AAAGAAGGAA
	ACATTAATCC	AAGAGAATGT		
4381	AGTTTTGCCT	CAGATACATA	CAGTGACTGG	CACTAAGAAT
	TTCATGAAGA	ACCTTTTCTT		
4441	ACTGAGCACT	AGGCAAAATG	TAGAAGGTTC	ATATGACGGG
	GCATATGCTC	CAGTACTTCA		
4501	AGATTTTAGG	TCATTAAATG	ATTCAACAAA	TAGAACAAAG
	AAACACACAG	CTCATTTCTC		
4561	AAAAAAGGG	GAGGAAGAAA	ACTTGGAAGG	CTTGGGAAAT
	CAAACCAAGC	AAATTGTAGA		
4621	GAAATATGCA	TGCACCACAA	GGATATCTCC	TAATACAAGC
	CAGCAGAATT	TTGTCACGCA		
4681	ACGTAGTAAG	AGAGCTTTGA	AACAATTCAG	ACTCCCACTA
	GAAGAAACAG	AACTTGAAAA		
4741	AAGGATAATT	GTGGATGACA	CCTCAACCCA	GTGGTCCAAA
	AACATGAAAC	ATTTGACCCC		
4801	GAGCACCTC	ACACAGATAG	ACTACAATGA	GAAGGAGAAA
	GGGGCCATTA	CTCAGTCTCC		
4861	CTTATCAGAT	TGCCTTACGA	GGAGTCATAG	CATCCCTCAA
	GCAAATAGAT	CTCCATTACC		
4921	CATTGCAAAG	GTATCATCAT	TTCCATCTAT	TAGACCTATA
	TATCTGACCA	GGGTCCTATT		
4981	CCAAGACAAC	TCTTCTCATC	TTCCAGCAGC	ATCTTATAGA
	AAGAAAGATT	CTGGGGTCCA		
5041	AGAAAGCAGT	CATTTCTTAC	AAGGAGCCAA	AAAAAATAAC
	CTTTCTTTAG	CCATTCTAAC		

5101	CTTGGAGATG	ACTGGTGATC	AAAGAGAGGT	TGGCTCCCTG
	GGGACAAGTG	CCACAAATTC		
5161	AGTCACATAC	AAGAAAGTTG	AGAACACTGT	TCTCCCGAAA
	CCAGACTTGC	CCAAAACATC		
5221	TGGCAAAGTT	GAATTGCTTC	CAAAAGTTCA	CATTTATCAG
	AAGGACCTAT	TCCCTACGGA		
5281	AACTAGCAAT	GGGTCTCCTG	GCCATCTGGA	TCTCGTGGA
	GGGAGCCTTC	TTCAGGGAAC		
5341	AGAGGGAGCG	ATTAAGTGGA	ATGAAGCAAA	CAGACCTGGA
	AAAGTTCCCT	TTCTGAGAGT		
5401	AGCAACAGAA	AGCTCTGCAA	AGACTCCCTC	CAAGCTATTG
	GATCCTCTTG	CTTGGGATAA		
5461	CCACTATGGT	ACTCAGATAC	CAAAAGAAGA	GTGGAAATCC
	CAAGAGAAGT	CACCAGAAAA		
5521	AACAGCTTTT	AAGAAAAAGG	ATACCATTTT	GTCCCTGAAC
	GCTTGTGAAA	GCAATCATGC		
5581	AATAGCAGCA	ATAAATGAGG	GACAAAATAA	GCCCGAAATA
	GAAGTCACCT	GGGCAAAGCA		
5641	AGGTAGGACT	GAAAGGCTGT	GCTCTCAAAA	CCCACCAGTC
	TTGAAACGCC	ATCAACGGGA		
5701	AATAACTCGT	ACTACTCTTC	AGTCAGATCA	AGAGGAAATT
	GACTATGATG	ATACCATATC		
5761	AGTTGAAATG	AAGAAGGAAG	ATTTTGACAT	TTATGATGAG
	GATGAAAATC	AGAGCCCCCG		
5821	CAGCTTTCAA	AAGAAAACAC	GACACTATTT	TATTGCTGCA
	GTGGAGAGGC	TCTGGGATTA		
5881	TGGGATGAGT	AGCTCCCCAC	ATGTTCTAAG	AAACAGGGCT
	CAGAGTGGCA	GTGTCCCTCA		
5941	GTTCAAGAAA	GTTGTTTTCC	AGGAATTTAC	TGATGGCTCC
	TTTACTCAGC	CCTTATACCG		
6001	TGGAGAACTA	AATGAACATT	TGGGACTCCT	GGGGCCATAT
	ATAAGAGCAG	AAGTTGAAGA		
6061	TAATATCATG	GTAACTTTCA	GAAATCAGGC	CTCTCGTCCC
	TATTCCTTCT	ATTCTAGCCT		
6121	TATTTCTTAT	GAGGAAGATC	AGAGGCAAGG	AGCAGAACCT
	AGAAAAAACT	TTGTCAAGCC		
6181	TAATGAAACC	AAAACTTACT	TTTGGAAAGT	GCAACATCAT
	ATGGCACCCA	CTAAAGATGA		
6241	GTTTGACTGC	AAAGCCTGGG	CTTATTTCTC	TGATGTTGAC
	CTGGAAAAAG	ATGTGCACTC		

6301	AGGCCTGATT GGACCCCTTC	TGGTCTGCCA	CACTAACACA
	CTGAACCCTG CTCATGGGAG		
6361	ACAAGTGACA GTACAGGAAT	TTGCTCTGTT	TTTCACCATC
	TTTGATGAGA CCAAAGCTG		
6421	GTACTIONACT GAAAATATGG	AAAGAAACTG	CAGGGCTCCC
	TGCAATATCC AGATGGAAGA		
6481	TCCCACTTTT AAAGAGAATT	ATCGCTTCCA	TGCAATCAAT
	GGCTACATAA TGGATACACT		
6541	ACCTGGCTTA GTAATGGCTC	AGGATCAAAG	GATTGATGG
	TATCTGCTCA GCATGGGCAG		
6601	CAATGAAAAC ATCCATTCTA	TTCATTTTCA	TGGACATGTG
	TTCATGTAC GAAAAAAGA		
6661	GGAGTATAAA ATGGCACTGT	ACAATCTCTA	TCCAGGTGTT
	TTTGAGACAG TGGAATGTT		
6721	ACCATCCAAA GCTGGAATTT	GGCGGGTGGA	ATGCCTTATT
	GGCGAGCATC TACATGCTGG		
6781	GATGAGCACA CTTTTTCTGG	TGTACAGCAA	TAAGTGTCAG
	ACTCCCCTGG GAATGGCTTC		
6841	TGGACACATT AGAGATTTTC	AGATTACAGC	TTCAGGACAA
	TATGGACAGT GGGCCCCAAA		
6901	GCTGGCCAGA CTTTATTATT	CCGGATCAAT	CAATGCCTGG
	AGCACCAAGG AGCCCTTTTC		
6961	TTGGATCAAG GTGGATCTGT	TGGCACCAAT	GATTATTCAC
	GGCATCAAGA CCCAGGGTGC		
7021	CCGTCAGAAG TTCTCCAGCC	TCTACATCTC	TCAGTTTATC
	ATCATGTATA GTCTTGATGG		
7081	GAAGAAGTGG CAGACTTATC	GAGGAAATTC	CACTGGAACC
	TTAATGGTCT TCTTTGGCAA		
7141	TGTGGATTCA TCTGGGATAA	AACACAATAT	TTTTAACCTT
	CCAATTATTG CTCGATACAT		
7201	CCGTTTGCAC CCAACTCATT	ATAGCATTCG	CAGCACTCTT
	CGCATGGAGT TGATGGGCTG		
7261	TGATTTAAAT AGTTGCAGCA	TGCCATTGGG	AATGGAGAGT
	AAAGCAATAT CAGATGCACA		
7321	GATTACTGCT TCATCCTACT	TTACCAATAT	GTTTGCCACC
	TGGTCTCCTT CAAAAGCTCG		
7381	ACTTCACCTC CAAGGGAGGA	GTAATGCCTG	GAGACCTCAG
	GTGAATAATC CAAAAGAGTG		
7441	GCTGCAAGTG GACTTCCAGA	AGACAATGAA	AGTCACAGGA
	GTAATACTC AGGGAGTAAA		

7501 ATCTCTGCTT ACCAGCATGT ATGTGAAGGA GTTCCTCATC
TCCAGCAGTC AAGATGGCCA
7561 TCAGTGGACT CTCTTTTTTC AGAATGGCAA AGTAAAGGTT
TTTCAGGGAA ATCAAGACTC
7621 CTTCACACCT GTGGTGAAC CTCTAGACCC ACCGTTACTG
ACTCGCTACC TTCGAATTCA
7681 CCCCCAGAGT TGGGTGCACC AGATTGCCCT GAGGATGGAG
GTTCTGGGCT GCGAGGCACA
7741 GGACCTCTAC **GACAAA**ACTC **ACACATGCCC** **ACCGTGCCCA**
GCTCCAGAAC TCCTGGGCGG
7801 **ACCGTCAGTC** **TTCCTCTTCC** **CCCCAAAACC** **CAAGGACACC**
CTCATGATCT CCCGGACCCC
7861 TGAGGTCACA TGC GTGGTGG TGGACGTGAG CCACGAAGAC
CCTGAGGTCA AGTTCAACTG
7921 GTACGTGGAC GCGGTGGAGG TGCATAATGC CAAGACAAAG
CCGCGGGAGG AGCAGTACAA
7981 CAGCACGTAC CGTGTGGTCA GCGTCCTCAC CGTCCTGCAC
CAGGACTGGC TGAATGGCAA
8041 GGAGTACAAG TGCAAGGTCT CCAACAAAGC CCTCCCAGCC
CCCATCGAGA AAACCATCTC
8101 CAAAGCCAAA GGGCAGCCCC GAGAACCACA GGTGTACACC
CTGCCCCCAT CCCGGGATGA
8161 GCTGACCAAG AACCAGGTCA GCCTGACCTG CCTGGTCAAA
GGCTTCTATC CCAGCGACAT
8221 CGCCGTGGAG TGGGAGAGCA ATGGGCAGCC GGAGAACAAC
TACAAGACCA CGCCTCCCGT
8281 GTTGGACTCC GACGGCTCCT TCTTCCTCTA CAGCAAGCTC
ACCGTGGACA AGAGCAGGTG
8341 GCAGCAGGGG AACGTCTTCT CATGCTCCGT GATGCATGAG
GCTCTGCACA ACCACTACAC
8401 GCAGAAGAGC CTCTCCCTGT CTCCGGGTAA A

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

Tabla 2: Secuencias de polipéptidos

A.Híbrido monomérico de FVIII-Fc con dominio B suprimido (dímero monómero FVIII-Fc BDD): creado por la coexpresión de FVIII-Fc BDD y cadenas de Fc.

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

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

MQIELSTCFFLCLLRFCFS

ATRRYILGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPFPRVPKSFNFNTSVVYKKTLEVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHAVGVSYWKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSILSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITFLTAQTLLMDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYVKVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNPSFSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQILNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTREAIQHESGILGPLLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLASGLIGPLLICYSVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWILTENIQRFLPNPAGVQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYTFKHKMYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSCDKNTGDYYEDSYEDISAILLSKNNIAIEPR*SFSQNPPVLKRHQR***EITRTTLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWDYGMSSSPHVLRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPYIRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEPKRFVKNPNETKTYFWKVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLLVCHTNTLNPAHGRQVTVQEFALFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIMDTLPLGLVMAQDQRRIRWILLMSGNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPGVFETVEMLPSKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQITASGQYQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIHGIKTQGARQKFSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFFNPPIIARYIRLHPHTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNMFATWSPSKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVTTQGVKSLTSMYVKEFLISSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRILRIHPQSWVHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL**N

GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

METDTLLLWVLLLWVPGSTG
DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS
NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

**B. Híbrido monomérico de FVIII_{FC} longitud completa (dímero
monómero deFVIII_{FC} longitud completa): creado por la coexpresión de
FVIII_{FC} y cadenas Fc.**

Constructo = fusión HC-B-LC-Fc. Un casete de expresión de Fcse
cotransfecta con FVIII-Fc de longitud completa para generar el monómero de
FVIII_{FC} de longitud completa.Para la cadena FVIII_{FC}, la secuencia de Fc se
muestra en negrita; la secuencia de HC se muestra con doble subrayado; la
secuencia del dominio B restante se muestra en itálica. Los péptidos señal están
subrayados.

i)cadena de FVIII_{FC} de longitud completa (péptido señal de FVIII subrayado
(SEQ ID NO:6)

MQIELSTCFFLCLLRFCFS
ATRRYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDARFPPRVPKSFPFNTSVVYKCTL
FVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVITLKNMASHPVSLHAVGVSY
WKASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASDPLCLTYSI
LSHVDLVKDLNSGLIGALLVCREGSLAKEKTQTLHKFILLFAVFDEGKSWHSETKN
SLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIGCHRKSVYWHVIGMGTTPEVH
SIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPITELTAQTLLMDLGQFLFCHISSHQHDGMEAYV
KVDSCPEEPQLRMKNNEEAEDYDDDLTDSEMDVVRFDDDNSPSFIQIRSVAKKH
PKTWVHYIAAEEEDWDYAPLV LAPDDRSYKSQILNNGPQRIGRKYKKVRFMAYT
DETFKTREAIQHESGILGPLYGEVGD TLLIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRR
LPKGVKHLKDFPILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPRCLTRYYSFVNMERDLAS
GLIGPLLCYKESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWILTENIQRFLPNPAGV
QLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSVCLHEVAYWYILSIGAQTDFLSVFFSGYT
FKHKMVYEDTLTLFPFSGETVFMSENPGLWILGCHNSDFRNRGMTALLKVSSC
DKNTGDYYEDSYEDISAILLSKNNAIEPSFSQNSRHPSTRQKQFNATTIPENDIEK

TDPWFAHRTMPKIQNVSSDLLMLLRQSPTPHGLSLSDLQEAKYETFSDDPSP
 GAIDSNNLSLSEMTHFRPQLHHS GDMVFTPE SGLQLRLNEKLGTTAATELKKLDFK
 VSSTSNNLISTIPSDNLAAGTDNTSSLGPPSMPVHYDSQLDTTLFGKKSSPLTESG
 GPLSLSEENND SKLLESGLMNSQESSWGKNVSSTESGRLFKGKRAHGPALLTKD
 NALFKVISISLLKTNKTSNNSATNRKTHIDGPSLLIENSPSVWQNILES DTEFKKVTP
 LIHDRMLMDKNATALRLNHMSNKTTSKNNMEMVQQKKEGPIPPDAQNPDM SFFK
 MLFLPESARWIQRTHGKNSLNSGQGPSPKQLVSLGPEKSV EQNFLSEKNKVVV
 GKGEFTKDVGLKEMVFPSSRNLF LTNLNLHENNTHNQEKKIQEEIEKKETLIQEN
 VVLPQIHVTGTKNFMKNLFLLSTRQNVESYDGAYAPVLQDFRSLNDSTNR TKK
 HTAHFSKKGEEENLEGLGNQTKQIVEKYACTTRISPNTSQQN FVTQRSKRALKQF
 RLPLEETELEKRIIVDDTSTQWSKNMKHLTPSTLTQIDYNEKEKGAITQSPLSDCLT
 RSHSIPQANRSPLPIAKVSSFPSIRPIILTRVLFQDNSSHLPAASYRKKDSGVQESS
 HFLQGAKKNL SLAILTLEMTGDQREVGS LGTSATNSVTYKKVENTVLPKPDLPK
 TSGKVELLPKVHIYQKDLFPTETSNGSPGHLDLVEGSLLQGTEGAIKWNEANRPG
 KVPFLRVATESSAKTPSKLLDPLAWDNHYGTQIPKEEWKSQEK SPEKTAFKKKDT
 ILSLNACESNHAIAAINEGQNKPEIEVTWAKQGRTERLCSQNPPVLKRHQREITRT
 TLQSDQEEIDYDDTISVEMKKEDFDIYDEDENQSPRSFQKKTRHYFIAAVERLWD
 YGMSSSPHVLNRNRAQSGSVPQFKKVVFQEFTDGSFTQPLYRGELNEHLGLLGPY
 IRAEVEDNIMVTFRNQASRPYSFYSSLISYEEDQRQGAEP RKNFVKPNETKTYFW
 KVQHHMAPTKDEFDCKAWAYFSDVDLEKDVHSGLIGPLL VCHTNTLNPAHGRQV
 TVQEFALFFTIFDETKSWYFTENMERNCRAPCNIQMEDPTFKENYRFHAINGYIM
 DTLPLGLVMAQDQRIRWILLMSGNENIHSIHFSGHVFTVRKKEEYKMALYNLYPG
 VFETVEMLP SKAGIWRVECLIGEHLHAGMSTLFLVYSNKCQTPLGMASGHIRDFQ
 ITASGQYGQWAPKLARLHYSGSINAWSTKEPFSWIKVDLLAPMIIHG IKTQGARQK
 FSSLYISQFIIMYSLDGKKWQTYRGNSTGTLMVFFGNVDSSGIKHNIFNPPIIARYIR
 LHPTHYSIRSTLRMELMGCDLNSCSMPLGMESKAISDAQITASSYFTNM FATWSP
 SKARLHLQGRSNAWRPQVNNPKEWLQVDFQKTMKVTGVT TQGVKSLLTSMYVK
 EFLISSSQDGHQWTLFFQNGKVVFQGNQDSFTPVVNSLDPPLLTRILRIHPQSW
 VHQIALRMEVLGCEAQDLYDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

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

METDTLLLWVLLLWVPGSTG

DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
 EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS

NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

Referencias citadas

4. Aledort L. *et al.*, *J Intern Med.*:236:391-399 (1994)
5. Petrini P. *et al.*, *Am J Pediatr Hematol Oncol.* 13:280-287 (1991).
6. Aznar J. *et al.*, *Haemophilia* 6(3):170-176 (2000).
7. Feldman B. *et al.*, *J Thromb Haemost.* 4:1228-1236 (2006).
8. Kreuz W. *et al.*, *Haemophilia* 4:413-417 (1998).
9. Liesner R. *et al.*, *B J Haem.* 92:973-978 (1996).
10. Ljung R., *Haemophilia*. 4(4):409-412 (1998).
11. Löfquist T, *et al.*, *J Intern Med* 241:395-400 (1997).
12. Nilsson I, *et al.*, *B. J Int Med* 232:25-32 (1992).
13. Risebrough N. *et al.*, *Haemophilia*. 14:743–752 (2008).
14. Van Den Berg H. *et al.*, *Haemophilia* 9 (Suppl. 1):27–31 (2003).
15. Van Den Berg H. *et al.*, *Haematologica* 89(6):645-650 (2004).
16. Molho P. *et al.*, *Haemophilia* 6(1):23-32 (2000).
17. Coppola A. *et al.*, *Blood Transfus.* 6(2): 4-11 (2008).
18. Geraghty S. *et al.*, *Haemophilia* 12:75-81 (2006).
19. Hacker M. *et al.*, *Haemophilia* 7(4):392-396 (2001).
20. Lillicrap D., *Current Opinion in Hematology* 17:393-397 (2010).
21. Dumont J.A. *et al.*, *BioDrugs* 20(3): 151-60 (2006).
22. Dumont J.A. *et al.*, "Monomeric Fc fusion technology: an approach to create long lasting clotting factors," in: Kontermann R., ed., *Therapeutic Proteins – Strategies to Modulate Half-Life*, Chapter 11, Wiley VCH publisher; in press.
23. Roopenian D.C. *et al.*, *Nat Rev Immunol.* 7(9):715-25 (Epub 2007 Aug 17).
24. Lencer W.I. and Blumberg R.S., *Trends Cell Biol.* 15(1):5-9 (2005).
25. Huang C., *Curr Opin Biotechnol.* 20(6):692-9. (Epub 2009 Nov 4).
26. Schmidt S.R., *Curr Opin Drug Discov Devel.* 12(2):284-295 (2009).
27. Dumont J. *et al.*, *Blood*. 116(21) Abstract 545 (2009).
28. Liu T. *et al.*, *J Thromb Haemost.* 9(S2):561 (2011).
29. Rosen S., *Scand J Haematol Suppl.* 33(Suppl 40):139-45 (1984).
30. Lee C.A. *et al.*, *Thromb Haemost.* 82(6):1644-7 (Dec. 1999).
31. Mikaelsson M. and Oswaldsson U., *Semin Thromb Hemost.* 28(3):257-64 (June 2002).
32. Stroobants A.K. *et al.*, *J Thromb Haemost.* 9 (Suppl 2) (2011).
33. Lenting P.J. *et al.*, *J Thromb Haemost.* 5: 1353–60 (2007).
34. Smith N.L. *et al.*, *Circulation* 121:1382-1392 (2010).

REIVINDICACIONES

1. Un método de administrar Factor VIII a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido quimérico que comprende una porción del Factor VIII y una segunda porción en un intervalo de dosis al menos aproximadamente una y medio veces más largo que el intervalo de dosis requerido para una dosis equivalente de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII, donde dicha porción del Factor VIII comprende el Factor VIII procesado, que tiene dos cadenas, una primera cadena que comprende una cadena pesada y una segunda cadena que comprende una cadena liviana, donde dicha primera cadena y dicha segunda cadena se asocian con un enlace metálico.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, donde al menos aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2, donde aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dicha porción del Factor VIII comprende el Factor VIII de cadena simple, que es una cadena simple.

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, donde dicho Factor VIII de cadena simple contiene un sitio de procesamiento intracelular intacto.

6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, donde dicho sitio de procesamiento intracelular corresponde a Arginina en el residuo 1648 del Factor VIII de longitud completa (residuo de Arginina 1667 de los aminoácidos 20-2351 de la SEQ ID NO: 6).

7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde al menos aproximadamente 1%, aproximadamente 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, o aproximadamente 25% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple.

8. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde aproximadamente 25% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 75% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde aproximadamente 20% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de

cadena simple y aproximadamente 80% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde aproximadamente 15% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 85% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde aproximadamente 10% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 90% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde aproximadamente 5% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 95% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 7, donde aproximadamente 1% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3-6, donde al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, o aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 30% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 70% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 60% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 50% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 50% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 60% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 70% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 30% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 80% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 20% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 85% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 15% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 90% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 10% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 95% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 5% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 1% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 14, donde aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple.

26. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-25, donde el polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII a un nivel comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que fusionan a una de las dos porciones de Fc, cuando la actividad de Factor VIII se mide in vitro por un ensayo cromogénico.

27. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-26, donde dicho polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc.

28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-27, donde dicho polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple

tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc.

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-28, donde dicho Factor VIII de cadena simple en el polipéptido quimérico está inactivado por la Proteína C activada a un nivel comparable con el Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

30. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-29, donde dicho Factor VIII de cadena simple del polipéptido quimérico tiene una tasa de interacción del Factor IXa comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

31. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4-30, donde dicho Factor VIII de cadena simple del polipéptido quimérico se une a un Factor de von Willebrand a un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

32. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-31, donde dicho polipéptido quimérico tiene una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

una capacidad para interactuar con vesículas de fosfolípidos comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

una capacidad para formar un complejo Xase que activa el Factor X comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

una capacidad para ser activada con alfa-trombina en cinco minutos comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII; y

una capacidad para interactuar con el Factor IXa comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII.

33. El método de acuerdo con la reivindicación 32, donde dicho polipéptido quimérico tiene una o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

forma un complejo de Xasa que activa el Factor X en un Km en aproximadamente uno, aproximadamente uno y medio, o aproximadamente dos desviaciones estándares de la Km de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII, donde Km se mide en función de la concentración del Factor X;

forma un complejo Xasa que activa el Factor X a una Vmax de aproximadamente una, aproximadamente una y medio, o aproximadamente dos

desviaciones estándares de la V_{max} de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII, donde V_{max} se mide en función de concentración del Factor X;

forma un complejo Xasa que activa el Factor X a una K_d de aproximadamente una, aproximadamente una y medio, o aproximadamente dos desviaciones estándares de la K_d de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII, donde K_d se mide en función de La concentración del Factor IXa; y

forma un complejo Xasa que activa el Factor X a una V_{max} de aproximadamente una, aproximadamente una y medio, o aproximadamente dos desviaciones estándares de la V_{max} de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII, donde V_{max} se mide en función de La concentración del Factor IXa.

34. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-33, donde dicha dosis tiene una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) mayor que 1,38 IU/dL por IU/kg.

35. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 34, donde dicha dosis tiene una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) de al menos aproximadamente 1,5, al menos aproximadamente 1,85, o al menos aproximadamente 2,46 IU/dL por IU/kg.

36. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-35, donde dicho polipéptido quimérico exhibe uno o más parámetros farmacocinéticos, en dichas poblaciones de pacientes o en dicho sujeto, seleccionado del grupo que consiste en:

una C_{max_OBS} en dicho sujeto administrado con 25 IU/kg del polipéptido quimérico es comparable a una C_{max_OBS} en un sujeto al que se administran 25 IU/kg de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide en un ensayo de una etapa (aPTT) y un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una C_{max_OBS} en dicho sujeto de aproximadamente 60,5 IU/dL que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max_OBS} en dicho sujeto de aproximadamente 53,1 – 69 IU/dL que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max_OBS} en dicho sujeto de aproximadamente 119 IU/dL que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una C_{max_OBS} en dicho sujeto de aproximadamente 103 – 136 IU/dL que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una $C_{\max_OBS}$ en dicho sujeto de aproximadamente 76,5 IU/dL que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una $C_{\max_OBS}$ en dicho sujeto de aproximadamente 64,9 – 90,1 IU/dL que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una $C_{\max_OBS}$ en dicho sujeto de aproximadamente 182 IU/dL que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una $C_{\max_OBS}$ en dicho sujeto de aproximadamente 146 – 227 IU/dL que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente $2,33 \pm 1,08$ mL/hora/kg o menos;

una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 1,8-2,69 mL/hora/kg;

una depuración media (CL) (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 65% de la depuración de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,22 - 5,19 mL/hora/kg;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto es 0,51, 0,52, 0,53, 0,54, 0,55, 0,56, 0,57, 0,58, 0,59, 0,60, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64, 0,65, 0,66, 0,67, 0,68, 0,69, o 0,70 veces menor que la depuración de un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,68 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,31 – 2,15 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 2,32 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,64 – 3,29 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,49 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,16 – 1,92 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,52 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una depuración (CL) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 1,05- 2,20 mL/hora/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

un tiempo de permanencia medio (MRT) (actividad) en dicha población de pacientes de al menos aproximadamente $26,3 \pm 8,33$ horas;

un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 25,9 - 26,5 horas;

un MRT medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,5 veces más largo que el MRT medio de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

un tiempo de permanencia medio (MRT) (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14 – 41,3 horas;

un MRT en dicho sujeto es al menos 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,14, o 1,90 veces mayor que el MRT en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 27 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 20,6 – 35,3 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 23,9 – 28,5 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 19,8 – 28,9 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un MRT (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 20,5 – 39,6 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un $t_{1/2\beta}$ medio (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente $18,3 \pm 5,79$ horas;

un t1/2beta medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 18 - 18,4 horas;

un t1/2beta medio (actividad) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 1,5 veces más largo que el t1/2beta medio de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 11 - 26,4 horas;

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto que es al menos 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, o 1,87 veces mayor que el t1/2beta (actividad) en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 18,8 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14,3 – 24,5 horas que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT);

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 16,7 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 13,8 – 20,1 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 19,8 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

un t1/2beta (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 14,3 – 27,5 horas que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de aproximadamente $2,01 \pm 0,44$ IU/dL por IU/kg;

una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes de aproximadamente 1,85 - 2,46 IU/dL por IU/kg;

una recuperación incremental media (valor K) (actividad; observada) en dicha población de pacientes que es aproximadamente 90% de la recuperación incremental media de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

una recuperación incremental (valor K) (actividad; observada) en dicho sujeto de aproximadamente 1,38 - 2,88 IU/dL por IU/kg;

una recuperación incremental en dicho sujeto que es comparable a la Recuperación incremental en un sujeto al que se administra un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,44 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,12 – 2,81 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 1,83 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 1,59 – 2,10 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 3,09 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,80 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,61-3,66 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico; y

una recuperación incremental en dicho sujeto de aproximadamente 2,24-3,50 IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss media (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente $55,1 \pm 12,3$ mL/kg;

una Vss media (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 45,3 - 56,1 mL/kg;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 37,7 - 79,4 mL/kg;

una Vss (actividad) en dicho sujeto que es comparable a la Vss (actividad) en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 45,5 mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 39,3 – 52,5 mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 62,8 mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 55,2 – 71,5 mL/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 35,9 mL/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 30,4-42,3 mL/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 43,4 mL/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una Vss (actividad) en dicho sujeto de aproximadamente 38,2-49,2 mL/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

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

una AUC/dosis media (actividad) en dicha población de pacientes de aproximadamente 44,8 - 57,6 IU*h/dL por IU/kg; y

una AUC/dosis en dicho sujeto de aproximadamente 19,2 - 81,7 IU*h/dL por IU/kg;

una AUC_{INF} en dicho sujeto que es al menos 1,45 1,46, 1,47, 1,48, 1,49, 1,50, 1,51, 1,52, 1,53, 1,54, 1,55, 1,56, 1,57, 1,58, 1,59, 1,60, 1,61, 1,62, 1,63, 1,64, 1,65, 1,66, 1,67, 1,68, 1,69, 1,70, 1,71, 1,72, 1,73, 1,74, 1,75, 1,76, 1,77, 1,78, 1,79, 1,80, 1,81, 1,82, 1,83, 1,84, 1,85, 1,86, 1,87, 1,88, 1,14, 1,90 veces mayor que la AUC_{INF} en un sujeto al que se administra la misma cantidad de un polipéptido que consiste en el Factor maduro de longitud completa cuando se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) o un ensayo de dos etapas (cromogénico);

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1440 ± 316 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1160 - 1880 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1480 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 2910 ± 1320 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1980 - 3970 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 2800 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de una etapa (aPTT) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1660 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 1300 - 2120 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 25 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 4280 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico;

una AUC_{INF} en dicho sujeto de aproximadamente 2960 - 6190 hr*IU/dL por IU/kg que se mide con un ensayo de dos etapas (cromogénico) cuando se administran aproximadamente 65 IU/kg del polipéptido quimérico.

37. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-36, donde la dosis terapéutica es aproximadamente 10 a aproximadamente 150, 100-110, 110-120, 120-130, 130-140, 140-150, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, o 150 IU/kg.

38. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-37, donde el intervalo de dosis es uno y medio a 5, uno y medio, 2, 3, 4, o 5 días o más.

39. Una composición que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, donde al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de dicho polipéptido comprende a porción del Factor VIII, que es el Factor VIII de cadena simple, y una segunda porción, donde dicho Factor VIII de cadena simple es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

40. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, donde dicho Factor VIII de cadena simple es idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

41. A composición que comprende un polipéptido quimérico que tiene actividad de Factor VIII, donde al menos aproximadamente 30%, aproximadamente 40%, aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 99%, o aproximadamente 100% de dicho polipéptido comprende a porción del Factor VIII, que es el Factor VIII de cadena simple, y una segunda porción, donde dicho Factor VIII de cadena simple es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

42. La composición de acuerdo con la reivindicación 41, donde dicho Factor VIII de cadena simple es idéntico a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

43. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-42, donde dicha segunda porción es una región Fc, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina o CTP (péptido C-terminal de 28 aminoácidos (CTP) de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquiera de sus combinaciones.

44. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 43, donde dicha segunda porción es una región de Fc.

45. La composición de acuerdo con la reivindicación 44, donde dicha Fc es al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6)

46. La composición de acuerdo con la reivindicación 45, donde dicha Fc es idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

47. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, donde dicho polipéptido comprende una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fcs que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se

muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

48. La composición de acuerdo con la reivindicación 39, donde dicho polipéptido comprende una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fcs que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

49. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-48, donde dicho polipéptido está en la forma de un híbrido que comprende a segundo polipéptido, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una Fc.

50. La composición de acuerdo con la reivindicación 49, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

51. La composición de acuerdo con la reivindicación 50, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

52. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-51, donde dicho polipéptido tiene una vida media de al menos uno y medio a seis veces más larga, uno y medio a cinco veces más larga, uno y medio a cuatro veces más larga, uno y medio a tres veces más larga, o uno y medio a dos veces más larga que un polipéptido que consiste en dicho Factor VIII.

53. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-52, que tiene una, aproximadamente una y medio, o aproximadamente dos o más características seleccionadas del grupo que consiste en:

una capacidad para interactuar con vesículas de fosfolípidos comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

una capacidad para formar un complejo de Xasa que activa el Factor X comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII;

una capacidad ser activada por alfa-trombina en cinco minutos comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII; y

una capacidad para interactuar con Factor IXa comparable a la capacidad de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII.

54. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-53, donde aproximadamente 70%, aproximadamente 60%, aproximadamente 50%, aproximadamente 40%, aproximadamente 30%, aproximadamente 20%, aproximadamente 10%, aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2%, o aproximadamente 1% de la porción del Factor VIII de dicho polipéptido es el Factor VIII procesado.

55. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-54, donde dicho polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene actividad de Factor VIII comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, donde dicho Factor VIII procesado se fusiona a una Fc de las dos porciones de Fc, cuando el Factor VIII se mide in vitro por un ensayo cromogénico.

56. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-57, donde dicho polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable al Factor VIII procesado.

57. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-58, donde dicho polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena simple tiene una tasa de generación de Factor Xa comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc.

58. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-57, donde dicho Factor VIII de cadena simple en el polipéptido quimérico tiene una tasa de interacción del Factor IXa comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

59. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-58, donde dicho Factor VIII de cadena simple en el polipéptido quimérico es inactivado por una Proteína C activada a un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

60. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-59, donde dicho Factor VIII de cadena simple en el polipéptido quimérico se une al Factor de von Willebrand a un nivel comparable al Factor VIII procesado en un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado.

61. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-60, donde dicho polipéptido quimérico que comprende el Factor VIII de cadena

simple tiene actividad de Factor VIII in vivo comparable a un polipéptido quimérico que consiste en dos porciones de Fc y el Factor VIII procesado, que se fusiona a una de las dos porciones de Fc.

62. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 30% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 70% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

63. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 60% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

64. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 50% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 50% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

65. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 60% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 40% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

66. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 70% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 30% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

67. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 80% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 20% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

68. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 90% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 10% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

69. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 95% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 5% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

70. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 99% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple y aproximadamente 5% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII procesado.

71. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-61, donde aproximadamente 100% de la porción del Factor VIII del polipéptido quimérico es el Factor VIII de cadena simple.

72. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-71, que es una composición farmacéutica que además comprende un excipiente.

73. Un método de tratar una afección de sangrado que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39-72.

74. El método de acuerdo con la reivindicación 73 donde dicho tratamiento es tratamiento profiláctico.

75. El método de acuerdo con la reivindicación 73, donde dicho tratamiento es tratamiento a demanda.

76. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 73-75, donde dicha afección de sangrado se selecciona del grupo que consiste en un trastorno de la coagulación con sangrado, hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma cerebral, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado en sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, y sangrado en la vaina de iliopsoas.

77. El método de acuerdo con la reivindicación 76, donde dicho trastorno de la coagulación con sangrado es hemofilia.

78. El método de acuerdo con la reivindicación 77, donde dicho trastorno de la coagulación con sangrado es hemofilia A.

79. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38 y 73 a 78, donde dicha administración mantiene un nivel mínimo de Factor VIII en al menos 90% de dicha población de pacientes a un nivel superior a 1%.

80. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38 y 73 a 78, donde dicha administración mantiene un nivel mínimo de Factor VIII en al menos 60% de dicha población de pacientes a un nivel superior a 3%.

81. Un método de mantener el Factor VIII en una población de pacientes a un nivel superior a 1% durante al menos un día, dos días, o tres días que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de rFVIIIIFc a dicha población, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es al menos 25 IU/kg de rFVIIIIFc y donde al menos 90% de dicha población mantiene el nivel mínimo del Factor VIII al menos 1% o más.

82. Un método de mantener Factor VIII en una población de paciente a un nivel superior a 3% durante al menos un día, dos días, tres días que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de rFVIIIIFc a dicha población, donde la cantidad terapéuticamente efectiva es al menos 65 IU/kg de rFVIIIIFc y

donde al menos 90% de dicha población mantiene el nivel mínimo del Factor VIII al menos 3% o más.

83. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 38 y 73 a 82, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645.

84. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 38 y 73 a 83, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648.

85. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 38 y 73 a 84, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en las posiciones de aminoácido correspondientes a Arginina 1645 y Arginina 1648 del Factor VIII de longitud completa.

86. El método de acuerdo con la reivindicación 85, donde 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.

87. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 83-86, donde una sustitución o mutación es un aminoácido diferente de arginina.

88. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 72, donde la FVII de cadena simple comprende un sitio de procesamiento intracelular intacto.

89. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 72, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 en el Factor VIII maduro de longitud completa.

90. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 72, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648 en el Factor VIII maduro de longitud completa.

91. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 39 a 72, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en las posiciones de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa.

92. La composición de acuerdo con la reivindicación 91, donde 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.

93. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 89 a 92, donde una sustitución o mutación es un aminoácido diferente de arginina.

94. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 73 a 82, donde el Factor VIII de cadena simple comprende un sitio de procesamiento intracelular intacto.

95. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 73 a 82, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 en el Factor VIII maduro de longitud completa.

96. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 73 a 82, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en una posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648 en el Factor VIII maduro de longitud completa.

97. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 73 a 82, donde el Factor VIII de cadena simple comprende una sustitución o mutación en las posiciones de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 y Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa.

98. El método de acuerdo con la reivindicación 97, donde el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1645 es un aminoácido diferente de el aminoácido sustituido en la posición de aminoácido correspondiente a Arginina 1648 en el Factor VIII de longitud completa.

99. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 95 a 98, donde una sustitución o mutación es un aminoácido diferente de arginina.

100. El método de acuerdo con la reivindicación 87 o 99, donde el residuo de aminoácido diferente de arginina se selecciona del grupo que consiste en isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina, o taurina.

101. La composición de acuerdo con la reivindicación 93, donde el residuo de aminoácido diferente a arginina se selecciona del grupo que consiste en isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano, valina, alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, selenocisteína, serina, tirosina, histidina, ornitina, pirrolisina, o taurina.

102. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 38, 73 a 87 o 94 a 100, donde dicho sujeto es un sujeto pediátrico.

103. Un método de prevenir, disminuir, o tratar un episodio de sangrado en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína del Factor VIII (FVIII) de acción prolongada, donde el sujeto expresa un nivel alto de Factor de von Willebrand (VWF) en plasma.

104. Un método de acuerdo con la reivindicación 103, donde se ha identificado que el sujeto expresa un alto nivel de VWF en plasma.

105. Un método de prevenir, disminuir, o tratar un episodio de sangrado en un sujeto que comprende:

(a) identifican un sujeto que tiene niveles altos de VWF por la medición del nivel de VWF en el plasma de dicho sujeto, donde un nivel de VWF de al menos aproximadamente 100 IU/dL identifica el sujeto que tiene un alto nivel de VWF; y

(b) administrar al sujeto una cantidad efectiva de una proteína de FVIII de acción prolongada.

106. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-105, donde el sujeto es un ser humano.

107. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-106, donde el sujeto es un sujeto pediátrico.

108. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-107, donde el sujeto tiene hemofilia A.

109. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-108, donde el alto nivel de VWF es al menos aproximadamente 100 IU/dL.

110. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-109, donde el alto nivel de VWF está entre aproximadamente 100 IU/dL y aproximadamente 200 IU/dL.

111. El método de acuerdo con la reivindicación 110, donde el alto nivel de VWF es aproximadamente 110 IU/dL, aproximadamente 120 IU/dL, aproximadamente 130 IU/dL, aproximadamente 140 IU/dL, aproximadamente 150 IU/dL, aproximadamente 160 IU/dL, aproximadamente 170 IU/dL, aproximadamente 180 IU/dL, aproximadamente 190 IU/dL, o aproximadamente 200 IU/dL.

112. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-111, donde el sujeto tiene el serotipo sanguíneo A, B, o AB.

113. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-112, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media en dicho sujeto entre aproximadamente 20 y aproximadamente 40 horas.

114. El método de acuerdo con la reivindicación 113, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media de aproximadamente 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas, 35 horas, 36 horas, 37 horas, 38 horas, 39 horas, o 40 horas.

115. El método de acuerdo con la reivindicación 114, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media de entre aproximadamente 20 y 27 horas.

116. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-115, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de dicha

proteína de FVIII de acción prolongada cuando se administró a un individuo que tiene niveles promedio de VWF.

117. El método de acuerdo con la reivindicación 116, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media que es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media de dicha proteína de FVIII de acción prolongada cuando se administra a un individuo que tienen niveles promedio de VWF.

118. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-117, donde la cantidad efectiva es al menos aproximadamente 20 IU/kg, al menos aproximadamente 25 IU/kg, al menos aproximadamente 30 IU/kg, al menos aproximadamente 35 IU/kg, al menos aproximadamente 40 IU/kg, al menos aproximadamente 45 IU/kg, al menos aproximadamente 50 IU/kg, al menos aproximadamente 55 IU/kg, al menos aproximadamente 60 IU/kg, al menos aproximadamente 65 IU/kg, al menos aproximadamente 70 IU/kg, al menos aproximadamente 75 IU/kg, al menos aproximadamente 80 IU/kg, al menos aproximadamente 85 IU/kg, o al menos aproximadamente 90 IU/kg.

119. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-118, donde la cantidad efectiva es al menos aproximadamente 65 IU/kg a al menos aproximadamente 90 IU/kg.

120. El método de acuerdo con la reivindicación 119, donde la cantidad efectiva es 80 IU/kg.

121. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-120, donde la proteína de FVIII de acción prolongada se administra cada 72 horas o más.

122. El método de acuerdo con la reivindicación 121, donde la proteína de FVIII de acción prolongada se administra aproximadamente una vez por semana o más.

123. El método de acuerdo con la reivindicación 121, donde la cantidad efectiva de la proteína de FVIII de acción prolongada se administra aproximadamente una vez cada 10 días, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 15 días, aproximadamente una vez cada 20 días, aproximadamente una vez cada tres semanas, aproximadamente una vez cada 25 días, aproximadamente una vez cada cuatro semanas, o aproximadamente una vez cada un mes.

124. El método de acuerdo con la reivindicación 121, donde el FVIII de acción prolongada se administra a una dosis de 80 IU/kg una vez cada 72 horas.

125. El método de acuerdo con la reivindicación 124, donde el sujeto es un sujeto pediátrico.

126. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-125, donde la administración resuelve más del 5-20%, más del 5-15%, más del 5-10%, más del 10-20%, o más del 10-15% de los episodios de sangrado.

127. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-126, donde un nivel mínimo del Factor VIII:C plasmático en los sujetos se mantiene por encima de 1-3 o 3-5 IU/dl.

128. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-127, donde la administración previene un episodio de sangrado en el sujeto.

129. El método de acuerdo con la reivindicación 128, donde el episodio de sangrado es espontáneo.

130. El método de acuerdo con la reivindicación 129, donde la administración resuelve más de 80-100%, más del 80-90%, más del 85-90%, más del 90-100%, más del 90-95%, o más del 95-100% de los episodios de sangrado.

131. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-130, donde la administración mantiene la homeostasis en la población de los sujetos que necesitan de una cirugía.

132. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-131, donde la proteína de FVIII de acción prolongada se administra antes de, durante o después de la cirugía.

133. El método de acuerdo con la reivindicación 132, donde la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

134. El método de acuerdo con las reivindicaciones 131-133, donde la cirugía es una cirugía de urgencia.

135. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-134, donde la proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media más largo que un polipéptido que consiste en FVIII.

136. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-135, donde la proteína de FVIII de acción prolongada está pegilada, hesilada, o polisialilada.

137. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-136, donde la proteína de FVIII de acción prolongada es una proteína quimérica que comprende una porción de FVIII y una segunda porción.

138. El método de acuerdo con la reivindicación 137, donde la segunda porción es una región de Fc, albúmina, una secuencia de PAS, transferrina o CTP (péptido de 28 aminoácidos C-terminal (CTP) de hCG con sus 4 O-glicanos), polietilenglicol (PEG), hidroxietilalmidón (HES), polipéptido de unión a albúmina, moléculas pequeñas de unión a albúmina, o cualquiera de sus combinaciones.

139. El método de acuerdo con las reivindicaciones 137 o 138, donde la segunda porción se fusiona al extremo amino-terminal o carboxi-terminal de la porción de FVIII.

140. El método de acuerdo con las reivindicaciones 137 o 138, donde la segunda porción se inserta entre dos aminoácidos de la porción de FVIII.

141. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 137-140, donde la proteína quimérica es un híbrido de monómero y dímero de FVIII-Fc.

142. El método de acuerdo con la reivindicación 141, donde la porción de FVIII es una cadena simple.

143. El método de acuerdo con la reivindicación 142, donde la porción de FVIII comprende una cadena pesada y una cadena liviana.

144. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 137-143, donde la porción de FVIII comprende el Factor VIII de longitud completa, factor VIII maduro, o factor VIII con una supresión completa o parcial del dominio B.

145. El método de acuerdo con la reivindicación 141, donde la porción de FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6.

146. El método de acuerdo con la reivindicación 145, donde la porción de FVIII comprende aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6.

147. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 137-146, donde la segunda porción del polipéptido quimérico comprende una región de Fc que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6.

148. El método de acuerdo con la reivindicación 147, donde la segunda porción comprende los aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6.

149. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 103-148, donde el polipéptido de FVIII de acción prolongada se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

150. Un método de tratar un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado, que comprende medir la vida media de FVIII-Fc en dicho sujeto, donde una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc en un sujeto normal indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado, y administración de un polipéptido de FVIII-Fc en una cantidad efectiva y en un intervalo de dosis de al menos 3 días.

151. Un método de tratar un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado, que comprende administrar un polipéptido de FVIII-Fc en una cantidad efectiva y en un intervalo de dosis de al menos 3 días a un sujeto, donde la vida media de FVIII-Fc en dicho sujeto es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

152. El método de acuerdo con las reivindicaciones 150 o 151, donde la vida media plasmática del FVIII-Fc en dicho sujeto es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media plasmática de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

153. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-152, donde dicha vida media plasmática de FVIII-Fc está entre 20-40 horas.

154. El método de acuerdo con la reivindicación 153, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media de aproximadamente 21 horas, 22 horas, 23 horas, 24 horas, 25 horas, 26 horas, 27 horas, 28 horas, 29 horas, 30 horas, 31 horas, 31 horas, 32 horas, 33 horas, 34 horas, 35 horas, 36 horas, 37 horas, 38 horas, 39 horas, o 40 horas.

155. El método de acuerdo con la reivindicación 154, donde dicha proteína de FVIII de acción prolongada tiene una vida media de entre aproximadamente 20 y 27 horas.

156. Un método de tratar un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado, que comprende medir la vida media de un FVIII de acción corta administrada a dicho sujeto, donde una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor de la vida media de dicho FVIII de acción corta en un sujeto que tiene niveles promedio de VWF indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado y administración de un polipéptido de FVIII-Fc de acción prolongada de una cantidad efectiva y en un intervalo de dosis de al menos 3 días.

157. El método de acuerdo con la reivindicación 156, donde la vida media del FVIII de acción corta en dicho sujeto es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media de un FVIII de acción corta cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

158. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-157, donde el sujeto es un ser humano.

159. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-158, donde el sujeto es un sujeto pediátrico.

160. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-159, donde el sujeto tiene hemofilia A.

161. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-160, donde el sujeto tiene el serotipo sanguíneo A, B, o AB.

162. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-161, donde el FVIII de acción prolongada-Fc se administra en una cantidad efectiva que es al menos aproximadamente 20 IU/kg, al menos aproximadamente 25 IU/kg, al menos aproximadamente 30 IU/kg, al menos aproximadamente 35 IU/kg, al menos aproximadamente 40 IU/kg, al menos aproximadamente 45 IU/kg, al menos aproximadamente 50 IU/kg, al menos aproximadamente 55 IU/kg, al menos aproximadamente 60 IU/kg, al menos aproximadamente 65 IU/kg, al menos aproximadamente 70 IU/kg, al menos aproximadamente 75 IU/kg, al menos aproximadamente 80 IU/kg, al menos aproximadamente 85 IU/kg, o al menos aproximadamente 90 IU/kg.

163. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-161, donde la cantidad efectiva es al menos aproximadamente 65 IU/kg a al menos aproximadamente 90 IU/kg.

164. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-163, donde la cantidad efectiva de la proteína de FVIII-Fc se administra aproximadamente una vez cada semana, aproximadamente una vez cada 10 días, aproximadamente una vez cada dos semanas, aproximadamente una vez cada 15 días, aproximadamente una vez cada 20 días, aproximadamente una vez cada tres semanas, aproximadamente una vez cada 25 días, aproximadamente una vez cada cuatro semanas, o aproximadamente una vez cada mes.

165. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-164, donde la administración resuelve más del 5-20%, más del 5-15%, más del 5-10%, más del 10-20%, o más del 10-15% de los episodios de sangrado.

166. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-165, donde un nivel mínimo de Factor VIII:C plasmático en los sujetos se mantiene por encima de 1-3 o 3-5 IU/dl.

167. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-166, donde la administración evita un episodio de sangrado en el sujeto.

168. El método de acuerdo con la reivindicación 167, donde el episodio de sangrado es espontáneo.

169. El método de acuerdo con la reivindicación 167, donde la administración resuelve más del 80-100%, más del 80-90%, más del 85-90%, más del 90-100%, más del 90-95%, o más del 95-100% de los episodios de sangrado.

170. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-169, donde la administración mantiene la homeostasis en la población de los sujetos que necesitan cirugía.

171. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-170, donde la proteína de FVIII-Fc se administra antes, durante o después de la cirugía.

172. El método de acuerdo con las reivindicaciones 170 o 171, donde la cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

173. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 170-172, donde la cirugía es una cirugía de urgencia.

174. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-173, donde la proteína de FVIII-Fc tiene una vida media más largo que un polipéptido que consiste en FVIII.

175. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-174, donde la proteína de FVIII-Fc está pegilada, hesilada, o polisialilada.

176. El método de acuerdo con las reivindicaciones 174 o 175, donde la proteína de FVIII-Fc es un híbrido de monómero y dímero de FVIII-Fc.

177. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 172-176, donde la porción de FVIII es una cadena simple.

178. El método de acuerdo con la reivindicación 177, donde la porción de FVIII comprende una cadena pesada y una cadena liviana.

179. El método de cualquiera de 174-178, donde la porción de FVIII comprende el Factor VIII de longitud completa, factor VIII maduro, o factor VIII con una supresión completa o parcial del dominio B.

180. El método de acuerdo con la reivindicación 179, donde la porción de FVIII comprende una secuencia de aminoácidos al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a los aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6.

181. El método de acuerdo con la reivindicación 180, donde la porción de FVIII comprende los aminoácidos 1 a 1438 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 1 a 2332 de la SEQ ID NO: 6.

182. El método de 174-181, donde la segunda porción del polipéptido quimérico comprende una región de Fc que es al menos 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, o 100% idéntica a aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6.

183. El método de acuerdo con la reivindicación 182, donde la segunda porción comprende aminoácidos 1439 a 1665 de la SEQ ID NO: 2 o aminoácidos 2333 a 2559 de la SEQ ID NO: 6.

184. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 150-183, donde el polipéptido de FVIII-Fc se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

185. Un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la dosificación a de intervalo prolongado con un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir los niveles de expresión del VWF plasmático, donde un nivel de expresión de VWF de al menos 100 IU/dL indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado mediante un polipéptido de FVIII de acción prolongada.

186. El método de acuerdo con la reivindicación 185, donde dicho nivel de expresión de VWF es al menos aproximadamente 110 IU/dL, aproximadamente 120 IU/dL, aproximadamente 130 IU/dL, aproximadamente 140 IU/dL, aproximadamente 150 IU/dL, aproximadamente 160 IU/dL, aproximadamente 170 IU/dL, aproximadamente 180 IU/dL, aproximadamente 190 IU/dL, o aproximadamente 200 IU/dL.

187. Un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado de un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir la vida media de FVIII-Fc en dicho sujeto, donde una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra que a un sujeto que tiene niveles de VWF promedio indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado.

188. El método de acuerdo con la reivindicación 187, donde la vida media de FVIII-Fc es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

189. Un método para determinar si un sujeto diagnosticado con trastorno de sangrado es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado de un polipéptido de FVIII de acción prolongada, que comprende medir la vida media de FVIII de acción corta en dicho sujeto, donde una vida media que es al menos aproximadamente 1,2 veces mayor que la vida media de FVIII de acción corta cuando se administra a un sujeto que tiene un nivel de VWF promedio indica que el sujeto es un candidato para la dosificación de intervalo prolongado.

190. El método de acuerdo con la reivindicación 189, donde la vida media es al menos aproximadamente 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, o 2,5 veces mayor que la vida media de FVIII-Fc cuando se administra a un sujeto que tiene niveles promedio de VWF.

191. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-190, donde dicho polipéptido quimérico comprende una porción de Fc.

192. El método de acuerdo con la reivindicación 191, donde dicho intervalo de dosificación es al menos aproximadamente uno y medio a seis veces más prolongado, uno y medio a cinco veces más prolongado, uno y medio a cuatro veces más prolongado, uno y medio a tres veces más prolongado, o uno y medio a dos veces más prolongado, que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII.

193. El método de acuerdo con la reivindicación 192, donde dicho intervalo de dosificación es al menos aproximadamente uno y medio, dos, dos y medio, tres, tres y medio, cuatro, cuatro y medio, cinco, cinco y medio o seis veces más prolongado que el intervalo de dosificación requerido para una dosis equivalente de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII.

194. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-193, donde dicho intervalo de dosificación de dicho polipéptido quimérico es aproximadamente cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece o catorce días o más.

195. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-194, donde dicho sujeto necesita tratamiento profiláctico.

196. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-193, donde dicho sujeto necesita tratamiento a demanda.

197. El método de acuerdo con la reivindicación 196, donde dicho sujeto necesita tratamiento para un episodio de hemorragia.

198. El método de acuerdo con la reivindicación 197, donde dicho sujeto necesita tratamiento para hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma cerebral, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado en sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, y sangrado en la vaina de iliopsoas.

199. El método de acuerdo con la reivindicación 196, donde dicho sujeto necesita profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio o tratamiento para cirugía.

200. El método de acuerdo con la reivindicación 199, donde dicha cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

201. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 196-200, donde dicho intervalo de dosificación de dicho polipéptido quimérico 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.

202. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-201, donde dicha dosis terapéutica es 10-100 IU/kg.

203. El método de acuerdo con la reivindicación 201, donde dicha dosis terapéutica es 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 IU/kg.

204. El método de acuerdo con la reivindicación 202, donde dicha dosis terapéutica es 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 IU/kg.

205. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-204, donde dicho Factor VII es el Factor VIII humano.

206. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-205, donde dicho Factor VIII tiene una supresión total o parcial del dominio B.

207. El método de acuerdo con la reivindicación 205, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2; aminoácidos 20 to 2351 de la SEQ ID NO:6).

208. El método de acuerdo con la reivindicación 207, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

209. El método de acuerdo con la reivindicación 205, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

210. El método de acuerdo con la reivindicación 209, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

211. El método de acuerdo con la reivindicación 205 o 206, donde dicha segunda porción de dicho polipéptido quimérico es al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2; o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

212. El método de acuerdo con la reivindicación 211, donde dicha segunda porción de dicho polipéptido quimérico es idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

213. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-212, donde dicho polipéptido quimérico está en la forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido en asociación con dicho polipéptido quimérico, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una Fc.

214. El método de acuerdo con la reivindicación 213, donde dicho polipéptido quimérico comprende una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

215. El método de acuerdo con la reivindicación 214, donde dicho polipéptido quimérico comprende una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

216. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 213-215, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

217. El método de acuerdo con la reivindicación 216, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

218. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-217, donde dicho polipéptido quimérico se administra como parte una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

219. Un método de administrar el Factor VIII a un sujeto humano que lo necesita, que comprende administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido quimérico que comprende una porción del Factor VIII y una segunda

porción para obtener área bajo la curva de concentración de plasma versus tiempo (AUC) al menos aproximadamente una y un cuarto veces más que la AUC obtenida por una dosis equivalente de un polipéptido que consiste en dicha porción del Factor VIII.

220. El método de acuerdo con la reivindicación 219, donde dicho polipéptido quimérico se administra a un intervalo de dosificación de aproximadamente cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, o catorce días o más.

221. El método de acuerdo con la reivindicación 219 o 220, donde dicho sujeto necesita tratamiento profiláctico.

222. El método de acuerdo con la reivindicación 219 o 220, donde dicho sujeto necesita tratamiento a demanda.

223. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-222, donde dicho sujeto necesita tratamiento para un episodio de hemorragia.

224. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 219-222, donde dicho sujeto necesita tratamiento para hemartrosis, sangrado muscular, sangrado oral, hemorragia, hemorragia en los músculos, hemorragia oral, trauma, trauma cerebral, sangrado gastrointestinal, hemorragia intracraneana, hemorragia intra-abdominal, hemorragia intratorácica, fractura ósea, sangrado en sistema nervioso central, sangrado en el espacio retrofaríngeo, sangrado en el espacio retroperitoneal, y sangrado en la vaina de iliopsoas.

225. El método de acuerdo con la reivindicación 222, donde dicho sujeto necesita profilaxis quirúrgica, manejo perioperatorio o tratamiento para cirugía.

226. El método de acuerdo con la reivindicación 225, donde dicha cirugía es cirugía menor, cirugía mayor, extracción dental, amigdalectomía, herniotomía inguinal, sinovectomía, reemplazo de rodilla total, craniotomía, osteosíntesis, cirugía traumatológica, cirugía intracraneana, cirugía intraabdominal, cirugía intratorácica, o cirugía de reemplazo articular.

227. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-226, donde dicho intervalo de dosificación de dicho polipéptido quimérico 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.

228. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-227, donde dicha dosis terapéutica es 10-100 IU/kg.

229. El método de acuerdo con la reivindicación 228, donde dicha dosis terapéutica es 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 IU/kg.

230. El método de acuerdo con la reivindicación 229, donde dicha dosis terapéutica es 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 IU/kg.

231. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-230, donde dicho Factor VIII es el Factor VIII humano.

232. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-231, donde dicho Factor VIII has a supresión total o parcial del dominio B.

233. El método de acuerdo con la reivindicación 231, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

234. El método de acuerdo con la reivindicación 233, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

235. El método de acuerdo con la reivindicación 231, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

236. El método de acuerdo con la reivindicación 235, donde la porción del Factor VIII de dicho polipéptido quimérico es idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

237. El método de acuerdo con la reivindicación 231 o 232, donde dicha segunda porción de dicho polipéptido quimérico es al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 to 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

238. El método de acuerdo con la reivindicación 237, donde dicha segunda porción de dicho polipéptido quimérico es idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2; aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

239. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-238, donde dicho polipéptido quimérico está en la forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido en asociación con dicho polipéptido quimérico, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una Fc.

240. El método de acuerdo con la reivindicación 239, donde dicho polipéptido quimérico comprende una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

241. El método de acuerdo con la reivindicación 240, donde dicho polipéptido quimérico comprende una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

242. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 239-241, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

243. El método de acuerdo con la reivindicación 242, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

244. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 219-243, donde dicho polipéptido quimérico se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

245. Un método de administrar el Factor VIII a un sujeto humano que lo necesita, que comprende

administrar al sujeto una dosis terapéutica de un polipéptido que comprende un Factor VIII y un Fc en un intervalo de dosificación de aproximadamente cada tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, o catorce o más.

246. El método de acuerdo con la reivindicación 245, donde dicho sujeto necesita tratamiento profiláctico.

247. El método de acuerdo con la reivindicación 245 o 246, donde dicha dosis terapéutica es 10-100 IU/kg.

248. El método de acuerdo con la reivindicación 247, donde dicha dosis terapéutica es 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-70, 70-80, 80-90, o 90-100 IU/kg.

249. El método de acuerdo con la reivindicación 248, donde dicha dosis terapéutica es 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o 100 IU/kg.

250. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 245-249, donde dicho Factor VIII es el Factor VIII humano.

251. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 245-250, donde dicho Factor VIII has a supresión total o parcial del dominio B.

252. El método de acuerdo con la reivindicación 250, donde dicho Factor VIII es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

253. El método de acuerdo con la reivindicación 252, donde dicho Factor VIII es idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 20 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

254. El método de acuerdo con la reivindicación 250, donde dicho Factor VIII es al menos 90% o 95% idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

255. El método de acuerdo con la reivindicación 254, donde dicho Factor VIII es idéntica a una secuencia de aminoácidos del Factor VIII que se muestra en la Tabla 2 con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1457 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 1 a 2351 de la SEQ ID NO:6).

256. El método de acuerdo con la reivindicación 250 o 251, donde dicha segunda porción es al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

257. El método de acuerdo con la reivindicación 256, donde dicha segunda porción es idéntica a la secuencia de aminoácidos de Fc que se muestra en la Tabla 2 (aminoácidos 1458 a 1684 de la SEQ ID NO:2 o aminoácidos 2352 a 2578 de la SEQ ID NO:6).

258. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 245-257, donde dicho polipéptido quimérico es un polipéptido quimérico de Factor VIII-Fc que está en la forma de un híbrido que comprende un segundo polipéptido en asociación con dicho polipéptido quimérico, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una Fc.

259. El método de acuerdo con la reivindicación 258, donde dicho polipéptido quimérico comprende una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

260. El método de acuerdo con la reivindicación 259, donde dicho polipéptido quimérico comprende una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) sin una secuencia señal (aminoácidos 20 a 1684 de la SEQ ID NO:2) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos del Factor VIII y Fc que se muestra en la Tabla 2A(i) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 1684 de la SEQ ID NO:2).

261. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 258-260, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

262. El método de acuerdo con la reivindicación 261, donde dicho segundo polipéptido consiste esencialmente en una secuencia idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2a (ii) sin una secuencia señal (aminoácidos 21 a 247 de la SEQ ID NO:4) o al menos 90% o 95% idéntica a la secuencia de aminoácidos que se muestra en la Tabla 2A(ii) con una secuencia señal (aminoácidos 1 a 247 de la SEQ ID NO:4).

263. El método de acuerdo con cualquiera de la reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-262, donde dicho polipéptido se administra como parte de una composición farmacéutica que comprende al menos un excipiente.

264. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-38, 73-87, 94-100, y 102-263, donde dicho polipéptido quimérico tiene actividad del Factor VIII.

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) No. de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 38/37	
(22) Fecha de solicitud: 21-01-13		(71) Solicitante(s): BIOGEN IDEC HEMOPHILIA, INC.	
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	61/506,015	08-07-11	US
	61/522,647	11-08-11	US
	61/541,561	30-09-11	US
	61/569,158	09-12-11	US
	61/586,443	13-01-12	US
	61/622,789	11-04-12	US
	61/657,641	08-06-12	US
		(72) Inventor(es): DUMONT, Jennifer A.; LOW, Susan; BITONTI, Alan, J.; PIERCE, Glenn; LUK, Alvin; JIANG, Haiyan; MCKINNEY, Byron; OTTMER, Matt; SOMMER, Jurg; NUGENT, Karen; LI, Lian y PETERS, Robert.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
(85)	Fecha límite inicio fase nacional: 08-02-14		(87) Publicación internacional
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 17-01-13
	Fecha de presentación de la solicitud: 06-07-12		No. publicación: WO 2013/009627 A3
	No. de solicitud: PCT/US2012/045784		
(54) Título: “POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS DEL FACTOR VIII, Y SUS MÉTODOS DE USO”			

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención proporciona métodos de administrar el Factor VIII (FVII procesado, FVII de cadena simple, o una combinación de ellos); métodos de administrar Factor VIII que comprende polipéptidos quiméricos e híbridos; Factor VIII que comprende polipéptidos quiméricos e híbridos; polinucleótidos que codifican tales polipéptidos quiméricos e híbridos; células que comprenden tales polinucleótidos; y métodos de producir tales polipéptidos quiméricos e híbridos que usan tales células.

Sector: Industria farmacéutica, composiciones y métodos para la administración de polipéptidos quiméricos e híbridos del factor VIII, útil en el tratamiento de la hemofilia A.

Figura 1

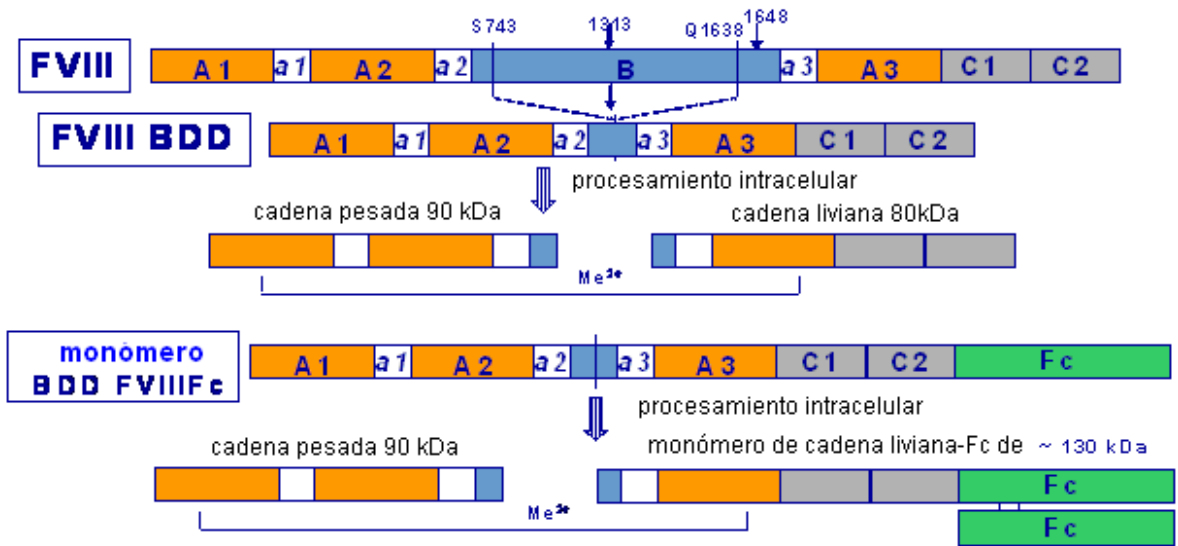
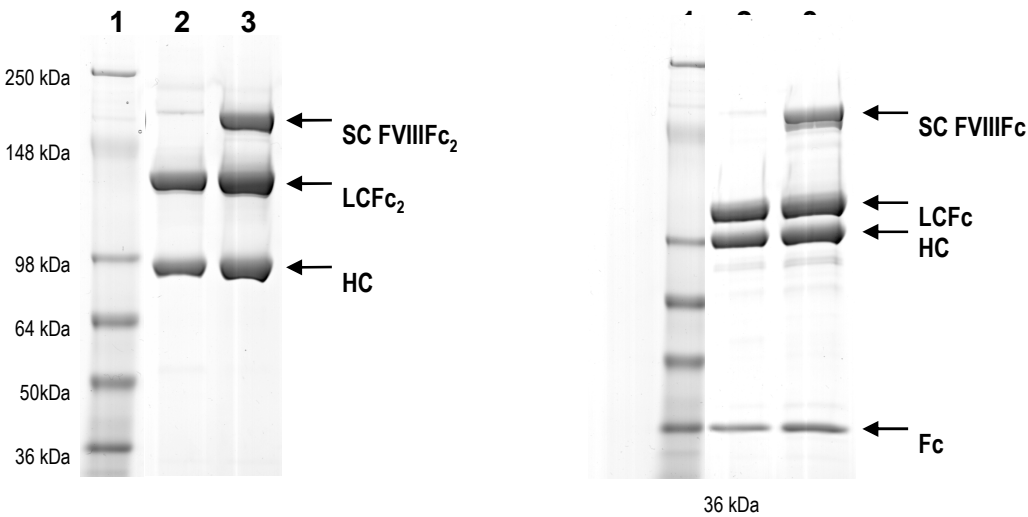


Figura 2

A

B



- 1. Ver marcador Blue MW r
- 2. rFVIIIIFc/PC5
- 3. rFVIIIIFc

Fig. 2C

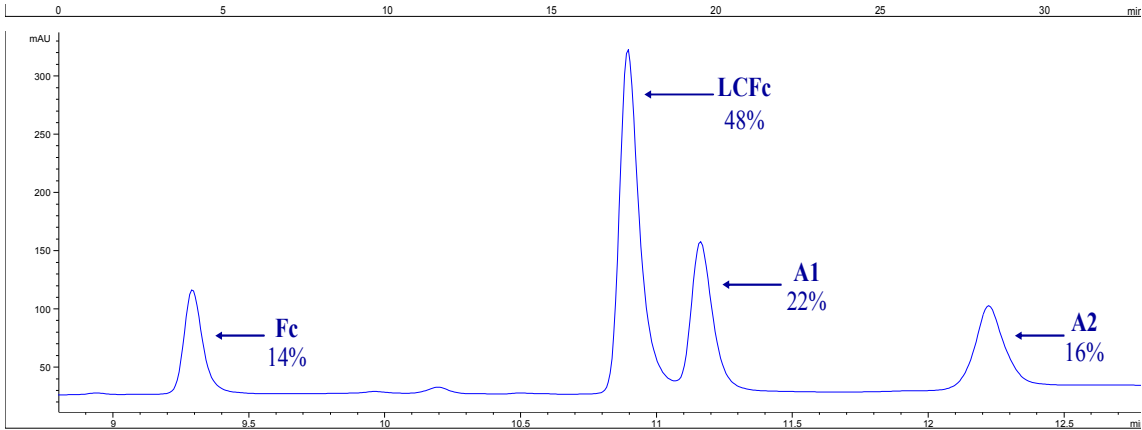


Figura. 2D

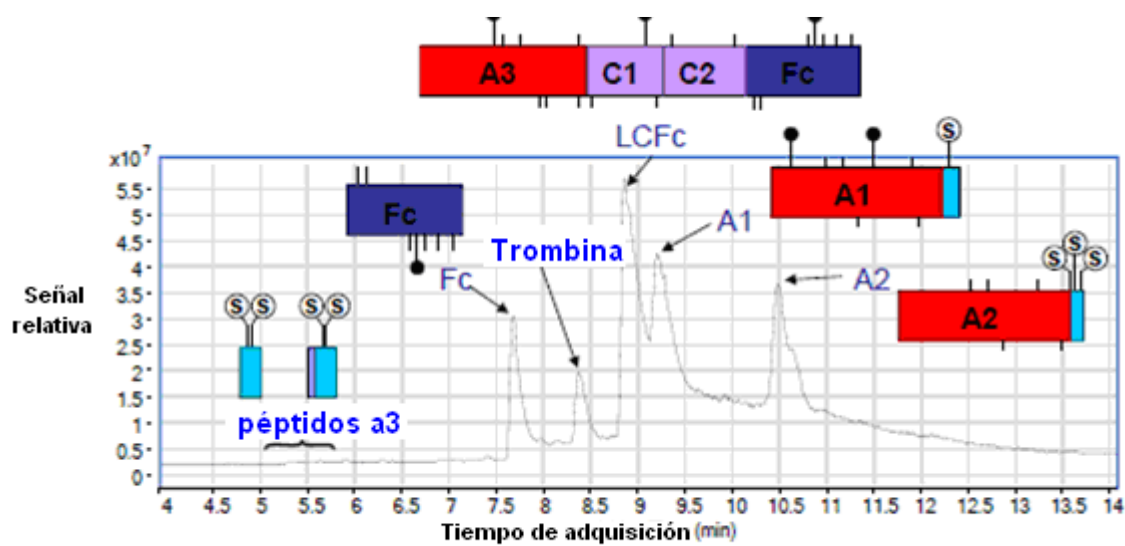


Fig. 2E

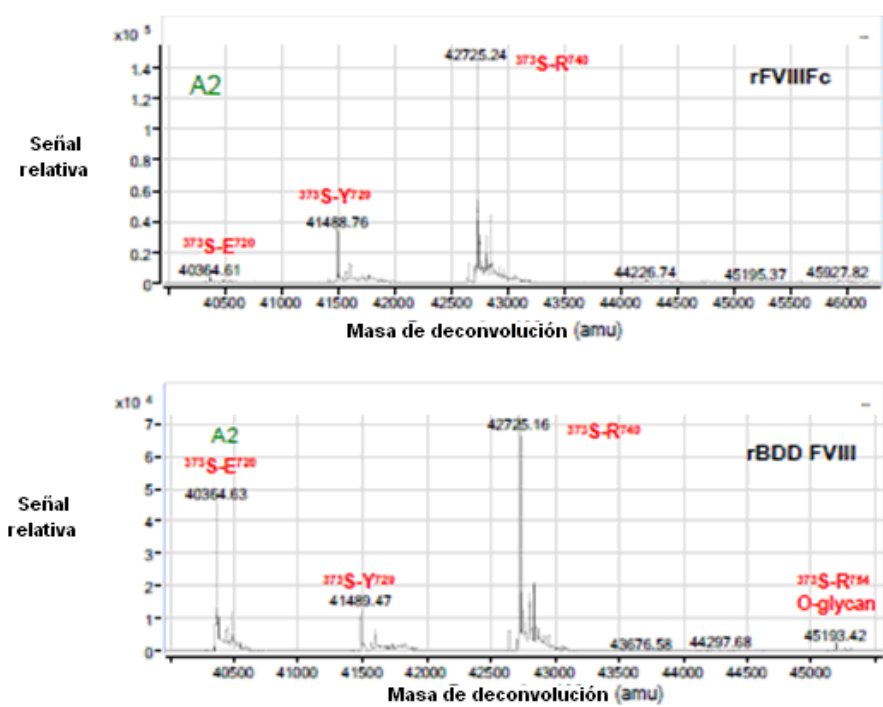
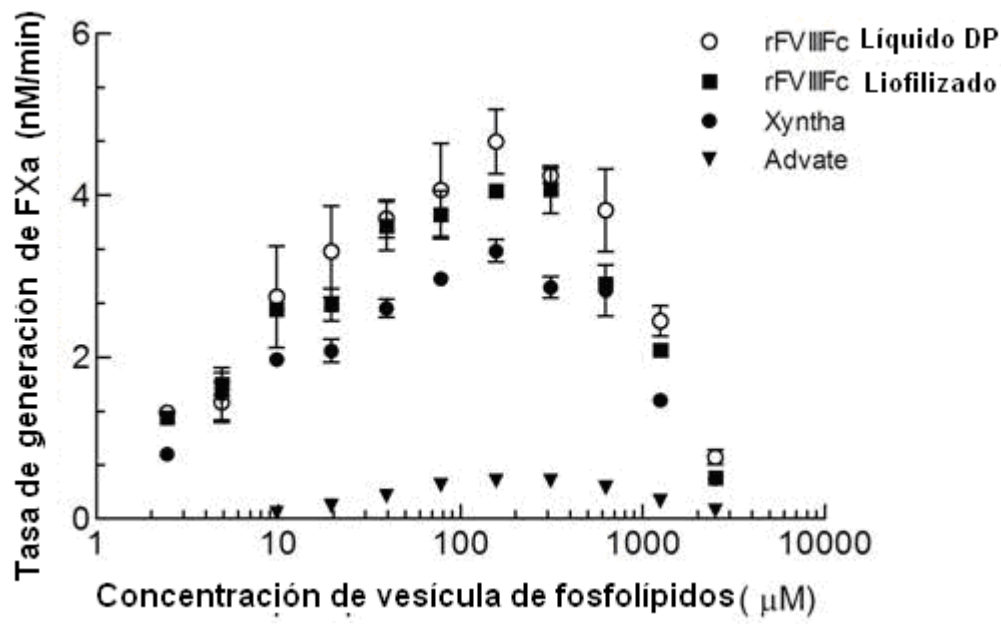
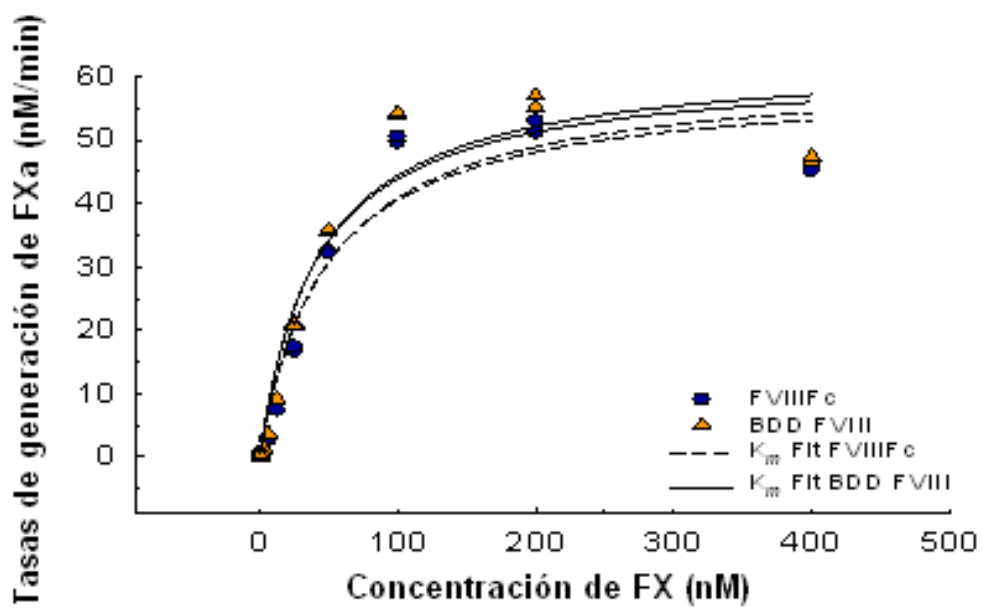


Figura 3

A.



3 B.



3C

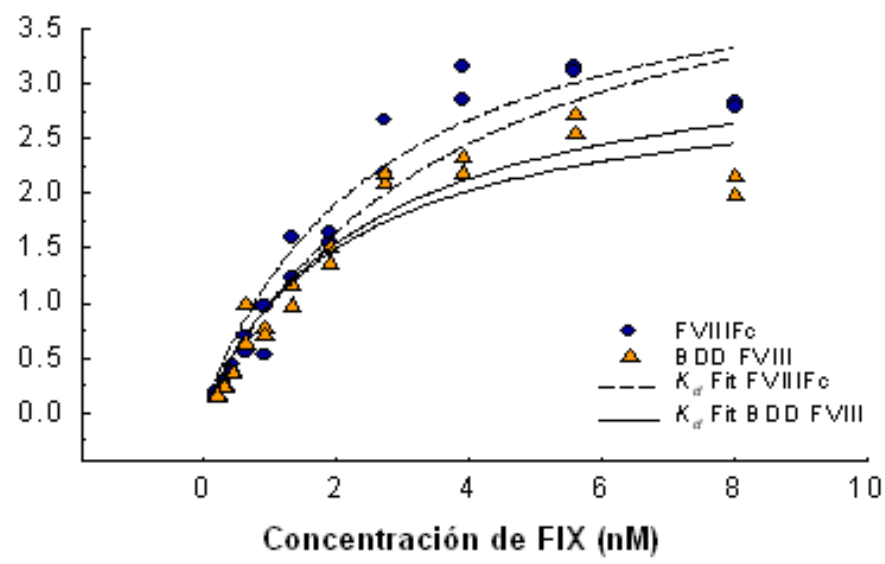


Figura 4

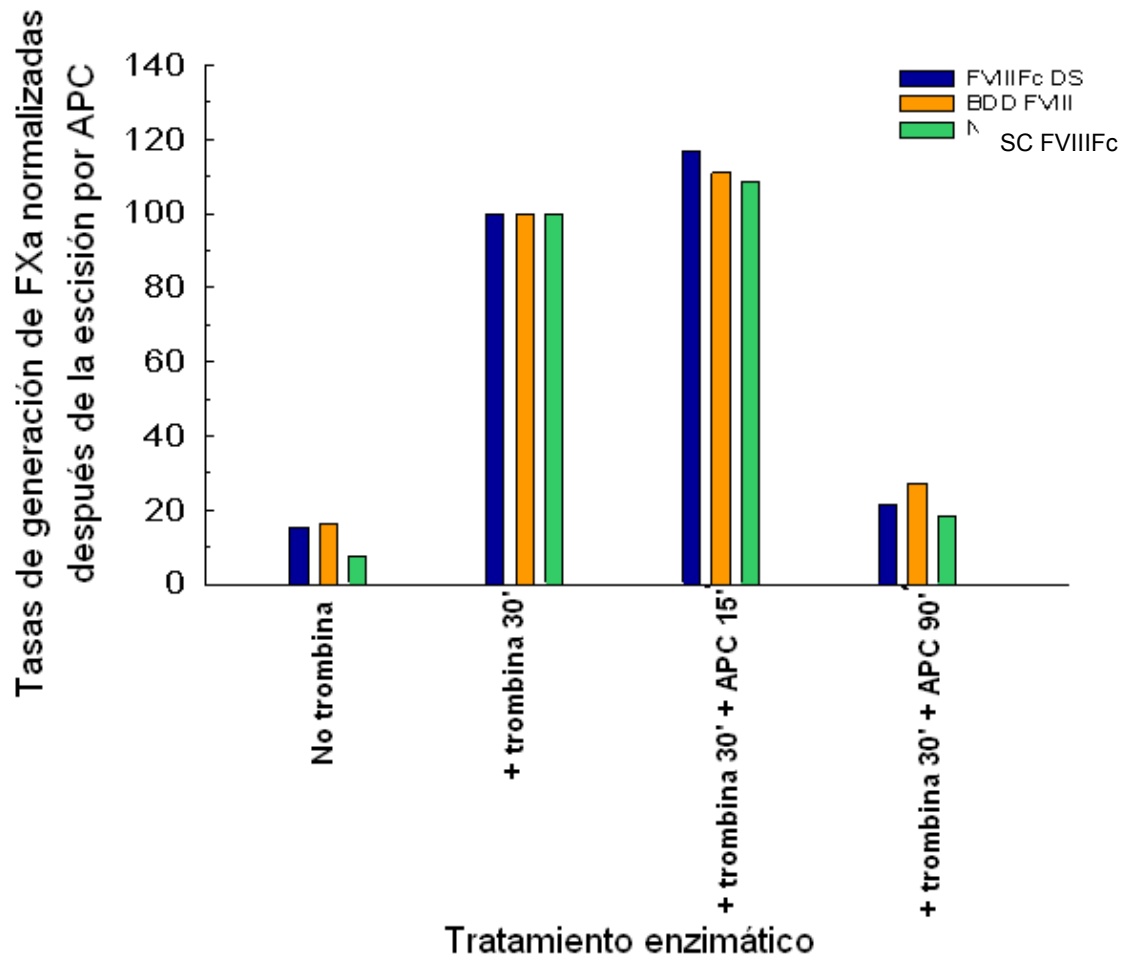


Figura 5A

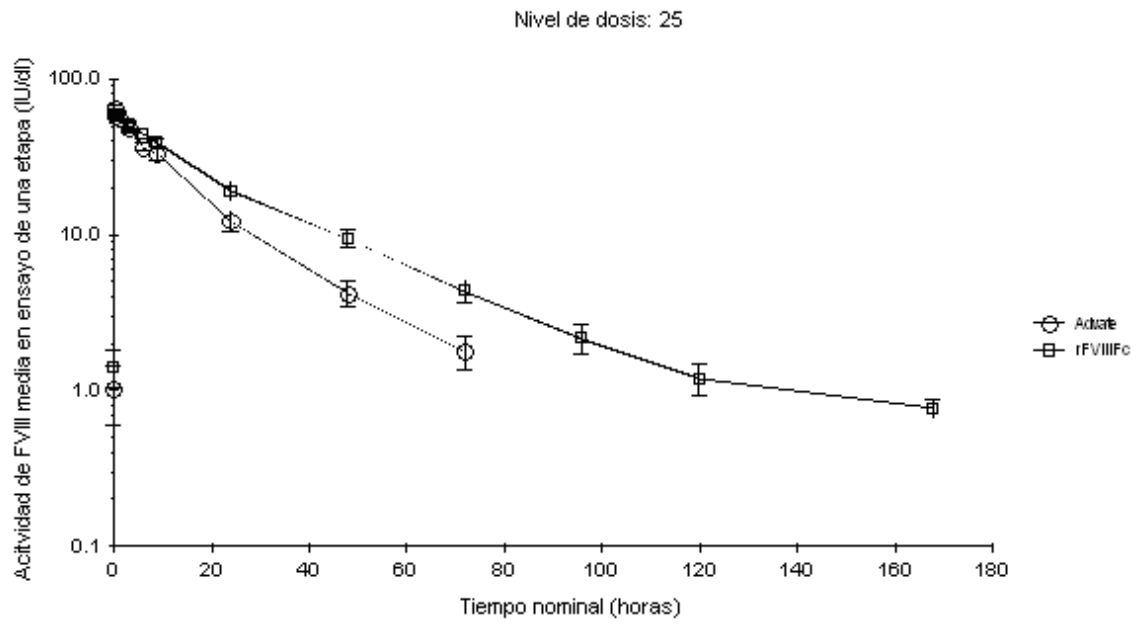


Figura 5B

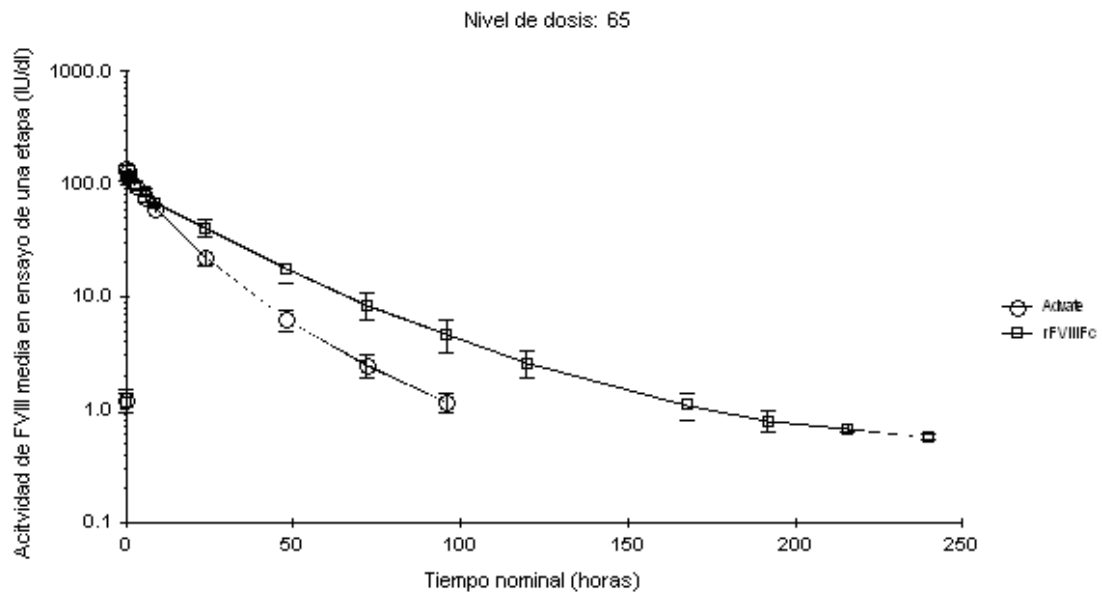


Figura 5C

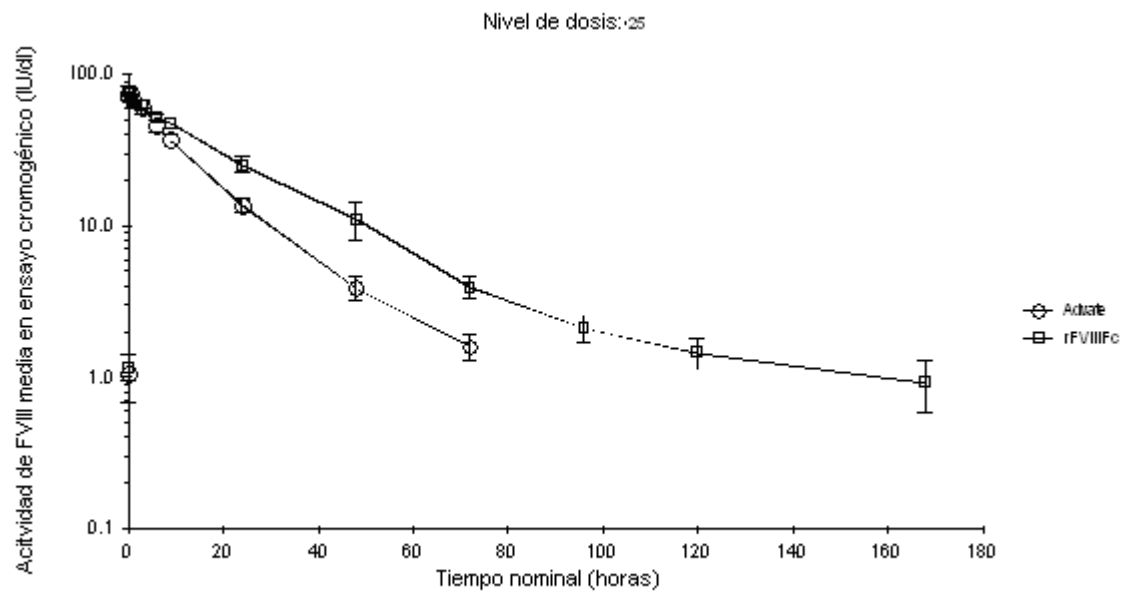


Figura 5D

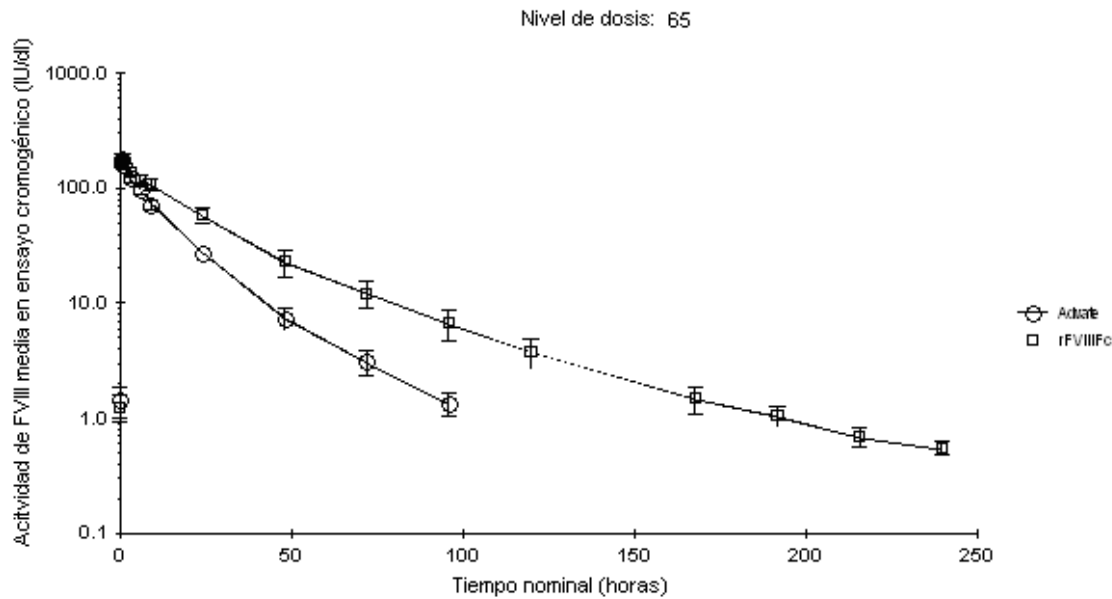


Figura 6A

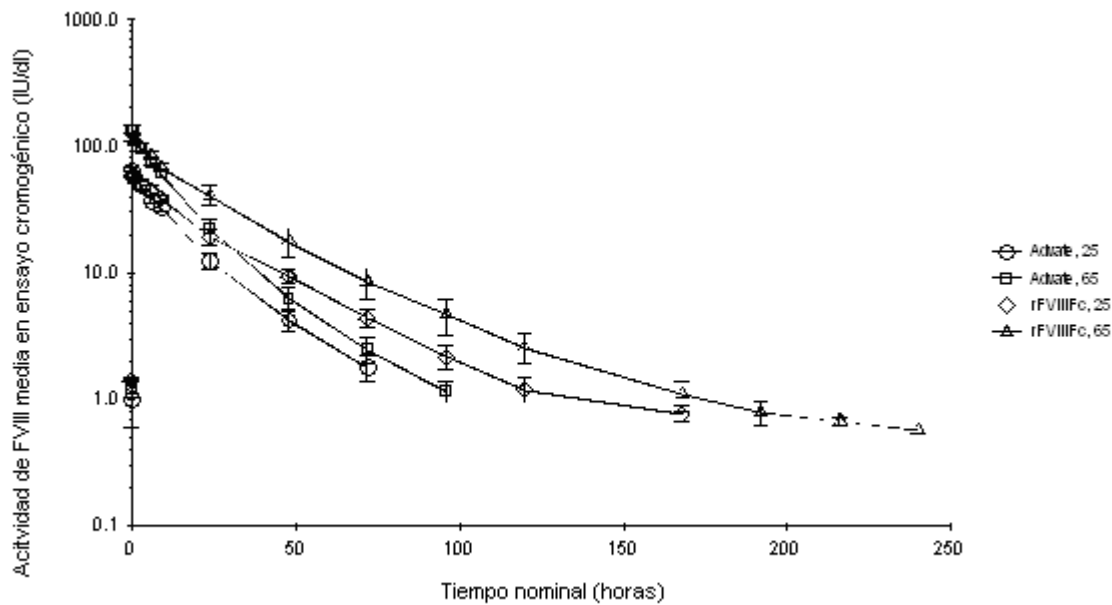


Figura 6B

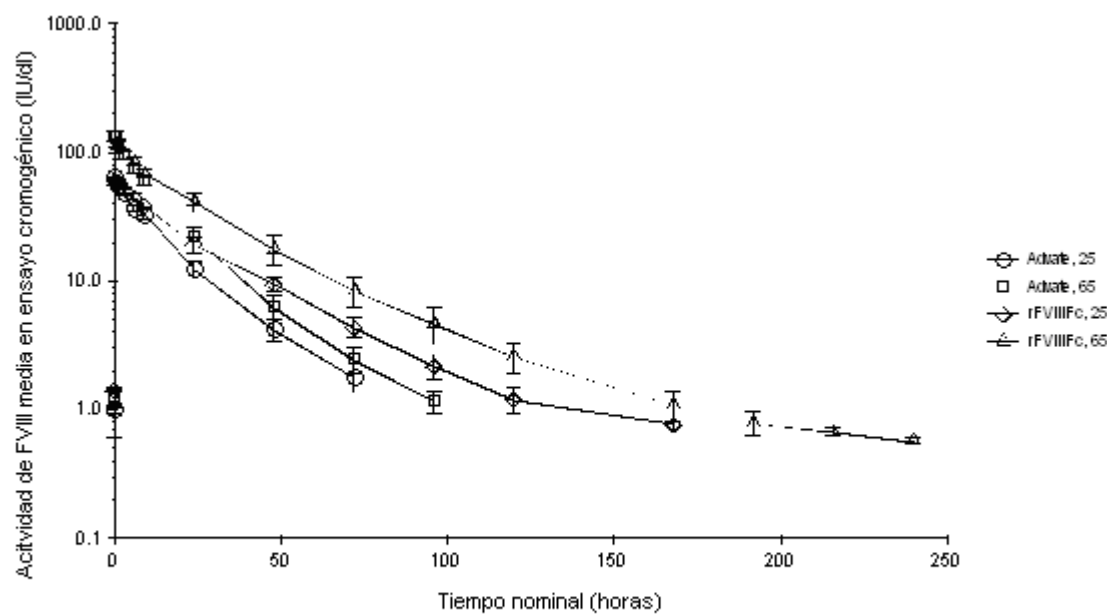


Figura 7A

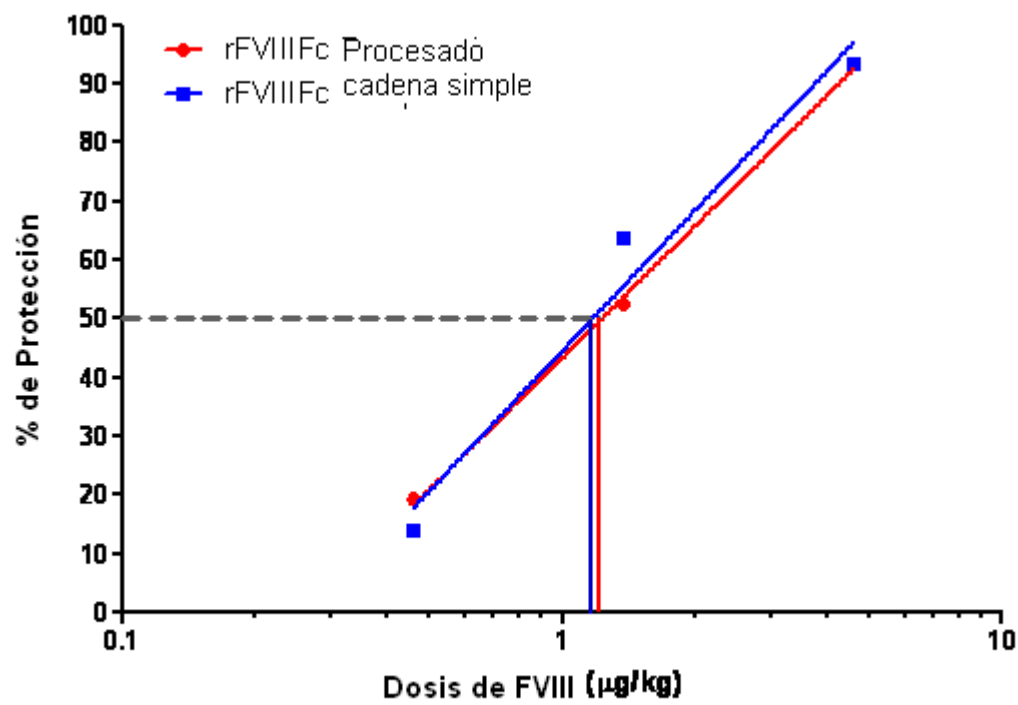


Figura 7B

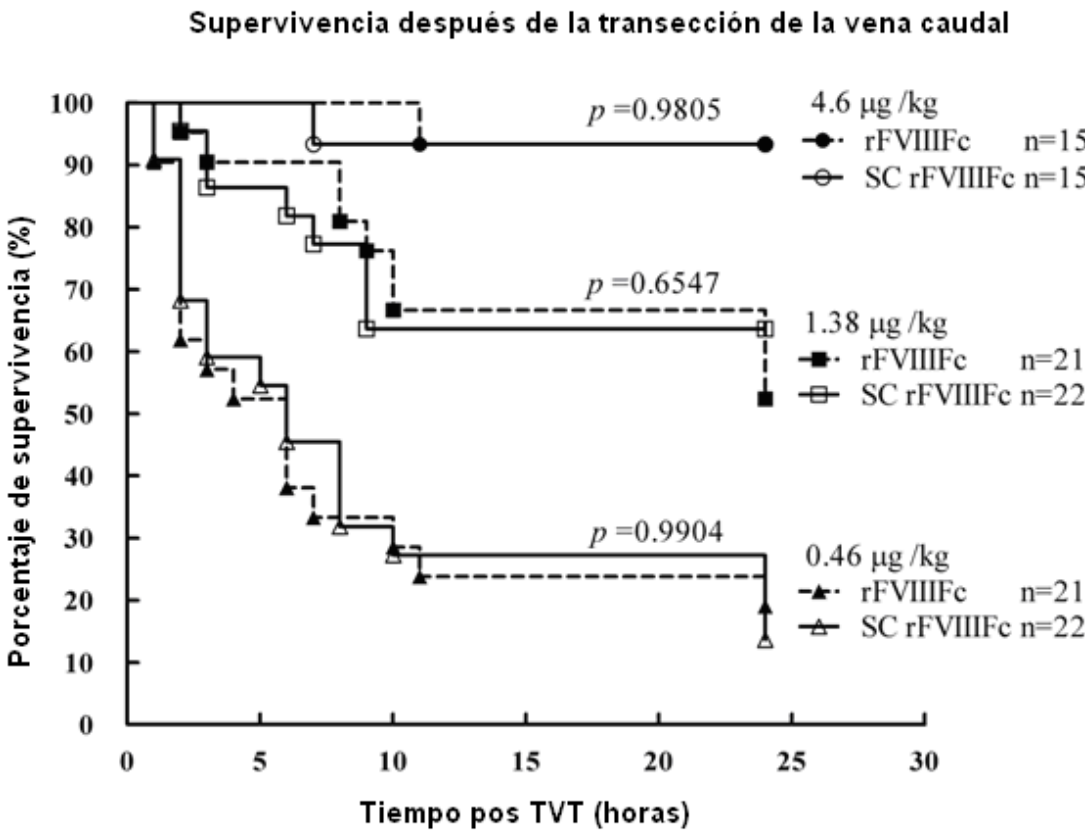


Figura 7C

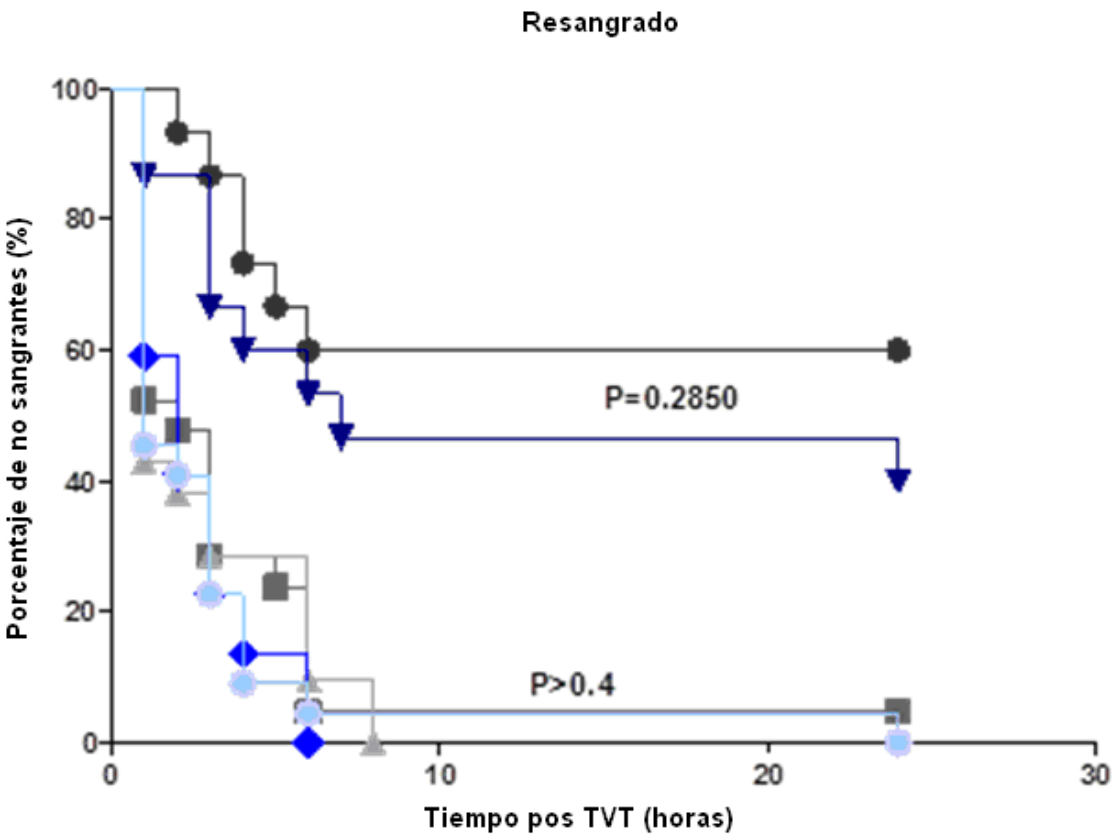


Figura 8 Diseño del estudio

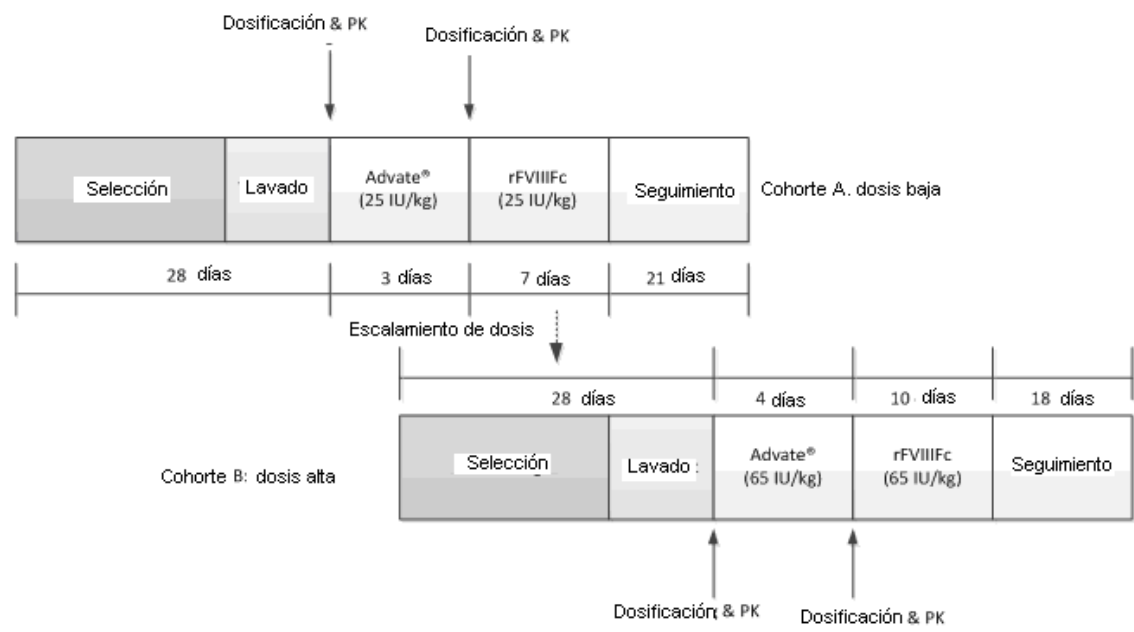


Figura 9

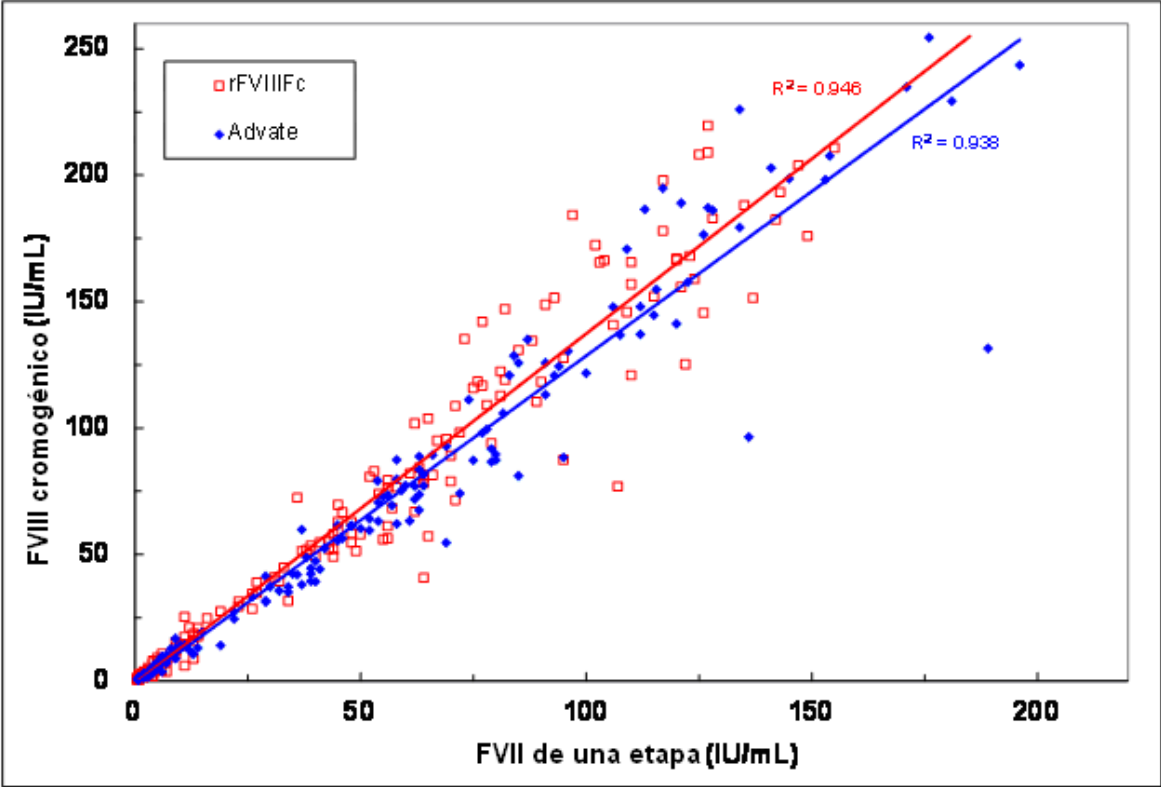


Figura 10

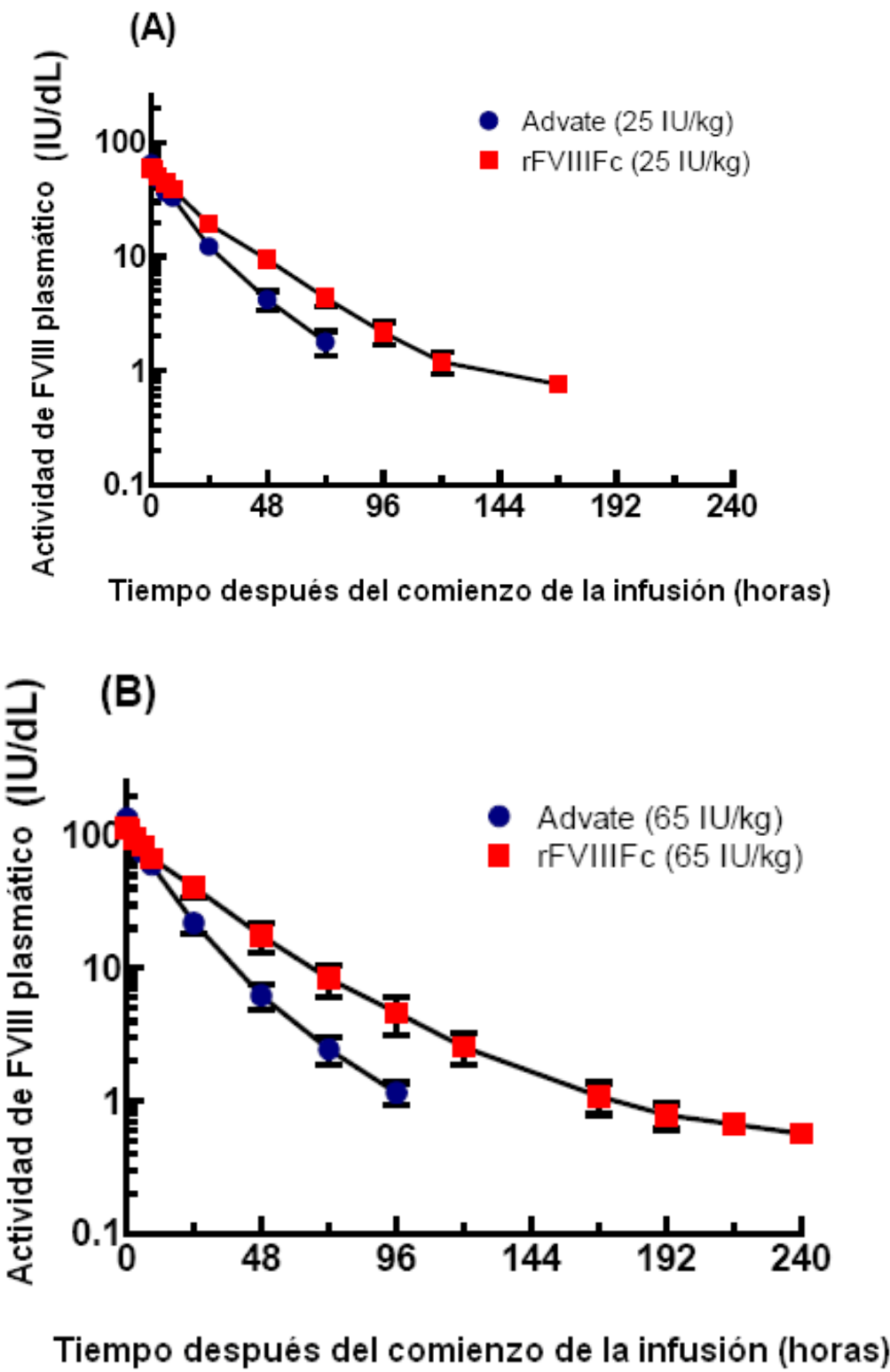


Figura 11

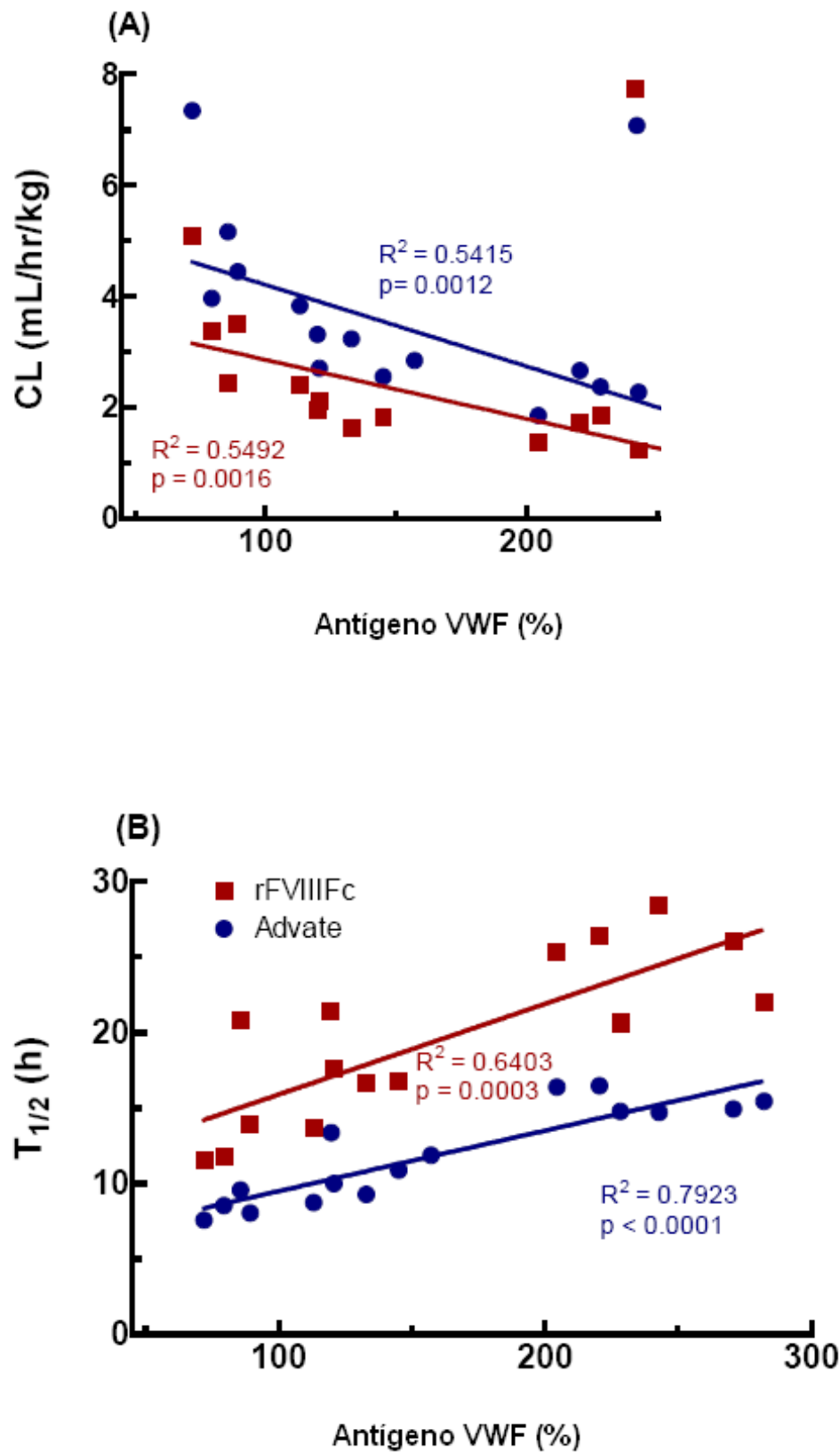


Figura 12

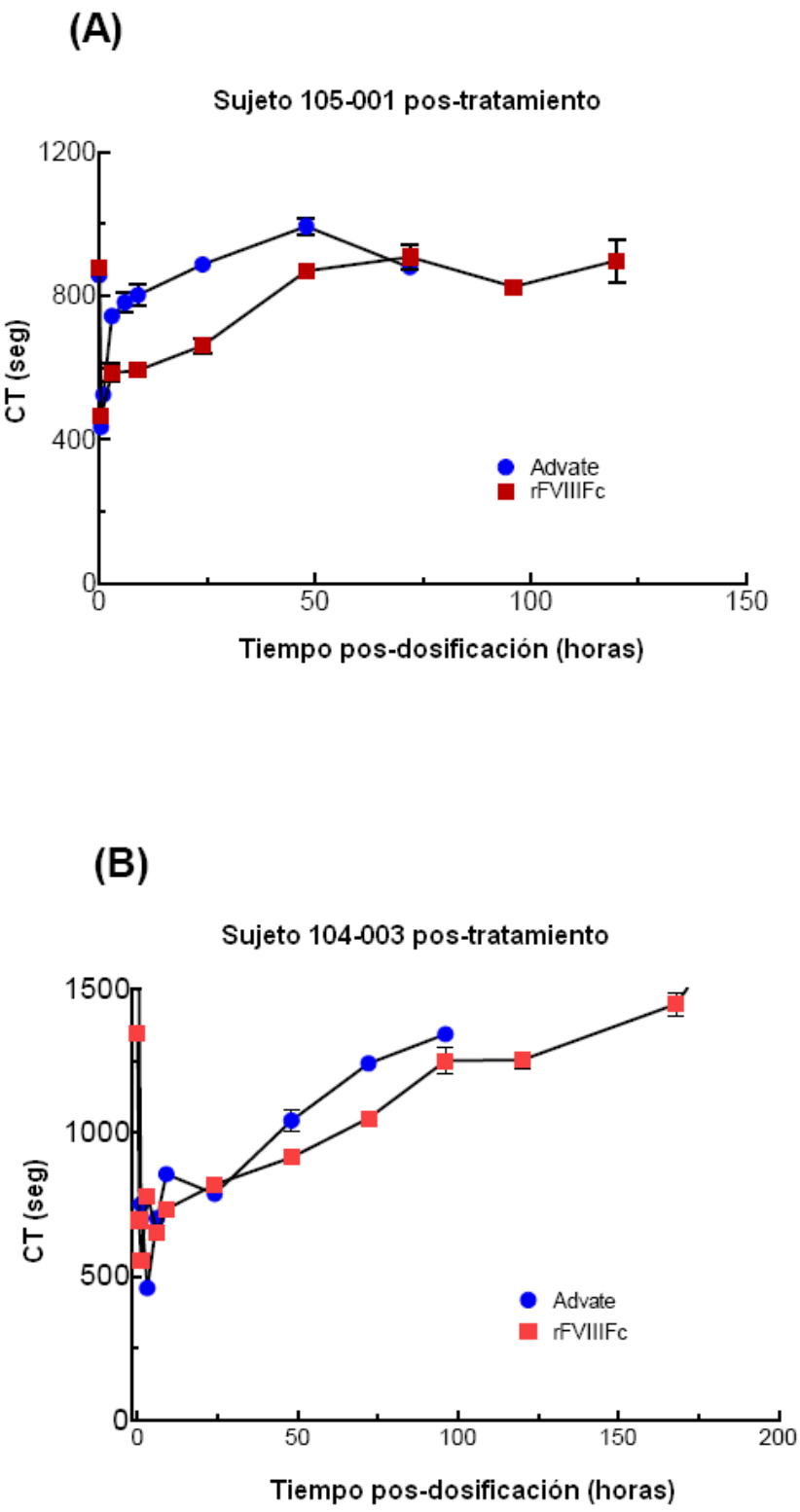


Figura 13A

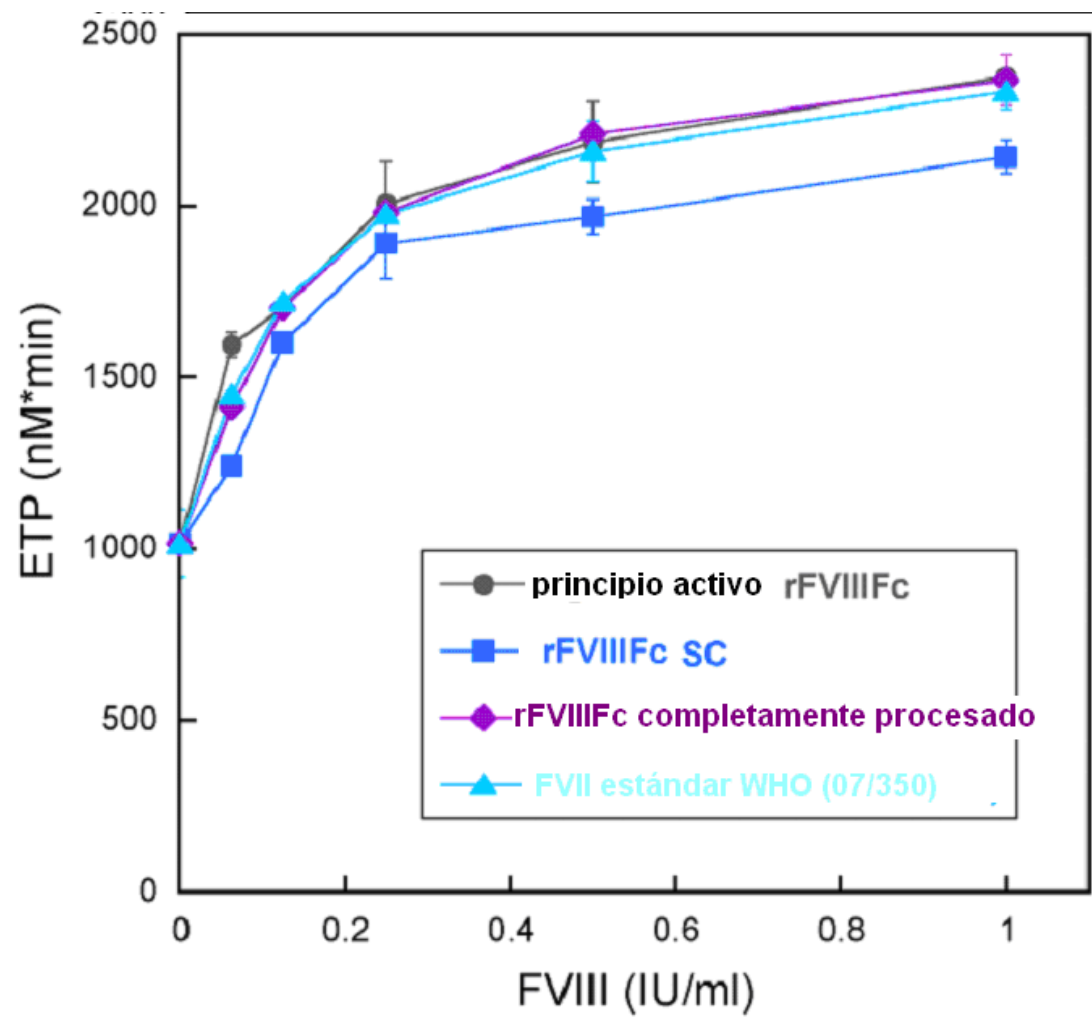


Figura 13B

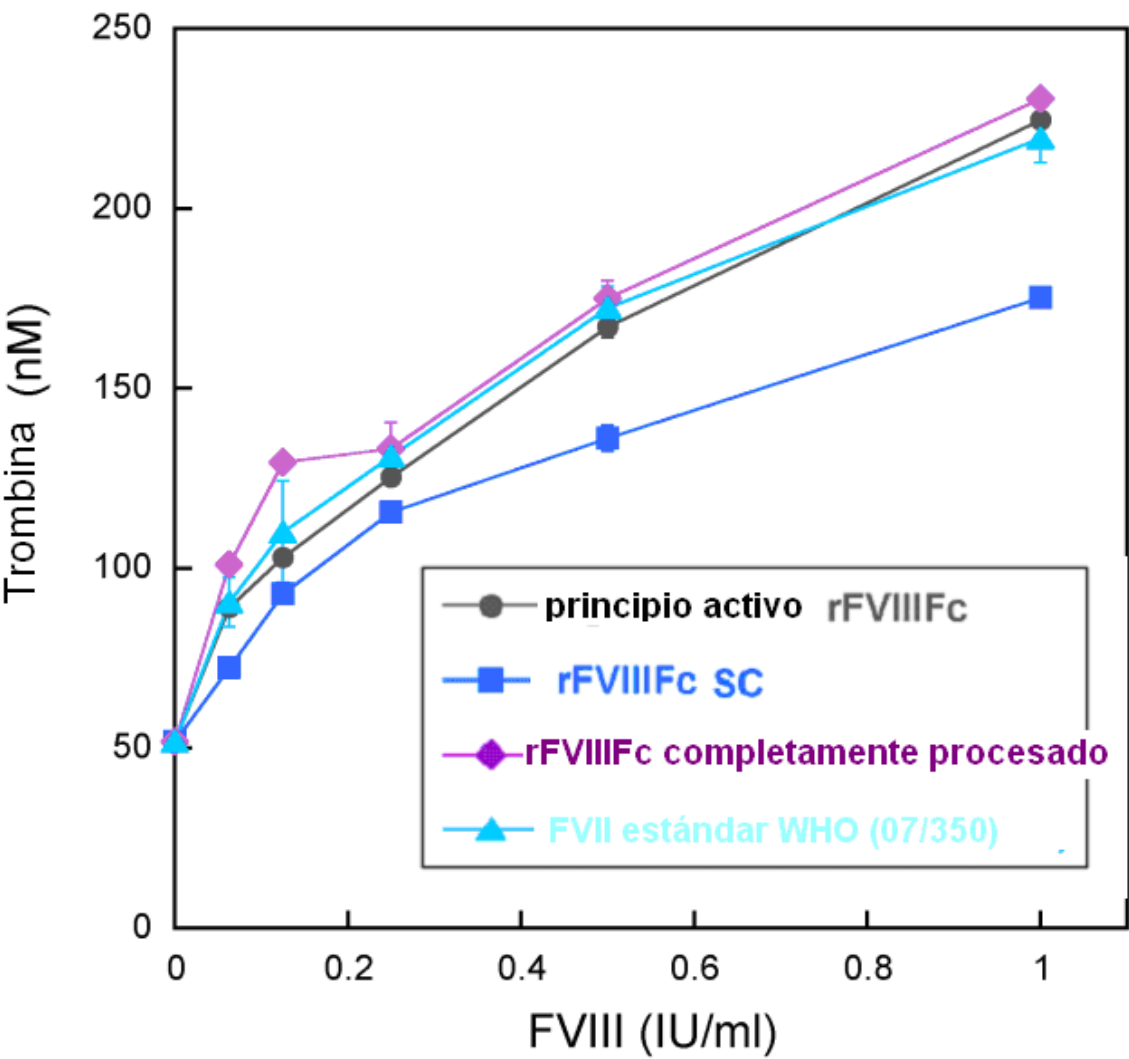
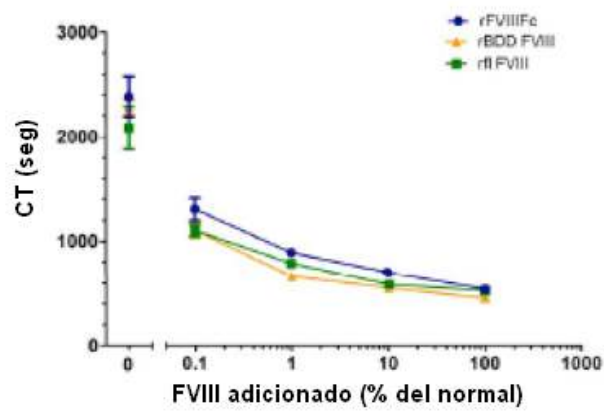
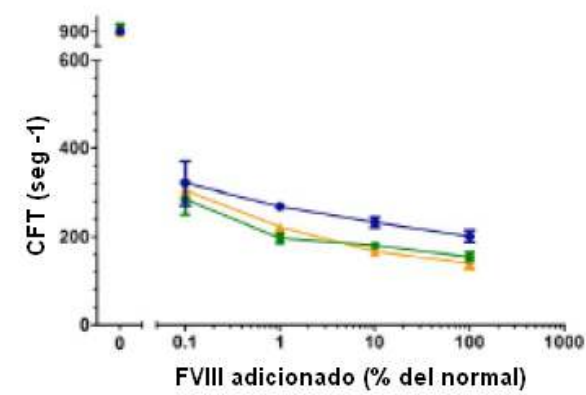


Figura 14.

A.



B.



C.

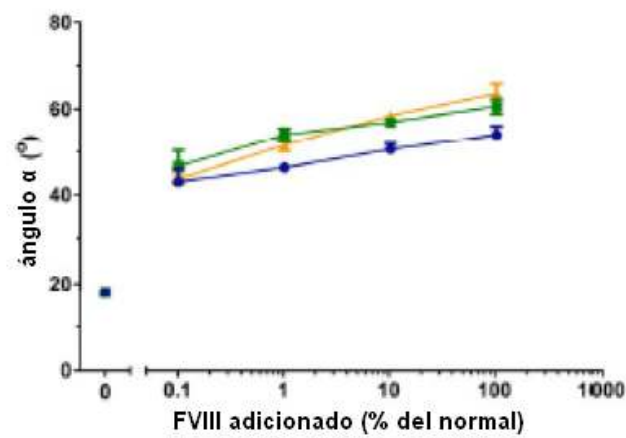
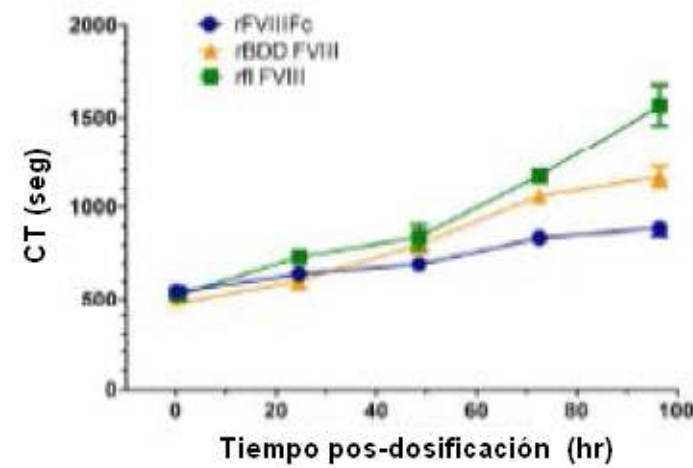
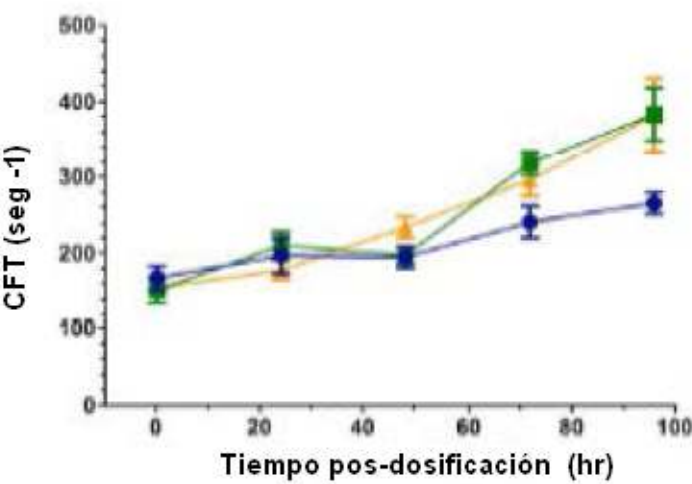


Figura 15.

A



B



C

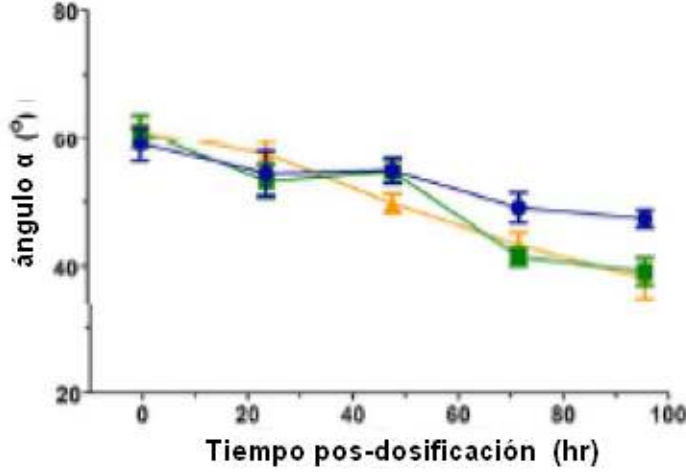


Figura 16A

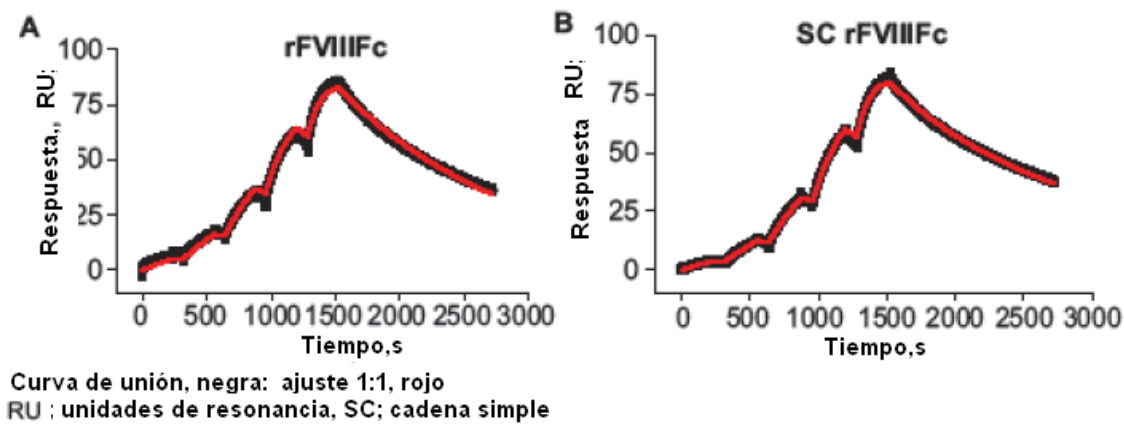


Figura 16b

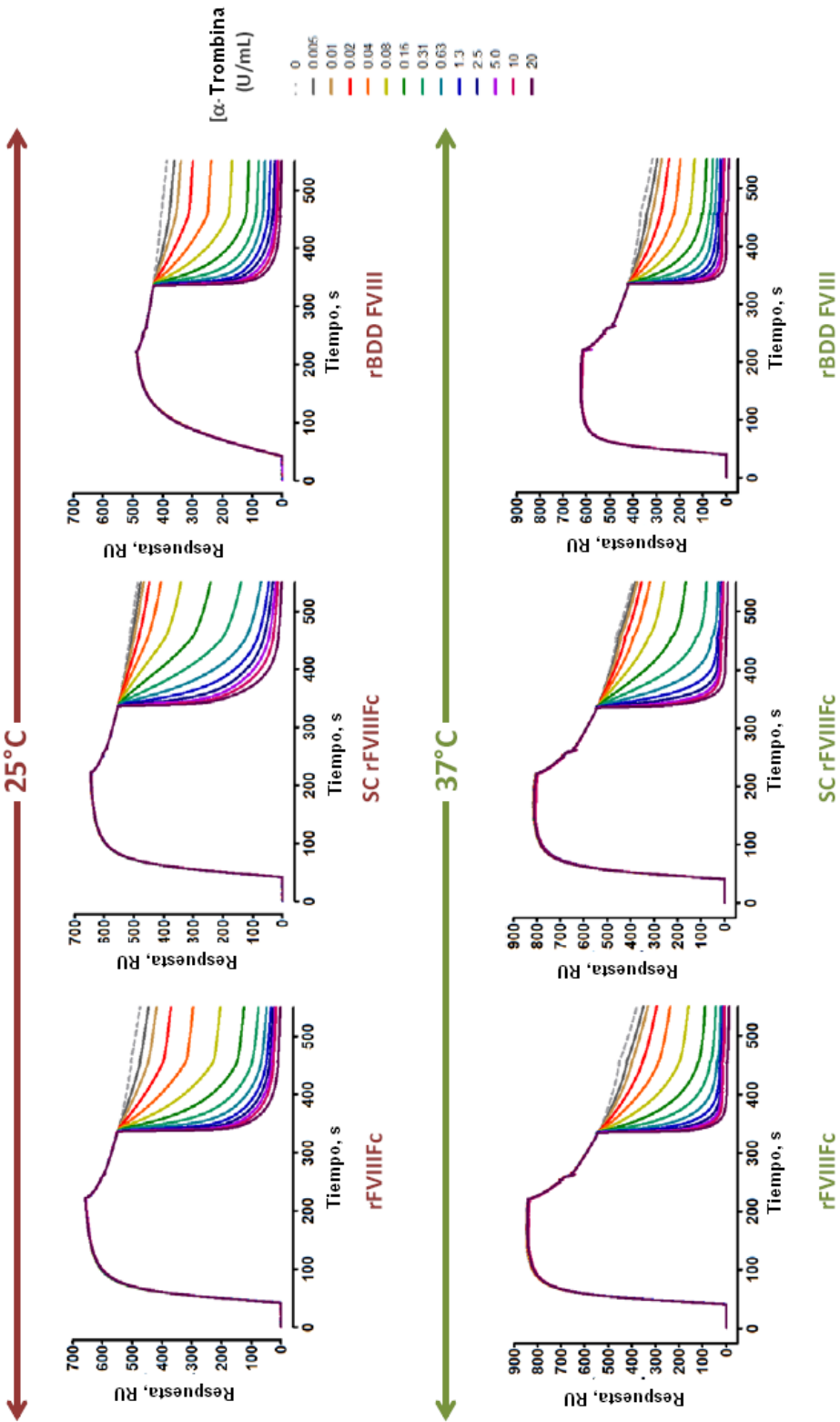


Figura 16C

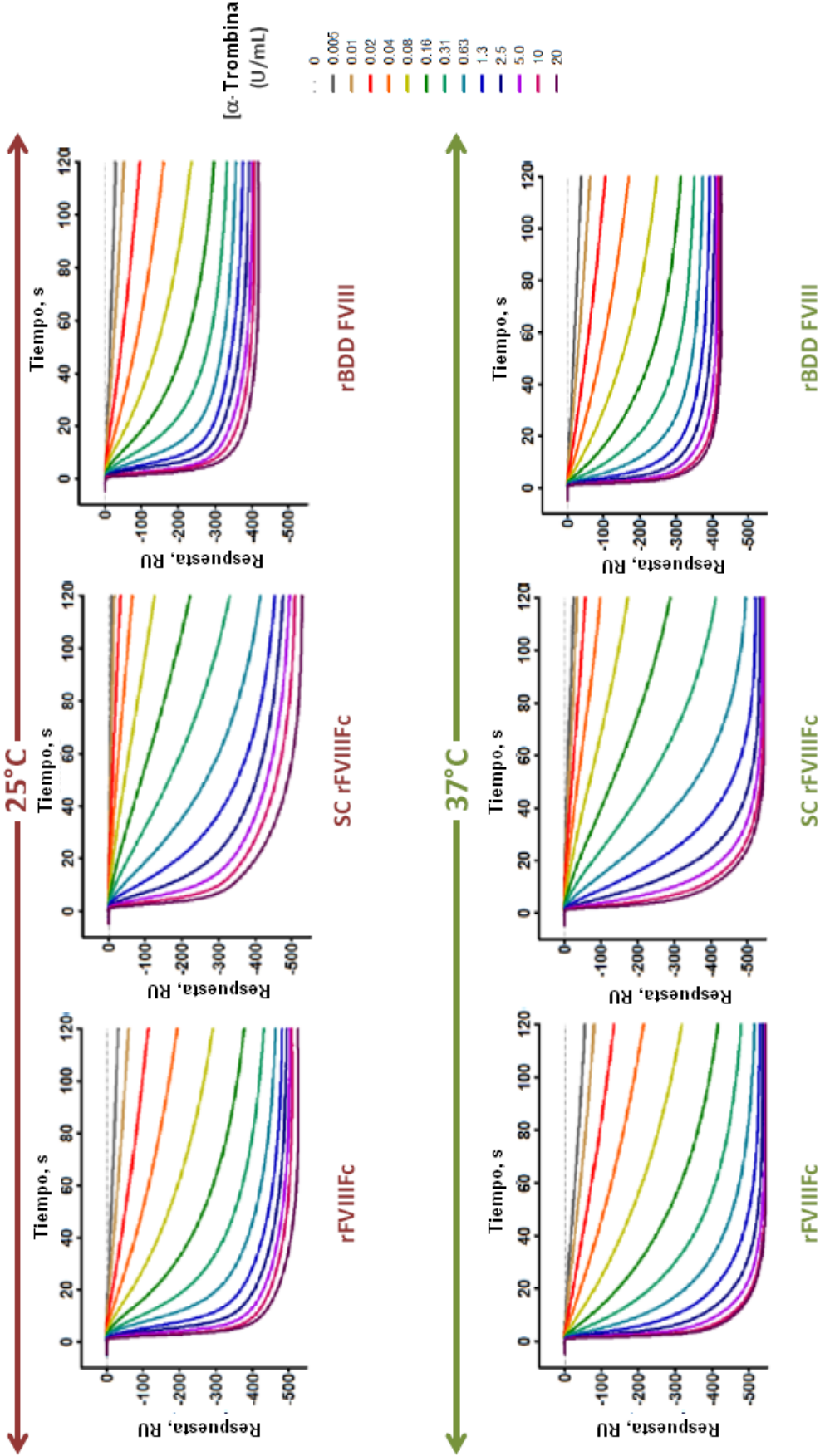


Figura 16D

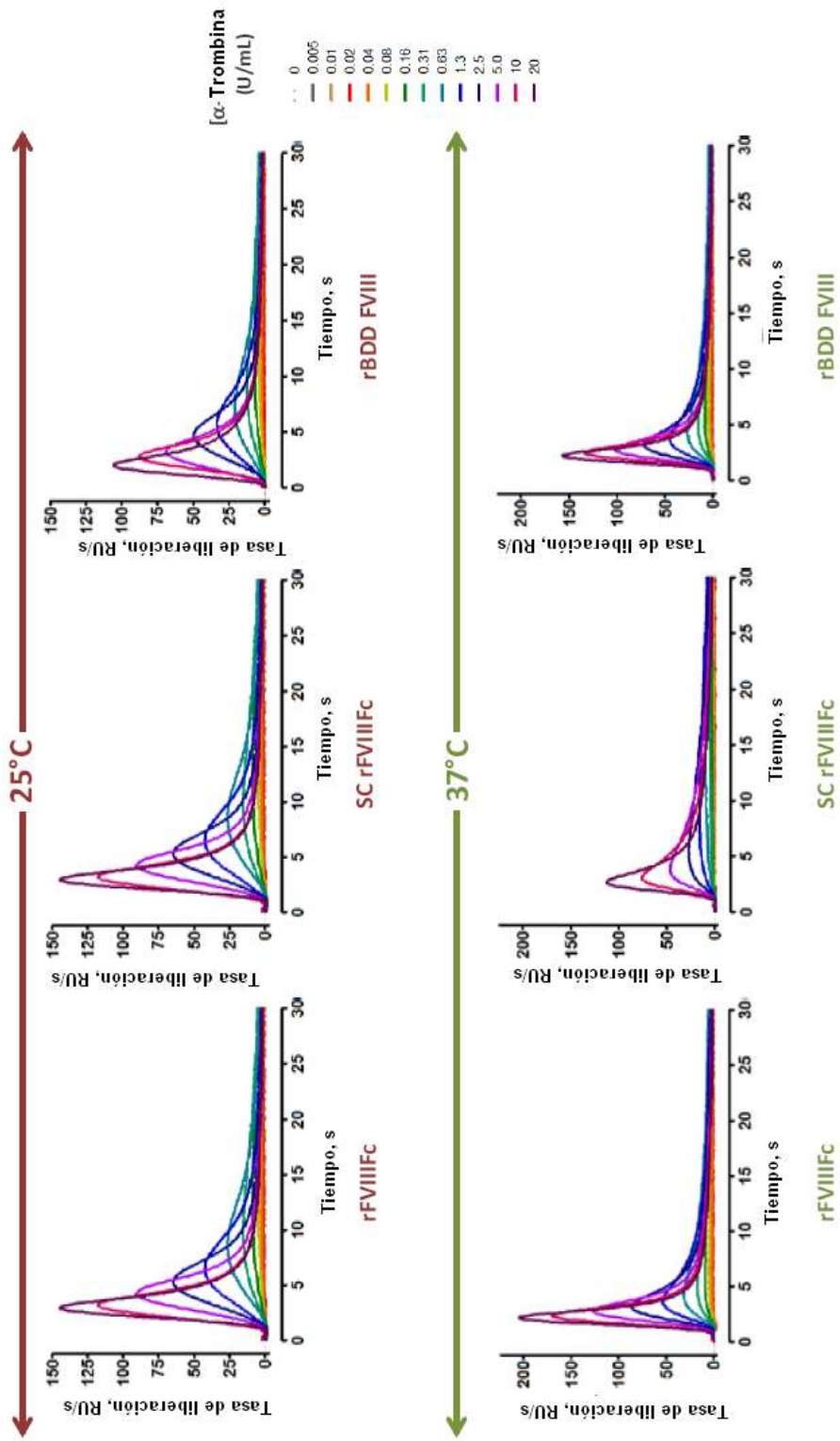
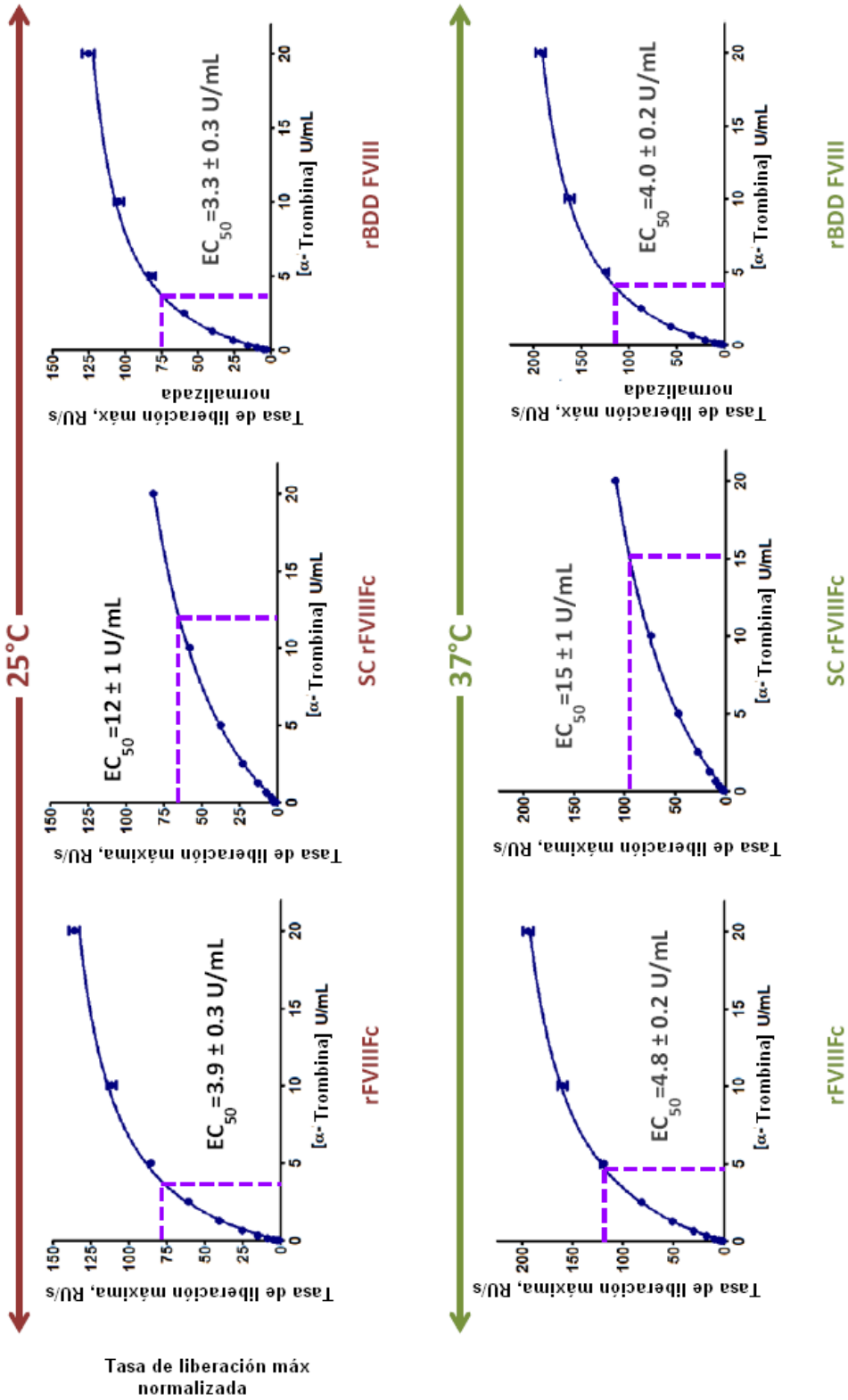


Figura 16E



503206.TXT
LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Biogen Idec MA Inc.
DUMONT, Jennifer A.
LOW, Susan
BITONTI, Alan J.
PIERCE, Glenn
LUK, Alvin
JIANG, Haiyan
MCKINNEY, Byron
OTTMER, Matt
SOMMER, Jurg
NUGENT, Karen
LI, Lian
PETERS, Robert

<120> Polipéptidos quiméricos del factor VIII e híbridos y métodos de usos de los
mismos
Thereof

<130> 2159.354PC07/EKS/C-K/CMG

<140> A a asignar
<141> Presente documento

<150> US 61/657.641
<151> 08-06-2012

<150> US 61/622.789
<151> 11-04-2012

<150> US 61/586.443
<151> 13-01-2012

<150> US 61/569.158
<151> 09-12-2011

<150> US 61/541.561
<151> 30-09-2011

<150> US 61/522.647
<151> 11-08-2011

<150> US 61/506.015
<151> 08-07-2011

<160> 16

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 5052
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Cadena FVIIIIFc con dominio B deletado

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(57)
<223> Señal FVIII

503206.TXT

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (4372)..(5052)
 <223> Región Fc

<400> 1
 atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
 accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
 ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct ctagagctgc caaaatcttt tccattcaac 180
 acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgaggtttat 300
 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt 360
 ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatggag ccctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
 tttgatgaag ggaaaagtgt gcactcagaa acaaagaact ctttgatgca ggatagggat 720
 gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacagggtct 780
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcatgtgat tggaatgggc 840
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca catttcttgt gaggaaccat 900
 cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960
 gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctcttccc accaacaatga tggcatggaa 1020
 gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaacccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080
 gaagcggaa actatgatga tgatcttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttgat 1140
 gatgacaact ctcttctctt tatccaaatt cgctcagttg ccaagaagca tcctaaaact 1200
 tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtcctcgcc 1260
 cccgatgaca gaagttataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320
 aagtacaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa cctttaagac tcgtgaagct 1380
 attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg gggaagttgg agacacactg 1440
 ttgattatat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact 1500
 gatgtccgtc ctttgtattc aaggagatta ccaaagggtg taaaacattt gaaggatttt 1560
 ccaattctgc caggagaaat attcaaatat aaatggacag tgactgtaga agatgggcca 1620
 actaaatcag atcctcggtg cctgaccgcg tattactcta gtttcgttaa tatggagaga 1680

503206.TXT

gatctagctt	caggactcat	tggccctctc	ctcatctgct	acaaagaatc	tgtagatcaa	1740
agaggaaacc	agataatgtc	agacaagagg	aatgtcatcc	tgttttctgt	atttgatgag	1800
aaccgaagct	ggtacctcac	agagaatata	caacgctttc	tccccaatcc	agctggagtg	1860
cagcttgagg	atccagagtt	ccaagcctcc	aacatcatgc	acagcatcaa	tggctatggt	1920
tttgatagtt	tgcagttgtc	agtttgtttg	catgaggtgg	catactggta	cattctaagc	1980
attggagcac	agactgactt	cctttctgtc	ttcttctctg	gatatacctt	caaacacaaa	2040
atggtctatg	aagacacact	caccctattc	ccattctcag	gagaaaactgt	cttcatgtcg	2100
atggaaaacc	caggtctatg	gatttctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagaggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagttgt	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttccagc	atacttgctg	agtaaaaaca	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
catgttctaa	gaaacagggc	tcagagtggc	agtgtccctc	agttcaagaa	agttgttttc	2580
caggaattta	ctgatggctc	ctttactcag	cccttatacc	gtggagaact	aatgaacat	2640
ttgggactcc	tggggccata	tataagagca	gaagttgaag	ataatatcat	ggtaactttc	2700
agaaatcagg	cctctcgtcc	ctattccttc	tattctagcc	ttatttctta	tgaggaagat	2760
cagaggcaag	gagcagaacc	tagaaaaaac	tttgtcaagc	ctaatgaaac	caaaacttac	2820
ttttgaaaag	tgcaacatca	tatggcaccc	actaaagatg	agtttgactg	caaagcctgg	2880
gcttatttct	ctgatgttga	cctggaaaaa	gatgtgcact	caggcctgat	tggacccctt	2940
ctggtctgcc	acactaacac	actgaaccct	gctcatggga	gacaagtgac	agtacaggaa	3000
tttgctctgt	ttttcaccat	ctttgatgag	acaaaaagct	ggtacttcac	tgaaaatatg	3060
gaaagaaact	gcagggctcc	ctgcaatatc	cagatggaag	atccccactt	taaagagaat	3120
tatcgcttcc	atgcaatcaa	tggctacata	atggatacac	tacctggctt	agtaatggct	3180
caggatcaaa	ggattcgatg	gtatctgctc	agcatgggca	gcaatgaaaa	catccattct	3240
attcatttca	gtggacatgt	gttcaactgt	cgaaaaaaag	aggagtataa	aatggcactg	3300
tacaatctct	atccagggtg	ttttgagaca	gtggaaatgt	taccatccaa	agctggaatt	3360
tggcgggtgg	aatgccttat	tggcgagcat	ctacatgctg	ggatgagcac	actttttctg	3420
gtgtacagca	ataagtgtca	gactccccctg	ggaatggctt	ctggacacat	tagagatttt	3480
cagattacag	cttcaggaca	atatggacag	tgggccccaa	agctggccag	acttcattat	3540
tccggatcaa	tcaatgcctg	gagcaccaag	gagccctttt	cttggatcaa	ggtggatctg	3600

503206.TXT

ttggcaccaa	tgattattca	cggcatacaag	acccaggggtg	cccgtcagaa	gttctccagc	3660
ctctacatct	ctcagtttat	catcatgtat	agtcttgatg	ggaagaagtg	gcagacttat	3720
cgaggaaatt	ccactggaac	cttaatgggtc	ttctttggca	atgtggattc	atctgggata	3780
aaacacaata	tttttaaccc	tccaattatt	gctcgataca	tccgtttgca	cccaactcat	3840
tatagcattc	gcagcactct	tcgcatggag	ttgatgggct	gtgatttaaa	tagttgcagc	3900
atgccattgg	gaatggagag	taaagcaata	tcagatgcac	agattactgc	ttcatcctac	3960
tttaccaata	tgtttgccac	ctgggtctcct	tcaaaagctc	gacttcacct	ccaagggagg	4020
agtaatgcct	ggagacctca	ggtgaataat	ccaaaagagt	ggctgcaagt	ggacttccag	4080
aagacaatga	aagtcacagg	agtaactact	cagggagtaa	aatctctgct	taccagcatg	4140
tatgtgaagg	agttcctcat	ctccagcagt	caagatggcc	atcagtggac	tctctttttt	4200
cagaatggca	aagtaaaggt	ttttcagggg	aatcaagact	ccttcacacc	tgtgggtgaac	4260
tctctagacc	caccgttact	gactcgctac	cttcgaattc	acccccagag	ttgggtgcac	4320
cagattgccc	tgaggatgga	ggttctgggc	tgcgaggcac	aggacctcta	cgacaaaact	4380
cacacatgcc	caccgtgccc	agctccagaa	ctcctgggcg	gaccgtcagt	cttcctcttc	4440
cccccaaac	ccaaggacac	cctcatgata	tcccggaccc	ctgaggtcac	atgcgtgggtg	4500
gtggacgtga	gccacgaaga	ccctgaggtc	aagttcaact	ggtacgtgga	cggcgtggag	4560
gtgcataatg	ccaagacaaa	gccgcgggag	gagcagtaca	acagcacgta	ccgtgtggtc	4620
agcgtcctca	ccgtcctgca	ccaggactgg	ctgaatggca	aggagtacaa	gtgcaagggtc	4680
tccaacaaag	ccctcccagc	ccccatcgag	aaaaccatct	ccaaagccaa	agggcagccc	4740
cgagaaccac	aggtgtacac	cctgccccca	tcccgggatg	agctgaccaa	gaaccagggtc	4800
agcctgacct	gcctgggtcaa	aggcttctat	cccagcgaca	tcgccgtgga	gtgggagagc	4860
aatgggcagc	cggagaacaa	ctacaagacc	acgcctcccg	tggtggactc	cgacggctcc	4920
ttcttctct	acagcaagct	caccgtggac	aagagcaggt	ggcagcaggg	gaacgtcttc	4980
tcatgctccg	tgatgcatga	ggctctgcac	aaccactaca	cgcagaagag	cctctccctg	5040
tctccgggta	aa					5052

<210> 2

<211> 1684

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cadena FVIII-Fc con dominio B delecionado

<220>

<221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> Señal

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (20)..(753)
 <223> Cadena pesada (CP)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (760)..(773)
 <223> Dominio B

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1457)..(1684)
 <223> Región Fc

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

503206.TXT

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

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

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 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

503206.TXT

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val
 930 935 940
 Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp
 945 950 955 960
 Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu
 965 970 975
 Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His
 980 985 990
 Gly Arg Gln Val Thr Val Gln Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe
 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

503206.TXT

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

503206.TXT

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

503206.TXT

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

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

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

Lys

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

<220>
 <223> Región Fc

<220>
 <221> misc_Señal
 <222> (1)..(60)
 <223> Señal de Ig kappa de ratón

<400> 3
 atggagacag acacactcct gctatgggta ctgctgctct gggttccagg ttccactggt 60
 gacaaaactc acacatgccc accgtgcccga gcacctgaac tcctgggagg accgtcagtc 120
 ttcctcttcc ccccaaaacc caaggacacc ctcattgatct cccggacccc tgaggtcaca 180
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccacgaagac cctgagggtca agttcaactg gtacgtggac 240
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagtacaa cagcacgtac 300
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaatggcaa ggagtacaag 360
 tgcaagggtct ccaacaaagc cctcccagcc cccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 420
 gggcagcccc gagaaccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccgcgatga gctgaccaag 480
 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctatc ccagcgacat cgccgtggag 540
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gttggactcc 600
 gacggctcct tcttcctcta cagcaagctc accgtggaca agagcagggtg gcagcagggg 660
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 720
 ctctccctgt ctccgggtaa a 741

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

<220>

<223> Cadena Fc

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(20)

<223> Señal heteróloga de la cadena de Ig kappa de ratón

<400> 4

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

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

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

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

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

503206.TXT

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

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

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 245

<210> 5
 <211> 7734
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> FVIIIIFc de longitud completa

<220>
 <221> misc_Señal
 <222> (1)..(57)
 <223> Señal FVIII

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (7054)..(7734)
 <223> Región Fc

<400> 5
 atgcaaatag agctctccac ctgcttcttt ctgtgccttt tgcgattctg ctttagtgcc 60
 accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actatatgca aagtgatctc 120
 ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttcct cctagagtgc caaaatcttt tccattcaac 180
 acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240
 gctaagccaa ggccaccctg gatgggtctg ctaggctcta ccatccaggc tgagggtttat 300
 gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttcccatc ctgtcagtct tcatgctggt 360
 ggtgtatcct actggaaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtcaaagg 420
 gagaaagaag atgataaagt cttccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctctg 480
 aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctta cctactcata tctttctcat 540
 gtggacctgg taaaagactt gaattcaggc ctcatcggag ccctactagt atgtagagaa 600
 gggagtctgg ccaaggaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgctgta 660
 tttgatgaag ggaaaagttg gcactcagaa acaaagaact ctttgatgca ggatagggat 720
 gctgcatctg ctcgggcctg gcctaaaatg cacacagtca atgggttatgt aaacagggtct 780
 ctgccaggtc tgattggatg ccacaggaaa tcagtctatt ggcattgtgat tggaatgggc 840
 accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca cttttcttgt gaggaaccat 900
 cgccaggcgt ccttggaat ctcgccaata actttcctta ctgctcaaac actcttgatg 960

503206.TXT

gaccttggac	agtttctact	gttttgtcat	atctcttccc	accaacatga	tggcatggaa	1020
gcttatgtca	aagtagacag	ctgtccagag	gaaccccaac	tacgaatgaa	aaataatgaa	1080
gaagcggaag	actatgatga	tgatcttact	gattctgaaa	tggatgtggt	caggtttgat	1140
gatgacaact	ctccttcctt	tatccaaatt	cgctcagttg	ccaagaagca	tcctaaaact	1200
tgggtacatt	acattgctgc	tgaagaggag	gactgggact	atgctccctt	agtcctcgcc	1260
cccgatgaca	gaagttataa	aagtcaatat	ttgaacaatg	gccctcagcg	gattggtagg	1320
aagtacaaaa	aagtccgatt	tatggcatac	acagatgaaa	cctttaagac	tcgtgaagct	1380
attcagcatg	aatcaggaat	cttgggacct	ttactttatg	gggaagttgg	agacacactg	1440
ttgattatat	ttaagaatca	agcaagcaga	ccatataaca	tctaccctca	cggaatcact	1500
gatgtccgtc	ctttgtattc	aaggagatta	ccaaaagggtg	taaaacattt	gaaggatttt	1560
ccaattctgc	caggagaaat	attcaaatat	aaatggacag	tgactgtaga	agatgggccca	1620
actaaatcag	atcctcgggtg	cctgacccgc	tattactcta	gtttcgttaa	tatggagaga	1680
gatctagctt	caggactcat	tggccctctc	ctcatctgct	acaaagaatc	tgtagatcaa	1740
agaggaaacc	agataatgtc	agacaagagg	aatgtcatcc	tgttttctgt	atttgatgag	1800
aaccgaagct	ggtacctcac	agagaatata	caacgctttc	tccccaatcc	agctggagtg	1860
cagcttgagg	atccagagtt	ccaagcctcc	aacatcatgc	acagcatcaa	tggctatggt	1920
tttgatagtt	tgcagttgtc	agtttgtttg	catgagggtg	catactggta	cattctaagc	1980
attggagcac	agactgactt	cctttctgtc	ttcttctctg	gatatacctt	caaacacaaa	2040
atggtctatg	aagacacact	caccctattc	ccattctcag	gagaaactgt	cttcatgtcg	2100
atggaaaacc	caggctcatg	gattctgggg	tgccacaact	cagactttcg	gaacagaggc	2160
atgaccgcct	tactgaaggt	ttctagttgt	gacaagaaca	ctggtgatta	ttacgaggac	2220
agttatgaag	atatttcagc	atacttgctg	agtaaaaaca	atgccattga	accaagaagc	2280
ttctcccaga	attcaagaca	ccctagcact	aggcaaaagc	aatttaatgc	caccacaatt	2340
ccagaaaatg	acatagagaa	gactgaccct	tggtttgcac	acagaacacc	tatgcctaaa	2400
atacaaaatg	tctcctctag	tgatttggtg	atgctcttgc	gacagagtcc	tactccacat	2460
gggctatcct	tatctgatct	ccaagaagcc	aaatatgaga	ctttttctga	tgatccatca	2520
cctggagcaa	tagacagtaa	taacagcctg	tctgaaatga	cacacttcag	gccacagctc	2580
catcacagtg	gggacatggt	atttaccctt	gagtcaggcc	tccaattaag	attaaatgag	2640
aaactgggga	caactgcagc	aacagagttg	aagaaacttg	atttcaaagt	ttctagtaca	2700
tcaataatc	tgatttcaac	aattccatca	gacaatttgg	cagcaggtac	tgataataca	2760
agttccttag	gacccccaag	tatgccagtt	cattatgata	gtcaattaga	taccactcta	2820

503206.TXT

tttggcaaaa	agtcattctcc	ccttactgag	tctgggtggac	ctctgagctt	gagtgaagaa	2880
aataatgatt	caaagttggt	agaatcaggt	ttaatgaata	gccaaagaaag	ttcatgggga	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	caaataaaaac	tacttcatca	aaaaacatgg	aaatgggtcca	acagaaaaaa	3300
gagggcccca	ttccaccaga	tgcacaaaat	ccagatatgt	cgttctttta	gatgctattc	3360
ttgccagaat	cagcaagggtg	gatacaaagg	actcatggaa	agaactctct	gaactctggg	3420
caaggcccca	gtccaaagca	attagtatcc	ttaggaccag	aaaaatctgt	ggaagggtcag	3480
aatttcttgt	ctgagaaaaa	caaagtggta	gtaggaaagg	gtgaatttac	aaaggacgta	3540
ggactcaaag	agatgggtttt	tccaagcagc	agaaacctat	ttcttactaa	cttggataat	3600
ttacatgaaa	ataatacaca	caatcaagaa	aaaaaaattc	aggaagaaat	agaaaaagaag	3660
gaaacattaa	tccaagagaa	tgtagttttg	cctcagatac	atacagtga	tggcactaag	3720
aatttcatga	agaacctttt	cttactgagc	actaggcaaa	atgtagaagg	ttcatatgac	3780
ggggcatatg	ctccagtact	tcaagatttt	aggtcattaa	atgattcaac	aaatagaaca	3840
aagaaacaca	cagctcattt	ctcaaaaaaa	ggggaggaag	aaaacttgga	aggcttgggga	3900
aatcaaacca	agcaaattgt	agagaaatat	gcatgcacca	caaggatatc	tcctaataca	3960
agccagcaga	attttgtcac	gcaacgtagt	aagagagctt	tgaaacaatt	cagactccca	4020
ctagaagaaa	cagaacttga	aaaaaggata	attgtggatg	acacctcaac	ccagtgggtcc	4080
aaaaacatga	aacatttgac	cccgagcacc	ctcacacaga	tagactacaa	tgagaaggag	4140
aaaggggcca	ttactcagtc	tcccttatca	gattgcctta	cgaggagtca	tagcatccct	4200
caagcaaata	gatctccatt	acccattgca	aaggatcat	catttccatc	tattagacct	4260
atatatctga	ccagggtcct	attccaagac	aactcttctc	atcttccagc	agcatcttat	4320
agaaagaaaag	attctgggggt	ccaagaaagc	agtcatttct	tacaaggagc	caaaaaaaat	4380
aacctttctt	tagccattct	aaccttggag	atgactgggtg	atcaaagaga	ggttggctcc	4440
ctggggacaa	gtgccacaaa	ttcagtcaca	tacaagaaag	ttgagaacac	tgttctcccg	4500
aaaccagact	tgcccaaaaac	atctggcaaa	gttgaattgc	ttccaaaagt	tcacatttat	4560
cagaaggacc	tattccctac	ggaaactagc	aatgggtctc	ctggccatct	ggatctcgtg	4620
gaaggaggcc	ttcttcaggg	aacagagggga	gcgattaagt	ggaatgaagc	aaacagacct	4680
ggaaaagttc	cctttctgag	agtagcaaca	gaaagctctg	caaagactcc	ctccaagcta	4740

503206.TXT

ttggatcctc	ttgcttggga	taaccactat	ggtactcaga	tacaaaaaga	agagtggaaa	4800
tcccaagaga	agtcaccaga	aaaaacagct	tttaagaaaa	aggataccat	tttgtccctg	4860
aacgcttggtg	aaagcaatca	tgcaatagca	gcaataaatg	agggacaaaa	taagcccgaa	4920
atagaagtca	cctgggcaaa	gcaaggtagg	actgaaaggc	tgtgctctca	aaaccaccca	4980
gtcttgaaac	gccatcaacg	ggaaaataact	cgtactactc	ttcagtcaga	tcaagaggaa	5040
attgactatg	atgataccat	atcagttgaa	atgaagaagg	aagattttga	catttatgat	5100
gaggatgaaa	atcagagccc	ccgcagcttt	caaaagaaaa	cacgacacta	ttttattgct	5160
gcagtggaga	ggctctggga	ttatgggatg	agtagctccc	cacatgttct	aagaaacagg	5220
gctcagagtg	gcagtgtccc	tcagttcaag	aaagttgttt	tccaggaatt	tactgatggc	5280
tcctttactc	agcccttata	ccgtggagaa	ctaaatgaac	atttgggact	cctggggcca	5340
tatataagag	cagaagttga	agataatatc	atggtaactt	tcagaaatca	ggcctctcgt	5400
ccctattcct	tctattctag	ccttatttct	tatgaggaag	atcagaggca	aggagcagaa	5460
cctagaaaaa	actttgtcaa	gcctaataaa	acaaaaactt	acttttggaa	agtgcaacat	5520
catatggcac	ccactaaaaga	tgagtttgac	tgcaaaagcct	gggcttattt	ctctgatggt	5580
gacctggaaa	aagatgtgca	ctcaggcctg	attggacccc	ttctgggtctg	ccacactaac	5640
acactgaacc	ctgctcatgg	gagacaagtg	acagtacagg	aatttgctct	gtttttcacc	5700
atctttgatg	agacaaaaag	ctgggtacttc	actgaaaata	tggaaagaaa	ctgcagggct	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	ttcttggatc	aagggtggatc	tgttggcacc	aatgattatt	6300
cacggcatca	agaccagggg	tgcccgtcag	aagttctcca	gcctctacat	ctctcagttt	6360
atcatcatgt	atagtcttga	tgggaagaag	tggcagactt	atcgaggaaa	ttccactgga	6420
accttaatgg	tcttcttttg	caatgtggat	tcattctggga	taaaacacaa	tatttttaac	6480
cctccaatta	ttgctcgata	catccgtttg	cacccaactc	attatagcat	tcgcagcact	6540
cttcgcatgg	agttgatggg	ctgtgattta	aatagttgca	gcatgccatt	gggaatggag	6600

503206.TXT

```

agtaaagcaa tatcagatgc acagattact gcttcacacct actttaccaa tatgtttgcc 6660
acctgggtctc cttcaaaagc tcgacttcac ctccaaggga ggagtaatgc ctggagacct 6720
caggtgaata atccaaaaga gtggctgcaa gtggacttcc agaagacaat gaaagtcaca 6780
ggagtaacta ctcagggagt aaaatctctg cttaccagca tgtatgtgaa ggagttcctc 6840
atctccagca gtcaagatgg ccatcagtgg actctctttt ttcagaatgg caaagtaaag 6900
gtttttcagg gaaatcaaga ctccttcaca cctgtggtga actctctaga cccaccgtta 6960
ctgactcgct accttcgaat tcacccccag agttgggtgc accagattgc cctgaggatg 7020
gaggttctgg gctgcgaggc acaggacctc tacgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 7080
ccagctccag aactcctggg cggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 7140
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa 7200
gaccttgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 7260
aagccgcggg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 7320
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcagg tctccaacaa agccctccca 7380
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 7440
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 7500
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 7560
aactacaaga ccacgcctcc cgtgttggac tccgacggct ctttcttcct ctacagcaag 7620
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 7680
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaa 7734

```

```

<210> 6
<211> 2578
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

```

```

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

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(19)
<223> Señal FVIII
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (20)..(759)
<223> CP

```

```

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (760)..(1667)
<223> Dominio B

```

```

<220>

```

<221> MISC_FEATURE
 <222> (2352)..(2578)
 <223> Región Fc

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp
 Página 19

503206.TXT																		
225						230						235						240
Ala	Ala	Ser	Ala	Arg 245	Ala	Trp	Pro	Lys	Met 250	His	Thr	Val	Asn	Gly 255	Tyr			
Val	Asn	Arg	Ser 260	Leu	Pro	Gly	Leu	Ile 265	Gly	Cys	His	Arg	Lys 270	Ser	Val			
Tyr	Trp	His 275	Val	Ile	Gly	Met	Gly 280	Thr	Thr	Pro	Glu	Val 285	His	Ser	Ile			
Phe	Leu 290	Glu	Gly	His	Thr	Phe 295	Leu	Val	Arg	Asn	His 300	Arg	Gln	Ala	Ser			
Leu 305	Glu	Ile	Ser	Pro	Ile 310	Thr	Phe	Leu	Thr	Ala 315	Gln	Thr	Leu	Leu	Met 320			
Asp	Leu	Gly	Gln	Phe 325	Leu	Leu	Phe	Cys	His 330	Ile	Ser	Ser	His	Gln 335	His			
Asp	Gly	Met	Glu 340	Ala	Tyr	Val	Lys	Val 345	Asp	Ser	Cys	Pro	Glu 350	Glu	Pro			
Gln	Leu	Arg 355	Met	Lys	Asn	Asn	Glu 360	Glu	Ala	Glu	Asp	Tyr 365	Asp	Asp	Asp			
Leu	Thr 370	Asp	Ser	Glu	Met	Asp 375	Val	Val	Arg	Phe	Asp 380	Asp	Asp	Asn	Ser			
Pro 385	Ser	Phe	Ile	Gln	Ile 390	Arg	Ser	Val	Ala	Lys 395	Lys	His	Pro	Lys	Thr 400			
Trp	Val	His	Tyr	Ile 405	Ala	Ala	Glu	Glu	Glu 410	Asp	Trp	Asp	Tyr	Ala 415	Pro			
Leu	Val	Leu	Ala 420	Pro	Asp	Asp	Arg	Ser 425	Tyr	Lys	Ser	Gln	Tyr 430	Leu	Asn			
Asn	Gly	Pro 435	Gln	Arg	Ile	Gly	Arg 440	Lys	Tyr	Lys	Lys	Val 445	Arg	Phe	Met			
Ala	Tyr 450	Thr	Asp	Glu	Thr	Phe 455	Lys	Thr	Arg	Glu	Ala 460	Ile	Gln	His	Glu			
Ser 465	Gly	Ile	Leu	Gly	Pro 470	Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu 475	Val	Gly	Asp	Thr	Leu 480			

503206.TXT

Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro
 485 490 495
 His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys
 500 505 510
 Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe
 515 520 525
 Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp
 530 535 540
 Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg
 545 550 555 560
 Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu
 565 570 575
 Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val
 580 585 590
 Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu
 595 600 605
 Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp
 610 615 620
 Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val
 625 630 635 640
 Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp
 645 650 655
 Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly
 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735

503206.TXT

Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Ser Arg His Pro
 755 760 765
 Ser Thr Arg Gln Lys Gln Phe Asn Ala Thr Thr Ile Pro Glu Asn Asp
 770 775 780
 Ile Glu Lys Thr Asp Pro Trp Phe Ala His Arg Thr Pro Met Pro Lys
 785 790 795 800
 Ile Gln Asn Val Ser Ser Ser Asp Leu Leu Met Leu Leu Arg Gln Ser
 805 810 815
 Pro Thr Pro His Gly Leu Ser Leu Ser Asp Leu Gln Glu Ala Lys Tyr
 820 825 830
 Glu Thr Phe Ser Asp Asp Pro Ser Pro Gly Ala Ile Asp Ser Asn Asn
 835 840 845
 Ser Leu Ser Glu Met Thr His Phe Arg Pro Gln Leu His His Ser Gly
 850 855 860
 Asp Met Val Phe Thr Pro Glu Ser Gly Leu Gln Leu Arg Leu Asn Glu
 865 870 875 880
 Lys Leu Gly Thr Thr Ala Ala Thr Glu Leu Lys Lys Leu Asp Phe Lys
 885 890 895
 Val Ser Ser Thr Ser Asn Asn Leu Ile Ser Thr Ile Pro Ser Asp Asn
 900 905 910
 Leu Ala Ala Gly Thr Asp Asn Thr Ser Ser Leu Gly Pro Pro Ser Met
 915 920 925
 Pro Val His Tyr Asp Ser Gln Leu Asp Thr Thr Leu Phe Gly Lys Lys
 930 935 940
 Ser Ser Pro Leu Thr Glu Ser Gly Gly Pro Leu Ser Leu Ser Glu Glu
 945 950 955 960
 Asn Asn Asp Ser Lys Leu Leu Glu Ser Gly Leu Met Asn Ser Gln Glu
 965 970 975
 Ser Ser Trp Gly Lys Asn Val Ser Ser Thr Glu Ser Gly Arg Leu Phe
 980 985 990

503206.TXT

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

503206.TXT

1220		1225		1230
His Thr Val Thr Gly Thr Lys Asn Phe Met Lys Asn Leu Phe Leu	1235	1240	1245	
Leu Ser Thr Arg Gln Asn Val Glu Gly Ser Tyr Asp Gly Ala Tyr	1250	1255	1260	
Ala Pro Val Leu Gln Asp Phe Arg Ser Leu Asn Asp Ser Thr Asn	1265	1270	1275	
Arg Thr Lys Lys His Thr Ala His Phe Ser Lys Lys Gly Glu Glu	1280	1285	1290	
Glu Asn Leu Glu Gly Leu Gly Asn Gln Thr Lys Gln Ile Val Glu	1295	1300	1305	
Lys Tyr Ala Cys Thr Thr Arg Ile Ser Pro Asn Thr Ser Gln Gln	1310	1315	1320	
Asn Phe Val Thr Gln Arg Ser Lys Arg Ala Leu Lys Gln Phe Arg	1325	1330	1335	
Leu Pro Leu Glu Glu Thr Glu Leu Glu Lys Arg Ile Ile Val Asp	1340	1345	1350	
Asp Thr Ser Thr Gln Trp Ser Lys Asn Met Lys His Leu Thr Pro	1355	1360	1365	
Ser Thr Leu Thr Gln Ile Asp Tyr Asn Glu Lys Glu Lys Gly Ala	1370	1375	1380	
Ile Thr Gln Ser Pro Leu Ser Asp Cys Leu Thr Arg Ser His Ser	1385	1390	1395	
Ile Pro Gln Ala Asn Arg Ser Pro Leu Pro Ile Ala Lys Val Ser	1400	1405	1410	
Ser Phe Pro Ser Ile Arg Pro Ile Tyr Leu Thr Arg Val Leu Phe	1415	1420	1425	
Gln Asp Asn Ser Ser His Leu Pro Ala Ala Ser Tyr Arg Lys Lys	1430	1435	1440	
Asp Ser Gly Val Gln Glu Ser Ser His Phe Leu Gln Gly Ala Lys	1445	1450	1455	

503206.TXT

Lys Asn Asn Leu Ser Leu Ala Ile Leu Thr Leu Glu Met Thr Gly
 1460 1465 1470
 Asp Gln Arg Glu Val Gly Ser Leu Gly Thr Ser Ala Thr Asn Ser
 1475 1480 1485
 Val Thr Tyr Lys Lys Val Glu Asn Thr Val Leu Pro Lys Pro Asp
 1490 1495 1500
 Leu Pro Lys Thr Ser Gly Lys Val Glu Leu Leu Pro Lys Val His
 1505 1510 1515
 Ile Tyr Gln Lys Asp Leu Phe Pro Thr Glu Thr Ser Asn Gly Ser
 1520 1525 1530
 Pro Gly His Leu Asp Leu Val Glu Gly Ser Leu Leu Gln Gly Thr
 1535 1540 1545
 Glu Gly Ala Ile Lys Trp Asn Glu Ala Asn Arg Pro Gly Lys Val
 1550 1555 1560
 Pro Phe Leu Arg Val Ala Thr Glu Ser Ser Ala Lys Thr Pro Ser
 1565 1570 1575
 Lys Leu Leu Asp Pro Leu Ala Trp Asp Asn His Tyr Gly Thr Gln
 1580 1585 1590
 Ile Pro Lys Glu Glu Trp Lys Ser Gln Glu Lys Ser Pro Glu Lys
 1595 1600 1605
 Thr Ala Phe Lys Lys Lys Asp Thr Ile Leu Ser Leu Asn Ala Cys
 1610 1615 1620
 Glu Ser Asn His Ala Ile Ala Ala Ile Asn Glu Gly Gln Asn Lys
 1625 1630 1635
 Pro Glu Ile Glu Val Thr Trp Ala Lys Gln Gly Arg Thr Glu Arg
 1640 1645 1650
 Leu Cys Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu Lys Arg His Gln Arg Glu
 1655 1660 1665
 Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln Glu Glu Ile Asp Tyr
 1670 1675 1680
 Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu Asp Phe Asp Ile
 1685 1690 1695

503206.TXT

Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe Gln Lys Lys
 1700 1705 1710
 Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp Asp Tyr
 1715 1720 1725
 Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln Ser
 1730 1735 1740
 Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr
 1745 1750 1755
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu
 1760 1765 1770
 His Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asp
 1775 1780 1785
 Asn Ile Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser
 1790 1795 1800
 Phe Tyr Ser Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly
 1805 1810 1815
 Ala Glu Pro Arg Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr
 1820 1825 1830
 Tyr Phe Trp Lys Val Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu
 1835 1840 1845
 Phe Asp Cys Lys Ala Trp Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu
 1850 1855 1860
 Lys Asp Val His Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His
 1865 1870 1875
 Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His Gly Arg Gln Val Thr Val Gln
 1880 1885 1890
 Glu Phe Ala Leu Phe Phe Thr Ile Phe Asp Glu Thr Lys Ser Trp
 1895 1900 1905
 Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys Arg Ala Pro Cys Asn
 1910 1915 1920
 Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn Tyr Arg Phe His
 1925 1930 1935

503206.TXT

Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly Leu Val Met
 1940 1945 1950
 Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met Gly Ser
 1955 1960 1965
 Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe Thr
 1970 1975 1980
 Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr
 1985 1990 1995
 Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly
 2000 2005 2010
 Ile Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly
 2015 2020 2025
 Met Ser Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro
 2030 2035 2040
 Leu Gly Met Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala
 2045 2050 2055
 Ser Gly Gln Tyr Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His
 2060 2065 2070
 Tyr Ser Gly Ser Ile Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser
 2075 2080 2085
 Trp Ile Lys Val Asp Leu Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile
 2090 2095 2100
 Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser
 2105 2110 2115
 Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr
 2120 2125 2130
 Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu Met Val Phe Phe Gly Asn
 2135 2140 2145
 Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile Phe Asn Pro Pro Ile
 2150 2155 2160
 Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His Tyr Ser Ile Arg

2165						2170						2175
Ser	Thr	Leu	Arg	Met	Glu	Leu	Met	Gly	Cys	Asp	Leu	Asn Ser Cys
2180						2185					2190	
Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Met	Glu	Ser	Lys	Ala	Ile	Ser	Asp Ala Gln
2195						2200					2205	
Ile	Thr	Ala	Ser	Ser	Tyr	Phe	Thr	Asn	Met	Phe	Ala	Thr Trp Ser
2210						2215					2220	
Pro	Ser	Lys	Ala	Arg	Leu	His	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn Ala Trp
2225						2230					2235	
Arg	Pro	Gln	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Glu	Trp	Leu	Gln	Val Asp Phe
2240						2245					2250	
Gln	Lys	Thr	Met	Lys	Val	Thr	Gly	Val	Thr	Thr	Gln	Gly Val Lys
2255						2260					2265	
Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Met	Tyr	Val	Lys	Glu	Phe	Leu	Ile Ser Ser
2270						2275					2280	
Ser	Gln	Asp	Gly	His	Gln	Trp	Thr	Leu	Phe	Phe	Gln	Asn Gly Lys
2285						2290					2295	
Val	Lys	Val	Phe	Gln	Gly	Asn	Gln	Asp	Ser	Phe	Thr	Pro Val Val
2300						2305					2310	
Asn	Ser	Leu	Asp	Pro	Pro	Leu	Leu	Thr	Arg	Tyr	Leu	Arg Ile His
2315						2320					2325	
Pro	Gln	Ser	Trp	Val	His	Gln	Ile	Ala	Leu	Arg	Met	Glu Val Leu
2330						2335					2340	
Gly	Cys	Glu	Ala	Gln	Asp	Leu	Tyr	Asp	Lys	Thr	His	Thr Cys Pro
2345						2350					2355	
Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val Phe Leu
2360						2365					2370	
Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg Thr Pro
2375						2380					2385	
Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp Pro Glu
2390						2395					2400	

503206.TXT

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
2405 2410 2415

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
2420 2425 2430

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
2435 2440 2445

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile
2450 2455 2460

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
2465 2470 2475

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
2480 2485 2490

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
2495 2500 2505

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
2510 2515 2520

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
2525 2530 2535

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
2540 2545 2550

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
2555 2560 2565

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
2570 2575

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> péptido de unión a albúmina

<400> 7

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

<210> 8

<211> 32
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido CTP

<400> 8

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

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

<210> 9
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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

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

<210> 10
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido PAS

<400> 10

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

Ser Ala Pro Ala
 20

<210> 11
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <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

<210> 12
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido PAS

<400> 12

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

Ser Pro Ser Ser
 20

<210> 13
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<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

Ser Pro Ser

<210> 14
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido PAS

<400> 14

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

Ser Ser Pro Ala
 20

<210> 15

<211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <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

<210> 16
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Péptido PAS

<400> 16

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

Ser Ala Ala Ala
 20

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To: ERIC K. STEFFE
STERNE KESSLER GOLDSTEIN & FOX PLLC
1100 NEW YORK AVENUE, N.W.
WASHINGTON, DC 20005

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year)

21 DEC 2012

Applicant's or agent's file reference
2159.354PC07

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 12/45784

International filing date (day/month/year)

06 July 2012 (06.07.2012)

Priority date (day/month/year)

08 July 2011 (08.07.2011)

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC

IPC(8) - A61K 38/37; C07K 14/755 (2012.01)

USPC - 514/14.1

Applicant BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☒ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1 bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

05 December 2012 (05.12.2012)

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/45784

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed.
 - ☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account **therectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43 *bis*.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☒ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☒ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US 12/45784

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 7-38, 49-80, 83-102, 107-149, 153-155, 158-184, 191-218, 223-244, and 250-264

because:

- ☐ the said international application, or the said claims Nos. _____ relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

- ☒ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. (see below) are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

Claims 7-38, 49-80, 83-102, 107-149, 153-155, 158-184, 191-218, 223-244, and 250-264 are unsearchable because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

- ☐ the claims, or said claims Nos. _____ are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

- ☒ no international search report has been established for said claims Nos. see claims specified above

- ☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing: the applicant did not, within the prescribed time limit

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rule 13ter.1(a) or (b).

- ☐ See Supplemental Box for further details.

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 12/45784

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees the applicant has, within the applicable time limit:
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☒ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I claims 1-6 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof.

Group II claims 39, 40, 47, and 48 and dependent claims 43-46 directed to a composition comprising a chimeric polypeptide having Factor VIII activity without a signal sequence.

Group III claims 41 and 42 and dependent claims 43-46 directed to a composition comprising a chimeric polypeptide having Factor VIII activity with a signal sequence.

Group IV claims 81 and 82 directed to a method of maintaining Factor VIII in a patient population at a specified level comprising administering a therapeutically effective amount of rFVIII-Fc.

Group V claims 103-106 a method of preventing, decreasing, or treating a bleeding episode in a subject comprising administering to the subject an effective amount of a long-acting Factor VIII (FVIII) protein, wherein the subject expresses a high level of von Willebrand Factor (VWF) in plasma.

Group VI claims 150-152 directed to a method of treating a subject diagnosed with bleeding disorder, comprising measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject.

Group VII claims 156 and 157 directed to a method of treating a subject diagnosed with bleeding disorder, comprising measuring the half-life of a short-acting FVIII administered to said subject.

Group VIII claims 185 and 186 directed to a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing with a long-acting FVIII polypeptide comprising measuring the expression levels of plasma VWF.

Group IX claims 187 and 188 directed to a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing with a long-acting FVIII polypeptide comprising measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject.

Group X claims 189 and 190 a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing of a long-acting FVIII polypeptide, comprising measuring the half-life of short-acting FVIII in said subject.

Group XI claims 219-222 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof, to obtain an area under the plasma concentration versus time curve (AUC) at least about one and one-quarter times greater than the AUC obtained by an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion.

Group XII claims 245-249 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof.

------(Continued in First Supplemental Box)-----

4. Consequently, this opinion has been established in respect of the following parts of the international application:

- ☐ all parts
- ☒ the parts relating to claims Nos. 1-6

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 12/45784

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-6	YES
	Claims	None	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-6	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-6	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1-6 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over US 2010/0120664 A1 to Schulte et al. (hereinafter "Schulte").

As to claim 1, Schulte teaches a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0075], [0145], [0162]), comprising administering to the subject a therapeutic dose (para [0145]) of a chimeric polypeptide comprising a Factor VIII portion and a second portion (para [0111], [0164] - Factor VIII fused to albumin), wherein said Factor VIII portion comprises processed Factor VIII (para [0085]), which has two chains, a first chain comprising a heavy chain and a second chain comprising a light chain, wherein said first chain and said second chain are associated by a metal bond (para [0062]). Schulte does not expressly state that the chimeric polypeptide is administered at a dosing interval at least about one and one-half times longer than the dosing interval for an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion. However, Schulte does teach a dosing interval for normal Factor VIII, and that said Factor VIII has a short half-life (para [0009]), and further teaches that it would be highly desirable to create a Factor VIII with increased functional half-life, which could be administered less frequently (para [0010]). Schulte further teaches that Factor VIII fused to albumin extends the Factor VIII half-life 2-3-fold (para [0182]). Thus, based on its 2-3-fold extended half-life, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the disclosed Factor VIII-albumin fusion could be administered at a dosing interval at least about one and one-half times longer than the dosing interval for an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion. Further, determination of appropriate dosing was routine and well known in the art as appropriate practice at the time of the invention and would have been obvious to one of ordinary skill in the art.

As to claims 2-3, Schulte teaches that the Factor VIII portion of the chimeric polypeptide is processed Factor VIII (para [0062], [0085]), but does not expressly state that at least about 50% or about 100% of the Factor VIII portion of the chimeric polypeptide is processed Factor VIII. However, it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that it would be preferable to use a uniform preparation of the chimeric polypeptide, as it was routine in the art to administer pure forms of polypeptide. Accordingly, it would have been obvious that about 100% of the Factor VIII portion of the chimeric polypeptide is processed Factor VIII.

As to claim 4, Schulte teaches that said Factor VIII portion comprises single chain Factor VIII, which is a single chain (para [0115]).

As to claim 5, Schulte teaches that said single chain Factor VIII contains an intact intracellular processing site (para [0107] - "This can by way of non-limiting example be achieved by maintaining the cleavage sites for thrombin at amino acid position 740 of the FVIII sequence (SEQ ID NO 2) and for the protease cleaving between the B domain and the A3 domain during the secretion process.").

As to claim 6, Schulte teaches that said intracellular processing site corresponds to Arginine at residue 1648 of full-length Factor VIII (para [0107] - "This can by way of non-limiting example be achieved by maintaining the cleavage sites...for the protease cleaving between the B domain and the A3 domain"; para [0116]; Fig. 1a - cleavage site between B domain and A3 domain is located at Arginine 1648).

Claims 1-6 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 12/45784

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:

Box IV.3. Lack of Unity of Invention:

The inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single inventive concept under Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the Groups are delineated as above. The shared technical feature of all the groups is a chimeric polypeptide having Factor VIII activity. This is not an improvement over the prior art of US 2005/0118684 A1 to LOLLAR that teaches a composition comprising a chimeric polypeptide (para [0074]) having factor VIII activity (para [0030], [0042]). Groups I, IV-VII and IX-XII further share administration of a chimeric polypeptide with FcVIII activity. Likewise this is not an improvement over the prior art of Lollar that teaches administration of a chimeric polypeptide with FcVIII activity (para [0101]). Groups II and III further share the special technical features of a chimeric polypeptide having Factor VIII activity, wherein at least about 30%, about 40%, about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 90%, about 95%, about 96%, about 97%, about 98%, about 99%, or about 100% of said polypeptide comprises a Factor VIII portion, which is single chain Factor VIII, and a second portion, wherein said single chain Factor VIII is at least 90% or 95% identical to a Factor VIII amino acid sequence shown in Table 2. Like wise this is not an improvement over the prior art of Lollar that further teaches a chimeric polypeptide (para [0074]) having factor VIII activity (para [0042]), wherein the polypeptide comprises a Factor VIII portion, which is single chain Factor VIII (para [0024], [0074]), and a second portion (para [0074]), wherein said single chain Factor VIII is at least 95% identical to a Factor VIII amino acid sequence shown in Table 2 with a signal sequence (para [0024], [0074]; SEQ ID NO:13, which is 100% identical to amino acids 1-1457 of claimed SEQ ID NO:2). Lollar does not expressly teach that at least about 30% of said polypeptide comprises the Factor VIII portion. However, the percentage of the chimeric polypeptide encompassed by the Factor VIII portion would be determined by the size of the second portion, and it would have been obvious that methods for determining the optimal percentage of the chimeric polypeptide encompassed by the Factor VIII portion were routine in the art, and one of skill in the art would have arrived at the claimed percentage via routine experimentation. These shared features are not required by any of the other Groups.

Groups II and III differ in that Group II requires the chimeric polypeptide having Factor VIII activity without a signal sequence and Group III requires the chimeric polypeptide having Factor VIII activity with a signal sequence. Neither are required for any of the other Groups.

Group IV further requires administering a therapeutically effective amount of rFVIII-Fc wherein the therapeutically effective amount is at least 25 IU/kg of rFVIII-Fc and wherein at least 90% of said population maintains the Factor VIII trough level at least 1 % or more. This is not required by any of the other groups.

Group V further requires administering to the subject an effective amount of a long-acting Factor VIII (FVIII) protein, wherein the subject expresses a high level of von Willebrand Factor (VWF) in plasma which is not required by any of the other Groups.

Groups VI and IX share the special technical feature of measuring the half-life of FVIII-Fc in a subject. Likewise, this is not an improvement over the prior art of US 2010/0120664 A1 to SCHULTE et al. (hereinafter Schulte) that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte further teaches a method of measuring the half-life of a mutant FVIII in a subject as compared to a short-acting FVIII (wild-type FVIII, also referred to as Helixate) (see Example 6, para [0181]-[0183], Table 3, Fig. 3) and FVIII-Fc (para [0121]) has an extended half-life (para [0122]). It would have been readily obvious to one of ordinary skill in the art to perform the same half-life assay using any known form of chimeric, administered FVIII, including FVIII-Fc in order to monitor efficacy of the treatment as routine.

Groups VI, VII, and XII have the shared technical feature of a dosing interval of at least three days. Likewise, this is not an improvement over the prior art of Schulte that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte does not teach that the Factor VIII is administered at a dosing interval of about every three days or longer. However, Schulte does teach that the disclosed modified Factor VIII polypeptides have an enhanced in vivo half-life (para [0025]), which would allow a more spread-out dosing schedule than wild-type Factor III. Methods for determining the optimal dosing schedule were routine in the art, and one of skill in the art would have arrived at the claimed dosing schedule via routine experimentation.

Groups VII and X have the shared technical feature of measuring the half-life of a short-acting FVIII. Likewise, this is not an improvement over the prior art of Schulte that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte further teaches a method of measuring the half-life of a mutant FVIII in a subject as compared to a short-acting FVIII (wild-type FVIII, also referred to as Helixate) (see Example 6, para [0181]-[0183], Table 3, Fig. 3).

Group VII further requires the a half-life that is at least about 1.2 times greater than the half-life of said short-acting FVIII in a subject having average VWF levels indicates that the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other Groups. Which is not required by any of the other Groups.

Group VIII further requires measuring measuring the expression levels of plasma VWF, wherein an VWF expression level of at least 100 IU/dL indicates that the subject is a candidate for long interval dosing using a long-acting FVIII polypeptide which is not required by any of the other Groups.

----- (Continued in Supplemental Box) -----

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US 12/45784

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.
Continuation of:

Box IV.3. Lack of Unity of Invention (previous Supplemental Box):

Group IX further requires measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject, wherein a half-life that is at least about 1.2-fold greater than the half-life of FVIII-Fc when administered to a subject having average VWF levels indicates the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other groups.

Group X further requires the half-life of short-acting FVIII in said subject, wherein a half-life that is at least about 1.2-fold greater than the half-life of short-acting FVIII when administered to a subject having average VWF levels indicates the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other groups.

Group XI further requires administering Factor VIII to a human subject in need thereof, to obtain an area under the plasma concentration versus time curve (AUC) at least about one and one-quarter times greater than the AUC obtained by an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion which is not required by any of the other Groups.

Therefore the inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because they do not share a same or corresponding special technical feature. This ISA will establish the ISR for the first Group mentioned, specifically, Group I claims 1-6 without additional fees. In order for all inventions to be examined, the appropriate examination fees must be paid.

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO WEY y/o ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Los abajo firmados,

Biogen Idec Hemophilia Inc.

con domicilio en

9 Fourth Avenue

Waltham, Massachusetts 02451, EE.UU.

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en **todos los trámites relativos a la propiedad industrial de la solicitud de Fase Nacional de la Solicitud Internacional PCT/US2010/059136**, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o ANA MARIA CASTRO y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado
The undersigned,

[JLLCCO: 370302.DOC v.1]

Biogen Idec Hemophilia Inc.

domiciled at

9 Fourth Avenue

Waltham, Massachusetts 02451, EE.UU.

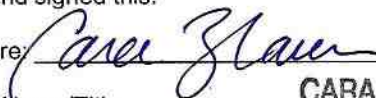
hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in **all proceedings pertaining to industrial property for national Phase of International Application PCT/US2010/059136**, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or ANA MARIA CASTRO and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this:

Signature:



Printed Name/Title:

CARA LOWEN

ASSISTANT SECRETARY
Date: 9/5/2012 ASSOCIATE GENERAL COUNSEL



- (51) **International Patent Classification:**
A61K 38/37 (2006.01) *C07K 14/755* (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/US2012/045784
- (22) **International Filing Date:**
6 July 2012 (06.07.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
- | | | |
|------------|--------------------------------|----|
| 61/506,015 | 8 July 2011 (08.07.2011) | US |
| 61/522,647 | 11 August 2011 (11.08.2011) | US |
| 61/541,561 | 30 September 2011 (30.09.2011) | US |
| 61/569,158 | 9 December 2011 (09.12.2011) | US |
| 61/586,443 | 13 January 2012 (13.01.2012) | US |
| 61/622,789 | 11 April 2012 (11.04.2012) | US |
| 61/657,641 | 8 June 2012 (08.06.2012) | US |
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC. [US/US]; 9 Fourth Avenue, Waltham, Massachusetts 02451 (US).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants (for US only):** DUMONT, Jennifer A. [US/US]; 37 Fawn Terrace Lane, Groton, Massachusetts 01450 (US). LOW, Susan [GB/US]; 86 Brookline Street, Pepperill, Massachusetts 01463 (US). BITONTI, Alan, J. [US/US]; 32 Carlton Drive, Acton, Massachusetts 01720 (US). PIERCE, Glenn [US/US]; PO Box 675486, Rancho Santa Fe, California 92067 (US). LUK, Alvin [US/US]; 101 Canal Street N907, Boston, Massachusetts 02114-1897 (US). JIANG, Haiyan [US/US]; 3 Bayberry Lane, Belmont, Massachusetts 02478 (US). MCKINNEY, Byron [US/US]; 7234 Shoreline Drive #156, San Diego, California 92122 (US). OTTMER, Matt [US/US]; 112 Gibbs Street, Newton, Massachusetts 02459 (US). SOMMER, Jurg [US/US]; 30 Hampshire Road, Wayland, Massachusetts 01778 (US). NUGENT, Karen [GB/GB]; Owlswick Farmhouse, Buckinghamshire Owlswick,

Princes Risborough, HP279RH (GB). LI, Lian [CN/US]; 10 Carol Lane, Lexington, Massachusetts 02420 (US). PETERS, Robert [US/US]; 51 New Filed Street, West Roxbury, Massachusetts 02132 (US).

(74) **Agents:** STEFFE, Eric K. et al.; Sterne Kessler Goldstein & Fox PLLC, 1100 New York Avenue, N.W., Washington, District of Columbia 20005 (US).

(81) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of national protection available*): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States** (*unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available*): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

- with international search report (Art. 21(3))
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))
- with sequence listing part of description (Rule 5.2(a))

(88) **Date of publication of the international search report:**

7 March 2013

(54) **Title:** FACTOR VIII CHIMERIC AND HYBRID POLYPEPTIDES, AND METHODS OF USE THEREOF

(57) **Abstract:** The present invention provides methods of administering Factor VIII (processed FVIII, single chain FVIII, or a combination thereof); methods of administering chimeric and hybrid polypeptides comprising Factor VIII; chimeric and hybrid polypeptides comprising Factor VIII; polynucleotides encoding such chimeric and hybrid polypeptides; cells comprising such polynucleotides; and methods of producing such chimeric and hybrid polypeptides using such cells



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/37; C07K 14/755 (2012.01)

USPC - 514/14.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC: 514/14.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC: 514/14.1, 13.7, 13.5, 1.1; 435/69.7, 69.1, 41; 424/184.1, 192.1

(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase; Google; PubMed

Search terms: Factor VIII, FVIII, fusion, chimeric, chain, metal, half-life, administer, Arg1648

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0120664 A1 (SCHULTE et al.) 13 May 2010 (13.05.2010) para [0009]-[0010], [0062], [0075], [0085], [0107], [0111], [0115]-[0116], [0145], [0162], [0164], [0182]; Fig. 1a	1-6
A	US 2005/0118684 A1 (LOLLAR) 02 June 2005 (02.06.2005) para [0024], [0030], [0042], [0074], [0101].	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 December 2012 (05.12.2012)

Date of mailing of the international search report

21 DEC 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 7-38, 49-80, 83-102, 107-149, 153-155, 158-184, 191-218, 223-244, and 250-264
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I claims 1-6 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof.

Group II claims 39, 40, 47, and 48 and dependent claims 43-46 directed to a composition comprising a chimeric polypeptide having Factor VIII activity without a signal sequence.

Group III claims 41 and 42 and dependent claims 43-46 directed to a composition comprising a chimeric polypeptide having Factor VIII activity with a signal sequence.

----- (Continued on extra sheet) -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box III (observations where unity of invention is lacking):

Group IV claims 81 and 82 directed to a method of maintaining Factor VIII in a patient population at a specified level comprising administering a therapeutically effective amount of rFVIII-Fc.

Group V claims 103-106 a method of preventing, decreasing, or treating a bleeding episode in a subject comprising administering to the subject an effective amount of a long-acting Factor VIII (FVIII) protein, wherein the subject expresses a high level of von Willebrand Factor (VWF) in plasma.

Group VI claims 150-152 directed to a method of treating a subject diagnosed with bleeding disorder, comprising measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject.

Group VII claims 156 and 157 directed to a method of treating a subject diagnosed with bleeding disorder, comprising measuring the half-life of a short-acting FVIII administered to said subject.

Group VIII claims 185 and 186 directed to a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing with a long-acting FVIII polypeptide comprising measuring the expression levels of plasma VWF.

Group IX claims 187 and 188 directed to a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing with a long-acting FVIII polypeptide comprising measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject.

Group X claims 189 and 190 a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing of a long-acting FVIII polypeptide, comprising measuring the half-life of short-acting FVIII in said subject.

Group XI claims 219-222 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof, to obtain an area under the plasma concentration versus time curve (AUC) at least about one and one-quarter times greater than the AUC obtained by an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion.

Group XII claims 245-249 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof.

The inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single inventive concept under Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the Groups are delineated as above. The shared technical feature of all the groups is a chimeric polypeptide having Factor VIII activity. This is not an improvement over the prior art of US 2005/0118684 A1 to LOLLAR that teaches a composition comprising a chimeric polypeptide (para [0074]) having factor VIII activity (para [0030], [0042]). Groups I, IV-VII and IX-XII further share administration of a chimeric polypeptide with FcVIII activity. Likewise this is not an improvement over the prior art of Lollar that teaches administration of a chimeric polypeptide with FcVIII activity (para [0101]). Groups II and III further share the special technical features of a chimeric polypeptide having Factor VIII activity, wherein at least about 30%, about 40%, about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 90%, about 95%, about 96%, about 97%, about 98%, about 99%, or about 100% of said polypeptide comprises a Factor VIII portion, which is single chain Factor VIII, and a second portion, wherein said single chain Factor VIII is at least 90% or 95% identical to a Factor VIII amino acid sequence shown in Table 2. Like wise this is not an improvement over the prior art of Lollar that further teaches a chimeric polypeptide (para [0074]) having factor VIII activity (para [0042]), wherein the polypeptide comprises a Factor VIII portion, which is single chain Factor VIII (para [0024], [0074]), and a second portion (para [0074]), wherein said single chain Factor VIII is at least 95% identical to a Factor VIII amino acid sequence shown in Table 2 with a signal sequence (para [0024], [0074]; SEQ ID NO:13, which is 100% identical to amino acids 1-1457 of claimed SEQ ID NO:2). Lollar does not expressly teach that at least about 30% of said polypeptide comprises the Factor VIII portion. However, the percentage of the chimeric polypeptide encompassed by the Factor VIII portion would be determined by the size of the second portion, and it would have been obvious that methods for determining the optimal percentage of the chimeric polypeptide encompassed by the Factor VIII portion were routine in the art, and one of skill in the art would have arrived at the claimed percentage via routine experimentation. These shared features are not required by any of the other Groups.

Groups II and III differ in that Group II requires the chimeric polypeptide having Factor VIII activity without a signal sequence and Group III requires the chimeric polypeptide having Factor VIII activity with a signal sequence. Neither are required for any of the other Groups.

Group IV further requires administering a therapeutically effective amount of rFVIII-Fc wherein the therapeutically effective amount is at least 25 IU/kg of rFVIII-Fc and wherein at least 90% of said population maintains the Factor VIII trough level at least 1 % or more. This is not required by any of the other groups.

Group V further requires administering to the subject an effective amount of a long-acting Factor VIII (FVIII) protein, wherein the subject expresses a high level of von Willebrand Factor (VWF) in plasma which is not required by any of the other Groups.

Groups VI and IX share the special technical feature of measuring the half-life of FVIII-Fc in a subject. Likewise, this is not an improvement over the prior art of US 2010/0120664 A1 to SCHULTE et al. (hereinafter Schulte) that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte further teaches a method of measuring the half-life of a mutant FVIII in a subject as compared to a short-acting FVIII (wild-type FVIII, also referred to as Helixate) (see Example 6, para [0181]-[0183], Table 3, Fig. 3) and FVIII-Fc (para [0121]) has an extended half-life (para [0122]). It would have been readily obvious to one of ordinary skill in the art to perform the same half-life assay using any known form of chimeric, administered FVIII, including FVIII-Fc in order to monitor efficacy of the treatment as routine.

----- (Continued on extra sheet) -----

Continuation of Box III (observations where unity of invention is lacking) (previous extra sheet):

Groups VI, VII, and XII have the shared technical feature of a dosing interval of at least three days. Likewise, this is not an improvement over the prior art of Schulte that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte does not teach that the Factor VIII is administered at a dosing interval of about every three days or longer. However, Schulte does teach that the disclosed modified Factor VIII polypeptides have an enhanced in vivo half-life (para [0025]), which would allow a more spread-out dosing schedule than wild-type Factor III. Methods for determining the optimal dosing schedule were routine in the art, and one of skill in the art would have arrived at the claimed dosing schedule via routine experimentation.

Groups VII and X have the shared technical feature of measuring the half-life of a short-acting FVIII. Likewise, this is not an improvement over the prior art of Schulte that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte further teaches a method of measuring the half-life of a mutant FVIII in a subject as compared to a short-acting FVIII (wild-type FVIII, also referred to as Helixate) (see Example 6, para [0181]-[0183], Table 3, Fig. 3).

Group VII further requires the a half-life that is at least about 1.2 times greater than the half-life of said short-acting FVIII in a subject having average VWF levels indicates that the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other Groups. Which is not required by any of the other Groups.

Group VIII further requires measuring the expression levels of plasma VWF, wherein an VWF expression level of at least 100 IU/dL indicates that the subject is a candidate for long interval dosing using a long-acting FVIII polypeptide which is not required by any of the other Groups.

Group IX further requires measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject, wherein a half-life that is at least about 1.2-fold greater than the half-life of FVIII-Fc when administered to a subject having average VWF levels indicates the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other groups.

Group X further requires the half-life of short-acting FVIII in said subject, wherein a half-life that is at least about 1.2-fold greater than the half-life of short-acting FVIII when administered to a subject having average VWF levels indicates the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other groups.

Group XI further requires administering Factor VIII to a human subject in need thereof, to obtain an area under the plasma concentration versus time curve (AUC) at least about one and one-quarter times greater than the AUC obtained by an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion which is not required by any of the other Groups.

Therefore the inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because they do not share a same or corresponding special technical feature. This ISA will establish the ISR for the first Group mentioned, specifically, Group I claims 1-6 without additional fees. In order for all inventions to be examined, the appropriate examination fees must be paid.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 2159.354PC07	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 12/45784	International filing date (<i>day/month/year</i>) 06 July 2012 (06.07.2012)	(Earliest) Priority Date (<i>day/month/year</i>) 08 July 2011 (08.07.2011)
Applicant BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☒ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:
- a. (means)
- ☐ on paper
- ☒ in electronic form
- b. (time)
- ☐ in the international application as filed
- ☒ together with the international application in electronic form
- ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☒ Claims Nos.: 7-38, 49-80, 83-102, 107-149, 153-155, 158-184, 191-218, 223-244, and 250-264
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I claims 1-6 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof.

Group II claims 39, 40, 47, and 48 and dependent claims 43-46 directed to a composition comprising a chimeric polypeptide having Factor VIII activity without a signal sequence.

Group III claims 41 and 42 and dependent claims 43-46 directed to a composition comprising a chimeric polypeptide having Factor VIII activity with a signal sequence.

----- (Continued on extra sheet) -----

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 38/37; C07K 14/755 (2012.01)

USPC - 514/14.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC: 514/14.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

USPC: 514/14.1, 13.7, 13.5, 1.1; 435/69.7, 69.1, 41; 424/184.1, 192.1

(keyword limited; terms below)

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PatBase; Google; PubMed

Search terms: Factor VIII, FVIII, fusion, chimeric, chain, metal, half-life, administer, Arg1648

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0120664 A1 (SCHULTE et al.) 13 May 2010 (13.05.2010) para [0009]-[0010], [0062], [0075], [0085], [0107], [0111], [0115]-[0116], [0145], [0162], [0164], [0182]; Fig. 1a	1-6
A	US 2005/0118684 A1 (LOLLAR) 02 June 2005 (02.06.2005) para [0024], [0030], [0042], [0074], [0101].	1-6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

05 December 2012 (05.12.2012)

Date of mailing of the international search report

21 DEC 2012

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

Continuation of Box III (observations where unity of invention is lacking):

Group IV claims 81 and 82 directed to a method of maintaining Factor VIII in a patient population at a specified level comprising administering a therapeutically effective amount of rFVIII-Fc.

Group V claims 103-106 a method of preventing, decreasing, or treating a bleeding episode in a subject comprising administering to the subject an effective amount of a long-acting Factor VIII (FVIII) protein, wherein the subject expresses a high level of von Willebrand Factor (VWF) in plasma.

Group VI claims 150-152 directed to a method of treating a subject diagnosed with bleeding disorder, comprising measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject.

Group VII claims 156 and 157 directed to a method of treating a subject diagnosed with bleeding disorder, comprising measuring the half-life of a short-acting FVIII administered to said subject.

Group VIII claims 185 and 186 directed to a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing with a long-acting FVIII polypeptide comprising measuring the expression levels of plasma VWF.

Group IX claims 187 and 188 directed to a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing with a long-acting FVIII polypeptide comprising measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject.

Group X claims 189 and 190 a method for determining whether a subject diagnosed with bleeding disorder is a candidate for long interval dosing of a long-acting FVIII polypeptide, comprising measuring the half-life of short-acting FVIII in said subject.

Group XI claims 219-222 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof, to obtain an area under the plasma concentration versus time curve (AUC) at least about one and one-quarter times greater than the AUC obtained by an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion.

Group XII claims 245-249 directed to a method of administering Factor VIII to a human subject in need thereof.

The inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single inventive concept under Rule 13.1 because under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The special technical features of the Groups are delineated as above. The shared technical feature of all the groups is a chimeric polypeptide having Factor VIII activity. This is not an improvement over the prior art of US 2005/0118684 A1 to LOLLAR that teaches a composition comprising a chimeric polypeptide (para [0074]) having factor VIII activity (para [0030], [0042]). Groups I, IV-VII and IX-XII further share administration of a chimeric polypeptide with FcVIII activity. Likewise this is not an improvement over the prior art of Lollar that teaches administration of a chimeric polypeptide with FcVIII activity (para [0101]). Groups II and III further share the special technical features of a chimeric polypeptide having Factor VIII activity, wherein at least about 30%, about 40%, about 50%, about 60%, about 70%, about 80%, about 90%, about 95%, about 96%, about 97%, about 98%, about 99%, or about 100% of said polypeptide comprises a Factor VIII portion, which is single chain Factor VIII, and a second portion, wherein said single chain Factor VIII is at least 90% or 95% identical to a Factor VIII amino acid sequence shown in Table 2. Like wise this is not an improvement over the prior art of Lollar that further teaches a chimeric polypeptide (para [0074]) having factor VIII activity (para [0042]), wherein the polypeptide comprises a Factor VIII portion, which is single chain Factor VIII (para [0024], [0074]), and a second portion (para [0074]), wherein said single chain Factor VIII is at least 95% identical to a Factor VIII amino acid sequence shown in Table 2 with a signal sequence (para [0024], [0074]; SEQ ID NO:13, which is 100% identical to amino acids 1-1457 of claimed SEQ ID NO:2). Lollar does not expressly teach that at least about 30% of said polypeptide comprises the Factor VIII portion. However, the percentage of the chimeric polypeptide encompassed by the Factor VIII portion would be determined by the size of the second portion, and it would have been obvious that methods for determining the optimal percentage of the chimeric polypeptide encompassed by the Factor VIII portion were routine in the art, and one of skill in the art would have arrived at the claimed percentage via routine experimentation. These shared features are not required by any of the other Groups.

Groups II and III differ in that Group II requires the chimeric polypeptide having Factor VIII activity without a signal sequence and Group III requires the chimeric polypeptide having Factor VIII activity with a signal sequence. Neither are required for any of the other Groups.

Group IV further requires administering a therapeutically effective amount of rFVIII-Fc wherein the therapeutically effective amount is at least 25 IU/kg of rFVIII-Fc and wherein at least 90% of said population maintains the Factor VIII trough level at least 1 % or more. This is not required by any of the other groups.

Group V further requires administering to the subject an effective amount of a long-acting Factor VIII (FVIII) protein, wherein the subject expresses a high level of von Willebrand Factor (VWF) in plasma which is not required by any of the other Groups.

Groups VI and IX share the special technical feature of measuring the half-life of FVIII-Fc in a subject. Likewise, this is not an improvement over the prior art of US 2010/0120664 A1 to SCHULTE et al. (hereinafter Schulte) that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte further teaches a method of measuring the half-life of a mutant FVIII in a subject as compared to a short-acting FVIII (wild-type FVIII, also referred to as Helixate) (see Example 6, para [0181]-[0183], Table 3, Fig. 3) and FVIII-Fc (para [0121]) has an extended half-life (para [0122]). It would have been readily obvious to one of ordinary skill in the art to perform the same half-life assay using any known form of chimeric, administered FVIII, including FVIII-Fc in order to monitor efficacy of the treatment as routine.

----- (Continued on extra sheet) -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/45784

Continuation of Box III (observations where unity of invention is lacking) (previous extra sheet):

Groups VI, VII, and XII have the shared technical feature of a dosing interval of at least three days. Likewise, this is not an improvement over the prior art of Schulte that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte does not teach that the Factor VIII is administered at a dosing interval of about every three days or longer. However, Schulte does teach that the disclosed modified Factor VIII polypeptides have an enhanced in vivo half-life (para [0025]), which would allow a more spread-out dosing schedule than wild-type Factor III. Methods for determining the optimal dosing schedule were routine in the art, and one of skill in the art would have arrived at the claimed dosing schedule via routine experimentation.

Groups VII and X have the shared technical feature of measuring the half-life of a short-acting FVIII. Likewise, this is not an improvement over the prior art of Schulte that teaches administering Factor VIII to a human subject in need thereof (para [0145]), comprising administering to the subject a therapeutic dose of a polypeptide comprising a Factor VIII and an Fc (para [0121], [0145], [0162]). Schulte further teaches a method of measuring the half-life of a mutant FVIII in a subject as compared to a short-acting FVIII (wild-type FVIII, also referred to as Helixate) (see Example 6, para [0181]-[0183], Table 3, Fig. 3).

Group VII further requires the a half-life that is at least about 1.2 times greater than the half-life of said short-acting FVIII in a subject having average VWF levels indicates that the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other Groups. Which is not required by any of the other Groups.

Group VIII further requires measuring the expression levels of plasma VWF, wherein an VWF expression level of at least 100 IU/dL indicates that the subject is a candidate for long interval dosing using a long-acting FVIII polypeptide which is not required by any of the other Groups.

Group IX further requires measuring the half-life of FVIII-Fc in said subject, wherein a half-life that is at least about 1.2-fold greater than the half-life of FVIII-Fc when administered to a subject having average VWF levels indicates the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other groups.

Group X further requires the half-life of short-acting FVIII in said subject, wherein a half-life that is at least about 1.2-fold greater than the half-life of short-acting FVIII when administered to a subject having average VWF levels indicates the subject is a candidate for long interval dosing which is not required by any of the other groups.

Group XI further requires administering Factor VIII to a human subject in need thereof, to obtain an area under the plasma concentration versus time curve (AUC) at least about one and one-quarter times greater than the AUC obtained by an equivalent dose of a polypeptide consisting of said Factor VIII portion which is not required by any of the other Groups.

Therefore the inventions listed as Groups I-XII do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because they do not share a same or corresponding special technical feature. This ISA will establish the ISR for the first Group mentioned, specifically, Group I claims 1-6 without additional fees. In order for all inventions to be examined, the appropriate examination fees must be paid.

TRADUCCION OFICIAL No. 2014-01-17-026
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Sello
Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

Subsecretario de Comercio para Propiedad Intelectual y
Director de la Oficina de Patentes y Marcas de los Estados Unidos

1 de mayo de 2012

PTAS

501905382

STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX PLLC
1100 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20005

OFICINA DE MARCAS Y PATENTES DE LOS ESTADOS UNIDOS
NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN DOCUMENTO DE TRASPASO

EL DOCUMENTO ADJUNTO HA SIDO REGISTRADO POR LA DIVISION DE TRASPASOS DE LA OFICINA DE PATENTES Y MARCAS DE LOS ESTADOS UNIDOS. UNA COPIA MICROFILMADA COMPLETA ESTA DISPONIBLE EN LA OFICINA DE BUSQUEDA DE TRASPASOS BAJO LOS NUMEROS DE ROLLO Y MICROFICHA CUYAS REFERENCIAS SE INDICAN A CONTINUACION.

POR FAVOR REVISE TODA LA INFORMACION CONTENIDA EN ESTA NOTIFICACION. LA INFORMACION QUE ESTA NOTIFICACION DE REGISTRO CONTIENE REFLEJA LOS DATOS QUE FIGURAN EN EL SISTEMA DE TRASPASOS DE PATENTES Y MARCAS. SI USTED ENCUENTRA ERRORES O TIENE ALGUNA PREGUNTA RELACIONADA CON ESTA NOTIFICACION, PUEDE COMUNICARSE CON EL EMPLEADO CUYO NOMBRE FIGURA EN ESTA NOTIFICACION EN EL TELEFONO 571-272-3350. POR FAVOR ENVIE SU SOLICITUD DE CORRECCION A: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT DIVISION SERVICES, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

FECHA DE REGISTRO: 04/30/2012

ROLLO /MICROFICHA: 028130 / 0778

NUMERO DE PAGINAS: 15

RESUMEN: TRASPASO DE LOS INTERESES DEL CEDENTE(S) (VER DOCUMENTO PARA
DETALLES). NUMERO DE EXPEDIENTE: 2159.3540000

CEDENTE:

DUMONT, JENNIFER A.

FECHA DEL DOCUMENTO: 09/27/2011

CEDENTE:

LOW, SUSAN

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/30/2012

CEDENTE:

BITONTI, ALAN J.

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/18/2012

CEDENTE:

PIERCE, GLENN

FECHA DEL DOCUMENTO: 09/13/2011

CEDENTE:

LUK, ALVIN

FECHA DEL DOCUMENTO: 12/01/2011

CEDENTE:

JIANG, HAIYAN

FECHA DEL DOCUMENTO: 09/27/2011

CEDENTE:

MCKINNEY, BYRON

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/04/2012

CEDENTE:

OTTMER, MATT

FECHA DEL DOCUMENTO: 12/01/2011

CEDENTE:

SOMMER, JURG

FECHA DEL DOCUMENTO: 01/18/2012

CEDENTE:

NUGENT, KAREN

FECHA DEL DOCUMENTO: 12/16/2011

CEDENTE:

LI, LIAN

FECHA DEL DOCUMENTO: 09/27/2011

CEDENTE:

PETERS, ROBERT

FECHA DEL DOCUMENTO: 09/27/2011

CESIONARIO:

BIAGEN IDEC HEMOPHILIA INC.

9 FOURTH AVENUE

WALTHAM, MASSACHUSETTS 02451

NUMERO DE SOLICITUD: 61506015

FECHA DE PRESENTACIÓN: 07 / 08 /2011

NUMERO DE PATENTE:

FECHA DE EXPEDICIÓN:

TITULO: POLIPÉPTIDOS QUIMÉRICOS E HÍBRIDOS DEL FACTOR VIII, Y SUS MÉTODOS DE
USO

SUCURSAL DE SERVICIOS DE TRASPASOS

DIVISION DE REGISTROS PUBLICOS

TRASPASO

Por una valiosa consideración, nosotros, Jennifer A. DUMONT, de Cambridge, MA; Susan LOW, de Cambridge, MA; Alan J. BITONTI, de Cambridge, MA; Glenn PIERCE, de Cambridge, MA; Alvin LUK, de Cambridge, MA; Haiyan JIANG, de Cambridge, MA; Byron MCKINNEY, de Cambridge, MA; Matt OTTMER, de Cambridge, MA; Jurg SOMMER, de Cambridge, MA; Karen NUGENT, de Cambridge, MA; Lian LI, de Cambridge, MA; y Robert PETERS, de Cambridge, MA; por el traspasamos a Biogen Idec Hemophilia Inc., una sociedad de Delaware con domicilio en:

9 Fourth Avenue

Waltham, Massachusetts 02451,

y a sus sucesores y cesionarios (colectivamente en adelante llamados “el Cesionario”), todo nuestro derecho, título e interés en todo el mundo en las invenciones y mejoras que son objeto de una solicitud para Patente de los Estados Unidos llamada Polipéptidos Quiméricos e Híbridos del Factor VIII, y sus Métodos de Uso, presentada el 8 de julio de 2011, y a la que se le asignó Número de Solicitud de los EE.UU. 61/506,015, este traspaso incluyendo dicha solicitud, cualquiera y todas las patentes de utilidad y solicitudes de patente de los Estados Unidos y extranjeras, incluyendo continuación, continuación en parte, divisional, reexpedición y solicitudes de reexamen, modelos de utilidad y registros de diseño otorgados para cualquiera de dichas invenciones o mejoras, y el derecho a reivindicar prioridad con base en la fecha de presentación de dicha solicitud bajo la Convención Internacional para la Protección de Propiedad Industrial, el Tratado de Cooperación de Patentes, la Convención Europea de Patentes, y todos los otros tratados de propósito semejante; y nosotros autorizamos al Cesionario para que solicite en todos los países en nombre nuestro o en su propio nombre patentes, modelos de utilidad, registros de diseño y derechos semejantes de exclusión y certificados de inventores para dichas invenciones y mejoras; y nosotros acordamos para nosotros mismos y nuestros herederos, representantes legales y cesionarios respectivos, sin compensación adicional llevar a cabo dichos actos legítimos y firmar dichas solicitudes, traspasos, Declaraciones Preliminares adicionales y otros documentos legítimos según el Cesionario pudiese solicitar razonablemente para efectuar completamente este traspaso.

FECHA: 27 de septiembre de 2011

(firma: ilegible)

Jennifer A. DUMONT

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 27 de septiembre de 2011, compareció personalmente Jennifer A. DUMONT quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Laura R. Almada
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 16 de marzo de 2018

FECHA: 1 / 30 / 12

(firma: ilegible)

Susan LOW

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 30 de enero de 2012, compareció personalmente Susan LOW quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de Licencia de Conducción de Massachusetts, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira: 17 de junio de 2016

[Sello Notarial]

Melody Natal
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 17 de junio de 2016

FECHA: 18 de enero de 2012

(firma: ilegible)

Alan J. BITONTI

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 18 de enero de 2012, compareció personalmente Alan J. BITONTI quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de licencia de conducción, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Laura R. Almada
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 16 de marzo de 2018

FECHA: 13 de septiembre de 2011

(firma: ilegible)

Glenn PIERCE

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 13 de septiembre de 2011, compareció personalmente Glenn PIERCE quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Michelle Raddi
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 18 de abril de 2014

FECHA: 01 de diciembre de 2011

(firma: ilegible)

Alan LUK

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 1 de diciembre de 2011, compareció personalmente Alan LUK quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Michelle Raddi
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 18 de abril de 2014

FECHA: 27 de septiembre de 2011

(firma: ilegible)

Haiyan JIANG

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 27 de septiembre de 2011, compareció personalmente Haiyan JIANG quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Laura R. Almada
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 16 de marzo de 2018

FECHA: 1 / 4 / 2012

(firma: ilegible)

Byron MCKINNEY

Estado de California)

Condado de San Diego) SS.

Ante mí, este día 4 de enero de 2012, compareció personalmente Byron MCKINNEY quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de Licencia de Conducción de California, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira: 11/13/2014

[Sello Notarial]

Jefferson P. Moore
Nombramiento # 1913176
Notario Público - California
Condado de San Diego
Mi Nombramiento Expira el 13 de noviembre de 2014

FECHA: 12 / 1 / 11

(firma: ilegible)

Matt OTTMER

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 1 de diciembre de 2011, compareció personalmente Matt OTTMER quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Michelle Raddi
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 18 de abril de 2014

FECHA: 18 de enero de 2012

(firma: ilegible)

Jurg SOMMER

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 18 de enero de 2012, compareció personalmente Jurg SOMMER quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de licencia de conducción, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Laura R. Almada
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 16 de marzo de 2018

EN TESTIMONIO DE LO CUAL, ejecutado por el inventor suscrito en la fecha frente a su nombre.

FECHA: 16 de diciembre de 2011

Firma del Inventor: (ilegible)
Karen NUGENT

Testificado ante mí:

Firma del Testigo: (ilegible)

Fecha: 16 de diciembre de 2011

Nombre: (ilegible)

Firma del Testigo: (ilegible)

Fecha: 16 de diciembre de 2011

Nombre: (ilegible)

FECHA: 27 de septiembre de 2011

(firma: ilegible)
Lian LI

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 27 de septiembre de 2011, compareció personalmente Lian LI quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Laura R. Almada
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 16 de marzo de 2018

FECHA: 27 de septiembre de 2011

(firma: ilegible)

Robert PETERS

Estado de Massachusetts)

Condado de Middlesex) SS.

Ante mí, este día 27 de septiembre de 2011, compareció personalmente Robert PETERS quien sé que es la persona cuyo nombre está suscrito en el Traspaso anterior, quien me demostró por medio de evidencia satisfactoria de identificación en la forma de ID de la Compañía, y reconoció que ella suscribió el mismo como su acto y acción libres para los fines ahí contenidos.

(firma: ilegible)

Notario Público

Mi Nombramiento Expira:

[Sello Notarial]

Laura R. Almada
Notario Público
Mancomunidad de Massachusetts
Mi Nombramiento Expira el 16 de marzo de 2018

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 17 de enero de 2014, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNDER SECRETARY OF COMMERCE FOR INTELLECTUAL PROPERTY AND
DIRECTOR OF THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

MAY 1, 2012

PTAS

STERNE, KESSLER, GOLDSTEIN & FOX PLLC
1100 NEW YORK AVENUE, NW
WASHINGTON, DC 20005

501905382

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH AT 571-272-3350. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, MAIL STOP: ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH, P.O. BOX 1450, ALEXANDRIA, VA 22313.

RECORDATION DATE: 04/30/2012

REEL/FRAME: 028130/0778
NUMBER OF PAGES: 15

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNORS INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

DOCKET NUMBER: 2159.3540000

ASSIGNOR:

DUMONT, JENNIFER A.

DOC DATE: 09/27/2011

ASSIGNOR:

LOW, SUSAN

DOC DATE: 01/30/2012

ASSIGNOR:

BITONTI, ALAN J.

DOC DATE: 01/18/2012

ASSIGNOR:

PIERCE, GLENN

DOC DATE: 09/13/2011

ASSIGNOR:

LUK, ALVIN

DOC DATE: 12/01/2011

ASSIGNOR:

JIANG, HAIYAN

DOC DATE: 09/27/2011

ASSIGNOR:

MCKINNEY, BYRON

DOC DATE: 01/04/2012

ASSIGNOR:
OTTMER, MATT

DOC DATE: 12/01/2011

ASSIGNOR:
SOMMER, JURG

DOC DATE: 01/18/2012

ASSIGNOR:
NUGENT, KAREN

DOC DATE: 12/16/2011

ASSIGNOR:
LI, LIAN

DOC DATE: 09/27/2011

ASSIGNOR:
PETERS, ROBERT

DOC DATE: 09/27/2011

ASSIGNEE:
BIOGEN IDEC HEMOPHILIA INC.
9 FOURTH AVENUE
WALTHAM, MASSACHUSETTS 02451

APPLICATION NUMBER: 61506015

FILING DATE: 07/08/2011

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE: FACTOR VIII CHIMERIC AND HYBRID POLYPEPTIDES, AND METHODS OF USE
THEREOF

ASSIGNMENT RECORDATION BRANCH
PUBLIC RECORDS DIVISION

ASSIGNMENT

For valuable consideration, we, Jennifer A. DUMONT, of Cambridge, MA; Susan LOW, of Cambridge, MA; Alan J. BITONTI, of Cambridge, MA; Glenn PIERCE, of Cambridge, MA; Alvin LUK, of Cambridge, MA; Haiyan JIANG, of Cambridge, MA; Byron MCKINNEY, of Cambridge, MA; Matt OTTMER, of Cambridge, MA; JURG SOMMER, of Cambridge, MA; Karen NUGENT, of Cambridge, MA; Lian LI, of Cambridge, MA; and Robert PETERS, of Cambridge, MA; hereby assign to Biogen Idec Hemophilia Inc., a corporation of Delaware having a place of business at:

9 Fourth Avenue
Waltham, Massachusetts 02451,

and its successors and assigns (collectively hereinafter called "the Assignee"), our entire right, title and interest throughout the world in the inventions and improvements which are subject of an application for United States Patent entitled Factor VIII Chimeric and Hybrid Polypeptides, and Methods of Use Thereof, filed July 8, 2011, and assigned U.S. Application Number 61/506,015, this assignment including said application, any and all United States and foreign utility patents and patent applications, including continuation, continuation-in-part, divisional, reissue, and reexamination applications, utility models, and design registrations granted for any of said inventions or improvements, and the right to claim priority based on the filing date of said application under the International Convention for the Protection of Industrial Property, the Patent Cooperation Treaty, the European Patent Convention, and all other treaties of like purposes; and we authorize the Assignee to apply in all countries in our name or in its own name for patents, utility models, design registrations and like rights of exclusion and for inventors' certificates for said inventions and improvements; and we agree for ourselves and our respective heirs, legal representatives and assigns, without further compensation to perform such lawful acts and to sign such further applications, assignments, Preliminary Statements and other lawful documents as the Assignee may reasonably request to effectuate fully this assignment.

DATE: 27 Sept 27

Jennifer A. Dumont
Jennifer A. DUMONT

STATE OF Massachusetts)
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 27 day of September, 20 11, personally appeared Jennifer A. DUMONT known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of Company ID, and acknowledged that she executed the same as her free act and deed for the purposes therein contained.

Laura R. Almada
Notary Public

My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]



LAURA R. ALMADA
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
March 16, 2018

DATE: 1-30-12

Susan Low
Susan LOW

STATE OF MASSACHUSETTS)
COUNTY OF Middlesex) SS.

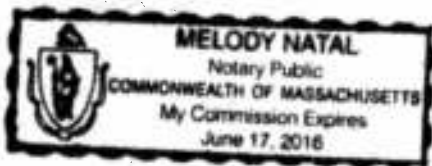
Before me this 30th day of January, 20 12, personally appeared Susan LOW known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of MASS Drivers License, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

M Natal
Notary Public

My Commission Expires:

June 17, 2016

[Notary's Seal Here]



DATE: Jan 18, 2012

Alan J. Bitonti
Alan J. BITONTI

STATE OF Massachusetts)
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 18th day of January, 2012, personally appeared Alan J. BITONTI known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of drivers license, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

Laura R. Almada
Notary Public
My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]

 **LAURA R. ALMADA**
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
March 16, 2018

DATE: 13 Sep 11

Glenn PIERCE
Glenn PIERCE

STATE OF Massachusetts
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 13 day of September, 20 11, personally appeared Glenn PIERCE known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of company id, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

Michelle Raddi

Notary Public

My Commission Expires

[Notary's Seal Here]

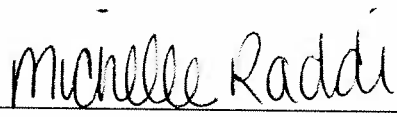


DATE: 01 DEC, 2011


Alvin LUK

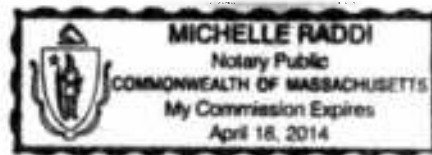
STATE OF Massachusetts
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 1st day of December, 20 11, personally appeared Alvin LUK known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of company id, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.


Notary Public

My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]



DATE: 27 Sept 11

Haiyan JIANG
Haiyan JIANG

STATE OF Massachusetts)
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 27 day of September, 2011, personally appeared Haiyan JIANG known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of Company ID, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

Laura R. Almada
Notary Public

My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]



LAURA R. ALMADA
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
March 16, 2018

DATE: 1/4/2012

Byron MCKINNEY
Byron MCKINNEY

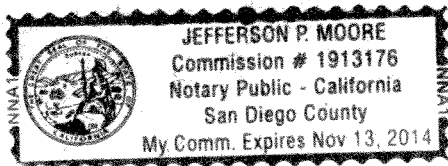
STATE OF California)
) SS.
COUNTY OF San Diego)

Before me this 4th day of January, 20 12, personally appeared Byron MCKINNEY known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of California Drivers License, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

Jefferson P. Moore
Notary Public

My Commission Expires: 11-13-2014

[Notary's Seal Here]



DATE: 12/1/11

Matt Ottmer
Matt OTTMER

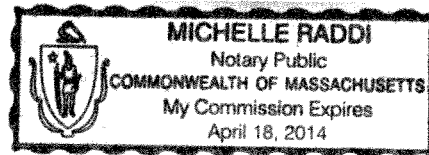
STATE OF Massachusetts
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 1st day of December, 20 11, personally appeared Matt OTTMER known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of company id, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

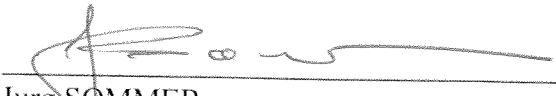
Michelle Raddi
Notary Public

My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]

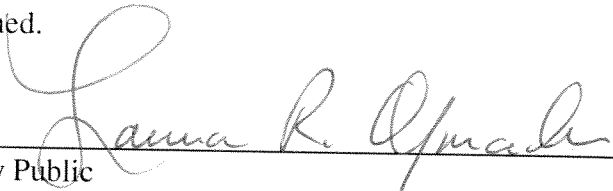


DATE: 18 Jan 2012


Jurg SOMMER

STATE OF Massachusetts)
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 18th day of January, 2012, personally appeared Jurg SOMMER known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of drivers license, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.


Notary Public

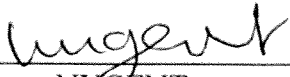
My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]

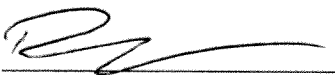


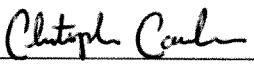
LAURA R. ALMADA
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
March 16, 2018

IN WITNESS WHEREOF, executed by the undersigned inventor on the date opposite her name.

Date: 16 Dec 2011 Signature of Inventor: 
Karen NUGENT

Witnessed before me:

Witness Signature:  Date: 16 / DEC / 2011
Print Name: Debra Dunn

Witness Signature:  Date: 16 / DEC / 2011
Print Name: CHRISTOPHER CARLAN

DATE: 27 Sept 11

Lian LI
Lian LI

STATE OF Massachusetts)
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 27 day of September, 20 11, personally appeared Lian LI known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of Company ID, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

Laura R. Almada
Notary Public

My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]



LAURA R. ALMADA
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
March 16, 2018

DATE: 27 Sept 11

Robert PETERS
Robert PETERS

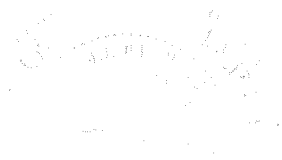
STATE OF Massachusetts)
COUNTY OF Middlesex) SS.

Before me this 27 day of September, 20 11, personally appeared Robert PETERS known to me to be the person whose name is subscribed to the foregoing Assignment, proved to me through satisfactory evidence of identification in the form of Company ID, and acknowledged that he executed the same as his free act and deed for the purposes therein contained.

Laura R. Almada
Notary Public

My Commission Expires:

[Notary's Seal Here]



LAURA R. ALMADA
Notary Public
Commonwealth of Massachusetts
My Commission Expires
March 16, 2018

1400090_1.DOC