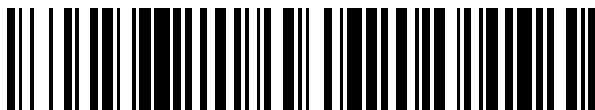


(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 843 642**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/36** (2006.01)

**A61P 7/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.06.2015 E 18153671 (5)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.11.2020 EP 3366305**

(54) Título: **Métodos de tratamiento de TTP con dominios variables únicos de inmunoglobulina y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

**16.06.2014 NL 2013007  
30.07.2014 US 201462030817 P**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.07.2021**

(73) Titular/es:

**ABLYNX NV (100.0%)  
Technologiepark 21  
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE**

(72) Inventor/es:

**DUBY, CHRISTIAN**

(74) Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 843 642 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Métodos de tratamiento de TTP con dominios variables únicos de inmunoglobulina y usos de los mismos

5 **1. Campo de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo de que la administración de polipéptidos que comprenden al menos un dominio variable único de inmunoglobulina frente a vWF a pacientes con TTP humanos proporciona una disminución significativa en el tiempo hasta la respuesta y menos complicaciones. La invención proporciona un polipéptido que comprende dos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, administrando al humano una dosis de 1-80 mg de dicho polipéptido. La divulgación se refiere además a formas unitarias de dosificación, kits y usos médicos para el tratamiento de TTP.

15 **2. Antecedentes de la invención**

**2.1 Papel de vWF en la agregación plaquetaria**

20 La proteína plasmática multimérica factor de von Willebrand (vWF) es esencial para captar plaquetas en circulación para la pared vascular dañada tras una lesión vascular. Esta captación está mediada a través de la unión del dominio vWF A1 con la glicoproteína receptora de plaquetas GPIb-IX-V.

25 Tras la expresión por parte de células endoteliales, el vWF se secreta a la circulación como multímeros ultragrandes o vWF ultragrande (ULvWF). Estos multímeros se procesan para dar multímeros de tamaño regular más pequeños a través de escisión enzimática mediante ADAMTS13. En estos multímeros de tamaño regular de vWF, el sitio de unión al receptor de plaquetas GPIb-IX-V en el dominio A1 es crítico y no reaccionará de manera espontánea con plaquetas. Una activación conformacional del sitio de unión al receptor de plaquetas GPIb-IX-V en el dominio A1 se desencadena mediante inmovilización o en condiciones de tensión de cizalladura dando como resultado adhesión plaquetaria y posteriormente formación de trombos.

30 **2.2 Papel de vWF y del procesamiento de vWF en la fisiopatología de TTP**

35 La púrpura trombocitopénica trombótica ("TTP") es una enfermedad rara y potencialmente mortal del sistema de coagulación sanguínea, en la que se ha implicado la acumulación de multímeros de ULvWF, que conduce a un riesgo aumentado de formación de trombos en vasos sanguíneos pequeños debido a una agregación plaquetaria excesiva. La enfermedad está caracterizada por la agregación plaquetaria sistémica en la microcirculación, produciendo isquemia fluctuante en muchos órganos. Si es sostenida, esto puede provocar infarto tisular, asociado con fragmentación eritrocitaria y trombocitopenia profunda.

40 Los multímeros de ULvWF tienen la capacidad natural de interaccionar de manera espontánea con el receptor de plaquetas GPIb-IX-V. En sujetos sanos, estos multímeros de ULvWF se procesan inmediatamente para dar multímeros de vWF de tamaño regular por medio de escisión mediante la proteasa de vWF ADAMTS13. Sin embargo, se ha encontrado que la actividad de ADAMTS13 es gravemente deficiente en TTP hereditaria, así como en TTP idiopática adquirida. La mayoría de los pacientes con TTP tienen autoanticuerpos frente a ADAMTS13 dando como resultado un procesamiento alterado de los multímeros de ULvWF. En consecuencia, el dominio A1 del ULvWF es activo de manera constitutiva e interacciona fácilmente con el receptor de plaquetas GPIb-IX-V. Esto da como resultado eventualmente la formación de los coágulos de sangre característicos encontrados en la población de pacientes con TTP.

50 La terapia actual de la TTP con intercambio plasmático (abreviado en el presente documento como "PE" o "PEX") y transfusión proporciona reemplazo de ADAMTS13 y elimina los anticuerpos frente a la enzima, conduciendo así progresivamente a una normalización del procesamiento de ULvWF. Sin embargo, este tratamiento requiere múltiples intercambios y transfusiones a lo largo de muchos días, tiempo durante el cual no hay una selección de diana farmacológica directa del proceso activo de agregación plaquetaria mediada por ULvWF.

55 Aunque la introducción de PE y transfusión ha reducido significativamente las tasas de mortalidad de TTP a lo largo de las últimas tres décadas, la enfermedad todavía conlleva un riesgo significativo de mortalidad y morbilidad. La tasa de mortalidad de ataques agudos en TTP idiopática aguda, en pacientes manejados con las terapias actuales sigue siendo del orden del 10% al 30% (Vesely *et al.* Blood 2003; 102: 60-68; Allford *et al.* Br.J.Haematol. 2003; 120: 556-573; Sadler *et al.* Hematology. Am.Soc.Hematol.Educ.Program. 2004; 407-423). En el caso de TTP secundaria, se reconoce que el PE y la transfusión son menos efectivos y la tasa de mortalidad es considerablemente mayor. En los casos en los que la enfermedad es secundaria a un embarazo, en los que se considera que el PE es razonablemente efectivo, la tasa de mortalidad de un ataque agudo de TTP es aproximadamente del 25%, aumentando hasta más del 40% en casos con preeclampsia concomitante (Martin *et al.* Am.J.Obstet.Gynecol. 2008; 199: 98-104). Sin embargo, en casos secundarios a, por ejemplo, malignidades subyacentes o trasplante de médula ósea la tasa de mortalidad sigue estando a del 40% al 60% a pesar del uso de tales regímenes de tratamiento (Sadler *et al.* 2004 citado

anteriormente; Elliott *et al.* Mayo Clin. Proc. 2003; 78: 421-430; Kremer Hovinga y Meyer Curr. Opin. Hematol. 2008; 15: 445-450).

5 Dado el nivel significativo continuo de mortalidad por TTP y las complicaciones observadas del PE y de la transfusión, existe una clara necesidad de desarrollar enfoques terapéuticos adicionales para complementar, o potencialmente reducir la necesidad de, estos métodos de tratamiento.

10 La investigación llevada a cabo sobre la TTP a lo largo de las últimas tres décadas ha mejorado el entendimiento de la fisiopatología de la enfermedad permitiendo el desarrollo potencial de agentes novedosos que tienen como diana los procesos patológicos subyacentes. No obstante, no hay terapias aprobadas actualmente para la TTP y, aunque hay terapias recientes que están sometiéndose actualmente a evaluación, los estudios de estos tratamientos potenciales están en una fase relativamente temprana.

15 Peyvandi presentó en la conferencia de la ISTH del 28 de julio de 2011 el diseño de estudio del ensayo TITAN, es decir, el tratamiento de un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF así como la descripción del punto final primario y las dosis usadas: 10 mg/día o 20 mg/día (2 PE).

20 Chapman *et al* (2013 Seminars in Thrombosis and Hemostasis 40:34-40) es un artículo de revisión que versa sobre la terapia para la púrpura trombocitopénica trombótica: pasado, presente y futuro, que indica que aunque parece que es probable que continúe en el futuro el uso de inmunoterapia (es decir rituximab), parece haber movimientos hacia tratamientos más específicos para TTP que reducen la tendencia trombótica asociada con VWF y reducen la necesidad de intercambio plasmático.

25 Se han descrito dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) frente a vWF en, por ejemplo, los documentos WO2004/015425, WO2004/062551, WO2006/074947, WO2006/122825, WO2009/115614 y WO2011/067160.

30 Se ha mostrado que los ISVD frente a vWF (por ejemplo, ALX 0081) se unen con avidez al vWF multimérico, bloqueando de ese modo la interacción de cualquier tamaño y fase de activación del vWF multimérico con el receptor de plaquetas GPIb-IX-V. La interacción de ALX 0081 con vWF es altamente específica y no interacciona con plaquetas o células sanguíneas humanas. Además, su interferencia con el receptor GPIb-IX-V de plaquetas es selectiva a través de la unión del dominio vWF A1 y no afecta a la capacidad de vWF de interaccionar con colágenos fibrilares o con colágeno de tipo VI. También se ha mostrado que los ISVD frente a vWF (por ejemplo, ALX 0081) no afectan a la actividad de la proteasa de vWF (restante) ADAMTS13 ni interfieren con la unión de FVIII a vWF.

35 En un estudio de fase I se ha mostrado que ALX 0081 es seguro y se tolera bien en voluntarios sanos.

40 Sin embargo, los voluntarios sanos humanos no permiten predecir la eficacia de los ISVD frente a vWF en general o ALX 0081 específicamente en la patología subyacente de pacientes con TTP. El vWF es anómalo en cantidad así como en calidad en pacientes con TTP. Aunque está aceptado que el ULvWF no funciona normalmente en hemostasis en pacientes con TTP, no se entiende el mecanismo subyacente. En pacientes con TTP, se esperan niveles de vWF mayores durante episodios agudos (Lotta *et al.* 2011 J Thromb Haemost 9: 1744-51; Stufano *et al.* 2012 J Thromb Haemost 10:728-730).

45 Debido a la ausencia de un modelo animal relevante, no se ha demostrado ninguna eficacia *in vivo* de ALX 0081 para neutralizar el ULvWF.

50 Por tanto, sigue debiendo esclarecerse si polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, son beneficiosos en pacientes con TTP, si polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, tienen un efecto positivo sobre PE, y cuál sería un tratamiento y régimen de dosis efectivo.

55 Existe una necesidad de terapias mejoradas para pacientes con TTP.

### 3. Sumario de la invención

60 La presente invención se basa en el hallazgo inesperado de que la administración de polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF a pacientes con TTP humanos proporciona una disminución de 2 días en el tiempo hasta la respuesta, materializada mediante una recuperación de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ . El aumento del recuento de plaquetas es un signo de agregación plaquetaria patológica disminuida, disminuyendo de ese modo el proceso trombótico iniciado mediante los complejos de plaqueta-vWF característicos de esta enfermedad. El cociente de riesgo ("HR") de placebo con respecto al polipéptido usado en la invención era un asombroso 2,2 con un IC del 95% (1,28, 3,78),  $p = 0,013$ . Esta respuesta se confirmó hasta 48 horas tras el tiempo hasta la respuesta. Por tanto, se demostró la prueba de concepto del polipéptido usado en la invención con una reducción del tiempo hasta la respuesta plaquetaria confirmada estadísticamente significativa y clínicamente significativa. Además, hubo una reducción en el número de exacerbaciones de 11 en la rama de placebo a 3 en la rama de tratamiento. No hubo muertes en la rama de tratamiento en comparación con 2 muertes en la rama de placebo.

Además, el presente estudio clínico con pacientes con TTP también demuestra que el polipéptido usado en la invención (por ejemplo, ALX 0081) son agentes bien tolerados y, en particular, que el potencial del riesgo de sangrado parece estar presente pero ser bajo y manejable. Los datos disponibles actualmente demuestran, por tanto, que la reducción de PE y transfusión y sus complicaciones asociadas se consiguen sin efectos adversos significativos a partir del uso de los polipéptidos de la propia invención. Esto representa un claro beneficio de seguridad para el uso de los polipéptidos de la invención en el tratamiento de pacientes con TTP.

Por tanto, la administración de polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF a pacientes con TTP humanos proporciona un tiempo hasta la respuesta disminuido inesperadamente, un efecto sostenido y prolongado, exacerbaciones reducidas, una hospitalización reducida, una morbilidad reducida, muertes reducidas y/o un número reducido de PE.

La actual terapia de TTP con PE y transfusión proporciona un reemplazo de ADAMTS13 y elimina anticuerpos frente a la enzima, conduciendo por tanto progresivamente a una normalización del procesamiento de ULvWF. Sin embargo, este tratamiento requiere múltiples intercambios y transfusiones a lo largo de muchos días, tiempo durante el cual no hay selección de diana farmacológica directa del proceso activo de agregación plaquetaria mediada por ULvWF.

Ahora se ha mostrado además inesperadamente que el polipéptido usado en la invención no interfiere con la enzima reemplazada mediante la transfusión de plasma. Se ha demostrado que los polipéptidos de la invención (por ejemplo, ALX 0081) pueden utilizarse, en combinación con PE y transfusión, para inhibir directamente la formación continua de trombos pequeños y el consumo de plaquetas en la microvasculatura. Esto permite un control más rápido del proceso trombótico subyacente y el consumo de plaquetas acompañante, con los beneficios de un grado reducido de complicaciones isquémicas y hemorrágicas. También da como resultado una recuperación clínica más rápida y menos morbilidad con un periodo más corto y un número reducido de PE y transfusiones. De hecho, un análisis sobre los biomarcadores de daño a los órganos específicos y clínicamente relevantes LDH, troponina T o I y creatinina sugería que podía esperarse que una isquemia tisular microvascular que se acorta más rápidamente tuviera un beneficio clínico. Además, la inhibición demostrada de interacción plaquetaria mediada por ULvWF mediante el polipéptido usado en la invención (por ejemplo, ALX 0081) y los efectos antitrombóticos observados elevan el potencial para su uso a largo plazo después de que los pacientes se hayan recuperado de un ataque agudo de TTP para prevenir recaídas de la enfermedad. Una frecuencia reducida de ataques agudos de TTP representa un beneficio significativo, con potencial para una reducción en la mortalidad y morbilidad asociadas con TTP y una reducción adicional en la necesidad de PE y transfusiones a lo largo de la vida de un paciente.

Aunque una recuperación más rápida de TTP y una reducción en las exacerbaciones y recaídas es un claro beneficio clínico en términos de eficacia del tratamiento, la reducción en la duración y la frecuencia de PE y transfusión también proporciona beneficios adicionales en términos de seguridad de los pacientes. Aunque actualmente el PE y la transfusión se consideran el tratamiento estándar en el manejo de TTP (Scully *et al.* Br.J.Haem. 2012; 158:323-335), los procedimientos conllevan el riesgo de complicaciones significativas. El procedimiento de PE requiere altos volúmenes de fluido y caudales que necesitan el uso de catéteres de hemodiálisis de doble luz venosos centrales. Las complicaciones del procedimiento incluyen hemorragia por la inserción del catéter, sepsis, trombosis por catéter, neumotórax, sobrecarga de fluido, hipoxia e hipotensión (Fontana *et al.* Semin.Hematol. 2004; 41: 48-59; George J.Intensive Care Med. 2007; 22: 82-91; Howard *et al.* Transfusion 2006; 46: 154-156; Rizvi *et al.* Transfusion 2000; 40: 896-901; Nguyen *et al.* Transfusion 2009; 49: 392-394). Reacciones anafilactoides complican del 0,25% al 0,5% de los procedimientos (Allford *et al.* 2003 citado anteriormente; George 2007 citado anteriormente). Además, la infusión de plasma que contiene productos sanguíneos puede provocar una TRALI no infecciosa. Este estado se reconoce como una de las causas más frecuentes de incidentes fatales relacionados con transfusión con una incidencia estimada del 0,02% al 0,05% por unidad que contiene plasma con un promedio diario de 17 unidades de plasma, el riesgo diario puede calcularse como un intervalo del 0,34% al 0,85%. La mayoría de los pacientes con TTP requieren múltiples PE y transfusiones. Los pacientes con TTP idiopática aguda requieren tratamientos diarios, y se requiere un promedio de aproximadamente 16 tratamientos para conseguir la remisión (Allford *et al.* 2003 citado anteriormente). En casos que no responden al tratamiento, la frecuencia de tratamiento puede aumentarse hasta dos veces al día (Allford *et al.* 2003 citado anteriormente). En el caso de pacientes con TTP familiar, se recomiendan infusiones de plasma profilácticas regulares a intervalos de dos a tres semanas (Lammle *et al.* J.Thromb.Haemost. 2005; 3: 1663-1675). Por tanto, la anafilaxia y la TRALI representan claros riesgos para pacientes con TTP cuyo tratamiento requiere una frecuencia y regularidad de PE y transfusiones de este tipo. Aunque se cree que este riesgo puede ser menor si se usa plasma tratado con solvente/detergente (S/D) en lugar de plasma congelado fresco, el uso de grandes volúmenes de plasma S/D puede estar asociado con un riesgo aumentado de tromboembolismo venoso (Allford *et al.* 2003 citado anteriormente; Fontana *et al.* 2004 citado anteriormente). En general, se estima que aproximadamente del 30% al 40% de los pacientes experimentarán efectos adversos a partir de PE y transfusión, y la tasa de mortalidad del procedimiento es del orden del 2% al 3% (George *et al.* Semin.Hematol. 2004; 41: 60-67; George 2007 citado anteriormente). Por tanto, la reducción en la duración y frecuencia de PE y transfusión también proporciona beneficios adicionales en términos de seguridad de los pacientes.

Tras la recuperación de un ataque de TTP, muchos pacientes describen anomalías cognitivas durante muchos años y notifican problemas molestos con la memoria, la concentración, energía disminuida y fatiga. Tales síntomas tienen un impacto negativo sobre la calidad de las vidas diarias de los pacientes. Además, este déficit en la calidad de vida

5 puede producirse en todos los pacientes que tienen TTP, independientemente de la etiología y la gravedad (Lewis *et al.* Transfusion 2009; 49: 118-124). Se cree que estos síntomas pueden reflejar los efectos residuales de la isquemia tisular. Sobre esta base, puede proponerse razonablemente que una recuperación más rápida de la TTP y la limitación de la formación de trombos en la microvasculatura que proporcionan el polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, da como resultado un desenlace a largo plazo mejorado para los pacientes en términos de su calidad de vida.

10 Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para tratar o aliviar enfermedades relacionadas con vWF en un sujeto administrando al sujeto un polipéptido que comprende al menos un ISVD frente a vWF, en el que la cantidad del polipéptido administrado es efectiva para reducir el tiempo hasta la respuesta, para reducir exacerbaciones, para reducir la hospitalización, para reducir la isquemia, para reducir el número de víctimas y/o para reducir el número de PE requeridos. La presente invención proporciona intervalos de dosis y programas de dosificación específicos para el polipéptido usado en la invención que dan como resultado uno o más de estos efectos sobre la enfermedad relacionada con vWF. En particular, la divulgación proporciona agentes farmacológicamente activos, 15 composiciones, métodos y/o programas de dosificación que tienen ciertas ventajas en comparación con los agentes, las composiciones, los métodos y/o los programas de dosificación que se usan y/o se conocen en la técnica actualmente, incluyendo el requisito de facilitar con menos frecuencia PE. Estas ventajas estarán claras a partir de la descripción adicional a continuación.

20 Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende dos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, que comprende administrar a dicho humano una primera dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido.

25 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha administración de dicho polipéptido va seguida en el plazo de 5 min a 8 h por la realización de un primer intercambio plasmático (PE).

30 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha administración de dicha primera dosis va precedida de la realización de un intercambio plasmático (PE) precedente, preferiblemente en el plazo de 36 h, tal como en el plazo de 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, por ejemplo, en el plazo de 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min de dicho primer PE.

35 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho primer PE va seguido de la administración de una segunda dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de dicho polipéptido, preferiblemente mediante inyección subcutánea, preferiblemente en el plazo de 1-60 min, más preferiblemente en el plazo de 30 min de dicho primer PE.

40 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho PE precedente se realiza en el plazo de 36 h, preferiblemente 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18 o 16 h, preferiblemente alrededor de 24 h de dicho primer PE.

45 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho polipéptido se administra por vía parenteral, preferiblemente mediante inyección subcutánea, intraperitoneal, intravenosa o intramuscular, preferiblemente mediante un inyección de empuje en bolo intravenoso (i.v.).

50 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha administración de dicho polipéptido va seguida de la realización de un PE en el plazo de 5 min a 8 h, tal como en el plazo de 10 min a 6 h o de 15 min a 4 h, por ejemplo, en el plazo de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min.

La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho tratamiento de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, comprende, además:

- 55 (i) realizar un PE; y (seguido de)
- (ii) administrar una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg de dicho polipéptido de 5 min a 4 h tras dicho PE de la etapa (i); y
- 60 (iii) opcionalmente medir el recuento de plaquetas y/o la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente,

en el que la etapa (i) y la etapa (ii) se repiten una vez al día, preferiblemente hasta que el recuento de plaquetas de dicho paciente es  $\geq 150000/\mu\text{l}$  y/o dicha actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.

La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido durante al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 60, 90 o incluso 120 días después de que el recuento de plaquetas de dicho paciente sea  $\geq 150.000/\mu\text{l}$  por primera vez.

- 5 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido hasta que dicho humano entra en remisión.
- 10 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, que comprende administrar dicho polipéptido hasta que la actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.
- 15 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha dosis es de alrededor de 1-80 mg o 5-40 mg, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 u 80 mg, preferiblemente alrededor de 10 mg de dicho polipéptido.
- 20 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho humano padece un episodio agudo de TTP, una exacerbación de TTP o una recaída de TTP.
- 25 En un aspecto preferido, las presentes divulgaciones proporcionan un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, que comprende
- 30 (1) opcionalmente realizar un intercambio plasmático (PE) precedente;
- (2) administrar a dicho humano una primera dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido, y si la etapa (1) se realiza preferiblemente en el plazo de 36 h, tal como en el plazo de 32 h, 30 h, 28 h, 26 h, 24 h, 22 h, 20 h, 18 h, 16 h, 14 h, 12 h, 10 h, 8 h, por ejemplo, en el plazo de 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min de (el final de) la etapa (1);
- 35 (3) realizar un intercambio plasmático (PE), opcionalmente en el plazo de 5 min a 8 h, tal como en el plazo de 10 min a 6 h o de 15 min a 4 h, por ejemplo, en el plazo de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min de la etapa (2);
- 40 (4) administrar una dosis adicional de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido preferiblemente en el plazo de 5 min a 8 h, tal como en el plazo de 10 min a 6 h o de 15 min a 4 h, por ejemplo, en el plazo de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min de (el final de) la etapa (3);
- 45 (5) repetir la etapa (3) y la etapa (4) una vez al día; opcionalmente hasta que el recuento de plaquetas de dicho paciente es  $\geq 150.000/\mu\text{l}$  y/o dicha actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.
- 50 (6) opcionalmente administrar una vez al día una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido durante al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 90 o incluso 120 días después de que el recuento de plaquetas de dicho paciente sea  $\geq 150.000/\mu\text{l}$  por primera vez o hasta que la actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.
- 55 La presente divulgación proporciona un polipéptido que comprende dos ISVD anti-vWF humano para su uso en prevenir (los síntomas de) una recaída de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, administrando al humano dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido.
- 60 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina que se une a SEQ ID NO: 20.
- 65 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF comprende un dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o un dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cadena pesada o un nanocuerpo.
- La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho nanocuerpo es un VHH.

La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en el que:

- 5 a) CDR1 comprende o consiste esencialmente en:
- la secuencia de aminoácidos YNPMG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos YNPMG;
- 10 y
- 15 b) CDR2 comprende o consiste esencialmente en:
- la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;
- 20 y
- 25 c) CDR3 comprende o consiste esencialmente en:
- la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTL PSEYTF; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTL PSEYTF; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTL PSEYTF.

La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que:

- 40 a) CDR1 es YNPMG (SEQ ID NO: 20);
- b) CDR2 es AISRTGGSTYYPDSVEG (SEQ ID NO: 21); y
- c) CDR3 es AGVRAEDGRVRTL PSEYTF (SEQ ID NO: 22).

45 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que el ISVD frente a vWF está representado por SEQ ID NO: 19 (12A02H1).

50 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, que comprende o consiste en al menos dos ISVD frente a vWF.

55 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que cada ISVD de dichos al menos dos ISVD frente a vWF consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en el que:

- a) CDR1 comprende o consiste esencialmente en:
- la secuencia de aminoácidos YNPMG; o
  - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos YNPMG;
- y
- b) CDR2 comprende o consiste esencialmente en:

- la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

5 10 y

c) CDR3 comprende o consiste esencialmente en:

- la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLSEYTF; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLSEYTF; o
- una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLSEYTF.

20 25 La presente invención proporciona un polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que cada ISVD frente a vWF consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en el que:

- a) CDR1 es YNPMG (SEQ ID NO: 20);
- b) CDR2 es AISRTGGSTYYPDSVEG (SEQ ID NO: 21); y
- c) CDR3 es AGVRAEDGRVRTLSEYTF (SEQ ID NO: 22).

30 35 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho polipéptido comprende o consiste en las SEQ ID NO: 1-19, preferiblemente SEQ ID NO: 19.

40 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF es un polipéptido de una sola cadena que comprende uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina.

45 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF es monovalente o multivalente.

50 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF es monoespecífico o multiespecífico.

55 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina son injertados con CDR, humanizados, camelizados, desinmunizados o seleccionados mediante presentación en fago.

60 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho ISVD frente a vWF comprende una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos al 90% a SEQ ID NO: 1.

65 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, que comprende dos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) anti-vWF humano y un ISVD anti-albúmina sérica humana (HSA).

70 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicho polipéptido está formulado en una formulación farmacéuticamente aceptable.

75 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha formulación comprende un tampón citrato o fosfato con un pH en el intervalo de 5,0 a 7,5.

80 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha formulación es adecuada para administración parenteral, tal como una o más seleccionadas de inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular o inyección intraperitoneal.

85 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha formulación está en forma líquida, liofilizada, secada por pulverización, liofilizada reconstituida o congelada.

La presente divulgación proporciona un kit o un artículo de fabricación, que comprende un recipiente que contiene el polipéptido tal como se describe en el presente documento o la formulación tal como se describe en el presente documento, e instrucciones de uso.

- 5 La presente divulgación proporciona un kit o artículo de fabricación tal como se describe en el presente documento, en el que la formulación está presente en un vial o una jeringa inyectable.
- 10 La presente divulgación proporciona un kit o artículo de fabricación tal como se describe en el presente documento, en el que la formulación está presente en una jeringa inyectable precargada.
- 15 La presente divulgación proporciona un kit o artículo de fabricación tal como se describe en el presente documento, en el que la jeringa o un vial está compuesto de vidrio, plástico o un material polimérico elegido de un polímero o copolímero de olefina cíclica.
- 15 La presente divulgación proporciona una formulación que comprende:
- 20 (a) un agente de unión a vWF a una concentración de desde alrededor de 0,1 mg/ml hasta alrededor de 80 mg/ml;
- 20 (b) un excipiente elegido de sacarosa, glicina, manitol, trehalosa o NaCl a una concentración de alrededor del 1% a alrededor del 15% (p/v);
- 25 (c) Tween-80 a una concentración de alrededor del 0,001% al 0,5% (v/v); y
- 25 (d) un tampón elegido de tampón citrato a una concentración de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM de modo que el pH de la formulación es de alrededor de 6,0 a 7,0 y un tampón fosfato a una concentración de alrededor de 10 mM a alrededor de 50 mM de modo que el pH de la formulación es de alrededor de 6,5 a 7,5,
- 30 para su uso en el tratamiento de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, administrando al humano una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido, en el que dicha dosis va seguida en el plazo de 5 min a 8 h, tal como de 15 min a 4 h, de un primer intercambio plasmático (PE).
- 35 La presente invención proporciona una forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral a un paciente, preferiblemente un paciente humano, que comprende un polipéptido para su uso según lo reivindicado o una formulación que comprende el polipéptido para su uso según lo reivindicado.
- 40 La presente invención proporciona un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha enfermedad relacionada con vWF se elige de síndrome coronario agudo (ACS), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho inestable o estable, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP).
- 45 La presente divulgación proporciona un método para el tratamiento de un paciente humano susceptible de o diagnosticado con una enfermedad caracterizada por una enfermedad relacionada con vWF, que comprende administrar una cantidad efectiva de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) al paciente humano.
- 50 La presente divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, que comprende administrar a un humano una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF), reduciendo de ese modo uno o más síntomas asociados con la enfermedad relacionada con vWF.
- 55 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, en el que dicha administración de un polipéptido tal como se describe en el presente documento va seguida en el plazo de 5 min a 8 h, tal como de 15 min a 4 h, de la realización de un primer intercambio plasmático (PE).
- 60 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, en el que dicha administración de un polipéptido tal como se describe en el presente documento va precedida de la realización de un intercambio plasmático (PE) precedido, en el plazo de 36 h, preferiblemente 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18 o 16 h, preferiblemente alrededor de 24 h de dicho primer PE.
- 65 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, en el que dicho primer PE va seguido de la administración de una segunda dosis de 1-80 mg, tal como 5 - 40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido tal como se describe en el presente documento en el plazo de 5 min a 8 h, tal como en el

plazo de 10 min a 6 h o de 15 min a 4 h, por ejemplo, en el plazo de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min, por ejemplo, en el que dicha segunda dosis de dicho polipéptido se administra en el plazo de 1-60 min, tal como 30 min de dicho primer PE, preferiblemente mediante inyección subcutánea.

5 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende, además:

(i) realizar un PE; (seguido de)

10 (ii) administrar una dosis de 1 - 80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido tal como se describe en el presente documento de 15 min a 4 h tras dicho PE de la etapa (i); y

(iii) opcionalmente medir el recuento de plaquetas y/o la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente,

15 en el que la etapa (i) y la etapa (ii) se repiten una vez al día opcionalmente hasta que el recuento de plaquetas de dicho paciente es  $\geq 150000/\mu\text{l}$  y/o la actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.

20 La presente divulgación proporciona también un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 1 - 80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido tal como se describe en el presente documento durante al menos 5, 10, 15, 20, 25 o incluso 30 días después de que el recuento de plaquetas de dicho paciente sea  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ .

25 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido tal como se describe en el presente documento hasta que dicho humano entra en remisión.

30 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende administrar dicho polipéptido hasta que la actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.

35 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para reducir el riesgo de y/o prevenir un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, que comprende o consiste en: (i) administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF); en el que la administración de dicho polipéptido reduce el riesgo de y/o previene un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF. Preferiblemente, dicho riesgo se reduce en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100. Preferiblemente, dicho riesgo se reduce en un 10% o incluso más, tal como un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60% o más, tal como un 80% o incluso un 100%.

40 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o incluso más de 10 veces, tal como 20 veces, preferiblemente más de 30 veces o incluso más.

45 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días, tal como 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o incluso más.

50 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicha dosis se administra 1 vez al día o dos veces al día.

55 En una realización, la presente invención se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, que comprende, además

(ii) medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente;

(iii) comparar dicha actividad de ADAMTS13 con una actividad de ADAMTS13 de referencia; y

60 (iv) si dicha actividad de ADAMTS13 es menor del 30%, tal como el 20%, el 15% o el 10% de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia, entonces repetir dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención.

65 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicha actividad de ADAMTS13 de dicho paciente se mide cada día, o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, preferiblemente al menos una vez cada semana.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que la etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención se repite hasta que dicha actividad de ADAMTS13 es al menos el 10%, el 15%, tal como el 20%, o incluso el 30% o más de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia.

5 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que la etapa (i) se repite hasta que dicha actividad de ADAMTS13 es al menos el 10%, el 15%, tal como el 20% o el 30% de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia en al menos 2 mediciones consecutivas. Preferiblemente, dichas 2 mediciones consecutivas están separadas al menos 24 h, más preferiblemente 48 h, tal como separadas al menos 3 días, o incluso más tal como separadas 4, 5, 6 o incluso 7 días, preferiblemente separadas una semana.

10 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención se repite durante al menos al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días o incluso más, después de que dicha actividad de ADAMTS13 sea al menos el 10% o el 15%, tal como el 20% o el 30% de dicha actividad de referencia en al menos 2 mediciones consecutivas.

15 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, que comprende, además

20 - medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente;

- comparar dicha actividad de ADAMTS13 con una actividad de ADAMTS13 de referencia; y

25 - si dicha actividad de ADAMTS13 es  $\geq 10\%$ , tal como más del 15%, o más del 20% o del 30% de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia, entonces repetir dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención durante como máximo 30 días, tal como, como máximo, 20 días, o incluso 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 días o incluso 1 día.

30 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para reducir el riesgo de y/o prevenir un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, que comprende al menos las siguientes etapas:

35 (i) medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente;

(ii) comparar dicha actividad de ADAMTS13 con una actividad de ADAMTS13 de referencia; y

(iii) si dicha actividad de ADAMTS13 es menor del 30%, del 20%, del 15% o del 10% de dicha actividad de referencia, entonces administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF);

40 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que

45 - el riesgo de daño a los órganos, daño isquémico y/o formación de microtrombos se reduce en un 10%, un 20%, un 30%, preferiblemente en al menos un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;

50 - el riesgo de daño a los órganos, daño isquémico y/o formación de microtrombos se reduce en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,75, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100;

55 - el daño a los órganos, el daño isquémico y/o la formación de microtrombos se reduce preferiblemente en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;

60 - el daño a los órganos, el daño isquémico y/o la formación de microtrombos se reduce en un factor de 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100;

65 - los marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, los niveles de troponina T, troponina I y/o los niveles de creatinina, vuelven a al menos el 40%, o incluso al menos el 50%, tal como el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o incluso hasta el 100% de los niveles normales;

- los marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, los niveles de troponina T, troponina I y/o los niveles de creatinina, mejoran en al menos un 20%, tal como un 30% o incluso más, tal como un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100% de los

- niveles normales. Preferiblemente, dichos marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, los niveles de troponina T, troponina I y/o los niveles de creatinina, mejoran en menos de 30 días de tratamiento, preferiblemente, en menos de 20 días de tratamiento, tal como, menos de 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 días o incluso en el plazo de 1 día.
- 5 - el número de plaquetas se mantiene a  $\geq 150000/\mu\text{l}$ .
- 10 - el riesgo de exacerbaciones se reduce en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;
- 15 - el riesgo de exacerbaciones se reduce en un factor de 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100;
- 20 - la mortalidad debido a dicha enfermedad relacionada con vWF se reduce en un 10%, un 20%, un 30%, preferiblemente en al menos un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;
- 25 - la mortalidad debido a dicha enfermedad relacionada con vWF se reduce en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100.
- 30 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, que comprende además medir el número de plaquetas; y si dicho número de plaquetas es menor de 150.000/ $\mu\text{l}$ , entonces repetir dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención.
- 35 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicho número de plaquetas de dicho paciente se mide cada día, o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, preferiblemente al menos cada semana.
- 40 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que la etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención se repite hasta que dicho número de plaquetas es de al menos 150.000/ $\mu\text{l}$  en al menos 2 mediciones consecutivas. Preferiblemente, dichas 2 mediciones consecutivas están separadas al menos 24 h, más preferiblemente separadas 48 h, tal como separadas al menos 3 días o incluso más, tal como separadas 4, 5, 6 o incluso 7 días, preferiblemente separadas una semana.
- 45 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días o incluso más, después de que dicho número de plaquetas sea de al menos 150.000/ $\mu\text{l}$  en al menos 2 mediciones consecutivas. Preferiblemente, dichas 2 mediciones consecutivas están separadas al menos 24 h, más preferiblemente 48 h, tal como separadas al menos 3 días o incluso más, tal como separadas 4, 5, 6 o incluso 7 días, preferiblemente separadas una semana.
- 50 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, que comprende además medir el número de plaquetas de dicho paciente; y si dicho número de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ , entonces repetir dicha etapa (i) de administrar el polipéptido de la invención durante como máximo 30 días, tal como, como máximo, 20 días, o incluso 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 días o incluso 1 día.
- 55 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para reducir el riesgo de y/o prevenir un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, que comprende al menos las siguientes etapas:
- (i) medir el número de plaquetas de dicho paciente; y
- (ii) si dicho número de plaquetas es menor de 150.000/ $\mu\text{l}$ , entonces administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF);
- 60 en el que la administración de dicho polipéptido reduce el riesgo de y/o previene un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF.
- 65 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, que comprende al menos las siguientes etapas;

- 5 (i) administrar a dicho humano una primera dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF);

- 10 (ii) realizar un primer intercambio plasmático (PE), preferiblemente en el plazo de 5 min a 8 h de la etapa (i).

15 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, en el que la etapa (i), es decir administrar a dicho humano el polipéptido de la invención, va precedida de la realización de un PE precedente, preferiblemente en el plazo de 24 h de la etapa (ii), es decir la realización de un primer PE.

20 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, que comprende al menos las siguientes etapas:

- 25 (i) realizar un intercambio plasmático (PE); (ii) administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF). Preferiblemente dicha etapa (i), es decir la realización de un PE, y dicha etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido de la invención, se repiten una vez o dos veces al día, durante como máximo 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 días.

30 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, en el que la etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido de la invención, se realiza en el plazo de 15 min a 4 h de la etapa (i), es decir la realización de un PE.

35 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, que comprende además medir el recuento de plaquetas de dicho humano, preferiblemente tras la etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido de la invención; y si dicho recuento de plaquetas es < 150.000/ $\mu$ l, repetir dicha etapa (i), es decir la realización de un PE, y dicha etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido.

40 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, que comprende además medir el recuento de plaquetas de dicho humano [preferiblemente tras la etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido de la invención]; y repetir la etapa (i), es decir la realización de un PE, y la etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido, [una vez/dos veces al día] hasta que dicho número de plaquetas es de al menos 150.000/ $\mu$ l en al menos 2 mediciones consecutivas. Preferiblemente, dichas 2 mediciones consecutivas están separadas al menos 24 h, más preferiblemente 48 h, tal como separadas al menos 3 días o incluso más, tal como separadas 4, 5, 6 o incluso 7 días, preferiblemente separadas una semana.

45 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido durante al menos 1-30 días después de que el recuento de plaquetas de dicho humano fuese por primera vez  $\geq$ 150.000/ $\mu$ l.

50 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, que comprende además medir la actividad de ADAMTS13 de dicho humano, preferiblemente tras la etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido.

55 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, tal como se describe en el presente documento, en el que la etapa (i), es decir la realización de un PE, y la etapa (ii), es decir la administración a dicho humano de dicho polipéptido de la invención, se repiten hasta que la actividad de ADAMTS13 es [por primera vez] más del 15%, o del 20% o incluso del 30% de una actividad de ADAMTS13 de referencia.

60 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para reducir el riesgo de y/o prevenir daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos [que pueden provocarse mediante una enfermedad relacionada con vWF] en un humano que lo necesite, que comprende al menos la siguiente etapa: (i)

65 administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg/día, preferiblemente 10 mg/día, de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF); en el que la administración de dicho polipéptido reduce el riesgo de y/o previene el daño isquémico, el daño a los órganos y/o la formación de microtrombos en un 10%, un 20%, un 30%, preferiblemente en al menos un 40% o incluso al menos un

50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%. Preferiblemente, la administración de dicho polipéptido reduce el riesgo de y/o previene el daño isquémico, el daño a los órganos y/o la formación de microtrombos en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100.

- 5 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método en el que dicha etapa (i) de administrar dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o incluso más tiempo, tal como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o incluso más tiempo, tal como 1 mes o incluso 2 meses.
- 10 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método que comprende además medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente, preferiblemente una vez por semana.
- 15 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método en el que dicha etapa (i) de administrar dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o incluso más tiempo, tal como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o incluso más tiempo, tal como 1 mes o incluso 2 meses, cuando la actividad de ADAMTS13 es [por primera vez]  $\geq 10\%$ , tal como más del 15%, o incluso más del 20% de una actividad de ADAMTS13 de referencia.
- 20 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de un síntoma de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que padece dicha enfermedad, que comprende administrar al sujeto un polipéptido de la invención, en una cantidad efectiva para tratar el síntoma de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que padece dicha enfermedad.
- 25 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método de inhibición en un humano de la aparición o la progresión de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, cuya inhibición se efectúa mediante la unión de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) a vWF, que comprende administrar al humano dosis inhibitorias efectivas a un intervalo predeterminado de dicho polipéptido, en el que cada administración del polipéptido entrega al humano desde 0,1 mg por kg hasta 25 mg por kg del peso corporal del humano, para inhibir de ese modo la aparición o la progresión de la enfermedad en el humano.
- 30 En una realización, la presente divulgación se refiere a un método de reducción de la probabilidad de que un humano contraiga daño isquémico a los órganos mediante una enfermedad relacionada con vWF, que comprende administrar al humano a una dosis predefinida un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF), en el que cada administración del anticuerpo entrega al humano desde 0,1 mg por kg hasta 25 mg por kg del peso corporal del humano, para reducir de ese modo la probabilidad de que el humano contraiga daño isquémico a los órganos.
- 35

#### 4. Leyendas de las figuras

- 40 Figura 1 Diagrama de flujo de tratamiento.
- Figura 2 Curvas de tiempo hasta la primera normalización de LDH (población ITT = sujetos con niveles anómalamente altos en el nivel inicial).
- 45 Figura 3 Curvas de tiempo hasta la normalización de troponina T o I para sujetos con niveles anómalamente altos en el nivel inicial en la población de intención de tratar.
- Figura 4 Curvas de tiempo hasta la normalización de creatinina para sujetos con niveles anómalamente altos en el nivel inicial en la población de intención de tratar.
- 50 Figura 5: Niveles de vWF en pacientes con TTP: % de disminución predicho según el modelo desde el nivel inicial de niveles de vWF libre al final del periodo 2 en función del nivel de dosis diaria, incluyendo pacientes tratados con placebo. Se indican la mediana, los percentiles 25 y 75.
- 55 Figura 6: Modelo de PK/PD de caplacizumab y vWF libre, total y complejado: (A) Perfiles de concentración de caplacizumab predichos según el modelo tras la administración s.c. diaria durante el periodo 1 y el periodo 2 (con y sin PE diario concomitante). (B) Niveles predichos según el modelo de vWF libre durante una administración s.c. de 10 mg diaria de caplacizumab y tras el periodo de tratamiento. (C) Niveles de complejo caplacizumab-vWF estimados durante una administración s.c. de 10 mg diaria de caplacizumab y tras el periodo de tratamiento. (D) Niveles de vWF total predichos según el modelo durante una administración s.c. de 10 mg diaria de caplacizumab y tras el periodo de tratamiento. Se muestran las medianas de los perfiles, los percentiles 5 y 95.

#### 5. Descripción detallada

65

A menos que se indique lo contrario, todos los métodos, etapas, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle pueden realizarse y se han realizado de una manera en sí conocida, como estará claro para el experto en la técnica. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándar y la técnica anterior general mencionada en el presente documento y a las referencias adicionales citadas en los mismos; así como a, por ejemplo, las siguientes revisiones Presta, Adv. Drug Deliv. Rev. 2006, 58 (5-6): 640-56; Levin y Weiss, Mol. Biosyst. 2006, 2(1): 49-57; Irving *et al.*, J. Immunol. Methods, 2001, 248(1-2), 31-45; Schmitz *et al.*, Placenta, 2000, 21 Suppl. A, S106-12, Gonzales *et al.*, Tumour Biol., 2005, 26(1), 31-43, que describen técnicas para ingeniería de proteínas, tal como maduración de la afinidad y otras técnicas para mejorar la especificidad y otras propiedades deseadas de proteínas tales como inmunoglobulinas.

Tiene que indicarse que tal como se usa en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un reactivo" incluye uno o más de tales reactivos diferentes y la referencia a "el método" incluye la referencia a etapas y métodos equivalentes conocidos por los expertos habituales en la técnica que puedan modificarse o sustituirse por los métodos descritos en el presente documento.

A menos que se indique lo contrario, el término "al menos" precediendo una serie de elementos debe entenderse como que hace referencia a cada elemento en la serie.

El término "y/o" donde sea que se use en el presente documento incluye el significado de "y", "o" y "todos o cualquier otra combinación de los elementos conectados mediante dicho término".

El término "alrededor de" o "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento significa dentro del 20%, preferiblemente dentro del 15%, más preferiblemente dentro del 10% y lo más preferiblemente dentro del 5% de un valor o intervalo dado.

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de número enteros o etapas establecido, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de número enteros o etapas. Cuando se usa en el presente documento, el término "que comprende" puede sustituirse por el término "que contiene" o "que incluye" o en ocasiones cuando se usa en el presente documento por el término "que tiene".

El potencial terapéutico de los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, en un entorno de TTP se demostró mediante experimentos *in vitro* usando plasma de pacientes con TTP en experimentos de cámara de flujo. En estos experimentos, se estimularon células endoteliales para producir cadenas de ULvWF sobre su superficie (véase el ejemplo 7.2). Se demostró que los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, eran capaces de inhibir interacciones plaqueta-vWF y particularmente la interacción plaquetaria mediada por ULvWF *in vitro* y también se mostró que no tenían impacto sobre la función de ADAMTS13. En particular, se demostró que los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, eran capaces de interaccionar con vWF tanto en su fase activa (es decir funcional para la interacción con GPIb-IX-V como multímeros de tamaño regular y como multímeros ultragrandes) como en su fase inactiva (multímeros de tamaño regular antes del cambio conformacional del dominio A1). El estudio demostró una prueba de concepto de que los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, pueden usarse para tratar pacientes con TTP. También demuestra que los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, no interfieren con la actividad de ADAMTS13.

La presente invención se basa al menos parcialmente en el hallazgo de que la administración a pacientes con TTP humanos de polipéptidos que comprenden dos ISVD frente a vWF (también denominados en el presente documento "polipéptido(s) usado(s) en la invención") proporciona una disminución inesperada de 2 días en el tiempo hasta la respuesta. El tiempo hasta la respuesta se materializó mediante el tiempo necesario para la recuperación de plaquetas hasta  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ . Además, la invención proporciona un efecto inesperadamente sostenido y prolongado, exacerbaciones reducidas, una hospitalización reducida, una morbilidad reducida, un número reducido de PE requeridos, una isquemia reducida, un daño a los órganos reducido y un número de víctimas reducido.

Por tanto, la divulgación se refiere al uso de los polipéptidos de la invención para tratar o mejorar una enfermedad relacionada con vWF en un paciente mediante una disminución inesperadamente grande en el tiempo hasta la respuesta, demostrada mediante una recuperación de plaquetas acelerada. La invención también proporciona PE menos frecuentes, al tiempo que mantiene todavía la recuperación de plaquetas en el paciente humano en períodos de tiempo inesperadamente prolongados. Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos para disminuir el tiempo hasta la respuesta en un paciente humano administrando al paciente un polipéptido de la invención, en el que la cantidad del polipéptido administrado es efectiva para cambiar uno o más marcadores de enfermedad de TTP, tal como el número de plaquetas, trombocitopenia, función neurocognitiva, niveles de metaloproteasa similar a desintegrina con repeticiones de trombospondina 13 (ADAMTS13) y títulos de anticuerpo anti-ADAMTS13, niveles de actividad de ADAMTS13, marcador cardiaco (troponina T o troponina I), BNP (péptido natriurético cerebral) o pro-peptido natriurético cerebral N-terminal (NT proBNP), y marcadores de daño cerebral (tal como NSE (enolasa específica de neurona) y S $\beta$ 100 (S100beta)), preferentemente un aumento en el número de plaquetas.

Además, el polipéptido usado en la invención, cuando se administró a un paciente con TTP humano, era seguro tal como se examinó mediante marcadores de laboratorio de seguridad, tales como RICO, vWF y cromógeno de FVIII. Aunque hubo un potencial de un riesgo de sangrado aumentado, este fue totalmente manejable.

- 5 Los marcadores pueden medirse usando métodos estándar conocidos por y usados por el experto en la técnica, tal como diversos ensayos de base inmunológica, incluyendo ensayos de inmunoabsorción ligados a enzima (ELISA; también conocido como inmunoensayo enzimático (EIA)), radioinmunoensayos o ensayos inmunoenzimáticos. También pueden usarse ensayos de base química, colorimétrica y enzimática cuando sea adecuado.
- 10 Por consiguiente, la presente invención proporciona un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que lo necesite, administrando al humano una dosis de 5-40 mg de dicho polipéptido, en el que dicha dosis va seguida en el plazo de 15 min a 4 h de un primer intercambio plasmático (PE).
- 15 Los polipéptidos usados en la invención se administraron como tratamiento adyuvante en momentos específicos en relación con los procedimientos de PE para tratar o prevenir (por ejemplo, reducir o mejorar uno o más síntomas asociados con) una enfermedad relacionada con vWF, por ejemplo, TTP.
- 20 El término “tratar” se refiere a administrar una terapia en una cantidad, una manera y/o un modo efectivo para mejorar un estado, síntoma o parámetro asociado con una enfermedad o para prevenir la progresión de una enfermedad, o bien en un grado estadísticamente significativo o bien en un grado detectable para un experto en la técnica. En el caso del uso terapéutico, el tratamiento puede mejorar, curar, mantener o disminuir la duración de la enfermedad o el estado en el sujeto. En usos terapéuticos, el sujeto puede tener una manifestación parcial o completa de los síntomas. En un caso típico, el tratamiento mejora la enfermedad o el estado del sujeto en una extensión detectable por un médico, o previene el empeoramiento de la enfermedad o el estado. Por ejemplo, mejoran las características y signos clínicos en un episodio agudo de TTP tal como se representa en la tabla 1 o tal como se proporciona en las directrices de tratamiento de TTP (Scully *et al.* 2012 citado anteriormente). Por ejemplo, debido al tratamiento, el recuento de plaquetas se normaliza, el título de autoanticuerpo ADAMTS13 disminuye y/o la actividad de ADAMTS13 aumenta, todo tal como se conoce en la técnica y/o se detalla adicionalmente en el presente documento (véase más adelante). Una cantidad, manera o modo efectivo puede variar dependiendo del sujeto y puede adaptarse al sujeto.
- 25 Tal como se usa en el presente documento, el término “prevenir” significa mitigar un síntoma del trastorno referenciado. En particular, dicho término abarca el rango completo de efectos terapéuticamente positivos de administrar un polipéptido usado en la invención a un sujeto, incluyendo la reducción de, la paliación de y el alivio de, un trastorno relacionado con vWF, por ejemplo, TTP, y síntomas del mismo. El término “prevención” incluye la prevención o postergación del desarrollo de la enfermedad, la prevención o postergación del desarrollo de síntomas y/o una reducción en la gravedad de tales síntomas que se desarrollarán o se espera que se desarrolle. Estos incluyen además la mejora de síntomas existentes, la prevención de síntomas adicionales y la mejora o prevención de las causas subyacentes de los síntomas.
- 30 Tal como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se usan de manera intercambiable. Tal como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, por ejemplo, un mamífero, incluyendo uno distinto de un primate (por ejemplo, una vaca, cerdo, caballo, burro, cabra, camello, gato, perro, cobaya, rata, ratón, oveja) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un macaco cangrejero, gorila, chimpancé y un humano). Un “paciente” se refiere preferiblemente a un humano. Dicho paciente puede incluir ancianos, adultos, adolescentes y niños, de cualquier edad, por ejemplo, niños que oscilan entre la edad de 2 años y menos de 12 años, adolescentes que oscilan entre 12 años y menos de 18 años, adultos que oscilan entre 18 años y menos de 65 años, y ancianos desde 65 años y más.
- 35 Tal como se usan en el presente documento, los ejemplos no limitativos de enfermedades relacionadas con vWF que pueden tratarse incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, síndrome coronario agudo (ACS), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho inestable o estable, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y síndrome de Upshaw-Schülman, preferiblemente TTP.
- 40 Los procedimientos de PE para tratar o prevenir una enfermedad relacionada con vWF, tal como, por ejemplo, TTP se han descrito en Guidelines on the diagnosis and management of TTP and other thrombotic microangiopathies (Scully *et al.* 2012 citado anteriormente). La remisión completa se define como un recuento de plaquetas normal, es decir  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ , y opcionalmente la ausencia de exacerbaciones (véase Scully *et al.* 2012, citado anteriormente).
- 45 Tal como se usa en el presente documento, el “tiempo hasta la respuesta” es el tiempo entre el primer tratamiento de un paciente que tiene un episodio de TTP agudo y un recuento de plaquetas de  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ , en el que el primer tratamiento es un PE o la administración de un polipéptido usado en la invención, o ambos, cualquiera que sea el más temprano.
- 50
- 55
- 60
- 65

- El término “intercambio plasmático” (“PE”) se refiere a un procedimiento terapéutico usado para tratar una variedad de enfermedades, incluyendo TTP, a través de la eliminación en masa de plasma, es decir un procedimiento en el que se elimina un gran volumen de plasma, habitualmente 1-1,5 volúmenes de plasma, que se reemplaza por un fluido de reemplazo (Winters 2012 Hematology ASH Education Book 1:7-12). A través de la eliminación en masa y el reemplazo de plasma, el PE elimina sustancias patológicas tales como autoanticuerpos frente a ADAMTS13 y ULvWF, pero también algunas plaquetas. El plasma se usa como fluido de reemplazo para reemplazar ADAMTS13 cuando se trata púrpura trombocitopénica trombótica (McLeod Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19:157-167). La eliminación en masa y el reemplazo de plasma también tiene implicaciones para pruebas de laboratorio, haciendo que las pruebas del paciente sean intrincadas.
- Dado que el PE implica la eliminación en masa de plasma, cualquier cosa que circule en el plasma se eliminará. Por tanto, este procedimiento no es selectivo, eliminando componentes plasmáticos tanto normales como patológicos, pero también cualquier medicamento para tratar TTP administrado antes del PE.
- El experto en la técnica está muy familiarizado con la determinación del número de plaquetas. Los recuentos de plaquetas pueden realizarse mediante cualquier método conocido en la técnica, tal como manualmente usando un hemocitómetro o con un analizador automatizado, por ejemplo, recuento electrónico. Los recuentos también pueden estimarse durante un examen de frotis de sangre. El método microscópico usa un microscopio de contraste de fases para ver sangre en un portaobjetos de hemocitómetro. El recuento electrónico de plaquetas es el método más común.
- Hay dos tipos de recuento electrónico, sistemas de recuento por impulsos de tensión y electroópticos. Por ejemplo, el analizador de hematología ADVIA puede usarse para obtener recuentos de plaquetas y verificar el recuento obtenido estimando recuentos en un frotis de sangre con tinción de Wright. El ADVIA mide plaquetas mediante citometría de flujo basándose en principios de dispersión de luz. Por ejemplo, las plaquetas se identifican por su tamaño (< 30 FL, dispersión de luz de ángulo bajo) e índice de refracción (de  $n = 1,35$  a  $n = 1,40$  o dispersión de luz de ángulo alto).
- En diversos pacientes tras un episodio agudo de TTP, el polipéptido usado en la invención que comprende dos ISVD frente a vWF, por ejemplo, ALX 0081, se administró después de que dicho paciente hubiera recibido un PE (“PE precedente”; un PE que precede a la administración de la primera dosis del polipéptido usado en la invención). Se observó que en el grupo de sujetos que recibieron un PE precedente (también indicado como “un PEX antes de la aleatorización”), la mediana del tiempo hasta la respuesta disminuyó inesperadamente en 2 días de 4,31 días para la rama de placebo a 2,44 días para la rama de tratamiento: reducción del 43% (tabla 5; PEX antes de la aleatorización = Sí).
- Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a realizar un PE (PE precedente) a un paciente que lo necesite, por ejemplo, un paciente con un episodio agudo de TTP, seguido de un siguiente PE en el plazo de 24 h de dicho PE precedente, y administrar un polipéptido de la invención (“primera dosis”) alrededor de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min antes de empezar dicho siguiente PE, tal como desde 6 h hasta 15 min antes de empezar dicho siguiente PE (el “primer PE”). En la presente invención, el término “primera dosis” significa la primera administración de un polipéptido de la invención a un paciente que lo necesite, por ejemplo, tras un episodio agudo o cada episodio agudo de TTP.
- En una realización, una administración del polipéptido usado en la invención a un paciente, preferiblemente una primera dosis va seguida en el plazo de 5 min a 8 h, tal como en el plazo de 10 min a 6 h o de 15 min a 4 h, por ejemplo, en el plazo de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min de un PE.
- En la presente invención, el término “primer PE” significa el primer PE realizado tras (o en algunos casos de manera concurrente con) la administración a un paciente de una primera dosis del polipéptido usado en la invención. El polipéptido usado en la invención puede administrarse o usarse para su administración en forma de una disolución líquida (por ejemplo, disoluciones inyectables e infusibles). Tales composiciones pueden administrarse por un modo parenteral (por ejemplo, inyección subcutánea, intraperitoneal o intramuscular) o por inhalación.
- Las frases “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” tal como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de la administración enteral y tópica, habitualmente por inyección, e incluyen administración subcutánea (s.c.) o intramuscular, así como infusión e inyección intravenosa (i.v.), intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Preferiblemente, la segunda dosis o dosis adicionales de los polipéptidos usados en la invención descritos en el presente documento se administran por vía subcutánea.
- Preferiblemente, la administración de la primera dosis de un polipéptido usado en la invención tras un episodio agudo de TTP es una inyección en bolo intravenoso, por ejemplo, entregando el polipéptido a través de una vía intravenosa, administrado todo de una vez, a lo largo de un periodo de un minuto o dos. Incluso más preferiblemente, la administración de la primera dosis de un polipéptido usado en la invención tras un episodio agudo de TTP es una inyección de empuje intravenoso, por ejemplo, entregando el polipéptido a través de una vía intravenosa, administrado todo de una vez, a lo largo de un periodo de alrededor de 30 segundos o menos.

Se encontró sorprendentemente que los polipéptidos usados en la invención administrados antes del PE (incluso sin un PE precedente), momento en el que no hay selección de diana farmacológica directa del proceso activo de agregación plaquetaria mediada por ULvWF y puede esperarse que dicho PE elimine el polipéptido, eran todavía capaces de reducir la mediana del tiempo hasta la respuesta mediante una disminución inesperadamente grande de 5 2 días desde 4,92 días para la rama de placebo hasta 3,00 días para la rama de caplacizumab: reducción del 39% (tabla 5: PEX antes de la aleatorización = NO).

10 Los inventores, considerando que el polipéptido usado en la invención es seguro de usar tal como se demostró en estudios previos en voluntarios sanos y el presente estudio con pacientes con TTP (véase el ejemplo 7.5.3), que la TTP puede ser difícil de diagnosticar, especialmente ataques agudos de TTP, y que todo tiempo perdido antes de empezar un tratamiento da como resultado adversidades, concluyeron que este hallazgo tiene el beneficio de que un tratamiento con el polipéptido usado en la invención ya puede empezarse de manera temprana, incluso antes de que el paciente entre en un hospital, tal como, por ejemplo, en una ambulancia. Preferiblemente, el polipéptido usado en la invención, tal como ALX 081, se administra mediante una inyección de empuje intravenoso, dado que esto puede 15 realizarse fácilmente fuera de los hospitales, ahorrando así un tiempo valioso.

20 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a administrar a un paciente que lo necesite, tal como, por ejemplo, pacientes con episodios agudos (ataques agudos) de TTP, un polipéptido de la invención alrededor de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min antes de empezar el PE, tal como desde 6 h hasta 15 min antes de empezar el PE ("primera dosis").

25 En una realización, la administración de una primera dosis de un polipéptido usado en la invención tras un episodio agudo de TTP va seguida de un PE ("primer PE"). Este primer PE, vaya precedido o no por un PE precedente, va seguido de la administración de una segunda dosis o dosis adicional del polipéptido usado en la invención ("segunda dosis" o "dosis adicional"). Preferiblemente, la segunda dosis o dosis adicional se administra en el plazo de 120, 90 o 60 min, tal como en el plazo de 1 - 60 min, por ejemplo, en el plazo de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 o incluso 1 min tras el primer PE. En algunos casos puede ser ventajoso administrar la segunda dosis o dosis adicional conjuntamente o de manera concurrente con el fluido de reemplazo, por ejemplo, el plasma del PE.

30 En realizaciones adicionales, una primera dosis, una segunda dosis o dosis adicional del polipéptido usado en la invención es de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, o 40, 50, 60, 70 u 80 mg, preferiblemente 5-40 mg, incluso más preferiblemente 10 mg, que puede administrarse a un paciente que lo necesite, preferiblemente al día. Para la administración a pacientes juveniles, tales como por ejemplo, niños y adolescentes, la dosis puede ajustarse al peso del paciente. En realizaciones particulares, la dosis es de alrededor de 35 0,01, 0,025, 0,05, 0,075, 0,1, 0,12, 0,14, 0,15, 0,16, 1,08, 0,2, 0,22, 0,24 o 0,25 mg/kg, preferiblemente 0,143 mg/kg, lo que corresponde a una dosis de 10 mg en un adulto de 70 kg.

40 En una realización, la presente invención se refiere a la administración de alrededor de 5 a 40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido usado en la invención, por ejemplo, ALX 0081, en el plazo de 1-60 min tras un procedimiento de PE, por ejemplo, el primer PE, el segundo PE o un PE adicional.

45 En una realización, el polipéptido usado en la invención, por ejemplo, ALX 0081, se administra una vez al día o dos veces al día a un paciente con TTP que lo necesite, preferiblemente un paciente con un recuento de plaquetas por debajo de 100.000/ $\mu$ l de plasma y/o un paciente con una actividad de ADAMTS13 de  $\leq 10\%$  tal como  $\leq 5\%$ :

50 En una realización adicional, un paciente con TTP que lo necesite se trata con

(i) PE; y

55 (ii) una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de dicho polipéptido de 60 min a 1 min tras dicho PE de la etapa (i),

en el que la etapa (i) y la etapa (ii) se repiten una vez o dos veces al día hasta que el recuento de plaquetas de dicho paciente es de al menos 50.000/ $\mu$ l de plasma, tal como 75.000, 100.000, 125.000 o incluso 150.000 por  $\mu$ l de plasma.

55 En algunos casos puede ser ventajoso repetir la etapa (i) y la etapa (ii) durante un mínimo de dos días tras la remisión completa (un recuento de plaquetas de  $\geq 150.000/\mu$ l de plasma).

60 En una realización, 5-40 mg del polipéptido usado en la invención se administran diariamente o dos veces al día durante al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 60, 90 o incluso 120 días después de que el recuento de plaquetas de dicho paciente sea  $\geq 150.000/\mu$ l de plasma, particularmente cuando la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente es  $\leq 10\%$  tal como  $\leq 5\%$ , o después del último PE.

65 Cuando se evalúan los datos según estratificación (1 PEX antes de la aleatorización: Sí y NO), un cociente de riesgo global para la población global suma 2,197 con un valor  $p = 0,013$ . Este cociente de riesgo significa que en cualquier momento, los sujetos que reciben el polipéptido usado en la invención tienen más de dos veces la tasa de consecución

del punto final primario de recuperación de plaquetas confirmada en comparación con sujetos con placebo. Además, esta recuperación de plaquetas se consigue 2 días más rápido en el grupo de tratamiento.

Por tanto, la administración de polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, a pacientes con TTP humanos tras un episodio agudo de TTP proporciona una disminución inesperada en el tiempo hasta la respuesta, independientemente del orden de administración de dicho polipéptido y dicho PE, por ejemplo, ya se realice el PE antes o después de la administración de la primera dosis del polipéptido usado en la invención.

Además se encontró sorprendentemente que el número de exacerbaciones disminuyó de 11 en el grupo de placebo a 3 en el grupo de caplacizumab. Por tanto, hay 3 veces más exacerbaciones en el grupo de placebo (es decir pacientes con TTP que reciben PE y un placebo en lugar del polipéptido usado en la invención) en comparación con el grupo de tratamiento (es decir pacientes con TTP que reciben PE y el polipéptido de la invención; también indicado como grupo de caplacizumab). El término "exacerbación" tal como se usa en el presente documento se refiere a una trombocitopenia recurrente tras una respuesta plaquetaria confirmada y que requiere un nuevo inicio del tratamiento de PE diario tras  $\geq 1$  día pero  $\leq 30$  días tras el último PE.

Esto indica que el polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, puede ser responsable únicamente de tratar y/o paliar (los síntomas de) TTP.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, administrando al humano una dosis de 1-80 mg o 5-40 mg, tal como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 u 80 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido.

Basándose en esta observación sorprendente, los presentes inventores diseñaron un protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, en esencia basado en la idea de que la distribución del tiempo de respuesta plaquetaria confirmada es más corta y no está desplazada y sesgada a la derecha (tiempo más largo hasta la respuesta) en la rama de CAP en comparación con la rama de placebo. En el protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, todos los sujetos se tratan con un periodo de tratamiento de PE fijo, que se establece para 3-5 días, tal como 3 días o 4 días o 5 días, preferiblemente 3 días. En este caso, el periodo de tratamiento de PE puede ser independiente de la recuperación de plaquetas ( $\geq 150.000/\mu\text{l}$ ). En el protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, se disminuyen la carga para el paciente y los costes.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, para su uso según lo reivindicado, que comprende: (i) realizar un PE; y (ii) administrar una dosis de 5-40 mg, tal como 10 mg del polipéptido usado en la invención de 15 min a 4 h tras dicho PE de la etapa (i), en el que la etapa (i) y la etapa (ii) se repiten una vez al día durante 3-5 días, tal como 3 días, 4 días o 5 días, preferiblemente 3 días; seguido de comprender además la administración una vez al día de una dosis de 5-40 mg, tal como 10 mg de dicho polipéptido durante al menos 10 días, tal como al menos 20 días o al menos 30 días y/o durante al menos 10 días, tal como al menos 20 días o al menos 30 días después de que el recuento de plaquetas de dicho paciente haya sido por primera vez  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ .

En el presente estudio, se ha hecho un seguimiento durante hasta un año a pacientes con TTP para determinar la remisión. El término "remisión" tal como se usa en el presente documento se refiere la respuesta plaquetaria confirmada y la ausencia de exacerbación. El término "respuesta plaquetaria confirmada" tal como se usa en el presente documento se refiere al tiempo hasta la respuesta de tratamiento tal como se define mediante una recuperación de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ , respuesta que tiene que confirmarse 48 horas tras la notificación inicial de la recuperación de plaquetas por encima de  $150.000/\mu\text{l}$  mediante una medición *de novo* de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ , y preferiblemente LDH  $\leq 2 \times \text{ULN}$ .

Tal como se demuestra en el presente documento (ejemplo 7.5.5; tabla 8), en global, 29 pacientes en el grupo de tratamiento entraron en remisión, en comparación con 18 pacientes en el grupo de placebo. Por tanto, la rama de tratamiento presenta 1,6 x más sujetos con remisión completa frente a la rama de placebo.

Tal como se indicó anteriormente, el recuento de plaquetas es el medio primario para evaluar la remisión. La medición de la actividad de ADAMTS13 en pacientes con un historial de TTP clásica es importante, porque niveles bajos han mostrado ser predictivos de recaída. Sin embargo, no está claro en la actualidad (y los datos están en conflicto) si el título de un anticuerpo inhibidor con respecto a ADAMTS13 es significativo, es decir si aquellos individuos con un título alto de anticuerpo anti-ADAMTS13 tienen más probabilidad de recaer que aquellos con un título bajo. El experto en la técnica aprecia que las pruebas actuales de ADAMTS13 se realizan en condiciones estáticas y no siempre reflejan de manera precisa los cambios fisiológicos que se producen *in vivo* ([http://practical-haemostasis.com/Miscellaneous/Miscellaneous%20Tests/adamts13\\_assays.html](http://practical-haemostasis.com/Miscellaneous/Miscellaneous%20Tests/adamts13_assays.html)).

Los presentes inventores observaron ahora inesperadamente que la remisión parece más pronunciada para el subgrupo de sujetos con una actividad de ADAMTS13 de nivel inicial baja (es decir menos del 10%, tal como menos

del 5%), cuando se empieza el tratamiento, por ejemplo, se administra la primera dosis, del polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081 (véase el ejemplo 7.5.8).

Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF para su uso según lo reivindicado, administrando a dicho humano una primera dosis de 1-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido, hasta que el recuento de plaquetas de dicho humano es  $\geq 150000/\mu\text{l}$ . En un aspecto preferido, dicho humano tiene una actividad de ADAMTS13 de menos del 10%, tal como menos del 5% cuando se administra dicho polipéptido.

10 En el presente estudio, se ha hecho un seguimiento durante hasta un año a pacientes con TTP para determinar recaídas. El término "recaída" tal como se usa en el presente documento se refiere a un acontecimiento *de novo* de TTP que se produce más tarde de 30 días tras el último PE diario, por ejemplo, 0-2 días después de que el paciente con TTP mostrara remisión completa. La fecha "más tarde de 30 días" coincide con la última administración del polipéptido usado en la invención en el presente estudio.

15 Aunque el polipéptido usado en la invención ya no se administró más, se ha encontrado que el número de recaídas en el grupo de caplacizumab igualaba el número de recaídas en el grupo de placebo (véase la tabla 7, en el ejemplo 7.5.4).

20 Los inventores observaron que en ambas ramas de tratamiento, las recaídas son más prominentes en pacientes con una actividad de ADAMTS13 de nivel inicial de <10%, tal como < 5%, aunque la actividad de ADAMTS13 solo estaba disponible en un subconjunto de los pacientes. Los inventores hipotetizaron (sin restringirse a ninguna teoría) que esto puede indicar que los pacientes con una actividad de ADAMTS13 de nivel inicial de <10%, tal como < 5% son más propensos a recaídas (o exacerbaciones), cuando se detiene la administración del polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081.

25 En particular, los datos respaldan el uso de la actividad de ADAMTS13 como marcador predictivo para recurrencias de TTP y su potencial para decisiones de tratamiento. La actividad de ADAMTS13 es capaz de predecir recaídas que se producen poco después de detener el tratamiento de caplacizumab. Estas recaídas se consideran recaídas del episodio de TTP presente (actividad patológica no resuelta, basado en una actividad de ADAMTS13 continuamente baja). Un periodo de tratamiento de 30 días (tras PE) con caplacizumab ha demostrado un impacto significativo sobre el número de exacerbaciones. Por tanto, prolongar el periodo de tratamiento de caplacizumab para aquellos pacientes que corren el riesgo de recaída (es decir con actividad patológica subyacente basada en la actividad de ADAMTS13) mantendrá los efectos protectores de caplacizumab hasta que la enfermedad subyacente se haya tratado y resuelto adecuadamente. A la inversa, el tratamiento por precaución con caplacizumab reducirá el riesgo de un -nuevo- episodio agudo de TTP.

30 Por tanto, el tratamiento con polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, debe continuarse durante períodos más largos en comparación con pacientes con una actividad mayor. El polipéptido usado en la invención debe administrarse a un paciente con TTP para reducir el riesgo de y/o prevenir la probabilidad de recaída(s) hasta que la actividad de ADAMTS13 sea de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45% o incluso el 50% en comparación con la actividad normal o de referencia.

35 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) para su uso en la reducción del riesgo de y/o la prevención de un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, por ejemplo, TTP, en un humano que lo necesite, que comprende una etapa (i): administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg, de dicho polipéptido. Preferiblemente, dicho riesgo se reduce en un factor de al menos 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100. Preferiblemente dicho riesgo se reduce en un 10% o incluso más, tal como un 20%, un 30%, un 40%, un 50%, un 60% o más, tal como un 80% o incluso un 100%.

40 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar a dicho humano dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces, o incluso más de 10 veces, tal como 20 veces, preferiblemente más de 30 veces o incluso más.

45 El método de la divulgación, en el que dicha etapa (i) de administrar a dicho humano dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días, tal como 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o incluso más.

50 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha dosis se administra 1 vez al día o dos veces al día.

55 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso según lo reivindicado, que comprende además

- (ii) medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente;
- (iii) comparar dicha actividad de ADAMTS13 con una actividad de ADAMTS13 de referencia; y
- 5 (iv) si dicha actividad de ADAMTS13 es menor del 30%, tal como el 20%, el 15%, el 10% o el 5% de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia, entonces repetir dicha etapa (i) de administrar a dicho humano dicho polipéptido.

10 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha actividad de ADAMTS13 de dicho paciente se mide cada día, o cada 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, preferiblemente al menos una vez cada semana.

15 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que la etapa (i) se repite hasta que dicha actividad de ADAMTS13 es de al menos el 5%, el 10%, el 15%, tal como el 20% o incluso el 30% o más de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia.

20 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que la etapa (i) de administrar a dicho humano dicho polipéptido se repite hasta que dicha actividad de ADAMTS13 es de al menos el 5%, el 10%, el 15%, tal como el 20% o el 30% de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia en al menos 2 mediciones consecutivas. Preferiblemente, dichas 2 mediciones consecutivas están separadas al menos 24 h, más preferiblemente 48 h, tal como separadas al menos 3 días o incluso más, tal como separadas 4, 5, 6 o incluso 7 días, preferiblemente separadas una semana.

25 Por consiguiente, la presente invención se refiere a un polipéptido para su uso según lo reivindicado, en el que dicha etapa (i) de administrar a dicho humano dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días o incluso más, después de que dicha actividad de ADAMTS13 sea de al menos el 5%, al menos el 10%, al menos el 15%, tal como el 20% o al menos el 30% de dicha actividad de referencia en al menos 2 mediciones consecutivas.

30 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) para su uso en la reducción del riesgo de y/o la prevención de un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, que comprende la etapa (i): administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido, que comprende además

- 35 - medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente;
- comparar dicha actividad de ADAMTS13 con una actividad de ADAMTS13 de referencia; y
- 40 - si dicha actividad de ADAMTS13 es  $\geq 5\%$ , tal como  $\geq 10\%$ , o incluso  $\geq 15\%$ , o más del 20% o del 30% de dicha actividad de ADAMTS13 de referencia, entonces repetir dicha etapa (i) durante como máximo 30 días, tal como, como máximo, 20 días, o incluso 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 días o incluso 1 día.

45 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) para su uso en la reducción del riesgo de y/o la prevención de un episodio agudo de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, que comprende al menos las siguientes etapas:

- 50 (i) medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente;
- (ii) comparar dicha actividad de ADAMTS13 con una actividad de ADAMTS13 de referencia; y
- (iii) si dicha actividad de ADAMTS13 es menor del 30%, del 20%, del 15%, del 10% o del 5% de dicha actividad de referencia, entonces administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg, preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF).

60 Tal como se usa en el presente documento, reducir el riesgo o la incidencia incluye disminuir la probabilidad o incidencia de una indicación, síntoma o resultado de enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, para un sujeto en comparación con una población control relevante, por ejemplo, no tratada, o en el mismo sujeto antes del tratamiento según la divulgación.

65 Una indicación, síntoma o resultado de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, tal como se usa en el presente documento incluye daño a los órganos, daño isquémico, formación de microtrombos, exacerbaciones, mortalidad, recaídas, uno o más marcadores de enfermedad de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, incluyendo el número de plaquetas, trombocitopenia, función neurocognitiva, niveles de ADAMTS13 y títulos de

- anticuerpo anti-ADAMTS13, niveles de actividad de ADAMTS13, marcador cardiaco (troponina T o troponina I), BNP (péptido natriurético cerebral) o pro-péptido natriurético cerebral N-terminal (NT proBNP), creatinina y marcadores de daño cerebral (tal como NSE (enolasa específica de neurona) y S $\beta$ 100 (S100beta)), preferentemente los marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, niveles de troponina T y/o troponina I, y/o los niveles de creatinina.
- 5
- El riesgo o la incidencia reducidos pueden incluir el retardo o la prevención de la aparición de una indicación, síntoma o resultado de enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP. El riesgo o la incidencia también pueden reducirse si la gravedad de una indicación, síntoma o resultado de enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, se reduce hasta un nivel de modo que no sea de relevancia clínica. Es decir, la indicación, síntoma o resultado de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, puede estar presente, pero a un nivel que no pone en peligro la vida, las actividades y/o el bienestar del sujeto. En algunas circunstancias, la ocurrencia de la enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, se reduce en la medida de que el sujeto no presenta ningún signo de la enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, durante y/o tras el periodo de tratamiento.
- 10
- 15
- Se apreciará que no puede obtenerse una prueba actual de riesgo reducido para un individuo, porque si se proporciona tratamiento entonces no puede decirse si una indicación, síntoma o resultado de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, se habría producido o se habría producido antes en ausencia de tal tratamiento. Por tanto, el concepto de riesgo y, riesgo aumentado o reducido, solo se refiere a valores estadísticos. Además, la reducción del riesgo de una indicación, síntoma o resultado de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, puede reflejarse en una reducción en la gravedad de una indicación, síntoma o resultado de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, así como en la ausencia de observación o retardo en la observación de una indicación, síntoma o resultado de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP.
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- De hecho, este razonamiento está respaldado por la normalización de los marcadores de daño a los órganos. En particular, los resultados indican que los marcadores de daño a los órganos, tales como troponina I y T, LDH y creatinina, vuelven más rápido a niveles normales en sujetos que reciben el polipéptido usado en la invención, por ejemplo, ALX 0081, que en sujetos que reciben placebo (véase el ejemplo 7.5.7).
- Por tanto, los resultados sugieren que una tasa de normalización más rápida de estos marcadores de daño a los órganos está ligada a un mejor desenlace clínico, es decir un riesgo reducido de y menos daño a los órganos debido a isquemia de órganos provocada por microtrombos.
- Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un método tal como se describe en el presente documento, en el que
- el riesgo de daño a los órganos, daño isquémico y/o formación de microtrombos se reduce en un 10%, un 20%, un 30%, preferiblemente en al menos un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100% (por ejemplo, ausencia de daño a los órganos, daño isquémico y/o formación de microtrombos debido a la enfermedad relacionada con vWF);
  - el riesgo de daño a los órganos, daño isquémico y/o formación de microtrombos se reduce en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100;
  - el daño a los órganos, el daño isquémico y/o la formación de microtrombos se reduce preferiblemente en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;
  - el daño a los órganos, el daño isquémico y/o la formación de microtrombos se reduce en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100;
  - los marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, los niveles de troponina T, troponina I y/o los niveles de creatinina, vuelven a al menos el 40% o incluso al menos el 50%, tal como el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o incluso hasta el 100% de los niveles normales;
  - los marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, los niveles de troponina T, troponina I y/o los niveles de creatinina, mejoran en al menos un 20%, tal como un 30% o incluso más, tal como un

- 40% o incluso al menos 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100% de los niveles normales. Preferiblemente, dichos marcadores de daño a los órganos, tales como los niveles de LDH, los niveles de troponina T, troponina I y/o los niveles de creatinina, mejoran en menos de 30 días de tratamiento, preferiblemente, en menos de 20 días de tratamiento, tal como, menos de 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 días o incluso en el plazo de 1 día.
- 5 - el número de plaquetas se mantiene a  $\geq 150000/\mu\text{l}$ .
- 10 - el tiempo hasta la normalización de plaquetas ( $\geq 150000/\mu\text{l}$ ) se reduce en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 35%, un 39%, preferiblemente en al menos un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%.
- 15 - el riesgo de exacerbaciones se reduce en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;
- 20 - el riesgo de exacerbaciones se reduce en un factor de 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100;
- 25 - la mortalidad debido a dicha enfermedad relacionada con vWF se reduce en un 10%, un 20%, un 30%, preferiblemente en al menos un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%;
- 30 - la mortalidad debido a dicha enfermedad relacionada con vWF se reduce en un factor de 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100; y/o
- 35 - la remisión se aumenta en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100.
- El término "actividad de referencia" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la actividad de ADAMTS13 promedio de 5 sujetos sanos en el ensayo realizado, que se establece al 100%. Por ejemplo, en un ensayo FRETS-vWF73, la curva de calibración generada usando un conjunto de plasma humano normal, en el que la pendiente de la curva de regresión se calcula para cada muestra de calibración y se usa para generar la curva de calibración (línea de tendencia:  $y = ax + b$ ; siendo  $x = \text{ADAMTS13} (\%)$  e  $y = \text{delta de RFU/delta de tiempo}$ ). La actividad de ADAMTS13 (%) de una muestra se calcula entonces como:  $(y - b) \times 1/a$ . De hecho, en general los pacientes que recayeron tenían una actividad de ADAMTS13 menor que los pacientes que no recayeron.
- Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido para reducir el riesgo de y/o prevenir daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos, por ejemplo, que pueden provocarse por una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que lo necesite, que comprende al menos la siguiente etapa (i) administrar a dicho humano una dosis de 5-40 mg/día, preferiblemente 10 mg/día de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF); en el que la administración de dicho polipéptido reduce el riesgo de y/o previene daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos en al menos un 10%, un 20%, un 30%, preferiblemente en al menos un 40%, o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%. Preferiblemente, la administración de dicho polipéptido reduce el riesgo de y/o previene daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos en un factor de 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,75, 1,8, 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100.
- 40 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido para reducir el riesgo de y/o prevenir daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o incluso más tiempo, tal como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o incluso más tiempo, tal como 1 mes o incluso 2 meses.
- 45 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido para reducir el riesgo de y/o prevenir daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos tal como se describe en el presente documento, que comprende además medir la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente, preferiblemente una vez por semana.
- 50 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido para reducir el riesgo de y/o prevenir daño isquémico, daño a los órganos y/o formación de microtrombos tal como se describe en el presente documento, en el que dicha etapa (i) de administrar dicho polipéptido se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o incluso más tiempo, tal como 1 semana, 2 semanas, 3 semanas o incluso más tiempo, tal como 1 mes o incluso 2 meses, cuando la actividad de ADAMTS13 es [por primera vez]  $\geq 5\%$ , tal como  $\geq 10\%$ , o incluso  $\geq 15\%$  de una actividad de ADAMTS13 de referencia.
- 55 Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido de la invención para tratar un síntoma de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, en un humano que padece dicha enfermedad, que comprende

administrar al sujeto un polipéptido de la invención, en una cantidad efectiva para tratar el síntoma de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que padece dicha enfermedad.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido de la invención para inhibir en un humano la aparición o la progresión de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, cuya inhibición se efectúa mediante la unión de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) a vWF, que comprende administrar al humano dosis inhibitorias efectivas a un intervalo predeterminado de dicho polipéptido, en el que cada administración del anticuerpo entrega al humano desde 0,1 mg por kg hasta 25 mg por kg del peso corporal del humano, para inhibir de ese modo la aparición o la progresión de la enfermedad en el humano.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a un polipéptido para reducir la probabilidad de que un humano contraiga daño isquémico a los órganos por una enfermedad relacionada con vWF, que comprende administrar al humano a una dosis predefinida un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF), en el que cada administración del anticuerpo entrega al humano desde 0,1 mg por kg hasta 25 mg por kg del peso corporal del humano, para de ese modo reducir la probabilidad de que el humano contraiga daño isquémico a los órganos.

El modelado basado en estos resultados indica que mantener la administración de polipéptidos durante tiempos prolongados de la invención sería eficaz en la prevención de episodios agudos. Este perfil ventajoso da como resultado un peligro para la salud disminuido. Por tanto, puede concluirse que el polipéptido usado en la invención previene recaídas.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a la administración del polipéptido usado en la invención cada 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 días o incluso 2, 4, 6 u 8 semanas a dosis que oscilan entre 1-80 mg, tal como 5-40 mg, preferiblemente en la prevención de episodios agudos de TTP. Dosis eficaces particulares son 10-20 mg. En realizaciones particulares, la dosis comprende alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 u 80 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido que comprende al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081.

En una realización la presente divulgación se refiere a un método de prevención de la recaída en un paciente con TTP, que comprende

- (1) medir la actividad de ADAMTS13 de un paciente con TTP mediante un ensayo, tal como un ensayo directo o uno indirecto;
- (2) comparar dicha actividad de la etapa (1) con un valor de referencia (valor normal); y
- (3) si la actividad de ADAMTS13 de la etapa (1) es menos del 15%, tal como menos del 10% y menos del 5%, del valor de referencia, entonces administrar el polipéptido de la invención, por ejemplo, ALX 0081,

previniendo de ese modo una recaída.

Los resultados preliminares sugieren que la administración de la primera dosis del polipéptido usado en la invención antes del primer PE ya da como resultado un aumento en el número de plaquetas.

Por consiguiente, la presente divulgación se refiere a la administración del polipéptido usado en la invención en un paciente que lo necesite, tal como, por ejemplo, un paciente que experimenta un episodio agudo de TTP, una dosis de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 50, 60, 70 u 80 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido que comprende al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081.

Los polipéptidos usados en la invención que comprenden dos ISVD frente a vWF, por ejemplo, ALX 0081, pueden administrarse a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano) solos o en combinación con un segundo agente, por ejemplo, un segundo agente terapéutica o farmacológicamente activo, para tratar o prevenir (por ejemplo, reducir o paliar uno o más síntomas asociados con) una enfermedad relacionada con vWF, por ejemplo, TTP.

Los ejemplos no limitativos de agentes que pueden formularse conjuntamente con los polipéptidos usados en la invención que comprenden dos ISVD frente a vWF, por ejemplo, ALX 0081, incluyen, por ejemplo, tratamiento inmunosupresor adicional (por ejemplo, corticosteroides tales como (metil)prednisolona o (metil)prednisona; o rituximab), agentes antiplaquetarios (por ejemplo, aspirina), terapia de apoyo con transfusión de glóbulos rojos o suplementación de folato, tratamiento con vincristina o ciclosporina, anticuerpos anti-autoADAMTS13 o ADAMTS13. Tales terapias de combinación pueden utilizar ventajosamente dosificaciones menores de los agentes terapéuticos administrados, evitando así posibles toxicidades o complicaciones asociadas con las diversas monoterapias.

En una realización, la presente invención se refiere a una terapia de combinación del polipéptido usado en la invención junto con un tratamiento inmunosupresor, en particular rituximab, que previene eficientemente recaídas en pacientes

con TTP. Preferiblemente, la terapia de combinación se proporciona hasta que la actividad de ADAMTS13 sea al menos  $\geq 5\%$ , tal como  $\geq 10\%$ ,  $>15\%$ ,  $>20\%$ ,  $25\%$ ,  $30\%$ ,  $35\%$ ,  $40\%$ ,  $45\%$  o incluso normalizada tal como  $\geq 50\%$  de la actividad normal.

- 5 La TTP sigue siendo un diagnóstico basado en el historial clínico, un examen del paciente y el frotis de sangre. Los ensayos de ADAMTS13 ayudan a confirmar el diagnóstico y monitorizar el curso de la enfermedad y la posible necesidad de tratamientos adicionales. Los episodios agudos de TTP pueden diagnosticarse según la tabla 1 y las directrices de, por ejemplo, Scully *et al.* (2012 citado anteriormente).

10 **Tabla 1 Características y signos clínicos en episodio agudo de TTP.**

Trombocitopenia	Epistaxis, magulladura, petequias, sangrado gingival, hematuria, menorragia, sangrado gastrointestinal, hemorragia retinal y hemoptisis
Neurológicos centrales – a menudo fluctuantes y variables 70-80%	Confusión, cefalea, paresia, afasia, disartria, problemas visuales, encefalopatía, coma (10%)
Fiebre ( $>37,5^{\circ}\text{C}$ )	
Síntomas no específicos	Palidez, ictericia, fatiga, artralgia o mialgia
Ictericia	Que resulta de anemia hemolítica microangiopática
Deterioro renal	Proteinuria, microhematuria
Cardiacos	Dolor de pecho, insuficiencia cardiaca, hipotensión
Tracto gastrointestinal	Dolor abdominal

15 La eficacia de cualquier polipéptido particular usado en la invención o régimen de dosificación puede determinarse mediante métodos disponibles para los expertos en la técnica. Brevemente, durante un ensayo clínico, los pacientes pueden ser observarse por personal médico y el estado patológico se evalúa mediante cualquier combinación de criterios. La mejora del estado patológico de un paciente se determina basándose en estos criterios en numerosos puntos de tiempo y la combinación de estas determinaciones en una población de pacientes se representa gráficamente para evaluar la eficacia de tratamiento.

20 En realizaciones a modo de ejemplo, la evaluación de la eficacia puede medirse mediante cualquiera o todos los criterios expuestos a continuación:

- Tiempo hasta la respuesta de tratamiento, definido por una recuperación de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ . Esta respuesta tiene que confirmarse 48 horas tras la notificación inicial de recuperación de plaquetas por encima de  $150.000/\mu\text{l}$  mediante una medición *de novo* de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$  y preferiblemente mediante LDH  $\leq 2 \times \text{ULN}$
- Número de sujetos con remisión completa
- Número de (sujetos con) exacerbaciones de TTP y tiempo hasta la primera exacerbación de TTP. Exacerbación se define como trombocitopenia recurrente tras una respuesta y que requiere un nuevo inicio de tratamiento de PE diario tras  $\geq 1$  día, pero  $\leq 30$  días tras el último PE diario.
- Número de sujetos que recaen de TTP (definido como evento *de novo* de TTP que se produce más tarde de 30 días tras el último PE diario) durante un máximo de 1 año, y tiempo hasta la primera recaída de TTP
- Datos de PE diarios, incluyendo acontecimientos adversos graves (SAE) relacionados con el tratamiento de PE diario
- Función neurocognitiva, medida mediante una batería de pruebas neurocognitivas, a la remisión completa y al seguimiento de 1 año. Esta prueba irá precedida de la escala de coma de Glasgow para medir el estado de conciencia del sujeto
- Mejora de la disfunción orgánica y mejora de los signos y síntomas relacionados con TTP
- Mortalidad total en el plazo del periodo de tratamiento de PE diario y en el plazo del periodo de tratamiento con el fármaco del estudio posterior (incluyendo retirada gradual)
- Determinación de biomarcadores de TTP incluyendo, pero sin limitarse a, niveles de metaloproteasa similar a desintegrina con repeticiones de trombospondina 13 (ADAMTS13) y títulos de anticuerpo anti-ADAMTS13.

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de las eficacias.

- Por ejemplo, la actividad de ADAMTS13 puede evaluarse usando electroforesis de multímeros de vWF para detectar multímeros ultragrandes no escindidos mediante la proteasa (Moake *et al.* (1982) *The New England journal of medicine* 307, 1432-1435; Furlan, *et al.* (1997) *Blood* 89, 3097-3103 7, 8). La actividad de ADAMTS13 puede someterse a prueba empleando FRETs-vWF73, un fragmento de vWF modificado químicamente para emitir fluorescencia cuando se escinde mediante ADAMTS13. En el ensayo, FRETs-vWF73 se añade a una muestra del plasma del paciente y se mide el cambio en la fluorescencia a lo largo del tiempo para determinar la actividad de ADAMTS13. Si está presente un inhibidor, es frecuentemente un anticuerpo IgG neutralizante dirigido frente a ADAMTS13, que puede medirse mediante ELISA (Kokame *et al.* (2005) *British journal of haematology* 129, 93-100). Alternativamente o además, la actividad de ADAMTS13 puede determinarse tal como se describe en, por ejemplo, Vesely *et al.* (2003, citado anteriormente), Fontana *et al.* (2004, citado anteriormente) o Remuzzi *et al.* (*Blood* 2002; 100: 778-7852002). Por ejemplo, los ensayos de la actividad de ADAMTS13 indirectos implican la detección de escisión de productos de o bien una molécula de VWF de longitud completa o bien un fragmento de VWF que abarca el sitio de escisión de ADAMTS13 en el dominio A2 de VWF. (1) Ensayos de unión a colágeno. Se incuba plasma normal o VWF purificado con la muestra de plasma de prueba en presencia de BaCl2 y urea 1,5 M, lo que desnaturaliza el VWF. El VWF se escinde mediante ADAMTS13 y se mide el VWF residual mediante su unión a colágeno de tipo III. El VWF unido se cuantifica usando un ensayo ELISA con un anticuerpo anti-VWF conjugado. (2) Agregación inducida por ristocetina. Este es similar al ensayo de unión a colágeno anterior, pero se mide el VWF residual mediante agregación plaquetaria inducida por ristocetina usando un agregómetro de plaquetas. (3) Ensayos ELISA funcionales. En este ensayo se inmoviliza un fragmento de VWF recombinante sobre una placa de ELISA usando un anticuerpo para una etiqueta en el VWF. El fragmento de VWF codifica para el dominio A2 y el sitio de escisión de ADAMTS13 en Tyr1605-Met1606 y está etiquetado con S-transferasa [GST]-histidina [GST-VWF73-His]. Se añade plasma al fragmento GST-VWF73-His inmovilizado y se produce la escisión del fragmento inmovilizado en el sitio de escisión de ADAMTS13. El fragmento de VWF escindido, residual, se mide usando un segundo anticuerpo monoclonal que reconoce solo el fragmento de VWF escindido y no el fragmento de interacción. Por tanto, la actividad de ADAMTS13 es inversamente proporcional a la concentración de sustrato residual. Este método forma la base para el ELISA de actividad de ADAMTS13 TECHNOZYM®.

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de autoanticuerpos frente a ADAMTS13, por ejemplo, los autoanticuerpos anti-ADAMTS13 pueden determinarse mediante ELISA, tal como el ELISA de ADAMTS13 INH TECHNOZYM® (Technoclone).

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de la actividad del cofactor ristocetina en muestras humanas, por ejemplo, el cofactor ristocetina puede determinarse mediante el vW Select de Bio/Data corp. En un analizador agregómetro PAP-8E (Bio/Data corp.).

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de factor VIII en muestras humanas, por ejemplo, usando Factor VIII Coamatic (Chromogenix) en un analizador de evolución STA-R (Diagnostica Stago).

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de antígeno de factor de von Willebrand en muestras humanas, por ejemplo, usando un ensayo inmunoquímico (por ejemplo, usando una prueba STA Lia vWF:Ag) en un analizador de evolución STA-R (Diagnostica Stago).

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de niveles de LDH. La mayoría de los métodos se basan en un análisis enzimático a base de lactato deshidrogenasa en un espectrómetro. Una revisión conveniente se proporciona por Medbø *et al.* (2000) "Examination of four different instruments for measuring blood lactate concentration". *Scand J Clin Lab Invest* 60:367-380. Diversas empresas proporcionan ensayos, tal como Abnova (número de catálogo KA1653) que mide la catálisis mediante LDH de la interconversión de lactato y piruvato, es decir un ensayo de LDH colorimétrico no radiactivo basado en la reducción de la sal de tetrazolio MTT en una reacción enzimática acoplada con NADH para dar una forma reducida de MTT que presenta un máximo de absorción a 565 nm. La intensidad del color púrpura formado es directamente proporcional a la actividad enzimática. De manera similar, en el kit de Sigma Aldrich (MAK066-1KT), LDH reduce NAD a NADH, lo que se detecta específicamente mediante un ensayo colorimétrico (450 nm). Los valores normales se proporcionan en la tabla 1.1 a continuación.

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de troponina I y T. En general, la troponina T e I se miden mediante métodos de inmunoensayo, que están disponibles en muchas plataformas de inmunoensayo diferentes, por ejemplo, DPC Immulite, Abbott AxSYM, Bayer ACS:Centaur, Ortho Vitros, Roche Elecsys, third generation. Una revisión conveniente se proporciona por Wu *et al.* (1999) *National Academy of Clinical Biochemistry Standards of Laboratory Practice: recommendations for the use of cardiac markers in coronary artery diseases*. *Clin Chem*. julio de 1999;45(7):1104-21. Los valores normales se proporcionan en la tabla 1.1 a continuación.

El experto en la técnica está familiarizado con la determinación de creatinina. Una revisión conveniente se proporciona por Peake y Whiting "Measurement of Serum Creatinine - Current Status and Future Goals" *Clin Biochem Rev*. noviembre de 2006; 27(4): 173-184. Por ejemplo, los niveles de creatinina pueden determinarse mediante el kit de ensayo de creatinina de Abcam (ab65340) o el kit de ensayo de creatinina de BioVision. En el ensayo, la creatinina se

5 convierte en creatina mediante creatinina, la creatina se convierte en sarcosina, que se oxida específicamente para producir un producto que reacciona con una sonda para generar color rojo ( $\lambda_{\text{máx}} = 570 \text{ nm}$ ) y fluorescencia ( $\text{Ex/Em} = 538/587 \text{ nm}$ ). Los valores normales se proporcionan en la tabla 1.1 a continuación. Dado que la cantidad de creatinina en la sangre aumenta con la masa muscular, los hombres tienen habitualmente mayores niveles de creatinina que las mujeres.

**Tabla 1.1: Valores normales**

Prueba	Muestra	Unidades convencionales	Unidades del SI
Creatinina	Suero	0,7-1,3 mg/dl	61,9-115 $\mu\text{mol/l}$
Lactato deshidrogenasa (LDH)	Suero	60-160 U/l	1-1,67 $\mu\text{kat/l}$
Troponina I	Plasma	< 0,1 ng/ml	< 0,1 $\mu\text{g/l}$
Troponina T	Suero	$\leq 0,03 \text{ ng/ml}$	$\leq 0,03 \mu\text{g/l}$

10 Se apreciará que los valores normales proporcionados en la tabla 1.1 pueden variar entre laboratorios, entre hombres y mujeres, y por edad. No obstante, el experto en la técnica considerará que dependiendo del ensayo usado, los valores normales proporcionados por el fabricante pueden usarse normalmente como referencia, o alternativamente, los valores normales evaluados por el médico en el entorno específico.

15 Los polipéptidos usados en la invención comprenden normalmente al menos un ISVD frente a vWF. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina usados en la presente invención se unen a y/o tienen afinidad por vWF. En el contexto de la presente invención, "vWF" incluye, pero no está limitado a, vWF de macaco cangrejero, babuino, cerdo, cobaya, ratón y/o humano y lo más preferido vWF humano, es decir SEQ ID NO: 20 o la entrada de GenBank: NP\_000543.

20 Preferiblemente, el ISVD frente a vWF consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que:

a) CDR1 comprende o consiste esencialmente en:

25 - la secuencia de aminoácidos YNPMG; o  
 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos YNPMG;

30 y

b) CDR2 comprende o consiste esencialmente en:

35 - la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; o  
 - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG; o  
 40 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos AISRTGGSTYYPDSVEG;

y

45 c) CDR3 comprende o consiste esencialmente en:

50 - la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPLSEYTF; o  
 - una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de al menos el 80%, preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95%, incluso más preferiblemente al menos el 99% con la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPLSEYTF; o  
 - una secuencia de aminoácidos que tiene 2 o solo 1 diferencia(s) de aminoácido con la secuencia de aminoácidos AGVRAEDGRVRTLPLSEYTF.

55 Incluso más preferiblemente, el ISVD frente a vWF consiste esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4, respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3, respectivamente), en las que:

- a) CDR1 es YNPMG (SEQ ID NO: 20);
- b) CDR2 es AISRTGGSTYPDSVEG (SEQ ID NO: 21); y
- 5 c) CDR3 es AGVRAEDGRVRTLPSYEYTF (SEQ ID NO: 22).

Incluso más preferiblemente, el ISVD frente a vWF está representado por SEQ ID NO: 19 (12A02H1).

Preferiblemente, los polipéptidos usados en la invención comprenden o consisten en al menos dos ISVD frente a vWF.

10 Incluso más preferiblemente, los polipéptidos usados en la presente invención comprenden o consisten en dos ISVD frente a vWF definidos por las SEQ ID NO: 1-18, y lo más preferiblemente SEQ ID NO: 1 (ALX 0081; INN caplizumab). ALX 0081 es un nanocuerpo bivalente, que consiste en dos bloques constructivos monovalentes idénticos, que seleccionan como diana vWF.

15 Los polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-19, pueden usarse en un tratamiento de una enfermedad relacionada con vWF, en particular púrpura trombocitopénica trombótica (TTP).

20 Los términos "polipéptido" y "secuencia de aminoácidos" se usan de manera intercambiable en el presente documento.

25 Por tanto, por ejemplo, los polipéptidos adecuados para su uso en la invención pueden incluir los compuestos en la tabla A-1, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-19 o 20-22, o un compuesto que tiene una identidad secuencia de aminoácidos del 80% o más, más preferiblemente del 85% o más, lo más preferiblemente del 90%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, del 99% o más, con un compuesto en la tabla A-1 (véase la sección de definiciones para "identidad de secuencia").

30 Preferiblemente el ISVD frente a vWF para su uso en los polipéptidos usados en la invención son compuestos similares a 12A02H1. Para los propósitos de la presente descripción un compuesto similar a 12A02H1 es un compuesto que comprende 12A02H1 (es decir SEQ ID NO: 19) o un compuesto que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos del 80% o más, más preferiblemente del 85% o más, lo más preferiblemente del 90%, del 95%, del 96%, del 97%, del 98%, del 99% o más, con 12A02H1 (SEQ ID NO: 19). Un polipéptido particularmente preferido que comprende dos ISVD frente a vWF es ALX 0081 (SEQ ID NO: 1).

35 Dominios variables únicos de inmunoglobulina, tales como dominios VHH de camélido, dominios VH camelizados o dominios VHH humanizados, representan una clase que está creciendo rápidamente de agentes terapéuticos. Por ejemplo, se han descrito dominios variables únicos de inmunoglobulina frente a vWF en los documentos WO2004/015425, WO2004/062551, WO2006/074947, WO2006/122825, WO2009/115614 y WO2011/067160. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina preferidos adicionales para su uso en los polipéptidos usados en la invención incluyen los nanocuerpos mejorados descritos en el documento WO06/122825.

40 A menos que se indique lo contrario, el término "secuencia de inmunoglobulina" - ya se use en el presente documento para hacer referencia a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional - se usa como término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo, pero sin limitarse a, dominios o fragmentos de unión a antígeno tales como dominios VHH o dominios VH/VL, respectivamente). Además, el término "secuencia" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos tales como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia VHH" o "secuencia de proteína"), debe entenderse generalmente que incluye tanto la secuencia de aminoácidos relevante como ácidos nucleicos o secuencias de nucleótidos que codifican para la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

50 El término "dominio variable único de inmunoglobulina" ("ISVD"), usado de manera intercambiable con "dominio variable único", define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio de inmunoglobulina único. Esto distingue los dominios variables únicos de inmunoglobulina de las inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en los que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos dominios variables, interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. Normalmente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión a antígeno, es decir un total de 6 CDR estarán implicadas en la formación del sitio de unión a antígeno.

60 Por el contrario, el sitio de unión de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por un dominio de VH o VL único. Por tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable único de inmunoglobulina está formado por no más de tres CDR.

65 Por tanto, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" no comprende inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos que requieren la interacción de al menos dos dominios variables para la formación de un sitio de unión

a antígeno. Este es también el caso para realizaciones de la invención que “comprenden” o “contienen” un dominio variable único de inmunoglobulina. En el contexto de la presente invención, tales realizaciones excluyen inmunoglobulinas convencionales o sus fragmentos. Por tanto, un polipéptido o una composición que “comprende” o “contiene” un dominio variable único de inmunoglobulina puede hacer referencia a, por ejemplo, constructos que comprenden más de un dominio variable único de inmunoglobulina. Alternativamente, puede haber constituyentes adicionales distintos de los dominios variables únicos de inmunoglobulina, por ejemplo, agentes auxiliares de diferentes clases, etiquetas de proteína, colorantes, tintes, etc. Sin embargo, estos términos sí comprenden fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en los que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable único.

Generalmente, los dominios variables únicos serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente). Tales dominios variables únicos y fragmentos son los más preferidos, de modo que comprenden un pliegue de inmunoglobulina o son capaces de formar, en condiciones adecuadas, un pliegue de inmunoglobulina. Como tal, el dominio variable único puede, por ejemplo, comprender una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia VL) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia VH o secuencia VHH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que sea capaz de formar una unidad de unión a antígeno única (es decir una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable único, de modo que el dominio de unión a antígeno único no necesita interaccionar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional, tal como es, por ejemplo, el caso para los dominios variables que están presentes en, por ejemplo, anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que necesitan interaccionar con otro dominio variable - por ejemplo, a través de una interacción VH/VL - para formar un dominio de unión a antígeno funcional).

En una realización de la invención, los dominios variables únicos de inmunoglobulina son secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo, una secuencia VL) o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo, una secuencia VH); más específicamente, los dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cadena pesada (por ejemplo, una VHH).

Para una descripción general de anticuerpos de cadena pesada y los dominios variables de los mismos, se hace referencia entre otros a la técnica anterior citada en el presente documento, así como a la técnica anterior mencionada en la página 59 del documento WO 08/020079 y a la lista de referencia mencionadas en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153. Tal como se describe en estas referencias, los nanocuerpos (en particular secuencias VHH y nanocuerpos parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más “residuos Hallmark” en una o más de las secuencias de entramado. Una descripción adicional de los nanocuerpos, incluyendo la humanización y/o camelización de nanocuerpos, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o “fusiones de nanocuerpos”, constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitativos de secuencias ligadoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los nanocuerpos y sus preparaciones pueden encontrarse, por ejemplo, en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

Por ejemplo, el dominio variable único o dominio variable único de inmunoglobulina (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dominio variable único de inmunoglobulina) puede ser un anticuerpo de dominio (único) (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio (único)), un “dAb” o dAb (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o un nanocuerpo (tal como se define en el presente documento e incluyendo, pero sin limitarse a, una secuencia VHH); otros dominios variables únicos, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una descripción general de anticuerpos de dominio (único), se hace referencia también a la técnica anterior citada en el presente documento, así como al documento EP 0 368 684. Para el término “dAb” se hace referencia, por ejemplo, a Ward *et al.* 1989 (Nature 341 (6242): 544-6), a Holt *et al.* 2003 (Trends Biotechnol. 21(11): 484-490); así como a, por ejemplo, los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. También debe indicarse que, aunque son menos preferidos en el contexto de la presente invención porque no son de origen de mamífero, pueden derivarse dominios variables únicos de ciertas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados “dominios IgNAR”, véase, por ejemplo, el documento WO 05/18629).

En particular, el dominio variable único de inmunoglobulina puede ser un Nanobody® (tal como se define en el presente documento) o un fragmento adecuado del mismo. [Nota: Nanobody®, Nanobodies® y Nanoclone® son marcas registradas de Ablynx N.V.] Para una descripción general de nanocuerpos, se hace referencia a la descripción adicional a continuación, así como a la técnica anterior citada en el presente documento, tal como, por ejemplo, la descrita en el documento WO 08/020079 (página 16).

Puede considerarse que la secuencia de aminoácidos y la estructura de una secuencia de inmunoglobulina, en particular un dominio variable único de inmunoglobulina - pero sin estar limitada a ello - está compuesta por cuatro regiones de entramado o “FR”, que se denominan en la técnica y en el presente documento “región de entramado 1” o “FR1”; “región de entramado 2” o “FR2”; “región de entramado 3” o “FR3”; y “región de entramado 4” o “FR4”,

respectivamente; regiones de entramado que están interrumpidas por tres regiones determinantes de complementariedad o "CDR", que se denominan en la técnica "región determinante de complementariedad 1" o "CDR1"; "región determinante de complementariedad 2" o "CDR2"; y "región determinante de complementariedad 3" o "CDR3", respectivamente.

5 El número total de residuos de aminoácido en un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente 112-115 y es lo más preferiblemente 113. Sin embargo, debe indicarse que las partes, fragmentos, análogos o derivados de un dominio variable único de inmunoglobulina no están limitados particularmente en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales esbozados en el presente documento y sean también preferiblemente adecuados para los propósitos descritos en el presente documento.

10 15 Por tanto, en el significado de la presente invención, el término "dominio variable único de inmunoglobulina" o "dominio variable único" comprende péptidos que se derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camello. Pueden estar humanizados, tal como se ha descrito previamente, por ejemplo, en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes no de camélido, por ejemplo, de ratón o humana, que se han "camelizado", tal como se ha descrito previamente, por ejemplo, en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

20 25 30 El término "dominio variable único de inmunoglobulina" abarca secuencias de inmunoglobulina de diferente origen, que comprenden secuencias de inmunoglobulina de ratón, rata, conejo, burro, humano y camélido. También incluye secuencias de inmunoglobulina totalmente humanas, humanizadas o químéricas. Por ejemplo, comprende secuencias de inmunoglobulina de camélido y secuencias de inmunoglobulina de camélido humanizadas, o dominios variables únicos de inmunoglobulina camelizados, por ejemplo, dAb camelizado tal como se describe por Ward *et al* (véanse, por ejemplo, el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann 1994, Febs Lett. 339: 285 y 1996, Protein Engineering 9: 531).

35 Todos los ISVD frente a vWF (o elemento de unión a vWF) mencionados anteriormente se conocen ampliamente de la bibliografía. Esto incluye su fabricación (véase en particular, por ejemplo, el documento WO2006/122825 pero también el documento WO2004/062551). Por ejemplo, ALX 0081 se prepara tal como se describe, por ejemplo, en los documentos WO2006/122825 o WO2009/115614.

40 45 50 Los dominios variables únicos de inmunoglobulina proporcionados por la invención están preferiblemente en forma aislada o forma esencialmente aislada, o forman parte de una proteína o polipéptido de la invención, que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina y que puede comprender además opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas ligadas opcionalmente por medio de uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, el uno o más dominios variables únicos de inmunoglobulina pueden usarse como unidad de unión en una proteína o polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión (es decir frente a una o más dianas distintas de antígenos asociados a células), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multiespecífico de la invención, respectivamente, todos tal como se describe en el presente documento. Una proteína o polipéptido de este tipo también puede estar en forma aislada o esencialmente aislada. Por tanto, según la invención, los dominios variables únicos de inmunoglobulina comprenden constructos que comprenden dos o más unidades de unión a antígeno en forma de dominios únicos, tal como se esbozó anteriormente. Por ejemplo, dos (o más) dominios variables únicos de inmunoglobulina con la misma o diferente especificidad de antígeno pueden ligarse para formar, por ejemplo, un constructo bivalente, trivalente o multivalente. Combinando dominios variables únicos de inmunoglobulina de dos o más especificidades, pueden formarse constructos biespecíficos, triespecíficos, etc. Por ejemplo, un polipéptido según la invención puede comprender dos dominios variables únicos de inmunoglobulina dirigidos frente a la diana A, y un dominio variable único de inmunoglobulina frente a la diana B, haciéndolo bivalente para A y monovalente para B. Tales constructos y modificaciones de los mismos, que el experto en la técnica puede concebir fácilmente, están todos abarcados por la presente invención. En realizaciones particulares, la invención se refiere a constructos biparatópicos que comprenden al menos dos dominios variables únicos de inmunoglobulina dirigidos a diferentes epítopos dentro del mismo antígeno diana.

55 Todas estas moléculas se denominan también "polipéptido de la invención", que es sinónimo con "secuencias de inmunoglobulina" o "dominios variables únicos de inmunoglobulina" de la invención.

60 65 Además, el término "secuencia" tal como se usa en el presente documento (por ejemplo, en términos como "secuencia de inmunoglobulina", "secuencia de anticuerpo", "secuencia de dominio variable", "secuencia V<sub>HH</sub>" o "secuencia de proteína"), deben entenderse generalmente como que incluyen tanto la secuencia de aminoácidos relevante como secuencias de ácido nucleico o secuencias de nucleótidos que codifican para la misma, a menos que el contexto requiera una interpretación más limitada.

Según una realización no limitativa de la invención, las secuencias de inmunoglobulina, Nanobody® o el polipéptido usado en la invención está glicosilado. Según otra realización no limitativa de la invención, las secuencias de inmunoglobulina, Nanobody® o el polipéptido usado en la invención no está glicosilado.

Tal como se mencionó anteriormente, la presente invención usa polipéptidos que comprenden 2 o más ISVD frente a vWF, es decir ISVD que se unen a y/o tienen afinidad por un antígeno tal como se define en el presente documento, por ejemplo, factor de von Willebrand (vWF) y preferiblemente vWF humano (SEQ ID NO: 20).

- 5 En el contexto de la presente invención, "que se une a y/o que tiene afinidad por" un cierto antígeno tiene el significado usual en la técnica tal como se entiende, por ejemplo, en el contexto de anticuerpos y sus respectivos antígenos.
- 10 En realizaciones particulares de la invención, el término "se une a y/o que tiene afinidad por" significa que la secuencia de inmunoglobulina interacciona específicamente con un antígeno, y se usa de manera intercambiable con secuencias de inmunoglobulina "frente a" dicho antígeno.

15 El término "especificidad" se refiere al número de tipos diferentes de antígenos o determinantes antigenicos a los que puede unirse una secuencia de inmunoglobulina, molécula de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno (tal como un Nanobody® o un polipéptido usado en la invención) particular. La especificidad de una proteína de unión a antígeno puede determinarse basándose en la afinidad y/o avidez. La afinidad, representada por la constante de equilibrio para la disociación de un antígeno con una proteína de unión a antígeno (KD), es una medida de la intensidad de unión entre un determinante antigenico y un sitio de unión a antígeno en la proteína de unión a antígeno: cuanto menor sea el valor de la KD, más fuerte será la intensidad de unión entre un determinante antigenico y la molécula de unión a antígeno (alternativamente, la afinidad también puede expresarse como la constante de afinidad (KA), que es 1/KD). Como estará claro para el experto en la técnica (por ejemplo, basándose en la divulgación adicional en el presente documento), la afinidad puede determinarse de una manera en sí conocida, dependiendo del antígeno específico de interés. La avidez es la medida de la intensidad de unión entre una molécula de unión a antígeno (tal como un Nanobody® o polipéptido usado en la invención) y el antígeno pertinente. La avidez se refiere tanto a la afinidad entre un determinante antigenico y su sitio de unión a antígeno en la molécula de unión a antígeno como al número de sitios de unión pertenentes presentes en la molécula de unión a antígeno.

30 Normalmente, las secuencias de inmunoglobulina usadas en la presente invención (tal como las secuencias de aminoácidos, Nanobodies® y/o polipéptidos usados en la invención) se unirán a su antígeno con una constante de disociación (KD) de  $10^{-5}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos, y preferiblemente de  $10^{-7}$  a  $10^{-12}$  moles/litro o menos y más preferiblemente de  $10^{-8}$  a  $10^{-12}$  moles/litro (es decir con una constante de asociación (KA) de  $10^5$  a  $10^{12}$  litros/moles o más, y preferiblemente de  $10^7$  a  $10^{12}$  litros/moles o más y más preferiblemente de  $10^8$  a  $10^{12}$  litros/moles), y/o se unen a antígenos asociados a células tal como se define en el presente documento con una tasa kon de entre  $10^2$  M $^{-1}$ s $^{-1}$  y alrededor de  $10^7$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ , preferiblemente entre  $10^3$  M $^{-1}$ s $^{-1}$  y  $10^7$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ , más preferiblemente entre  $10^4$  M $^{-1}$ s $^{-1}$  y  $10^7$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ , tal como entre  $10^5$  M $^{-1}$ s $^{-1}$  y  $10^7$  M $^{-1}$ s $^{-1}$ ; y/o se unen a antígenos asociados a células tal como se define en el presente documento con una tasa koff de entre 1s $^{-1}$  ( $1/2=0,69$  s) y  $10^{-6}$  s $^{-1}$  (proporcionando un complejo casi irreversible con un t $1/2$  de múltiples días), preferiblemente entre  $10^{-2}$  s $^{-1}$  y  $10^{-6}$  s $^{-1}$ , más preferiblemente entre  $10^{-3}$  s $^{-1}$  y  $10^{-6}$  s $^{-1}$ , tal como entre  $10^{-4}$  s $^{-1}$  y  $10^{-6}$  s $^{-1}$ .

40 Cualquier valor de KD mayor de  $10^{-4}$  M (o cualquier valor de KA menor de  $10^4$  M $^{-1}$ ) se considera generalmente que indica una unión no específica.

45 Preferiblemente, una secuencia de inmunoglobulina monovalente usada en la invención se unirá al antígeno deseado con una afinidad menor de 500 nM, preferiblemente menor de 200 nM, más preferiblemente menor de 10 nM, tal como menos de 500 pM.

50 La unión específica de una proteína de unión a antígeno a un antígeno o determinante antigenico puede determinarse de cualquier manera adecuada en sí conocida, incluyendo, por ejemplo, análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva, tales como radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos enzimáticos (EIA) y ensayos competitivos de tipo sándwich, y las diferentes variantes de los mismos en sí conocidos en la técnica; así como las otras técnicas mencionadas en el presente documento.

55 La constante de disociación (KD) puede ser la constante de disociación real o aparente, como estará claro para el experto en la técnica. Los métodos para determinar la constante de disociación estarán claros para el experto en la técnica y, por ejemplo, incluyen las técnicas mencionadas en el presente documento. A este respecto, también estará claro que puede no ser posible medir las constantes de disociación de más de  $10^{-4}$  moles/litro o  $10^{-3}$  moles/litro (por ejemplo, de  $10^{-2}$  moles/litro). Opcionalmente, como también estará claro para el experto en la técnica, la constante de disociación (real o aparente) puede calcularse basándose en la constante de asociación (KA) (real o aparente), por medio de la relación [KD = 1/KA].

60 65 La afinidad designa la fuerza o estabilidad de una interacción molecular. La afinidad se facilita comúnmente mediante la KD, o constante de disociación, que tiene unidades de mol/litro (o M). La afinidad también puede expresarse como constante de asociación, KA, que es igual a 1/KD y tiene unidades de (mol/litro) $^{-1}$  (o M $^{-1}$ ). En la presente memoria descriptiva, la estabilidad de la interacción entre dos moléculas (tal como una secuencia de aminoácidos, secuencia de inmunoglobulina, Nanobody® o polipéptido usado en la invención y su diana pretendida) se expresará principalmente en términos del valor de KD de su interacción; estando claro para el experto en la técnica que en vista

- 5 de la relación  $KA = 1/KD$ , que especifica la fuerza de la interacción molecular mediante su valor de  $KD$ , también puede usarse para calcular el valor de  $KA$  correspondiente. El valor de  $KD$  caracteriza la fuerza de una interacción molecular también en un sentido termodinámico ya que se refiere a la energía libre ( $DG$ ) de unión mediante la relación ampliamente conocida  $DG = RT \cdot \ln(KD)$  (de manera equivalente  $DG = -RT \cdot \ln(KA)$ ), en la que  $R$  es igual a la constante de gas,  $T$  es igual a la temperatura absoluta y  $\ln$  designa el logaritmo natural.
- 10 La  $KD$  para interacciones biológicas, tal como la unión de las secuencias de inmunoglobulina usadas en la invención al antígeno asociado a células tal como se define en el presente documento, que se consideran significativas (por ejemplo, específicas), están normalmente en el intervalo de  $10^{-10}$  M (0,1 nM) a  $10^{-5}$  M (10000 nM). Cuanto más fuerte sea una interacción, menor será su  $KD$ .
- 15 La  $KD$  también puede expresarse como la relación de la constante de tasa de disociación de un complejo, denominada  $k_{off}$ , con respecto a la tasa de su asociación, denominada  $k_{on}$  (de modo que  $KD = k_{off}/k_{on}$  y  $KA = k_{on}/k_{off}$ ). La tasa  $k_{off}$  tiene unidades  $s^{-1}$  (siendo  $s$  la notación de la unidad del SI de segundo). La tasa  $k_{on}$  tiene unidades  $M^{-1}s^{-1}$ .
- 20 En cuanto a las secuencias de inmunoglobulina usadas en la invención, la tasa  $k_{on}$  puede variar entre  $10^2 M^{-1}s^{-1}$  y alrededor de  $10^7 M^{-1}s^{-1}$ , aproximándose a la constante de tasa de asociación limitada por difusión para interacciones bimoleculares. La tasa  $k_{off}$  se refiere a la semivida de una interacción molecular dada mediante la relación  $t_{1/2} = \ln(2)/k_{off}$ . La tasa  $k_{off}$  de secuencias de inmunoglobulina usadas en la invención puede variar entre  $10^{-6} s^{-1}$  (complejo casi irreversible con un  $t_{1/2}$  de múltiples días) y  $1 s^{-1}$  ( $t_{1/2} = 0,69 s$ ).
- 25 La afinidad de una interacción molecular entre dos moléculas puede medirse a través de diferentes técnicas en sí conocidas, tal como la técnica de biosensor de resonancia de plasmones superficiales (SPR) ampliamente conocida (véase, por ejemplo, Ober *et al.*, *Intern. Immunology*, 13, 1551-1559, 2001), en la que una molécula se inmoviliza sobre el chip de biosensor y la otra molécula se hace pasar sobre la molécula inmovilizada en condiciones de flujo produciendo mediciones de  $k_{on}$ ,  $k_{off}$  y por tanto valores de  $KD$  (o  $KA$ ). Esto puede realizarse, por ejemplo, usando los instrumentos Biacore ampliamente conocidos.
- 30 También estará claro para el experto en la técnica que la  $KD$  medida puede corresponder a la  $KD$  aparente si el proceso de medición influye de algún modo en la afinidad de unión intrínseca de las moléculas implicadas, por ejemplo, mediante artefactos relacionados con el recubrimiento sobre el biosensor de una molécula. Además, puede medirse una  $KD$  aparente si una molécula contiene más de un sitio de reconocimiento para la otra molécula. En tal situación, la afinidad medida puede verse afectada por la avidez de la interacción por las dos moléculas.
- 35 Otro enfoque que puede usarse para evaluar la afinidad es el procedimiento ELISA (ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima) de 2 etapas de Friguet *et al.* (*J. Immunol. Methods*, 77, 305-19, 1985). Este método establece una medición de equilibrio de unión en fase de disolución y evita posibles artefactos relacionados con la adsorción de una de las moléculas sobre un soporte tal como plástico.
- 40 Sin embargo, la medición precisa de  $KD$  puede requerir un trabajo bastante intenso y, en consecuencia, a menudo se determinan valores de  $KD$  aparentes para evaluar la intensidad de unión de dos moléculas. Debe indicarse que siempre que todas las mediciones se realicen de una manera consistente (por ejemplo, manteniendo las condiciones de ensayo inalteradas), las mediciones de  $KD$  aparente pueden usarse como aproximación de la  $KD$  verdadera y por tanto en el presente documento la  $KD$  y la  $KD$  aparente deben tratarse con la misma importancia o relevancia.
- 45 Finalmente, debe indicarse que en muchas situaciones el científico experimentado puede juzgar que sea conveniente determinar la afinidad de unión en relación con alguna molécula de referencia. Por ejemplo, para evaluar la intensidad de unión entre moléculas A y B puede usarse, por ejemplo, una molécula de referencia C que se sabe que se une a B y que está etiquetada de manera adecuada con un grupo fluoróforo o cromóforo u otro resto químico, tal como biotina, para una fácil detección en un ELISA o FACS (clasificación celular activada por fluorescencia) u otro formato (el fluoróforo para detección por fluorescencia, el cromóforo para la detección por absorción de luz, la biotina para la detección ELISA mediada por estreptavidina). Normalmente, la molécula de referencia C se mantiene a una concentración fija y la concentración de A se varía para una concentración o cantidad dada de B. Como resultado se obtiene un valor de  $IC_{50}$  que corresponde a la concentración de A en el que la señal medida para C en ausencia de A es la mitad. Siempre que se conozca  $KD$  ref, la  $KD$  de la molécula de referencia, así como la concentración total  $cref$  de la molécula de referencia, la  $KD$  aparente para la interacción A-B puede obtenerse a partir de la siguiente fórmula:  $KD = IC_{50} / (1 + cref / KD \text{ ref})$ . Obsérvese que si  $cref \ll KD \text{ ref}$ ,  $KD \approx IC_{50}$ . Siempre que la medición de la  $IC_{50}$  se realice de una manera consistente (por ejemplo, manteniendo  $cref$  fija) para los elementos de unión que se comparan, la fuerza o estabilidad de una interacción molecular puede evaluarse mediante la  $IC_{50}$  y se considera que esta medición es equivalente a la  $KD$  o a la  $KD$  aparente a lo largo de este texto.
- 55 La presente invención se refiere a dominios variables únicos de inmunoglobulina para su uso según lo reivindicado, o que pueden obtenerse mediante los métodos dados a conocer en los documentos WO2004/015425, WO2004/062551, WO2006/074947, WO2006/122825, WO2009/115614 o WO2011/067160, todos a nombre del presente solicitante.

La invención también abarca variantes optimizadas de estas secuencias de aminoácidos para su uso según lo reivindicado. Generalmente, una "variante optimizada" de una secuencia de aminoácidos según la invención es una variante que comprende una o más sustituciones beneficiosas, tales como sustituciones que aumentan i) el grado de "humanización", ii) la estabilidad química, y/o iii) el nivel de expresión; mientras que la potencia (medida, por ejemplo,

5 mediante el ensayo de potencia tal como se describe en la parte experimental del documento WO2006/122825 sigue siendo comparable (es decir dentro de una desviación del 10%) con el tipo silvestre 12A02 (tal como se define en el documento WO2006/122825) o comparable con la variante 12A02H1 (SEQ ID NO: 19), también tal como se define en el documento WO2006/122825. Preferiblemente, en comparación con la secuencia de tipo silvestre de 12A02, una secuencia de aminoácidos usada en la invención contiene al menos una sustitución de este tipo, y preferiblemente al menos dos sustituciones de este tipo, y preferiblemente al menos tres sustituciones humanizantes y preferiblemente al menos 10 sustituciones humanizantes de este tipo.

10 En un aspecto particular, las secuencias de aminoácidos usadas en la invención contienen un total de entre 1 y 15, preferiblemente entre 2 y 14, tal como entre 9 y 13, por ejemplo, 10, 11 o 12 sustituciones de aminoácido en comparación con la secuencia de tipo silvestre 12A02. Como se ha mencionado, estas diferencias comprenden preferiblemente al menos una y preferiblemente al menos dos, tal como tres, cuatro o cinco o diez sustituciones humanizantes, y pueden comprender opcionalmente una o más sustituciones adicionales (tal como una cualquiera de, o cualquier combinación adecuada de cualesquiera dos o más de, las sustituciones adicionales (a) a (c) mencionadas en el presente documento). De nuevo, basándose en la divulgación en el presente documento y opcionalmente tras un grado limitado de ensayo y error, el experto en la técnica será capaz de seleccionar (una combinación adecuada de) una o más de tales sustituciones humanizantes y/o adicionales adecuadas.

15 La presente invención abarca secuencias de polipéptido para su uso según la reivindicado que son muy similares a cualquiera de los ejemplos específicos proporcionados en el presente documento, o cualquiera de los ejemplos específicos definidos mediante referencia anteriormente. Muy similares significa una identidad de aminoácidos de al menos el 90%, por ejemplo, el 95, el 97, el 98 o el 99%. Las secuencias de polipéptido muy similares tendrán la misma función que la secuencia de la que se derivan, es decir se unirán a vWF, más específicamente se unirán a e inhibirán la interacción entre vWF y plaquetas.

20 30 En una realización particular, la invención se refiere a secuencias muy similares a una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-19, en particular SEQ ID NO: 1, para su uso según lo reivindicado. Sin embargo, para cada variante tiene que evaluarse la estabilidad de secuencia en la formulación tal como se define en el presente documento, de modo que la invención se refiere en particular a variantes o secuencias muy similares para su uso según lo reivindicado que son estables en las formulaciones tal como se define en el presente documento.

25 35 Los métodos para generar secuencias de polipéptido usadas en la invención se conocen ampliamente e incluyen, por ejemplo, síntesis o expresión recombinante. El experto en la técnica está muy familiarizado con la tecnología de expresión adecuada, por ejemplo, vectores recombinantes y células huésped adecuados, por ejemplo, células huésped bacterianas o de levadura. El experto en la técnica también está muy familiarizado con protocolos y técnicas de purificación adecuados.

40 45 La presente invención proporciona también formulaciones de polipéptidos que comprenden dos dominios variables únicos de inmunoglobulina frente a vWF, por ejemplo, ALX 0081, para su uso según lo reivindicado, que son estables, y preferiblemente adecuados para usos farmacéuticos, incluyendo la preparación de medicamentos (también denominada "formulación farmacéutica que comprende el polipéptido usado en la invención" o "formulación/formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la invención").

50 55 En realizaciones particulares, la formulación comprende uno o más polipéptidos seleccionados de las SEQ ID NO: 1-19, preferiblemente SEQ ID NO: 1.

60 El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del principio activo (el polipéptido usado en la invención) sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administre la formulación. Tales formulaciones son estériles. Excipientes (vehículos, aditivos) "farmacéuticamente aceptables" son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis efectiva del principio activo empleado.

65 70 El término "excipiente" tal como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia inerte que se usa comúnmente como diluyente, vehículo, conservante, lioprotector, tensioactivo, elemento de unión, portador o agente estabilizante para compuestos que confieren una propiedad física beneficiosa a una formulación. El experto en la técnica está familiarizado con excipientes adecuados para propósitos farmacéuticos, que pueden tener funciones particulares en la formulación, tal como lioprotección, estabilización, conservación, etc.

75 Una formulación "estéril" es aséptica o está libre o esencialmente libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Una formulación “estable” es una en la que la proteína en la misma conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Preferiblemente, la formulación conserva esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras el almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona generalmente basándose en la vida útil en almacenamiento pretendida de la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. En ciertas realizaciones, la formulación es estable a alrededor de 40°C durante al menos alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más semanas. Además, la formulación es preferiblemente estable tras la congelación (hasta, por ejemplo, -20°C o -70°C) y descongelación de la formulación, por ejemplo, tras 1, 2, 3, 4 o 5 ciclos de congelación y descongelación. La estabilidad puede evaluarse cualitativa y/o cuantitativamente en una variedad de maneras diferentes conocidas por el experto en la técnica. Los estudios de estabilidad mostraron que ALX 0081 es estable a -20°C durante al menos 3 años.

15 La formulación comprende un portador acuoso. El portador acuoso es en particular un tampón.

Tal como se usa en el presente documento, “tampón” se refiere a una disolución tamponada que resiste los cambios de pH mediante la acción de sus componentes conjugados de ácido-base. La formulación que comprende el polipéptido usado en la invención comprende un tampón seleccionado de al menos uno de tampón citrato o fosfato, preferiblemente un tampón citrato. Tal como se determinó previamente, estos tampones potencian la estabilidad de los elementos de unión a vWF.

20 La formulación que comprende el polipéptido usado en la invención comprende un tampón citrato a una concentración en el intervalo de 5-200 mM, preferiblemente 7,5-80 mM, incluso más preferiblemente 10-50, por ejemplo, 10, 15, 20, 25 o 30 mM, y lo más preferiblemente 20 mM, en el que cada valor se entiende que abarca opcionalmente un intervalo de  $\pm 5$  mM. Alternativamente, la formulación que comprende el polipéptido usado en la invención puede comprender un tampón fosfato a una concentración en el intervalo de 5-200 mM, preferiblemente 5-80 mM, más preferiblemente 7,5-60 mM, incluso más preferiblemente 10-40, por ejemplo, 10, 15, 20, 25 o 30 mM, y lo más preferiblemente 10 mM, en el que cada valor se entiende que abarca opcionalmente un intervalo de  $\pm 5$  mM. Se entenderá que una concentración menor del tampón tiene un efecto sobre la osmolalidad final, y correspondientemente sobre los solutos adicionales que pueden tener que añadirse.

25 El pH de la formulación que comprende el polipéptido usado en la invención está en el intervalo de 5,0 a 7,5, en el que cada valor se entiende que abarca un intervalo de  $\pm 0,2$ . El pH más ventajoso dependerá del tampón comprendido en la formulación. Por tanto, la invención se refiere particularmente a una formulación que comprende un tampón fosfato, que tiene preferiblemente un pH en el intervalo de 6,5 a 7,5, preferiblemente 6,9, 7,0, 7,1, por ejemplo, 7,1. Se mostró que una formulación que comprende un tampón citrato era excepcionalmente adecuada para el almacenamiento y uso. Por tanto, la presente invención se refiere a una formulación que comprende el polipéptido usado en que comprende un tampón citrato, que tiene preferiblemente un pH de entre 6,0 y 7,0, más preferiblemente 6,1, 6,2, 6,3, 30 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8 o 6,9, por ejemplo, 6,5, en el que cada valor se entiende que abarca opcionalmente un intervalo de  $\pm 0,2$ .

35 Las formulaciones de la invención comprenderán los polipéptidos usados en la invención, en particular los dominios variables únicos de inmunoglobulina o polipéptidos que comprenden al menos un dominio variable único de inmunoglobulina frente a vWF, tal como ALX 0081, a una concentración que es adecuada para propósitos clínicos, que incluye concentraciones usadas en disoluciones de reserva para su dilución antes del uso en el paciente. Aparte de la estabilización mejorada, las formulaciones de la invención posibilitan altas concentraciones de los polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081.

40 45 50 Las concentraciones típicas del agente activo, por ejemplo, polipéptidos que comprenden al menos un ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, en formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la invención comprenden los ejemplos no limitativos de concentraciones en el intervalo de 0,1 a 150 mg/ml, tal como 1-100 mg/ml, 5-80 mg/ml o 10-40 mg/ml, preferiblemente 10 mg/ml, en el que cada valor se entiende que abarca opcionalmente un intervalo de  $\pm 20\%$  (por ejemplo, un valor de 10 abarca opcionalmente un intervalo de 8 a 12 mg/ml).

55 En una realización adicional de la invención, la formulación que comprende el polipéptido usado en la invención puede comprender además un detergente o tensioactivo.

60 En el presente documento, un “tensioactivo” se refiere a un agente tensioactivo, preferiblemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos en el presente documento incluyen polisorbato; poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metilcocoil-taurato de sodio o metiloleil-taurato de disodio; y la serie MONAQUAT® (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronics, PF68, etc.); etc. En

una realización, el tensioactivo en el presente documento es polisorbato 80. Los detergentes o tensioactivos adecuados preferidos para su uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, ésteres de ácido graso de polioxietileno-sorbitano, por ejemplo, polisorbato-20, -40, -60, -65, -80 u -85. Los nombres comerciales comunes para polisorbatos incluyen Alquest, Canarcel y Tween. El experto en la técnica conoce ejemplos no limitativos adicionales de detergentes, tales como los enumerados, por ejemplo, en el documento WO2010/077422. En una realización preferida, el detergente es un detergente no iónico. Más específicamente, el detergente es polisorbato-80, también denominado Tween-80 a continuación en el presente documento. El experto en la técnica puede determinar fácilmente una concentración adecuada de detergente para una formulación que comprende el polipéptido usado en la invención. Normalmente, la concentración será tan baja como sea posible, al tiempo que se mantienen los efectos beneficiosos de los detergentes, por ejemplo, un efecto estabilizante en condiciones de tensión de cizalladura, por ejemplo, agitación, que reduce la agregación de los polipéptidos formulados usados en la invención. En realizaciones a modo de ejemplo, no limitativas, la concentración del detergente puede estar en el intervalo del 0,001 al 0,5%, por ejemplo, el 0,001, el 0,002, el 0,003, el 0,004, el 0,005, el 0,01, el 0,015, el 0,02, el 0,025, el 0,03, el 0,035, el 0,04, el 0,045, el 0,05%, el 0,1%, el 0,2%, el 0,3%, el 0,4% o el 0,5%, preferiblemente en una concentración de entre el 0,01 y el 0,05%, más preferiblemente entre el 0,01 y el 0,02%, por ejemplo, el 0,01% (v/v).

La formulación que comprende el polipéptido usado en la invención puede comprender además excipientes tales como conservantes.

Un "conservante" es un compuesto que puede incluirse opcionalmente en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en el mismo, facilitando así la producción de una formulación multiusos, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilmamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquibencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de benzetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como alcohol fenólico, butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. En una realización, el conservante en el presente documento es alcohol bencílico.

La formulación que comprende el polipéptido usado en la invención puede comprender además agentes estabilizantes, tales como polioles.

Un "poliol" es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes sacáricos y ácidos sacáricos. Un poliol puede estar incluido opcionalmente en la formulación, por ejemplo, para mejorar la estabilidad. En ciertas realizaciones, los polioles en el presente documento tienen un peso molecular que es menor de alrededor de 600 kD (por ejemplo, en el intervalo de desde alrededor de 120 hasta alrededor de 400 kD). Un "azúcar reductor" es uno que contiene un grupo hemi-acetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar covalentemente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un "azúcar no reductor" es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melezitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes sacáricos. En cuanto a los ácidos sacáricos, estos incluyen L-gluconato y sales metálicas del mismo. Cuando se desee que la formulación sea estable a la congelación-descongelación, el poliol es preferiblemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C) de modo que desestabiliza el anticuerpo en la formulación. En ciertas realizaciones, azúcares no reductores tales como sacarosa y trehalosa son ejemplos de polioles, prefiriéndose la sacarosa, a pesar de la estabilidad en disolución de la trehalosa.

Los compuestos terapéuticos usados según la presente invención se preparan para el almacenamiento mezclando un(os) polipéptido(s) que tiene(n) el grado deseado de pureza con portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables opcionales (Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. [1980]), en forma de formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Por consiguiente, las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la invención también pueden comprender opcionalmente uno o más excipientes.

Los estabilizadores y conservantes usados comúnmente se conocen ampliamente por el experto en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO2010/077422). Los portadores farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en estas composiciones incluyen, pero no se limitan a, intercambiadores de iones, alúmina, estearato de aluminio, lecitina, proteínas séricas, tales como albúmina sérica humana, sustancias tampón tales como fosfatos, glicina, ácido sórbico, sorbato de potasio, mezclas de glicéridos parciales de ácidos grasos vegetales saturados, agua, sales o electrolitos, tales como sulfato de protamina, hidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de potasio, cloruro de sodio, sales de cinc, sílice coloidal, trisilicato de magnesio, polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona, sustancias a base de celulosa, polietilenglicol, carboximetilcelulosa sódica, poliacrilatos, ceras, gelatina, polímeros de bloque de polietileno-polioxipropileno, polietilenglicol y grasa de lana; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; conservantes; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de alrededor de 10 residuos); proteínas; y aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina. En realizaciones ventajosas, el excipiente puede ser uno o más seleccionados de la lista que consiste en NaCl, trehalosa, sacarosa, manitol o glicina.

- Los principios activos también pueden estar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980).
- 5 Los polipéptidos usados en la invención pueden formularse en cualquier formulación farmacéuticamente aceptable. La formulación puede ser líquida o estar seca. La formulación puede generarse a través de mezclado, secado, 10 liofilización, secado a vacío o cualquier método conocido para formular composiciones farmacéuticas.
- 10 Una formulación preferida que comprende el polipéptido usado en la invención comprende un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF para su uso según lo reivindicado, tal como ALX 0081, en una disolución de tampón fosfato (pH 7,1). Incluso más preferiblemente, una formulación que comprende el polipéptido usado en la invención comprende un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF para su uso según lo reivindicado, tal como ALX 15 0081, en una disolución de tampón fosfato (pH 7,1), glicina (0,2 M) y polisorbato 80 (al 0,02% v/v).
- 15 Los polipéptidos usados en la invención pueden formularse además tal como se describe en el documento PCT/EP14/060107.
- 20 Una formulación preferida comprende:
- (a) un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF, tal como ALX 0081, a una concentración de desde alrededor de 0,1 mg/ml hasta alrededor de 80 mg/ml;
- 25 (b) un excipiente elegido de sacarosa, glicina, manitol, trehalosa o NaCl a una concentración de alrededor del 1% a alrededor del 15% (p/v);
- 30 (c) Tween-80 a una concentración de alrededor del 0,001% al 0,5% (v/v); y
- (d) un tampón citrato a una concentración de alrededor de 5 mM a alrededor de 200 mM de modo que el pH de la formulación es de alrededor de 6,0 a 7,0.
- 35 Una formulación preferida adicional que comprende el polipéptido usado en la invención comprende un polipéptido que comprende dos ISVD frente a vWF para su uso según lo reivindicado, tal como ALX 0081, preferiblemente a una concentración de 10 mg/ml, un tampón citrato a una concentración de 20 mM (pH 6,5), que comprende además un 7% de sacarosa (p/v), y Tween-80 a una concentración del 0,01% (v/v).
- 40 En algunas realizaciones, una formulación se almacena como líquido. En otras realizaciones, una formulación se prepara como líquido y entonces se seca, por ejemplo, mediante liofilización o secado por pulverización, antes del almacenamiento. Una formulación secada puede usarse como compuesto seco, por ejemplo, como aerosol o polvo, o reconstituirse a su concentración original u otra, por ejemplo, usando agua, un tampón u otro líquido apropiado.
- 45 La presente invención también se refiere a viales que comprenden los cargados con liofilizado que contiene 12,5 mg de caplacizumab para su uso según lo reivindicado y excipientes para una disolución para inyección. Excipientes (por ml de disolución reconstituida): 0,21 mg de ácido cítrico, 5,58 mg de citrato de trisodio dihidratado, 70 mg de sacarosa, 0,11 mg de polisorbato-80 por vial (pH 6,5 +/- 0,5). Tras la reconstitución con 1 ml de agua para inyección (WFI) la concentración es de 12,5 mg/ml de caplacizumab (para una dosis nominal administrada de 10 mg).
- 50 La invención también abarca productos que pueden obtenerse mediante el procesamiento adicional de una formulación líquida, tal como un producto congelado, liofilizado o secado por pulverización que comprende el polipéptido para su uso según lo reivindicado. Tras la reconstitución, estos productos sólidos pueden volverse formulaciones líquidas que comprenden el polipéptido usado en la invención (pero no se limitan a las mismas). En su sentido más amplio, por tanto, el término "formulación" abarca formulaciones tanto líquidas como sólidas. Sin embargo, 55 las formulaciones sólidas se entienden como derivables a partir de las formulaciones líquidas (por ejemplo, mediante congelación, secado por congelación o secado por pulverización), y por tanto tienen diversas características que están definidas por las características especificadas para formulaciones líquidas en el presente documento. La invención no excluye la reconstitución que conduce a una composición que se desvía de la composición original antes de, por ejemplo, secado por congelación o por pulverización. Por consiguiente, la formulación liofilizada puede reconstituirse 60 para producir una formulación que tiene una concentración que difiere de la concentración original (es decir, antes de la liofilización), dependiendo de la cantidad de agua o diluyente añadido al liofilizado en relación con el volumen de líquido que se había secado por congelación originalmente. Las formulaciones adecuadas pueden identificarse sometiendo a ensayo uno o más parámetros de la integridad de anticuerpo.
- 65 En una realización preferida, las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la invención son isotónicas en relación con la sangre humana. Las disoluciones isotónicas presentan la misma presión osmótica que el plasma

sanguíneo, y así pueden infundirse por vía intravenosa a un sujeto sin cambiar la presión osmótica del plasma sanguíneo del sujeto. La tonicidad puede expresarse en términos de osmolalidad, que puede ser una osmolalidad teórica, o preferiblemente una osmolalidad determinada experimentalmente. Normalmente, la osmolalidad estará en el intervalo de  $290 \pm 60$  mOsm/kg, preferiblemente  $290 \pm 20$  mOsm/kg.

- 5 Las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la invención también pueden comprender compuestos que son útiles específicamente para proteger el polipéptido usado en la invención durante el secado por congelación. Tales compuestos se conocen también como lioprotectores y son ampliamente conocidos por el experto en la técnica. Los ejemplos específicos incluyen, pero no se limitan a, azúcares tales como sacarosa, sorbitol o trehalosa; aminoácidos tales como glutamato, en particular glutamato monosódico o histidina; betaina, sulfato de magnesio, alcoholes sacáricos, propilenglicol, polietilenglicoles y combinaciones de los mismos. Al apreciar la invención, la cantidad requerida de un compuesto de este tipo que debe añadirse puede determinarse fácilmente por el experto en la técnica considerando la estabilidad de la formulación en forma líquida y cuando experimenta liofilización. Las formulaciones que son particularmente adecuadas para el secado por congelación pueden comprender además agentes de carga. Los agentes adecuados son ampliamente conocidos por el experto en la técnica. Se ha mostrado que una formulación que comprende sacarosa era no solo particularmente adecuada para mantener la estabilidad física durante, por ejemplo, el almacenamiento y la congelación-descongelación, de los elementos de unión a vWF, sino también como lioprotector.
- 10 20 Como se ha esbozado, cualquiera de las formulaciones anteriores puede procesarse adicionalmente, por ejemplo, mediante liofilización, secado por pulverización o congelación, por ejemplo, congelación en masa. El producto procesado resultante tiene características derivadas de la formulación de partida líquida, tal como se definió anteriormente. Cuando sea necesario, pueden incluirse agentes adicionales para el procesamiento adicional, tales como, por ejemplo, lioprotectores, etc.
- 15 25 30 Las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la presente invención tienen el efecto tras la liofilización de mantener la integridad química y física de los polipéptidos usados en la presente invención, en particular ALX 0081, es decir incluso tras un almacenamiento prolongado, por ejemplo, durante duraciones tales como las definidas anteriormente, a temperaturas de entre  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $+40^{\circ}\text{C}$ , el perfil de pureza/impurezas del producto esencialmente no cambia. Por ejemplo, un almacenamiento prolongado tras la liofilización no tuvo un efecto significativo sobre los perfiles de RP-HPLC, SE-HPLC o cIEF.
- 35 Los polipéptidos usados en la invención pueden producirse mediante cualquier método usado comúnmente. Los ejemplos típicos incluyen la expresión recombinante en sistemas huésped adecuados, por ejemplo, bacteria o levadura. Los polipéptidos usados en la invención experimentarán un régimen de purificación adecuado antes de formularse de acuerdo con la presente invención.
- 40 45 50 En general, los polipéptidos usados en la invención se producen mediante células huésped vivas que se han modificado mediante ingeniería genética para producir el polipéptido. Los métodos de modificación mediante ingeniería genética de células para producir proteínas se conocen ampliamente en la técnica. Véase, por ejemplo, Ausubel *et al.*, eds. (1990), *Current Protocols in Molecular Biology* (Wiley, Nueva York). Tales métodos incluyen la introducción de ácidos nucleicos que codifican para y permiten la expresión del polipéptido en células huésped vivas. Estas células huésped pueden ser células bacterianas, células fúngicas o células animales que se hacen crecer en cultivo. Las células huésped bacterianas incluyen, pero no se limitan a, células de *Escherichia coli*. Los ejemplos de cepas de *E. coli* adecuadas incluyen: HB101, DH5a, GM2929, JM109, KW251, NM538, NM539 y cualquier cepa de *E. coli* que no escinda ADN foráneo. Las células huésped fúngicas que pueden usarse incluyen, pero no se limitan a, células de *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris* y *Aspergillus*. Unos pocos ejemplos de líneas celulares animales que pueden usarse son CHO, VERO, BHK, HeLa, Cos, MDCK, 293, 3T3 y WI38. Pueden establecerse nuevas líneas celulares animales usando métodos ampliamente conocidos por los expertos en la técnica (por ejemplo, mediante transformación, infección viral y/o selección). Opcionalmente, el polipéptido puede secretarse por las células huésped al medio.
- 55 60 65 En algunas realizaciones, los polipéptidos pueden producirse en células bacterianas, por ejemplo, células de *E. coli*. Por ejemplo, si el polipéptido se codifica por secuencias en un vector de presentación en fago que incluye un codón de parada suprimible entre la entidad de presentación y una proteína bacteriófaga (o fragmento de la misma), el ácido nucleico de vector puede transferirse a una célula bacteriana que no puede suprimir un codón de parada. En este caso, el polipéptido no se fusiona a la proteína de gen III y se secreta al periplasma y/o a los medios. Los polipéptidos también pueden producirse en células eucariotas. En una realización, los polipéptidos se expresan en una célula de levadura tal como *Pichia* (véase, por ejemplo, Powers *et al.* *J Immunol Methods* 251:123-35 (2001)), *Hansenula* o *Saccharomyces*.
- 70 75 80 En una realización, los polipéptidos se producen en células de mamífero. Las células huésped de mamífero típicas para expresar los anticuerpos de clon o fragmentos de unión a antígeno de los mismos incluyen las de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células dhfr - CHO, descritas en Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220(1980), usadas con un marcador seleccionable por DHFR, por ejemplo, tal como se describe en Kaufman

y Sharp, Mol. Biol. 159:601-621 (1982)), líneas celulares linfocíticas, por ejemplo, células de mieloma NS0 y células SP2, células COS, y una célula de un animal transgénico, por ejemplo, un mamífero transgénico. Por ejemplo, la célula es una célula epitelial de mamífero.

- 5 Además de las secuencias de ácido nucleico que codifican para el polipéptido, los vectores de expresión recombinante  
pueden portar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la replicación del vector en células huésped  
(por ejemplo, orígenes de replicación) y genes marcadores seleccionables. El gen marcador seleccionable facilita la  
selección de células huésped en las que se ha introducido el vector (véanse, por ejemplo, las patentes  
10 estadounidenses n.ºs 4.399.216; 4.634.665; y 5.179.017). Por ejemplo, normalmente el gen marcador seleccionable  
confiere resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha  
introducido el vector.

15 Pueden usarse técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar  
las células huésped, seleccionar transformantes, cultivar las células huésped y recuperar la molécula de anticuerpo  
del medio de cultivo. Por ejemplo, los polipéptidos usados en la invención pueden aislarse mediante cromatografía de  
afinidad.

20 En una realización, el polipéptido usado en la invención se purifica tal como se describe en el documento WO  
10/056550. En una realización a modo de ejemplo, el polipéptido se purifica de uno o más contaminantes: poniendo  
en contacto una mezcla de polipéptido y contaminante(s) con un soporte a base de proteína A y/o un soporte de  
intercambio iónico, en condiciones que permiten que el polipéptido se una a o se adsorba al soporte; eliminando uno  
25 o más contaminantes lavando el soporte unido en condiciones en las que el polipéptido sigue unido al soporte, y  
eluyendo selectivamente el polipéptido del soporte eluyendo la molécula de polipéptido adsorbida con un tampón de  
elución.

25 Los polipéptidos usados en la invención también pueden producirse mediante un animal transgénico. Por ejemplo, la  
patente estadounidense n.º 5.849.992 describe un método de expresión de un anticuerpo en la glándula mamaria de  
30 un mamífero transgénico. Se construye un transgén que incluye un promotor específico de leche y ácidos nucleicos  
que codifican para la molécula de anticuerpo y una secuencia señal para la secreción. La leche producida por hembras  
35 de tales mamíferos transgénicos incluye, secretado en la misma, el dominio único de interés. La molécula de  
anticuerpo puede purificarse de la leche, o para algunas aplicaciones, usarse directamente.

40 La presente invención abarca métodos de producción de las formulaciones que comprenden el polipéptido para su  
uso según lo reivindicado.

45 Las etapas de purificación y formulación pueden coincidir, por ejemplo, cuando los polipéptidos usados en la invención  
se eluyen de una columna usando un tampón según la presente divulgación. Alternativamente, las formulaciones de  
50 la invención pueden prepararse intercambiando un tampón mediante cualquier medio adecuado, por ejemplo, medios  
usados ampliamente en la técnica tal como diálisis, ultrafiltración, etc.

40 En algunas realizaciones, el método de producción de una formulación que comprende el polipéptido usado en la  
invención también puede referirse a la reconstitución de una formulación liofilizada o secada por pulverización, por  
ejemplo, mediante la adición de agua o un tampón adecuado (que puede comprender opcionalmente excipientes  
45 adicionales).

45 Los métodos para preparar una formulación que comprende el polipéptido usado en la presente invención pueden  
abrir etapas adicionales, tales como el llenado de la misma en viales adecuados para uso clínico, tal como  
50 recipientes sellados, y/o la confección de la misma en una forma unitaria de dosificación. Los métodos también pueden  
comprender etapas adicionales tales como secado por pulverización, liofilización o congelación, por ejemplo,  
55 congelación en masa. La divulgación también abarca los recipientes, formas unitarias de dosificación u otros productos  
que puedan obtenerse mediante cualquiera de los métodos citados en el presente documento.

55 Las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la presente invención pueden usarse para almacenar los  
polipéptidos usados en la invención, por ejemplo, polipéptidos que comprenden dos ISVD frente a vWF, tal como ALX  
0081, tal como se define en el presente documento. Por tanto, la invención abarca un método de almacenamiento de  
los polipéptidos usados en la invención tal como se usa en el presente documento, caracterizado por el uso de una  
60 formulación tal como se define en el presente documento. Más específicamente, la invención abarca métodos para  
estabilizar los polipéptidos de la invención para el almacenamiento, que comprende, por ejemplo, la preparación de  
una formulación tal como se describe en el presente documento. El almacenamiento puede ser de 1-36 meses, tal  
como 1, 1.5, 3, 6, 9, 12, 18, 24, 30 o 36 meses, por ejemplo, al menos 12 meses, opcionalmente a una temperatura  
65 de entre -70°C y +40°C, tal como -70°C, -20°C, +5°C, +25°C o +40°C, preferiblemente una temperatura de entre -70°C  
y +25°C, más preferiblemente a una temperatura de entre -20°C y +5°C. Por tanto, el almacenamiento puede abarcar  
congelación, secado por congelación (liofilización) y/o secado por pulverización. Los métodos de almacenamiento  
pueden comprender además la evaluación de la integridad física y química de los elementos de unión a vWF tal como  
se define en el presente documento.

La presente divulgación también se refiere a métodos para analizar formulaciones que comprenden al menos uno de los elementos de unión a vWF tal como se definen en el presente documento. Las formulaciones pueden analizarse para cualquier signo de inestabilidad química o física de los elementos de unión a vWF tal como se define en el presente documento. Por ejemplo, las formulaciones pueden evaluarse para la presencia de productos de degradación, por ejemplo, derivados de bajo peso molecular tales como fragmentos proteolíticos; y/o para derivados químicos, por ejemplo, variantes de piroglutamato; y/o para derivados de alto peso molecular tales como agregados, aglomerados, etc. La formulación también puede evaluarse para el contenido de proteína total y/o la potencia. Cada uno de los diversos métodos de ensayo a los que se hace referencia en el presente documento puede usarse en el método de análisis de la presente divulgación.

Por tanto, la presente divulgación también se refiere a un método para monitorizar y/o evaluar la calidad y/o estabilidad de una formulación, por ejemplo, durante uno o más de la fabricación, el almacenamiento y el uso. La divulgación también se refiere a un método de control de calidad de una formulación, por ejemplo, para evaluar que la formulación cumple las especificaciones de producto tal como se describe adicionalmente en el presente documento. La divulgación en cualquiera de estos aspectos comprende uno o más seleccionados de la comparación con una o más muestras de referencia, el análisis de la variación entre lotes y la monitorización regular de un proceso de producción.

La presente invención se refiere a cualquier producto que esté asociado con las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la presente invención, por ejemplo, al comprenderlas o al ser necesario para su producción o confección, sin ninguna limitación.

Por ejemplo, la presente invención se refiere a un artículo de fabricación, por ejemplo, un recipiente sellado que comprende una o más de las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la presente invención.

La invención también se refiere a una forma de dosificación unitaria farmacéutica, por ejemplo, una forma de dosificación adecuada para la administración parenteral (por ejemplo, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa y por vía subcutánea) a un paciente, preferiblemente un paciente humano, que comprende una o más de la formulación según que comprende el polipéptido para su uso según lo reivindicado.

La forma unitaria de dosificación puede estar, por ejemplo, en el formato de una jeringa precargada, una ampolla, cartucho o un vial.

La divulgación también proporciona kits o artículos de fabricación, que comprenden la formulación que comprende el polipéptido usado en la invención e instrucciones para su uso por parte de, por ejemplo, un profesional sanitario. Los kits o artículos de fabricación pueden incluir un vial o una jeringa que contiene la formulación que comprende el polipéptido usado en la invención tal como se describe en el presente documento.

Preferiblemente, el vial o la jeringa está compuesto de vidrio, plástico o un material polimérico elegido de un polímero o copolímero de olefina cíclica. La jeringa, ampolla, cartucho o vial puede fabricarse de cualquier material adecuado, tal como vidrio o plástico y puede incluir materiales de caucho, tales como tapones de caucho para viales y émbolos de caucho y sellos de caucho para jeringas y cartuchos. La invención también se refiere a un kit que comprende una o más de las formulaciones que comprenden el polipéptido usado en la presente invención. El kit puede comprender además instrucciones para su uso y/o un prospecto clínico. En cualquier realización de los productos tal como se definen en el presente documento, la invención también abarca la presencia de material de envasado, instrucciones de uso y/o prospectos clínicos, por ejemplo, tal como se requiera según aspectos regulatorios.

Para los propósitos de comparar dos o más secuencias de aminoácidos, el porcentaje de *"identidad de secuencia"* entre una primera secuencia de aminoácidos y una segunda secuencia de aminoácidos (también denominada en el presente documento *"identidad de aminoácidos"*) puede calcularse dividiendo *[el número de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácidos que son idénticos a los residuos de aminoácido en las posiciones correspondientes en la segunda secuencia de aminoácidos]* entre *[el número total de residuos de aminoácido en la primera secuencia de aminoácidos]* y multiplicando por *[100%]*, en el que cada delección, inserción, sustitución o adición de un residuo de aminoácido en la segunda secuencia de aminoácidos - en comparación con la primera secuencia de aminoácidos - se considera una diferencia en un único residuo de aminoácido (posición), es decir una *"diferencia de aminoácido"* tal como se define en el presente documento.

Alternativamente, el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos puede calcularse usando un algoritmo informático conocido, tal como los mencionados anteriormente para determinar el grado de identidad de secuencia para secuencias de nucleótidos, de nuevo usando parámetros estándar.

Habitualmente, para el propósito de determinar el porcentaje de *"identidad de secuencia"* entre dos secuencias de aminoácidos según el método de cálculo esbozado anteriormente en el presente documento, la secuencia de aminoácidos con el mayor número de residuos de aminoácido se tomará como la *"primera"* secuencia de aminoácidos y la otra secuencia de aminoácidos se tomará como la *"segunda"* secuencia de aminoácidos.

Además, a la hora de determinar el grado de identidad de secuencia entre dos secuencias de aminoácidos, el experto en la técnica puede tener en cuenta las denominadas sustituciones de aminoácido "conservativas", que pueden describirse generalmente como sustituciones de aminoácido en las que un residuo de aminoácido se reemplaza por otro residuo de aminoácido de estructura química similar y que tiene poca o esencialmente ninguna influencia sobre la función, actividad u otras propiedades biológicas del polipéptido. Tales sustituciones de aminoácido conservativas se conocen ampliamente en la técnica, por ejemplo, de los documentos WO 04/037999, GB-A-3 357 768, WO 98/49185, WO 00/46383 y WO 01/09300; y pueden seleccionarse tipos (preferidos) y/o combinaciones de tales sustituciones basándose en las enseñanzas pertinentes del documento WO 04/037999 así como del documento WO 98/49185 y de las referencias adicionales citadas en los mismos. Tales sustituciones conservativas son preferiblemente sustituciones en las que un aminoácido dentro de los siguientes grupos (a) - (e) se sustituye por otro residuo de aminoácido dentro del mismo grupo: (a) residuos no polares o ligeramente polares, alifáticos pequeños: Ala, Ser, Thr, Pro y Gly; (b) residuos polares, cargados negativamente, y sus amidas (sin carga): Asp, Asn, Glu y Gln; (c) residuos polares, cargados positivamente: His, Arg y Lys; (d) residuos no polares, alifáticos grandes: Met, Leu, Ile, Val y Cys; y (e) residuos aromáticos: Phe, Tyr y Trp. Las sustituciones conservativas particularmente preferidas son tal como sigue: Ala por Gly o por Ser; Arg por Lys; Asn por Gln o por His; Asp por Glu; Cys por Ser; Gln por Asn; Glu por Asp; Gly por Ala o por Pro; His por Asn o por Gln; Ile por Leu o por Val; Leu por Ile o por Val; Lys por Arg, por Gln o por Glu; Met por Leu, por Tyr o por Ile; Phe por Met, por Leu o por Tyr; Ser por Thr; Thr por Ser; Trp por Tyr; Tyr por Trp; y/o Phe por Val, por Ile o por Leu. Cualquier sustitución de aminoácido aplicada a los polipéptidos descritos en el presente documento también puede basarse en el análisis de las frecuencias de variaciones de aminoácido entre proteínas homólogas de diferentes especies desarrollado por Schulz *et al.*, *Principles of Protein Structure*, Springer-Verlag, 1978, en los análisis de potenciales de formación de estructura desarrollados por Chou y Fasman, *Biochemistry* 13: 211, 1974 y *Adv. Enzymol.*, 47: 45-149, 1978, y en el análisis de patrones de hidrofobicidad en proteínas desarrollado por Eisenberg *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 140-144, 1984; Kyte y Doolittle; *J Molec. Biol.* 157: 105-132, 1981, y Goldman *et al.*, *Ann. Rev. Biophys. Chem.* 15: 321-353, 1986. Información sobre la estructura primaria, secundaria y terciaria de Nanobodies® se facilita en la descripción en el presente documento y en la técnica anterior general citada anteriormente. Además, para este propósito, la estructura cristalina de un dominio V<sub>HH</sub> de una llama se facilita, por ejemplo, por Desmyter *et al.*, *Nature Structural Biology*, vol. 3, 9, 803 (1996); Spinelli *et al.*, *Natural Structural Biology* (1996); 3, 752-757; y Decanniere *et al.*, *Structure*, vol. 7, 4, 361 (1999). Información adicional sobre algunos de los residuos de aminoácido que en dominios V<sub>H</sub> convencionales forman la interfaz V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub> y sustituciones de camelización potenciales en estas posiciones puede encontrarse en la técnica anterior citada anteriormente.

La presente divulgación también se refiere a un método de tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con vWF, tal como, por ejemplo, síndrome coronario agudo (ACS), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho inestable o estable, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP); comprendiendo dicho método administrar a un sujeto una composición farmacéutica que comprende la formulación de la invención, reduciendo de ese modo uno o más síntomas asociados con dicha enfermedad relacionada con vWF. En particular, dicha enfermedad relacionada con vWF es TTP.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para el tratamiento de un paciente humano susceptible a o diagnosticado con una enfermedad caracterizada por una enfermedad relacionada con vWF, que comprende administrar una cantidad efectiva de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF) al paciente humano.

La presente divulgación proporciona un método de tratamiento o prevención de una enfermedad relacionada con vWF, tal como TTP, que comprende administrar a un humano una dosis de 5-40 mg de un polipéptido que comprende al menos un dominio variable único de inmunoglobulina (ISVD) frente al factor de von Willebrand (vWF), reduciendo de ese modo uno o más síntomas asociados con la enfermedad relacionada con vWF.

La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, en el que dicha administración de un polipéptido tal como se describe en el presente documento va seguida en el plazo de 5 min a 8 h de la realización de un primer intercambio plasmático (PE).

La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, en el que dicha administración de un polipéptido tal como se describe en el presente documento va precedida de la realización de un intercambio plasmático (PE) precedente, en el plazo de 36 h, preferiblemente 32, 30, 28, 26, 24, 22, 20, 18 o 16 h, preferiblemente alrededor de 24 h de dicho primer PE.

La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, en el que dicho primer PE va seguido de la administración de una segunda dosis de 1-40 mg, preferiblemente 10 mg, de un polipéptido tal como se describe en el presente documento en el plazo de 5 min a 8 h, tal como en el plazo de 10 min a 6 h o de 15 min a 4 h, por ejemplo, en el plazo de 8 h, 7 h, 6 h, 5 h, 4 h, 3 h, 1 h, 45 min, 30 min, 20 min, 15 min, 10 min o incluso 5 min, por ejemplo, en el que dicha segunda dosis de dicho polipéptido se administra en el plazo de 1-60 min, tal como 30 min de dicho primer PE, preferiblemente mediante inyección subcutánea.

La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende además:

- 5 (i) realizar un PE; (seguido de)
- (ii) administrar una dosis de 5-40 mg de un polipéptido tal como se describe en el presente documento de 15 min a 4 h tras dicho PE de la etapa (i); y
- (iii) opcionalmente medir el recuento de plaquetas y/o la actividad de ADAMTS13 de dicho paciente,
- 10 en el que la etapa (i) y la etapa (ii) se repiten una vez al día hasta que el recuento de plaquetas de dicho paciente es >150000/μl y/o la actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.

15 La presente divulgación proporciona también un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 5-40 mg de un polipéptido tal como se describe en el presente documento durante al menos 5, 10, 15, 20, 25 o incluso 30 días después de que el recuento de plaquetas de dicho paciente sea >150.000/μl.

20 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende además administrar una vez al día una dosis de 5-40 mg de un polipéptido tal como se describe en el presente documento hasta que dicho humano entra en remisión.

25 La presente divulgación proporciona un tratamiento tal como se describe en el presente documento, que comprende administrar dicho polipéptido hasta que la actividad de ADAMTS13 es de al menos el 10%, tal como al menos el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 45% o incluso el 50% de la actividad de referencia de ADAMTS13.

30 En otra realización de la divulgación se proporciona un artículo de fabricación que contiene materiales útiles para el tratamiento de una enfermedad tal como se describió anteriormente. El artículo de fabricación comprende un recipiente, una etiqueta y un prospecto. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes pueden ser de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la composición que es efectiva en el tratamiento del estado y puede tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo, el recipiente puede ser una bolsa de disolución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica). Al menos un agente activo en la composición es el polipéptido de la invención, tal como ALX 0081. La etiqueta sobre, o asociada con, el recipiente indica que la composición se usa para tratar el estado de elección. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable, tal como una solución salina con tampón fosfato o una solución salina tamponada con citrato tal como se describe en el presente documento. Puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista de un usuario o comercial, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas.

35 La presente divulgación proporciona un kit o un artículo de fabricación, que comprende un recipiente que contiene el polipéptido tal como se describe en el presente documento o la formulación tal como se describe en el presente documento, e instrucciones de uso.

40 La presente divulgación proporciona un kit o artículo de fabricación tal como se describe en el presente documento, en el que la formulación está presente en un vial o una jeringa inyectable.

45 La presente divulgación proporciona un kit o artículo de fabricación tal como se describe en el presente documento, en el que la formulación está presente en una jeringa inyectable precargada.

50 La presente divulgación proporciona un kit o artículo de fabricación tal como se describe en el presente documento, en el que la jeringa o un vial está compuesto de vidrio, plástico, o un material polimérico elegido de un polímero o copolímero de olefina cíclica.

55 Las realizaciones ilustradas y comentadas en esta memoria descriptiva solo pretenden enseñar a los expertos en la técnica la mejor manera conocida por los inventores para hacer y usar la invención.

60 La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes aspectos, ejemplos y figuras preferidos no limitativos.

## 6. Abreviaturas

AE	acontecimientos adversos
ACS	síndrome coronario agudo
ADAMTS13	una metaloproteasa similar a desintegrina con repeticiones de trombospondina 13
ALX 0081	caplacizumab
AMI	infarto de miocardio agudo
BNP	péptido natriurético cerebral

	índice de masa corporal
	unidades Betesda
	región determinante de complementariedad
	isoelectrofoque capilar
5	dAb anticuerpo de dominio único
	ELISA ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima
	HR cociente de riesgo
	ISVD dominio variable único de inmunoglobulina
	ITT intención de tratar
10	i.v. intravenoso
	FR región de entramado
	KA constante de asociación
	KD constante de disociación
	LDH lactato deshidrogenasa
15	NSE enolasa específica de neurona
	NT proBNP propéptido natriurético cerebral N-terminal
	PE o PEX intercambio plasmático
	PP según el protocolo
	RICO actividad de cofactor ristocetina
20	RP-HPLC cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa
	SAE acontecimiento adverso grave
	s.c. subcutáneo
	scFv fragmento variable monocatenario
	S/D solvente/detergente
25	SE-HPLC cromatografía de líquidos de alto rendimiento por exclusión de tamaño
	SPR resonancia de plasmones superficiales
	TnI troponina I
	TnT troponina T
	TRALI lesión pulmonar aguda relacionada con transfusión
30	TPP púrpura trombocitopénica trombótica
	TTR tiempo hasta la respuesta
	ULN límite superior normal
	ULvWF vWF ultragrande
	VH dominio variable de cadena pesada
35	VHH secuencia de dominio variable de cadena pesada que se deriva de un anticuerpo de cadena pesada
	VL dominio variable de cadena ligera
	vWF factor de von Willebrand

## 7. EJEMPLOS

## 7.1 Regulaciones aplicables

45 Todas las muestras humanas usadas en la sección de ejemplos se obtuvieron o bien de fuentes comerciales o bien de voluntarios humanos (tras obtener todos los consentimientos y aprobaciones requeridos) y se usaron de acuerdo con los requisitos legales y regulatorios aplicables (incluyendo aquellos relativos al secreto médico y a la privacidad del paciente).

50 Los ensayos clínicos se realizaron según las leyes y regulaciones aplicables (incluyendo la Declaración de Helsinki y los principios del secreto médico y la protección de la privacidad del paciente) y tras haber obtenido todas las aprobaciones (incluyendo las aprobaciones por parte de los comités éticos relevantes) y los consentimientos (incluyendo el consentimiento informado de los sujetos implicados) requeridos.

55 Los objetivos y los contenidos de este estudio clínico así como sus resultados se trataron como confidenciales y no se han hecho accesibles a terceros. Los empleados que participaron en el estudio estaban obligados por la confidencialidad. Todos los fármacos no usados o bien se devolvieron al solicitante o bien se destruyeron.

## 7.2 Efectos de ALX 0081 sobre la adhesión plaquetaria a ULvWF derivado de células endoteliales y sobre la actividad de ADAMTS13

60 Objetivo: El objetivo de este estudio era evaluar si un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, puede inhibir la adhesión de plaquetas a ULvWF. Este podría servir entonces como prueba de concepto para el uso de un polipéptido usado en la invención, tal como ALX-081, para el tratamiento de pacientes con TTP en un episodio agudo. El estudio también determina el efecto de un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, sobre la actividad de ADAMTS13.

Método: Se usó la prueba de cámara de flujo para someter a prueba si un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, puede inhibir la interacción entre plaquetas y ULvWF según Sixma (Sixma *et al.* 1998 Thromb Res 92: S43-S46). Resumiendo, se cultivaron células endoteliales sobre cubreobjetos y se estimularon, secretando de ese modo ULvWF. El plasma de pacientes con TTP se suplementó con plaquetas y se perfundió sobre las células estimuladas.

5 Se visualizaron cadenas de plaquetas que se adherían a ULvWF mediante microscopía de video en tiempo real. El experimento se repitió en presencia de concentraciones crecientes de un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081. Con el fin de determinar el efecto de un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, sobre la escisión de ULvWF mediante ADAMTS13, se usaron dos tipos de experimentos. En el primer experimento, se evaluó la escisión de cadenas de plaquetas mediante ADAMTS13 en ausencia de exceso de un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081. En el segundo experimento, se usó un fragmento recombinante compuesto por el dominio A1-A2-A3 de vWF para evaluar el efecto inhibitorio de un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, sobre ADAMTS13.

10 15 Resultados: ALX 0081 inhibió la formación de cadenas de plaquetas sobre ULvWF en todas las concentraciones sometidas a prueba y no tuvo ningún efecto sobre el desprendimiento de cadenas de plaquetas mediante ADAMTS13. El polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, tampoco tuvo ningún efecto sobre la escisión del fragmento de dominio A1-A2-A3 recombinante de vWF mediante ADAMTS13. El polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, tampoco fue capaz de quitar las plaquetas de cadenas ya formadas en este experimento.

20 25 Conclusión: Este estudio proporciona una prueba de concepto de que un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, puede usarse para tratar pacientes con TTP. También demuestra que un polipéptido usado en la invención, tal como ALX 0081, no interfiere con la actividad de ADAMTS13.

### 7.3 Criterios de elegibilidad

30 35 40 Los pacientes tenían que cumplir todos de los siguientes criterios para ser elegibles para la admisión en el estudio:

#### Criterios de inclusión

- 30 1. 18 años de edad o mayores
2. Hombres o mujeres dispuestos a aceptar un régimen contraceptivo aceptable
3. Pacientes con diagnóstico clínico de TTP
- 35 4. Necesidad de PE (una sesión de PE única antes de que se permita la aleatorización en el estudio)
5. Sujeto accesible para el seguimiento
- 40 6. Consentimiento informado obtenido, firmado y fechado

#### Criterios de exclusión

- 45 1. Recuento de plaquetas mayor de o igual a 100.000/ $\mu$ l
2. Infección activa grave indicada mediante sepsis (requisito de vasopresores con o sin cultivos sanguíneos positivos)
3. Evidencia clínica de infección entérica con *E. coli* 0157 o un organismo relacionado
- 50 4. Síndrome antifosfolípido
5. Diagnóstico de DIC
- 55 6. Embarazo o lactancia
7. Microangiopatía trombótica asociada con trasplante de médula ósea o células madre hematopoyéticas
8. TTP congénita conocida
- 60 9. Sangrado activo o alto riesgo de sangrado
10. Hipertensión arterial no controlada

11. Tratamiento crónico conocido con tratamiento anticoagulante que no puede detenerse de manera segura, incluyendo, pero sin limitarse a, antagonistas de vitamina K, heparina o LMWH, y moléculas antiinflamatorias no esteroideas distintas de ácido acetilsalicílico
- 5 12. Estado clínico grave o potencialmente mortal distinto de TTP que alteraría la participación en el ensayo
13. Sujetos con malignidades que den como resultado una esperanza de vida de menos de 3 meses
- 10 14. Sujetos con carcinosis de médula ósea conocida o sospechada
- 15 15. Sujetos que no pueden cumplir con los requisitos y procedimientos del protocolo del estudio.
16. Hipersensibilidad conocida a la sustancia activa o a los excipientes del fármaco del estudio
- 15 17. Deterioro hepático grave, correspondiente a toxicidad de grado 3 definida mediante la escala CTCAE. Para los parámetros hepáticos clave, esto se define tal como sigue:
- 20 • bilirrubina  $> 3 \times$  ULN (necesidad de diferenciar un aumento aislado en la bilirrubina indirecta debido a hemólisis, este no es un parámetro de exclusión sino una enfermedad relacionada)
- 25 • ALT/AST  $> 5 \times$  ULN
- AP  $> 5 \times$  ULN
- 25 • gamma-glutamilo transpeptidasa (GGT)  $> 5 \times$  ULN
18. Deterioro renal crónico grave, tal como se define mediante GFR  $< 30$  ml/min

#### 7.4 Diseño del estudio

30 El presente estudio se diseñó como un estudio de fase II multicéntrico, ciego simple, de diseño paralelo, aleatorizado, controlado por placebo (ensayo Titan). La población del estudio eran pacientes sintomáticos con episodios agudos de TTP adquirida, que requerían tratamiento con PE. Tras la confirmación de la elegibilidad para la participación en el estudio (véase el ejemplo 7.3), se aleatorizaron los pacientes en una relación de 1:1 para recibir o bien ALX 0081 o bien placebo como terapia adyuvante a PE (Figura 1). Los pacientes se aleatorizaron antes del inicio del tratamiento con PE. Sin embargo, en casos excepcionales (debido a necesidad o capacidad de iniciar el PE en un marco de tiempo que no permitía la realización de todos los procedimientos del estudio de examen y/o nivel inicial requeridos), un paciente se aleatorizó tras una sesión de PE única, precedente (“PE precedente”), pero antes del inicio de la siguiente sesión de PE (“primer PE”). Esta sesión de PE siguiente en general se inició en el plazo de 24 horas del final de la sesión de PE precedente y se consideró el primer PE en el estudio (“primer PE”).

40 Se hizo un seguimiento de los pacientes en diferentes fases durante este estudio:

- 45 • Mediciones de examen y nivel inicial tras la admisión en el hospital
- Fase de tratamiento
  - Fármaco de estudio en bolo i.v. único administrado a través de inyección de empuje
- 50 • Fase de tratamiento s.c. adyuvante de PE diario
- Fase de tratamiento s.c. posterior al PE diario (incluyendo retirada gradual de PE si era aplicable, y fármaco del estudio tras PE durante 30 días después del último PE)
- 55 • Fase de seguimiento

60 Los pacientes recibieron el mejor cuidado y tratamiento médico que se consideró apropiado por el investigador en cada centro y según las directrices para el tratamiento de TTP. La duración total máxima de la participación en el estudio individual era un máximo de 15 meses: una fase de tratamiento de hasta 90 días y un periodo de seguimiento de como máximo 1 año tras la remisión o después de 90 días de tratamiento, lo que ocurriera primero. En general, se hospitalizó a los pacientes durante al menos 1 día tras el último PE diario.

65 El fármaco del estudio se administró como tratamiento adyuvante en momentos específicos en relación con los procedimientos de PE. El fármaco del estudio consistía en 10 mg de caplacizumab (“grupo de tratamiento”) o placebo (“grupo de placebo”), una vez o dos veces al día.

#### 7.4.1 Primera administración de fármaco

Los pacientes recibieron un primer bolo i.v. de 10 mg de ALX 0081 o placebo a través de inyección de empuje de 15 minutos a 6 h antes del inicio del primer PE. Este primer PE fue seguido de la administración s.c. de 10 mg del fármaco del estudio en el plazo de 30 minutos tras el final del procedimiento de PE.

Durante el periodo de tratamiento de PE completo (incluyendo retirada gradual y PE facilitado para exacerbaciones), el fármaco del estudio se administró diariamente a través de inyecciones s.c.

Si se programó 1 PE al día, se administraron 10 mg del fármaco del estudio en el plazo de 30 minutos tras el final del procedimiento de PE.

Si se programaron 2 PE al día, se administraron 10 mg del fármaco del estudio en el plazo de 30 minutos tras el final de cada procedimiento de PE. La dosis diaria total máxima del fármaco del estudio era por tanto 20 mg.

Si se programaron menos de 1 PE al día (es decir durante un régimen de retirada gradual), se administraron 10 mg del fármaco del estudio diariamente. Los días con un PE, la administración de fármaco del estudio era en el plazo de 30 minutos tras el final del procedimiento de PE; en los días sin PE, la administración de fármaco del estudio era 24 h ( $\pm 1$  h) tras la administración previa.

La administración de fármaco del estudio s.c. diaria de 10 mg continuó durante 30 días tras el último PE (incluyendo retirada gradual).

#### 7.4.2 Punto final primario

El punto final primario de este estudio de fase II era el tiempo hasta la respuesta (TTR), basándose en el siguiente criterio: recuperación de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ . Con el fin de cualificar como que se cumplía el punto final, la respuesta tenía que confirmarse 48 horas tras la notificación inicial de recuperación de plaquetas igual a o por encima de  $150.000/\mu\text{l}$  mediante una medición *de novo* de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$  y lactato deshidrogenasa (LDH)  $\leq 2 \times$  límite superior del normal (ULN), es decir, "respuesta plaquetaria confirmada". El recuento de plaquetas es el marcador de laboratorio crucial para la toma de decisiones terapéuticas en pacientes con TTP. Esto se basa en el hecho de que la agregación plaquetaria mediada por ULvWF es el mecanismo fisiopatológico común detrás de la TTP, conduciendo a trombocitopenia grave y anemia hemolítica microangiopática, que son los sellos distintivos principales en el diagnóstico de TTP (Scully *et al.* citado anteriormente).

#### 7.4.3 Determinación de la actividad de ADAMTS13

La actividad de ADAMTS13 y la actividad inhibitoria funcional se midieron mediante un ensayo fluorogénico usando el sustrato FRETS-VWF73 (Kokame *et al.* 2005. Br J Haematol 129(1):93-100; Kremer Hovinga *et al.* 2006 J Thromb Haemost 4(5):1146-8).

Brevemente, el ensayo de FRETS-VWF73 se realizó esencialmente tal como se describe (Kokame *et al.* 2005 citado anteriormente) con las siguientes modificaciones: se añadió Pefabloc SC (Boehringer, Mannheim, Alemania) al tampón de ensayo (Bis-Tris 5 mmol L-1, CaCl2 25 mmol L-1, Tween-20 al 0,005%, pH 6,0) a una concentración final de 1 mmol L-1. La calibración del ensayo se obtuvo usando un conjunto de plasma humano normal (NHP; Swiss Red Cross Blood Services, Berna, Suiza) diluido 1:25 (100%) en tampón de ensayo. Se obtuvieron muestras de calibración adicionales mediante prediluciones en serie de NHP de 3:4 (75%), 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:10 (10%), 1:20 (5%), 1:50 (2%) y 1:100 (1%) en NHP inactivado por calor, incubado durante 30 min a 56°C seguido de 15 min de centrifugación a 15 000 x g para corregir un efecto de matriz de plasma en el intervalo de menor actividad de la curva estándar. Todas estas muestras estaban así como el NHP inactivado por calor (0% actividad de ADAMTS13) y todas las muestras de prueba se diluyeron posteriormente 1:25 en tampón de ensayo. A continuación, se incubaron 25  $\mu\text{l}$  de cada muestra de paciente o estándar diluida a 37°C en una placa blanca de 384 pocillos (NUNC, Roskilde, Dinamarca). Tras 10 min, se añadieron 25  $\mu\text{l}$  de sustrato peptídico FRETS-VWF73 4  $\mu\text{mol L-1}$  disuelto en tampón de ensayo a cada pocillo y se registró la evolución de la fluorescencia a 37°C en un lector de microplacas de fluorescencia (GENios, Tecan, Zúrich, Suiza) equipado con un filtro de excitación de 340 nm (anchoa de banda 35 nm) y un filtro de emisión de 450 nm (anchoa de banda 25 nm). La evolución de la fluorescencia se midió a lo largo del tiempo (cada 5 min durante 42 ciclos). Las tasa de reacción se calculó mediante el análisis de regresión lineal (Passing-Bablok) de la evolución de la fluorescencia a lo largo del tiempo desde 5 (ciclo 2) hasta 60 min (ciclo 13). La pendiente de la curva de regresión se calculó para cada muestra de calibración y se usó para generar la curva de calibración (línea de tendencia:  $y = ax + b$ ; siendo  $x = \text{ADAMTS13} (\%)$  e  $y = \text{delta de RFU/delta de tiempo}$ ). La actividad de ADAMTS13 (%) de una muestra se calculó entonces como:  $(y - b) \times 1/a$ .

La actividad inhibitoria funcional de ADAMTS13 se midió mediante el mismo método de FRETS-VWF73 fluorogénico mediante la determinación de la actividad de ADAMTS13 residual de plasma humano normal tras una incubación 1:1 (v:v) durante 2 horas a 37°C con plasma del paciente inactivado por calor (30 min a 56°C).

Para cada lote analítico se generó una curva de calibración usando un conjunto de plasma humano normal (NHP; Swiss Red Cross Blood Services, Berna, Suiza) diluido 1:25 (100%) en tampón de ensayo. Se obtuvieron muestras de calibración adicionales mediante prediluciones en serie de NHP de 1:2 (50%), 1:4 (25%), 1:10 (10%), 1:20 (5%), 1:50 (2%) y 1:100 (1%) en NHP inactivado por calor. Todos los puntos de calibración se aplicaron una vez. Criterios de aceptación: (1) La pendiente de la regresión final de la línea de curva estándar tiene que ser  $>6,0$ ; y (2)  $R^2$  de la regresión de la representación gráfica final tiene que ser  $>0,98$  (o  $R >0,9899$ ). De lo contrario se rechazó el ensayo.

## 7.5 Resultados en pacientes con TTP

### 7.5.1 Disposición de sujetos y análisis de poblaciones.

El estudio de fase II comprendía un tamaño de muestra de 75 pacientes, que se aleatorizaron tal como se expone en la tabla 2.

La población de análisis primaria era la población de intención de tratar (ITT), que consistía en todos los sujetos aleatorizados según una asignación de tratamiento aleatorizada. Además, para los análisis de eficacia se usó la población por protocolo (PP). La población PP es un subconjunto de la población ITT y consiste en todos los sujetos aleatorizados, según la asignación de tratamiento aleatorizada, con exclusión de todas las desviaciones y los infractores del protocolo importantes.

Tabla 2	Caplacizumab N (%)	Placebo N (%)	Total N (%)
Aleatorizados	36	39	75
No tratados	1 (2,8%)	2 (5,1%)	3 (4,0%)
Población ITT	36 (100%)	39 (100%)	75 (100%)
Población de seguridad	35 (97,2%)	37 (94,9%)	72 (96,0%)

En conclusión, había una distribución regular en ambas ramas de tratamiento, es decir pacientes que recibían caplacizumab (grupo de tratamiento) y pacientes que recibían placebo (grupo de placebo). Las ramas de tratamiento estaban además bien equilibradas para la edad, etnia/raza y BMI.

Las características de nivel inicial de diversos parámetros se evaluaron en los pacientes del grupo de tratamiento y del grupo de placebo. En la tabla 3 se presentan los recuentos de plaquetas y LDH de nivel inicial. El aumento de niveles de LDH es un signo de isquemia tisular y/o hemólisis aumentada.

Tabla 3	Caplacizumab N=35	Placebo N=37	Total N=72
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ ) media $\pm$ desv. est.	$21,1 \pm 18,2$	$28,0 \pm 20,0$	$24,6 \pm 19,3$
mínimo, máximo	2, 70	5, 84	2, 84
LDH (U/l) media $\pm$ desv. est.	$1277,4 \pm 852,5$	$1270,1 \pm 939,3$	$1273,7 \pm 891,0$
mínimo, máximo	240, 3874	247, 4703	240, 4703

Hay un recuento de plaquetas de nivel inicial medio ligeramente menor para la rama de caplacizumab. En ambas ramas, los recuentos de plaquetas medios eran muy bajos en el nivel inicial, lo que es consistente con un entorno de enfermedad grave, pero también es indicativo de que todos los sujetos que se presentaron se consideraron para su inclusión y no hubo sesgo hacia sujetos trombocitopénicos menos graves.

Las medias de LDH son comparables para ambas ramas de tratamiento.

En la tabla 4 se presentan la vWF:Ag y la actividad de ADAMTS13 de nivel inicial.

Tabla 4	Caplacizumab N=36	Placebo N=39	Total N=75
vWF:Ag (%) media $\pm$ desv. est.; ULN = 150	$180,3 \pm 78,2$	$185,5 \pm 80,8$	$183,1 \pm 78,9$
Actividad de ADAMTS13 n(%)			
< 5%, indicativo de TTP idiopática	21 (58,3%)	22 (56,4%)	43 (57,3%)
$\geq 5\%$	9 (25,0%)	14 (35,9%)	23 (30,7%)
ausente	6 (16,7%)	3 (7,7%)	9 (12%)

Ambas ramas de tratamiento estaban bien equilibradas para la vWF:AG y la actividad de ADAMTS13. Más de la mitad de los sujetos tenían TTP idiopática tal como se indica mediante <5% de actividad de ADAMTS13.

## 7.5.2 Resultados del estudio: puntos finales primarios

El tiempo hasta la respuesta de los marcadores sanguíneos se monitorizó en un entorno de supervivencia. El punto final primario tiempo hasta la respuesta de marcadores sanguíneos comprendía una recuperación de plaquetas  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ . Los niveles de plaquetas representan un marcador sustituto fiable para actividad patológica de TTP. El periodo de cero hasta tiempo hasta el acontecimiento se estableció a 30 días.

Los resultados se representan en la tabla 5.

10 Los datos se evaluaron según la estratificación (1 PEX antes de la aleatorización: Sí y NO), lo que se agrega a un cociente de riesgo global para la población ITT completa de 2,197 con un valor de  $p = 0,013$  para la población global ITT. El cociente de riesgo significa que en cualquier momento, los sujetos que reciben caplacizumab tienen más de dos veces la tasa de conseguir el punto final primario de recuperación de plaquetas confirmada en comparación con los sujetos con placebo.

15 Reducción en el tiempo hasta la respuesta plaquetaria confirmada (punto final primario):

- En el grupo de sujetos sin PEX antes de la aleatorización, una mediana de 4,92 días para la rama de placebo se redujo hasta 3,00 días para la rama de caplacizumab: reducción del 39% (PEX antes de la aleatorización = NO)
- En el grupo de sujetos que recibieron un PEX antes de la aleatorización, una mediana de 4,31 días para la rama de placebo se redujo hasta 2,44 días para la rama de caplacizumab: reducción del 43% (PEX antes de la aleatorización = Sí)

20 25 Las medianas de los tiempos de 4,31 días y 4,92 días para las ramas de placebo de los 2 estratos (1 PEX antes de la aleatorización: Sí y NO) son menores de lo esperado de la bibliografía médica y los datos de los investigadores (6 días; véase Bandarenko *et al.* Journal of Clinical Apheresis 1998; 13: 133-141). Esto implica que incluso con un tratamiento de estándar de cuidado mejorado a lo largo de datos históricos, el tratamiento de caplacizumab era superior.

30 35 El IC del 95% del tiempo hasta la respuesta plaquetaria confirmada es de 2 a 3 veces más estrecho para las ramas de caplacizumab frente a las ramas de placebo. Esto implica que el tiempo hasta la resolución de la enfermedad es menos variable en las ramas de tratamiento de caplacizumab que en las ramas de placebo.

Tabla 5

PEX previo *		Caplacizumab N=36	Placebo N=39
No	Sujetos censurados a los 30 días n (%)	5 (13,9%)	11 (28,2%)
No	Sujetos con respuesta plaquetaria confirmada n (%)	29 (80,6%)	24 (61,5%)
No	Mediana (IC del 95%)	3,00 (2,74, 3,88)	4,92 (3,21, 6,59)
No	Percentil 25 y 75	2,72 y 4,31	3,01 y 11,37
Sí	Sujetos censurados a los 30 días n (%)	0	0
Sí	Sujetos con respuesta plaquetaria confirmada n (%)	2 (5,6%)	4 (10,3%)
Sí	Mediana (IC del 95%)	2,44 (1,92, 2,97)	4,31 (2,91, 5,68)
Sí	Percentil 25 y 75	1,92 y 2,97	3,37 y 5,23
Cociente de tasa de peligro global para caplacizumab frente a placebo (IC del 95%)		2,197 (1,278, 3,778)	
Prueba de rango logarítmico estratificada valor de $p$		0,013	

\* 1 PEX antes de la aleatorización

## 7.5.3 Resultados del estudio: exacerbaciones

40 Dentro de la población ITT se determinó la proporción de sujetos con exacerbaciones. Exacerbación se refiere a una trombocitopenia recurrente tras una respuesta plaquetaria confirmada y que requiere un nuevo inicio de tratamiento de PE diario tras  $\geq 1$  día, pero  $\leq 30$  días tras el último PE.

45 Los resultados se representan en la tabla 6.

Tabla 6	Caplacizumab N=36	Placebo N=39	Total N=75
Población global	3 (8,3%)	11 (28,2%)	14 (18,7%)

Hay 3 x más exacerbaciones en la rama de placebo frente a la rama de caplacizumab.

Esto confirma el hallazgo de que el polipéptido de la invención, tal como ALX 0081, puede ser responsable únicamente para tratar y/o paliar (los síntomas de) la TTP.

5

#### 7.5.4 Resultados del estudio: recaídas

Se evaluó el número de sujetos que experimentan recaída de TTP. La recaída de TTP se define como un acontecimiento *de novo* de TTP que se produce más tarde de 30 días tras el último PE diario. En la tabla 7 se representa la proporción de sujetos con exacerbación y/o recaída en el 1<sup>er</sup> mes tras el final del tratamiento en la población ITT.

Tabla 7	Caplacizumab N=36	Placebo N=39	Total N=75
Población global	13 (36,1%)	13 (33,3%)	26 (34,7%)
Recaída (al menos)	10	2	12
Actividad de ADAMTS13 de nivel inicial n(%)			
< 5%	7 (19,4%)	8 (20,5%)	15 (20,0%)
≥ 5%	2 (5,6%)	5 (12,8%)	7 (9,3%)

Se ven más recaídas en la rama de caplacizumab frente a la rama de placebo (PLC), lo que iguala los números totales.

15

Las recaídas en la rama de caplacizumab se producen con frecuencia en el plazo de unos pocos días de la terminación de tratamiento de caplacizumab. Esto implica una posible exacerbación "extendida" en lugar de una recaída. Por tanto, el tratamiento de caplacizumab (CAP) puede haber sido posiblemente de una duración demasiado corta para algunos sujetos. De hecho, un mayor número de recaídas tempranas en la rama de CAP corrobora un efecto protector y justifica un tratamiento de CAP más largo en algunos pacientes. Esto implica que el tratamiento de caplacizumab debería haberse continuado durante períodos prolongados.

20

Es interesante observar que en ambas ramas de tratamiento, las recaídas son más prominentes en pacientes con una actividad de ADAMTS13 de nivel inicial de < 5%, aunque la actividad de ADAMTS13 solo estaba disponible en un subconjunto de los pacientes. Esto puede indicar que pacientes con actividad de ADAMTS13 de nivel inicial de < 5% son más propensos a recaídas (o exacerbaciones) y que el tratamiento de caplacizumab debería haberse continuado durante períodos incluso más largos en comparación con pacientes con una mayor actividad (véase el ejemplo 7.5.8).

#### 7.5.5 Resultados del estudio: remisión completa

30

Se evaluó el número de sujetos con remisión completa en la población ITT. Remisión completa se define en este caso como respuesta plaquetaria confirmada y la ausencia de exacerbación. Los resultados se representan en la tabla 8.

Tabla 8		Caplacizumab N=36	Placebo N=39
Global	Número de sujetos n (%)	29 (80,6%)	18 (46,2%)
	IC del 95%	(64,0%, 91,8%)	(30,1%, 62,8%)
Actividad de ADAMTS13 de nivel inicial < 5%	Número de sujetos n (%)	17 (47,2%)	12 (30,8%)
	IC del 95%	(58,1%, 94,6%)	(32,2%, 75,6%)
Actividad de ADAMTS13 de nivel inicial ≥ 5%	Número de sujetos n (%)	7 (19,4%)	6 (15,4%)
	IC del 95%	(40,0%, 97,2%)	(17,7%, 71,1%)

35

La rama de caplacizumab presenta 1,6 x más sujetos con remisión completa frente a la rama de placebo. La proporción mayor de remisión completa, acoplada con la distribución más rápida y más estrecha del tiempo hasta la respuesta plaquetaria confirmada respalda una mayor predictibilidad de la respuesta del paciente a PE en la rama de CAP, y se refleja en el número de días de PE. El número de días consecutivos de PE era (media ± desv. est.)  $6,6 \pm 3,4$  días para CAP frente a  $8,1 \pm 6,5$  días para PLC con un volumen de plasma total administrado, incluyendo retirada gradual, de  $22,5 \pm 15,9$  litros para CAP frente a  $28,4 \pm 21,3$  litros para PLC. El efecto parece más pronunciado para el subgrupo de sujetos con una actividad de ADAMTS13 de nivel inicial baja, aunque los datos de actividad de ADAMTS13 de nivel inicial están incompletos para el grupo de caplacizumab (véase el ejemplo 7.5.8).

40

### 7.5.6 Resultados del estudio: evaluación de seguridad

Se evaluó la incidencia de acontecimientos adversos (AE) y acontecimientos adversos graves (SAE), centrándose en los SAE relacionados con sangrado y los SAE relacionados con inmunidad. La evaluación de SAE incluyó la hemorragia por la inserción del catéter, sepsis, trombosis por catéter, neumotórax, sobrecarga de fluido, hipoxia, hipotensión, reacciones anafilactoides y TRALI. El número de acontecimientos adversos graves era similar por ambas ramas de tratamiento: el 57% en la rama de caplacizumab en comparación con el 51% en la rama de placebo. El número de acontecimientos adversos también era similar por las ramas de tratamiento: el 97% en la rama de caplacizumab en comparación con el 100% en la rama de placebo. El número de sujetos con AE relacionados con sangrado estaba ligeramente elevado en la rama de caplacizumab (54%) en comparación con la rama de placebo (38%).

El riesgo más prominente de los agentes antitrombóticos no específicos usados actualmente es un sangrado aparente o diátesis hemorrágica elevados. Además de cualquier efecto inesperado, el sangrado representa también la preocupación de seguridad más relevante para caplacizumab. En este contexto, el caplacizumab se investigó en un modelo de sangrado quirúrgico preclínico. En este estudio, la pérdida de sangre quirúrgica en animales que recibían caplacizumab era comparable a la pérdida de sangre en animales tratados con Heparin®, y 2 y 4 veces menor en animales tratados con Plavix® y ReoPro®, respectivamente. Aunque esta es una indicación positiva de que el caplacizumab puede ser más seguro que Plavix® y ReoPro® en términos de riesgo de sangrado, esto se evaluó en personas sanas. Tal como se indicó anteriormente, un paciente con TTP difiere en muchos aspectos de una persona sana con respecto a vWF. El tratamiento del estudio se detuvo debido a un acontecimiento adverso en 4 pacientes tratados con caplacizumab y en 2 pacientes tratados con placebo. Sin embargo, el aumento en la tendencia al sangrado era fácilmente manejable.

La TTP es potencialmente mortal. Hubo 2 muertes (5,4%) notificadas en el ensayo, ambas en la rama de placebo. Se observa que el número de muertes en la rama de placebo es menor de la descrita en la bibliografía (10-30%). Esto puede inferir que el desenlace de TTP ha mejorado debido a estándares de cuidado más efectivos (en el presente estudio).

### 7.5.7 Resultados del estudio: protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente

Los presentes inventores diseñaron un protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, basándose en la idea de que la distribución del tiempo de respuesta plaquetaria confirmada es más corta y no está desplazada y sesgada a la derecha (tiempo más largo hasta la respuesta) en la rama de CAP en comparación con la rama de placebo.

En el protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, todos los sujetos se tratan en esencia tal como se expuso anteriormente en el punto 7.4, "Diseño del estudio", pero con la siguiente modificación importante: el periodo de tratamiento de PE se establece durante 3-5 días, tal como 3 días o 4 días o 5 días, preferiblemente 3 días. El periodo de tratamiento de PE es independiente de la recuperación de plaquetas ( $\geq 150.000/\mu\text{l}$ ). La administración de fármaco del estudio s.c. diaria se continúa durante al menos 10 días, tal como 20 días o 30 días después del último PE, pero preferiblemente durante al menos 10 días, tal como 20 días o 30 días tras la recuperación de plaquetas hasta  $\geq 150.000/\mu\text{l}$ . En la evaluación del protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, el punto final primario será el número de exacerbaciones tal como se definió anteriormente.

En el protocolo de tratamiento optimizado adicionalmente, se disminuyen la carga para el paciente y los costes.

### 7.5.8 Actividad de ADAMTS13

Se expuso evaluar adicionalmente la actividad de ADAMTS13 como marcador para la actividad patológica subyacente y evaluar la actividad de ADAMTS13 como marcador para guiar la duración del tratamiento óptimo de caplacizumab, para mantener el beneficio del tratamiento.

En este caso, cuando la actividad de ADAMTS13 era  $<10\%$  entonces se asumía actividad patológica subyacente. Para una actividad de ADAMTS13 de  $\geq 10\%$  se asumió ninguna actividad patológica subyacente.

Las exacerbaciones y recaídas se relacionaron con los datos de actividad de ADAMTS13 disponibles de los pacientes. Si una recaída iba precedida de una ADAMTS13 continuamente baja ( $<10\%$ ) durante el tratamiento, se consideró como recaída del presente episodio. Si una recaída iba precedida de una actividad de ADAMTS13  $\geq 10\%$  durante el tratamiento, se consideró como un episodio de TTP *de novo*. Los pacientes excluidos del análisis fueron (i) enfermedad no mediada por ADAMTS13 ( $\geq 10\%$  en el nivel inicial) ( $n=3$ ), y (ii) pacientes con datos insuficientes ( $n=12$ ).

#### (i) Pacientes sin exacerbaciones o recaídas:

- Caplacizumab: 13/16 (81%) tenían valores de actividad de ADAMTS13  $\geq 10\%$  cerca de la detención del tratamiento
- Placebo: 14/16 (88%) tenían valores de actividad de ADAMTS13  $\geq 10\%$  cerca de la detención del tratamiento

Por tanto, en la mayoría de los pacientes sin exacerbación o recaída, la actividad de ADAMTS13 se recuperó hasta niveles por encima del 10%, lo que sugiere la resolución del presente episodio de TTP.

5 (ii) *Pacientes con exacerbaciones*

- Caplacizumab: 2/3 (67%) tenían actividad de ADAMTS13 <10% alrededor de su exacerbación
- Placebo: 7/8 (88%) tenían actividad de ADAMTS13 <10% alrededor de su exacerbación

10 Por tanto, en la mayoría de los pacientes con exacerbaciones de TTP, la actividad de ADAMTS13 estaba por debajo del 10%, lo que sugiere actividad patológica no resuelta que conduce a exacerbación.

15 (iii) *Pacientes con recaídas del presente episodio de TTP*

- Caplacizumab: 7/7 (100%) tenían valores de actividad de ADAMTS13 <10% cerca de la detención del tratamiento; las recaídas ocurrieron en el plazo de 10 días tras la detención del tratamiento
- Placebo: N/A - todas fueron recaídas “*de novo*”

20 Por tanto, todos los sujetos en el grupo de caplacizumab con recaídas que ocurrieron poco después del final de tratamiento tenían actividad de ADAMTS13 continuamente baja (<10%), indicativa de enfermedad en curso.

25 (iv) *Pacientes con un episodio de recaída de novo*

- Caplacizumab: 4/4 (100%) tenían valores de actividad de ADAMTS13 ≥10% cerca de la detención del tratamiento; las recaídas ocurrieron en el plazo de ≥ 30 días tras la detención del tratamiento (intervalo: 30 - 167 días). Los 4 pacientes tenían de nuevo actividad de ADAMTS13 <10% en el momento de la recaída.
- Placebo: 2/3 (67%) tenían valores de actividad de ADAMTS13 ≥10% cerca de la detención del tratamiento; las recaídas ocurrieron en el plazo de ≥30 días tras la detención del tratamiento (intervalo: 30 -167 días). No había datos disponibles alrededor del momento de la recaída.

30 Por tanto, en la mayoría de los pacientes con un episodio de recaída *de novo*, la actividad de ADAMTS13 se recuperó hasta niveles por encima del 10% cerca de la detención del tratamiento, lo que sugiere una resolución del presente episodio de TTP; los valores eran bajos de nuevo (<10%) en el momento de la recaída, lo que indica un nuevo episodio de TTP

35 (v) *Conclusión*

40 Los datos respaldan el uso de la actividad de ADAMTS13 como marcador predictivo para recurrencias de TTP y su potencial para decisiones de tratamiento.

45 La actividad de ADAMTS13 es capaz de predecir recaídas que ocurren poco después de detener el tratamiento de caplacizumab.

50 Estas recaídas se consideran recaídas del presente episodio de TTP (actividad patológica no resuelta, basándose en una actividad de ADAMTS13 continuamente baja).

55 Un periodo de tratamiento de 30 días (posterior al PE) con caplacizumab ha demostrado un impacto significativo sobre el número de exacerbaciones.

55 La extensión del periodo de tratamiento de caplacizumab para aquellos pacientes que corren el riesgo de recaída (es decir con actividad patológica subyacente basándose en la actividad de ADAMTS13) mantendrá los efectos protectores de caplacizumab hasta que la enfermedad subyacente se trate y resuelta adecuadamente.

60 A la inversa, el tratamiento precautorio con caplacizumab reducirá el riesgo de un episodio agudo de TTP.

60 7.5.9 Resultados del estudio: marcadores de daño a los órganos

65 Las oclusiones microvasculares características en pacientes con TTP pueden conducir a isquemia de órganos por todo el cuerpo, incluyendo el cerebro, corazón y, en menor medida, los riñones.

65 Se ha notificado infarto de miocardio agudo (AMI) como una complicación temprana de TTP basándose tanto en el diagnóstico clínico de AMI (Patschan *et al.* 2006 *Nephrology, dialysis, transplantation* 21: p.1549-54) como en hallazgos de autopsia (Hosler *et al.* *Archives of pathology & laboratory medicine*, 2003. 127(7): p.834-9). Basándose

en altas elevaciones de lactato deshidrogenasa sérica (LDH) y troponina I (TnI) se demostró que los pacientes con TTP sospechada clínicamente corren un mayor riesgo de desarrollar AMI. Los niveles de troponina T elevados se vincularon con mortalidad y morbilidad aguda. Los sujetos que murieron tenían niveles de troponina T mayores, mientras que no hubo muertes en el grupo de niveles de troponina T normales. La histología confirmó trombosis microvascular miocárdica extendida en los sujetos que murieron (Hughes *et al.* 2009 J.Thromb.Haemost. 7: p.529-536). Estos resultados sugieren que podría esperarse que reducir más rápidamente una isquemia cardiaca microvascular adicional, por ejemplo, medida mediante troponina, del presente episodio de TTP tuviera un beneficio sobre el desenlace clínico, por ejemplo, reduce el riesgo de daño a los órganos, tal como cerebro, corazón y riñones. Otros informes retrospectivos encontraron resultados similares en la implicación cardiaca aguda y a largo plazo en pacientes con TTP, incluyendo infartos de miocardio (Wahla *et al.* 2008 Eur. J. Haem. 81: p.311-6) y otros acontecimientos cardíacos como infartos, arritmias, shock cardiogénico y muerte cardíaca repentina (Hawkins *et al.* 2008 Transfusion 48: p.382-92).

En un estudio retrospectivo, los niveles altos de LDH en la presentación se vincularon con un peor desenlace a largo plazo (mortalidad), que refleja una implicación de múltiples órganos grave (Benhamou, *et al.* 2012 Haematologica 97: p.1181-6). Por tanto, una rápida normalización de LDH como marcador para hemólisis y daño a los órganos isquémica también puede ser beneficiosa para un desenlace clínico a largo plazo y reduce el riesgo de daño a los órganos.

Dado que el daño isquémico puede dar como resultado tanto complicaciones agudas como desenlaces a largo plazo peores, se realizó un análisis sobre biomarcadores de daño a los órganos específicos y clínicamente relevantes de LDH, troponina T o I y creatinina. Se consideró que la troponina cardíaca (I o T) es un marcador específico para daño miocárdico, la creatinina es un biomarcador para la función renal y la LDH es un marcador de hemólisis e incluso predominantemente un marcador de daño a los órganos en esta enfermedad. En pacientes con TTP, altos niveles iniciales o una normalización más lenta en algunos de estos biomarcadores se han vinculado con peores desenlaces clínicos (por ejemplo, mortalidad, enfermedad que no responde al tratamiento).

Los datos sugieren que se espera que la isquemia de tejido microvascular que se acorta más rápidamente medida mediante daño a los órganos biomarcadores tenga un beneficio sobre el desenlace clínico, por ejemplo, un riesgo reducido de daño a los órganos. Sin embargo, debe indicarse que los resultados de marcador de daño a los órganos están en cierta medida confundidos por el efecto diluyente del intercambio plasmático diario (en el grupo tanto de pacientes como de placebo).

(i) *Lactato deshidrogenasa*

La LDH es un marcador importante de isquemia tisular no específica. Se calcularon las proporciones basándose en el número de sujetos en la población ITT. El número y la proporción de sujetos en la población ITT con valores para LDH  $\leq 2 \times$  ULN se resumió mediante el tratamiento planeado para los primeros 5 días del estudio. Se proporciona un resumen de los resultados en la tabla 9. La relación de LDH/ULN media por día de estudio se proporciona en la tabla 10.

El día 1, 11 sujetos (30,6%) en el grupo de tratamiento de ALX-0081 y 9 sujetos (23,1%) en el grupo de placebo tenían valores de LDH  $\leq 2 \times$  ULN. La proporción de sujetos siguió siendo más alta en el grupo de tratamiento de ALX-0081 en comparación con el grupo de placebo los días 2 (28 sujetos [77,8%] y 20 sujetos [51,3%, respectivamente] y 3 (33 sujetos [91,7%] y 29 sujetos [74,4%, respectivamente]). Los días 4 y 5, la proporción de sujetos con valores para LDH  $\leq 2 \times$  ULN era similar en ambos grupos.

Las relaciones medias de LDH/ULN eran comparables entre los grupos de tratamiento de ALX 0081 y placebo el día 1 (3,93 y 3,98, respectivamente) y mayores en el grupo de placebo en todos los demás puntos de tiempo incluidos.

**Tabla 9: Número y proporción de sujetos con valores de lactato deshidrogenasa  $\leq 2 \times$  el límite superior del normal por día del estudio (población de intención de tratar)**

Día relativo del análisis	Placebo	ALX 0081
	N=36	N=39
	n (%)	n (%)
1	11 (30,6)	9 (23,1)
2	28 (77,8)	20 (51,3)
3	33 (91,7)	29 (74,4)
4	34 (94,4)	34 (87,2)
5	34 (94,4)	34 (87,2)

N=número de sujetos en la población de interés; n=número de sujetos con LDH  $\leq 2 \times$  el ULN; ULN=límite superior del intervalo normal

**Tabla 10: Relación de lactato deshidrogenasa/límite superior del normal media por día del estudio (población de intención de tratar)**

Día relativo del análisis	n	ALX 0081	Placebo
		N=36	N= 39
1	n	34	35
	Media	3,93	3,98
2	n	35	36
	Media	1,70	2,03
3	n	35	36
	Media	1,05	1,44
4	n	35	36
	Media	0,90	1,25
5	n	35	36
	Media	0,88	1,14

N=número de sujetos en la población de interés; n=número de sujetos con datos disponibles

- 5 Se llevó a cabo un análisis de Kaplan-Meier para comparar el tiempo hasta la normalización de valores de LDH según el tratamiento planeado. Se proporcionan curvas de tiempo hasta la normalización de LDH en la Figura 2.
- 10 A partir del análisis de Kaplan-Meier se sugiere una vuelta más rápida a niveles normales de LDH para sujetos que reciben ALX 0081 en comparación con sujetos que reciben placebo.
- 15 (ii) *Troponina*
- 20 Se llevó a cabo un análisis de Kaplan-Meier para comparar el tiempo hasta la normalización de valores de troponina T o troponina I según el tratamiento planeado. Tal como se indicó anteriormente, tanto TnT como TnI son biomarcadores relevantes de daño de células cardíacas. Se proporcionan curvas de tiempo hasta la normalización troponina T o I en la Figura 3.
- 25 A partir del análisis de Kaplan-Meier se sugiere una vuelta más rápida a niveles normales de troponina T o I para sujetos que reciben ALX 0081 en comparación con sujetos que reciben placebo.
- 30 (iii) *Creatinina*
- 25 También en este caso se llevó a cabo un análisis de Kaplan-Meier para comparar los valores de tiempo hasta la normalización de creatinina según el tratamiento planeado. Se proporcionan curvas de tiempo hasta la normalización de creatinina en la Figura 4.
- 35 Para la creatinina se sugiere una vuelta más rápida a niveles normales para sujetos que reciben ALX 0081 en comparación con sujetos que reciben placebo mediante el análisis de Kaplan-Meier.
- 40 (iv) *Discusión*
- 35 Dada la fisiopatología de la TTP adquirida según la cual cadenas de ULvWF consumen plaquetas en la formación de microtrombos, se razonó que la recuperación de recuentos de plaquetas es una medida indirecta de prevención de la formación de microtrombos adicional. La morbilidad y la mortalidad aguda asociadas con TTP adquirida es un resultado de estos microtrombos.
- 40 De hecho, este razonamiento está respaldado por los marcadores de daño a los órganos. En particular, los resultados indican que los marcadores de daño a los órganos troponina I y T, LDH y creatinina vuelven más rápido a niveles normales en sujetos que reciben ALX 0081 que en sujetos que reciben placebo.
- 40 Por tanto, los resultados sugieren que una tasa de normalización más rápida de estos marcadores de daño a los órganos está ligada a un mejor desenlace clínico, es decir un riesgo reducido de y menos daño a los órganos debido a isquemia de órganos provocada por microtrombos.

### 7.5.10 Fundamento de la selección de dosis

La farmacología de caplacizumab es doble. El caplacizumab afecta a la funcionalidad de vWF, conduciendo a la incapacidad del vWF a unirse a plaquetas. También afecta a la disposición de vWF, conduciendo a reducciones transitorias de los niveles de vWF:Ag totales durante el tratamiento.

Se usó un modelo de PK/PD para evaluar la exposición esperada y el efecto correspondiente sobre los niveles de vWF total, libre y complejado para diferentes escenarios de dosificación en una población de pacientes con TTP virtual, a través de simulaciones. Se creó una población virtual de pacientes con TTP (n=500), con características basadas en la población el estudio TITAN muestreando las distribuciones truncadas de pesos corporales (media 81,9 kg ±22,6 SD, intervalo 47,5-150 kg) y vWF de nivel inicial estimado según el modelo en la población TTP del ensayo TITAN así como la distribución de géneros (H:M 40:60).

Los escenarios simulados incluían un procedimiento de PE diario de 8 días inicial con una administración diaria s.c. concomitante de caplacizumab 1 h tras la terminación de cada PE a dosis de 2,5, 5, 10, 20 mg (periodo 1). Posteriormente, se asumió que el caplacizumab se administraba a los mismos niveles/al mismo régimen de dosis durante 30 días adicionales en ausencia de cualquier otro procedimiento de PE (periodo 2).

El % de cambio del vWF libre con respecto al nivel inicial aumenta con la dosis, pero menos de manera proporcional a la dosis. Se predice una gran variabilidad entre individuos, relacionada principalmente con la gran variabilidad de expresión de diana (vWF) al entrar al estudio, a todos los niveles de dosis. Las dos dosis menores (2,5 y 5 mg una vez al día) conducen a una inhibición de diana inferior a la óptima, mientras que una dosis diaria mayor de caplacizumab que la sometida a prueba en el estudio TITAN (20 mg) no beneficia sustancialmente a la población TTP simulada global. La Figura 5 muestra el % de disminución predicho según el modelo con respecto al nivel inicial de niveles de vWF libre:Ag al final del periodo 2 en función del nivel de dosis, incluyendo pacientes tratados con placebo.

Los perfiles plasmáticos simulados de los niveles de fármaco, vWF libre, complejo y total para una dosis una vez al día de 10 mg se ilustran en la Figura 6.

A continuación del cambio en los niveles del vWF libre como marcador para la neutralización de diana se evaluó el cambio en los niveles de vWF total como marcador del riesgo de sangrado. Se usó un umbral de 0,4 IU/ml (o 16 nM), ligado a los niveles de vWF más altos observados en la enfermedad de von Willebrand de tipo I. Se considera que a estos niveles de vWF, siguen estando disponibles niveles suficientes de FVIII. El panel D muestra que los niveles de vWF total para la dosis propuesta de 10 mg una vez al día seguirían estando por encima de este umbral considerado para acontecimientos de riesgo de sangrado.

Basándose en los resultado del estudio *in vitro* previo y los niveles predichos según el modelo de biomarcadores para la eficacia (vWF libre) y la seguridad (vWF total), el régimen de dosificación usado en el presente documento (5-40 mg, preferiblemente 10 mg al día) se considera adecuado para alcanzar la supresión deseada de la capacidad de unión a plaquetas de (UL)vWF en pacientes con TTP, mientras que los acontecimientos de sangrado son mínimos y al menos controlables.

### 7.6 Conclusión

Hay una gran variabilidad entre individuos de la expresión de la diana (vWF) al entrar al estudio. No obstante, las dosis usadas conducen a una inhibición de la diana óptima, beneficiando sustancialmente a la población TTP tratada global.

Por tanto, ALX 0081 representa un enfoque novedoso para el tratamiento de TTP y proporciona un beneficio significativo en términos de eficacia, seguridad y calidad de vida para pacientes con TTP.

La prueba de concepto de caplacizumab se demostró con una reducción estadísticamente significativa y clínicamente significativa del tiempo hasta la respuesta plaquetaria confirmada. La mediana de los días hasta la respuesta plaquetaria confirmada era de 3 días para caplacizumab frente a 4,9 días para el placebo. HR (placebo con respecto a caplacizumab) de 2,2 con un IC del 95% (1,28, 3,78),  $p = 0,013$ .

Hubo una reducción en el número de exacerbaciones hasta 3 en la rama de caplacizumab desde 11 en la rama de placebo. Esto subraya el efecto protector del tratamiento de caplacizumab.

No hubo muertes en la rama de caplacizumab en comparación con 2 muertes en la rama de placebo.

Los AE y SAE son consistentes con un estado grave, potencialmente mortal. Casi dos veces más acontecimientos de sangrado en la rama de caplacizumab (66 acontecimientos) frente a la rama de placebo (35 acontecimientos), aunque solo 5 SAE en 2 sujetos para la rama de caplacizumab frente a 2 SAE en 2 sujetos para la rama de placebo.

En global, la evaluación de beneficio-riesgo para pacientes con TTP adquirida es muy positiva.

A través de su inhibición de la agregación plaquetaria mediada por ULvWF y el efecto antitrombótico resultante, los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, permiten un control más rápido de ataques agudos de TTP cuando se usan en combinación con PE y transfusión. Esto reduce claramente el riesgo de isquemia de los órganos. La normalización más rápida del recuento de plaquetas también reduce el riesgo de complicaciones hemorrágicas. Su uso también da como resultado desenlaces mejorados en pacientes con escasa respuesta, incluyendo aquellos con TTP secundaria en los que la mortalidad por la enfermedad sigue siendo alta.

Además, los polipéptidos usados en la invención, tal como ALX 0081, son valiosos en la prevención de recaídas tras la recuperación de un episodio agudo.

10 Tabla A-1: Ejemplos de polipéptidos que comprenden ISVD y CDR frente a vWF

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
12A02H1-3a-12A02H1 (ALX 0081)	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA GVRAEDGRVRLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAASRTGGSTYYPDSVE RFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEY FWGQGTQVTVSS
12A02-3a-12A02	2	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLV AAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRLPSEYTFWGQGTQVTVSSAAEVQLVESGGGLVQAG GALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPDSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSE YTFWGQGTQVTVSS
12A02-GS9-12A02	3	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLV AAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLVAAISRTGGST YYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGR VRTLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A02-GS30-12A02	4	QVKLEESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDLV AAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNNLKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRLPSEYTFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGG GGSGGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMG WFRQAPGKERDLVAAISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMN NLKPEGTAVYYCAAAGVRAEDGRVRLPSEYTFWGQGTQVTVSS
12A05-3a-12A05	5	

# ES 2 843 642 T3

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
		AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLK QGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSAAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLA SGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDGP KNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12A05-GS9-12A05	6	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLK QGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGG SLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVATITSGGSTNYADPVKGRF TISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLKQGSYGYRFNDYWGQGT QVTVSS
12A05-GS30-12A05	7	AVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGKQRELVA TITSGGSTNYADPVKGRFTISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYANLK QGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGGGG SGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRIFSIGAMGMYRQAPGK QRELVATITSGGSTNYADPVKGRFTISRDGPKNTVYLQMNSLKPEDTAVYY CYANLKQGSYGYRFNDYWGQGTQVTVSS
12B06-3a-12B06	8	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNAALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPESEYNFWGQGTQVTVSSAAEVQLVESGGGLVQAG GALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGSTYYARSV EGRFTISRDNAKRMVYLQMNAALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPS EYNFWGQGTQVTVSS
12B06-GS9-12B06	9	QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNAALKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPESEYNFWGQGTQVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG GLVQAGGALRLSCAASGRFTFSYNPMGWFRQAPGKERDVVAAISRTGGST YYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNAALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGR VRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12B06-GS30-12B06	10	

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
		QVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKERDVA AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNLAKPEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQTVSSGGGGSGGGSGGGSGG GGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQAGGALRLSCAASGRTFSYNPMG WFRQAPGKERDVAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQM ALKPEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQTVSS
12A02H4-3a-12A02H4	11	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAG VRAEDGRVRTLPSEYTFWQGTQTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTYYPDSVEGRF TISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSEYTFW GQGTQTVSS
12B06H2-3a-12B06H2	12	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPSEYNFWGQGTQTVSSAAAEVQLVESGGGLVQPG GSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVE GRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPSE YNFWGQGTQTVSS
12A02H1-GS9-12A02H1	13	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA GVRAEDGRVRTLPSEYTFWQGTQTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG LVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTYY PDSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVR TLPSEYTFWQGTQTVSS
12A02H4-GS9-12A02H4	14	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAG VRAEDGRVRTLPSEYTFWQGTQTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGG VQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVAISRTGGSTYY PDSVEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVR TLPSEYTFWQGTQTVSS
12B06H2-GS9-12B06H2	15	

# ES 2 843 642 T3

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPESEYNFWGQGTQVTVSSGGGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVVAAISRTGGST YYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGR VRTLPSEYNFWGQGTQVTVSS
12A02H1-GS30-12A02H1	16	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA GVRAEDGRVRTLPESEYTFWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGG GSGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGW FRQAPGKGRELVAISRTGGSTYYPDSEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSL RAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPESEYTFWGQGTQVTVSS
12A02H4-GS30-12A02H4	17	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRAEDTAVYYCAAAG VRAEDGRVRTLPESEYTFWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGGGG SGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGW FRQAPGKGRELVAISRTGGSTYYPDSEGRFTISRDNAKRSVYLQMNSLRA EDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPESEYTFWGQGTQVTVSS
12B06H2-GS30-12B06H2	18	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGREVV AAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA AGVRAEDGRVRTLPESEYNFWGQGTQVTVSSGGGGGGGGGGGGGGGG GGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMG WFRQAPGKGREVVAAISRTGGSTYYARSVEGRFTISRDNAKRMVYLQM NSLRAEDTAVYYCAAAGVRAEDGRVRTLPESEYNFWGQGTQVTVSS
12A02H1	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSYNPMGWFRQAPGKGRELVA AISRTGGSTYYPDSEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA GVRAEDGRVRTLPESEYTFWGQGTQVTVSS
12A02H1 CDR1	21	YNPMG
12A02H1 CDR2	22	AISRTGGSTYYPDSEGRFTISRDNAKRMVYLQMNSLRAEDTAVYYCAA
12A02H1 CDR3	23	AGVRAEDGRVRTLPESEYTF

# ES 2 843 642 T3

Tabla A-2

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
vWF humano	20	MIPARFAGVLLALALILPGTLCAEGTRGRSSTARCSLFGSDFVNTFDGSMYSFAGYCSYLLAG GCQKRSFSIIGDFQNGKRVSLSVYLGEFFDIHLFVNGTVTQGDQRVSMPYASKGLYLETEAG YYKLSGEAYGFVARIDGSGNFQVLLSDRYFNKTCGLCGNFIQAEDDFMTQEGTLTSDPYDF ANSWALSSGEQWCERASPPSSCNISSEGEMQKGLWEQCQLLKSTSVCARHPLDPEPFV ALCEKTLCECAGGLECACPALLEYARTCAQEGMVLYGWTDHSACSPVCPAGMEYRQCVP CARTCQLHINEMCQERCVDGSCPEGQLLDEGLCVESTECPCVHSGKRYPPGTSLSRDCN TCICRNSQWICSNEECPGECLVTGQSHFKSFNRYFTFSGICQYLLARDCQDHFSIVIETVQ CADDRDAVCTRSVTVRPLGLHNSLVKLKHAGVAMDGQDIQLPLKGDLRIQHTVTASVRL SYGEDLQMDWDGRGRLLVKLSPVYAGKTCGLCGNYNGNQGDDFLTPSGLAEPRVEDFGN AWKLHGDCQDLQKQHSDPCALNPRMTRFSEEACAVLTSPTFEACHRAVSPLPYLRNCYD VCSCSDGRECLCGALASYAACAGRGVRVAWREPGRCLENCPKGQVYLQCGTPCNLTCRS LSYPDEECNEACLEGCFCPGGLYMDERGDCVPKAQCPYYDGEIFQPEDIFSDHHTMCYCE DGFMHCTMSGVPGSLLPAVLSSPLSHRSKRSLSRPPMVKLVCPADNLRAEGLECTKTCQ NYDLECMSMGCVSGCLCPGMVRHENRCVALERCPCFHQKEYAPGETVKIGCNTCVCR DRKWNCNDHVCDATCSTIGMAHYLTDFGLKYLFPGEQVYLVQDYCGSNPGTFRILVGNK GCHPSVKCKRVTILVEGGEIELFDGEVNVKRPMDETHFEVVESGRYIILLGKALSVVWD RHLSISVVLKQTQEKVCGLCGNFDGIQNNDLTSSNLQVEEDPVDFGNWKVSSQCADTRK VPLDSSPATCHNNIMKQTMVDSSCRILTSDFQDCNKLVDPEPYLDVCIYDTCSCESIGDCA CFCDTIAAYAHVCAQHGKVWTWRATLCPQSCEERNLRENGYECEWRYNSCAPACQVTC QHPEPLACPVCQVEGCHAHCPPGKILDELLQTCVDPEDCPVCEAGRRFASGKKVTLNPSD PEHCQICHCDVNVNLTCEACQEPGGLVPPTDAPSPPTLYVEDISEPPLHDFYCSRLLDVFL DGSSRLSEAEEFVLKAFVVDMMERLISRQKWVRVAVVEYHDGSHAYIGLKDRKRPSLRRIA SQVKYAGSQVASTSEVLKYTLFQIFSKIDRPEASRIALLMASQEPQRMSRNFVRYVQGLKKK KVIVIPVGIGPHANLKQIRLIEKQAPENKAFVLSVDELEQQRDEIVSYLCDLAPEAPPPTLPP HMAQVTVGPGLRNSMVLDVAFVLEGSDKIGEADFNRSKEFMEEVIQRMDVGQDSIHVT LQSYMVTVEYPFSEAQSKEGDILQRVREIRYQGGNRTNTGLALRYLSDHSFLVSQGDREQA PNLVYMTGTPNpasdeikrlpgdiqvvpigvgpnanvqelerigwpnapiqliqdfetlpreap DLVLQRCCSGEGLQIPTLSPAPDCSQPLDVILLDGSSFPASYFDEMKSFAKAFISKANIGPR LTQVSVLQYGSITTIDVPWNVVPEKAHLLSLVDVMQREGGPSQIGDALGFAVRLTSEMHG ARPGASKAVVILVTDVSVDAAAARSNRVTVFPIGIGDRYAAQLRILAGPAGDSNV

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
		VKLQRIEDLPTMVTLGNSFLHKLCSGFVRICMDEDGNEKRPGDVWTLPDQCHTVTCQPDG QTLLKSHRVNCDRGLRPSCNSQSPVKVEETCGCRWTCPCVCTGSSTRHIVTFDGQNFKLT GSCSYVLFQNKEQDLEVLHNGACSPGARQGCMKSIEVKHSALSVELHSDMEVTVNGLVS VPYVGGNMEVNVGAIMHEVRFNHLGHIFTFTPQNNEFQLQLSPKTFASKTYGLCGICDEN GANDFMLRDGTVTTDWKTLVQEWTVQRPGQTCQPILEEQCLVPDSSHCVQLLPLFAECH KVLAPATFYAICQQDSCHQEQQVCEVIASYAHLCRTNGVCVDWRTPDFCAMSCPPSLVYNH CEHGCPRHCDGNVSSCGDHPSEGCFCPPDKVMLEGSCVPEEACTQCIGEDGVQHQFLEA WVPDHQPCQICTLSGRKVNCTTQPCPTAKAPTCGLCEVARLRQNADQCCPEYECVCDPV SCDLPPVPHCERGLQPTLTNPGECRPNFTACRKEECKRVSPSCPPHRLPTLRKTQCCDEY ECACNCVNSTVSCPLGYLASTATNDCGCTTCLPDKVCVHRSTIYPVGQFWEEGCDVCTC TDMEDAVMGLRVAQCSQKPCEDSCRSGFTYVLHEGECCGRCLPSACEVTGSPRQDSQSS WKSVGSQWASPENPCLINECVRVKEEVFIQQRNVSCPQLEVPVCPSGFQLSCKTSACCPSC RCERMEACMLNGTVIGPGKTVMIDVCTTCRCMVQVGVISGFKLECRKTTCNPCPLGYKEE NNTGECCGRCLPTACTIQLRGQIMTLKRDETLQDGCDTHFCKVNERGEYFWEKRVTGCP PFDEHKCLAEGGKIMKIPGTCCDTCEEPECNDITARLQYVKVGSKSEVEVDIHYCQGKAS KAMYSIDINDVQDQCSCCSPTRTEPMQVALHCTNGSVVYHEVNAMECKCSPRKCSK

## LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Ablynx N.V.  
<120> Métodos de tratamiento de TTP con variables únicos de inmunoglobulina  
10 <130> P105184NL00  
<140> NL 2013007  
<141> 16/06/2014  
<160> 23  
15 <170> PatentIn versión 3.5  
<210> 1  
<211> 259  
20 <212> PRT  
<213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> 12A02H1-3a-12A02H1  
25 <400> 1

ES 2 843 642 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg  
165 170 175

Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

5 <210> 2  
<211> 259  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

ES 2 843 642 T3

<220>  
<223> 12A02-3a-12A02

5 <400> 2

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
165 170 175

Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro  
180 185 190

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

ES 2 843 642 T3

<210> 3  
<211> 265  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5

<220>  
<223> 12A02-GS9-12A02

<400> 3

10

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

ES 2 843 642 T3

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys  
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 4

<211> 286

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12A02-GS30--12A02

10 <400> 4

ES 2 843 642 T3

Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser Glu Val  
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu  
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Leu Val Ala Ala  
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly  
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Gly Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
275 280 285

5 <210> 5  
<211> 247

ES 2 843 642 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> 12A05-3a-12A05

<400> 5

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly  
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr  
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Val Gln  
115 120 125

Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg  
130 135 140

10 Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly  
145 150 155 160

Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile  
165 170 175

Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe  
180 185 190

Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn  
195 200 205

Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu  
210 215 220

Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
225 230 235 240

Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
245

<210> 6

ES 2 843 642 T3

<211> 253  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> 12A05-GS9-12A05

<400> 6

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly  
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr  
85 90 95

10 Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp

ES 2 843 642 T3

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe  
145 150 155 160

Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg  
165 170 175

Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp  
180 185 190

Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr  
195 200 205

Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr  
210 215 220

Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn  
225 230 235 240

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 7

<211> 274

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12A05-GS30-12A05

10 <400> 7

Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly  
20 25 30

Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys  
50 55 60

ES 2 843 642 T3

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr  
85 90 95

Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
130 135 140

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly  
145 150 155 160

Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Leu Ala  
165 170 175

Ser Gly Arg Ile Phe Ser Ile Gly Ala Met Gly Met Tyr Arg Gln Ala  
180 185 190

Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Thr Ser Gly Gly Ser  
195 200 205

Thr Asn Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp  
210 215 220

Gly Pro Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu  
225 230 235 240

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala Asn Leu Lys Gln Gly Ser Tyr  
245 250 255

Gly Tyr Arg Phe Asn Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
260 265 270

Ser Ser

<210> 8

<211> 259

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B06-3a-12B06

10 <400> 8

ES 2 843 642 T3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
130 135 140

Ala Gly Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg  
165 170 175

Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val  
210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
245 250 255

Val Ser Ser

5 <210> 9  
<211> 265  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>

ES 2 843 642 T3

<223> 12B06-GS9-12B06

<400> 9

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Ala Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

5 Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys  
210 215 220

Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 10

ES 2 843 642 T3

<211> 286  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> 12B06-GS30-12B06

<400> 10

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

10 Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

ES 2 843 642 T3

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Val  
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly Ala Leu  
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Val Val Ala Ala  
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly  
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Met Asn Ala Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
275 280 285

<210> 11

<211> 259

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12A02H4-3a-12A02H4

10 <400> 11

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val

# ES 2 843 642 T3

	35	40	45	
	Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val			
	50	55	60	
	Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr			
	65	70	75	80
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95	
	Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro			
	100	105	110	
	Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser			
	115	120	125	
	Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln			
	130	135	140	
	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe			
	145	150	155	160
	Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg			
	165	170	175	
	Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro			
	180	185	190	
	Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg			
	195	200	205	
	Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val			
	210	215	220	
	Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg			
	225	230	235	240
	Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr			
	245	250	255	
	Val Ser Ser			
	<210> 12			
	<211> 259			
5	<212> PRT			
	<213> Secuencia artificial			
	<220>			
	<223> 12B06H2-3a-12B06H2			
10	<400> 12			

# ES 2 843 642 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

Ala Ala Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe  
 145 150 155 160

Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg  
 165 170 175

Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala  
 180 185 190

Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg  
 195 200 205

Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 210 215 220

Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg  
 225 230 235 240

Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr  
 245 250 255

Val Ser Ser

5 <210> 13  
 <211> 265  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 843 642 T3

<220>  
<223> 12A02H1-GS9-12A02H1

5 <400> 13

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

ES 2 843 642 T3

<210> 14  
<211> 265  
<212> PRT  
5 <213> Secuencia artificial  
  
<220>  
<223> 12A02H4-GS9-12A02H4  
  
10 <400> 14  
  
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn  
20 25 30  
  
Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
35 40 45  
  
Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60  
  
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr  
65 70 75 80  
  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
  
Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

ES 2 843 642 T3

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 15

<211> 265

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B06H2-GS9-12B06H2

10 <400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val  
35 40 45

ES 2 843 642 T3

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser  
130 135 140

Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala  
145 150 155 160

Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln  
165 170 175

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly  
180 185 190

Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser  
195 200 205

Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg  
210 215 220

Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala  
225 230 235 240

Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly  
245 250 255

Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
260 265

<210> 16

<211> 286

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12A02H1-GS30-12A02H1

10 <400> 16

# ES 2 843 642 T3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
 130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Glu Val  
 145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
 165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
 180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala  
 195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly  
 210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
 225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
 245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
 260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 275 280 285

ES 2 843 642 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> 12A02H4-GS30-12A02H4

<400> 17

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val  
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu

10

ES 2 843 642 T3

165

170

175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Ala  
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu Gly  
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Ser Val Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
260 265 270

Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
275 280 285

<210> 18

<211> 286

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12B06H2-GS30-12B06H2

10 <400> 18

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val  
35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val  
50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95

ES 2 843 642 T3

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
100 105 110

Ser Glu Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
115 120 125

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly  
130 135 140

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Val  
145 150 155 160

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu  
165 170 175

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Tyr Asn Pro Met  
180 185 190

Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Val Val Ala Ala  
195 200 205

Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Arg Ser Val Glu Gly  
210 215 220

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr Leu Gln  
225 230 235 240

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala  
245 250 255

Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
260 265 270

Tyr Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
275 280 285

<210> 19

<211> 128

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> 12A02H1

10 <400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
1 5 10 15

# ES 2 843 642 T3

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val  
 35 40 45

Ala Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val  
 50 55 60

Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Arg Met Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro  
 100 105 110

Ser Glu Tyr Thr Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 20

<211> 2804

5 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 20

Met Ile Pro Ala Arg Phe Ala Gly Val Leu Leu Ala Leu Ala Leu Ile  
 1 5 10 15

Leu Pro Gly Thr Leu Cys Ala Glu Gly Thr Arg Gly Arg Ser Ser Thr  
 20 25 30

Ala Arg Cys Ser Leu Phe Gly Ser Asp Phe Val Asn Thr Phe Asp Gly  
 35 40 45

Ser Met Tyr Ser Phe Ala Gly Tyr Cys Ser Tyr Leu Leu Ala Gly Gly  
 50 55 60

Cys Gln Lys Arg Ser Phe Ser Ile Ile Gly Asp Phe Gln Asn Gly Lys  
 65 70 75 80

Arg Val Ser Leu Ser Val Tyr Leu Gly Glu Phe Phe Asp Ile His Leu  
 85 90 95

10 Phe Val Asn Gly Thr Val Thr Gln Gly Asp Gln Arg Val Ser Met Pro  
 100 105 110

ES 2 843 642 T3

Tyr Ala Ser Lys Gly Leu Tyr Leu Glu Thr Glu Ala Gly Tyr Tyr Lys  
115 120 125

Leu Ser Gly Glu Ala Tyr Gly Phe Val Ala Arg Ile Asp Gly Ser Gly  
130 135 140

Asn Phe Gln Val Leu Leu Ser Asp Arg Tyr Phe Asn Lys Thr Cys Gly  
145 150 155 160

Leu Cys Gly Asn Phe Asn Ile Phe Ala Glu Asp Asp Phe Met Thr Gln  
165 170 175

Glu Gly Thr Leu Thr Ser Asp Pro Tyr Asp Phe Ala Asn Ser Trp Ala  
180 185 190

Leu Ser Ser Gly Glu Gln Trp Cys Glu Arg Ala Ser Pro Pro Ser Ser  
195 200 205

Ser Cys Asn Ile Ser Ser Gly Glu Met Gln Lys Gly Leu Trp Glu Gln  
210 215 220

Cys Gln Leu Leu Lys Ser Thr Ser Val Phe Ala Arg Cys His Pro Leu  
225 230 235 240

Val Asp Pro Glu Pro Phe Val Ala Leu Cys Glu Lys Thr Leu Cys Glu  
245 250 255

Cys Ala Gly Gly Leu Glu Cys Ala Cys Pro Ala Leu Leu Glu Tyr Ala  
260 265 270

Arg Thr Cys Ala Gln Glu Gly Met Val Leu Tyr Gly Trp Thr Asp His  
275 280 285

Ser Ala Cys Ser Pro Val Cys Pro Ala Gly Met Glu Tyr Arg Gln Cys  
290 295 300

Val Ser Pro Cys Ala Arg Thr Cys Gln Ser Leu His Ile Asn Glu Met  
305 310 315 320

Cys Gln Glu Arg Cys Val Asp Gly Cys Ser Cys Pro Glu Gly Gln Leu  
325 330 335

Leu Asp Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Thr Glu Cys Pro Cys Val His  
340 345 350

Ser Gly Lys Arg Tyr Pro Pro Gly Thr Ser Leu Ser Arg Asp Cys Asn  
355 360 365

ES 2 843 642 T3

Thr Cys Ile Cys Arg Asn Ser Gln Trp Ile Cys Ser Asn Glu Glu Cys  
370 375 380

Pro Gly Glu Cys Leu Val Thr Gly Gln Ser His Phe Lys Ser Phe Asp  
385 390 395 400

Asn Arg Tyr Phe Thr Phe Ser Gly Ile Cys Gln Tyr Leu Leu Ala Arg  
405 410 415

Asp Cys Gln Asp His Ser Phe Ser Ile Val Ile Glu Thr Val Gln Cys  
420 425 430

Ala Asp Asp Arg Asp Ala Val Cys Thr Arg Ser Val Thr Val Arg Leu  
435 440 445

Pro Gly Leu His Asn Ser Leu Val Lys Leu Lys His Gly Ala Gly Val  
450 455 460

Ala Met Asp Gly Gln Asp Ile Gln Leu Pro Leu Leu Lys Gly Asp Leu  
465 470 475 480

Arg Ile Gln His Thr Val Thr Ala Ser Val Arg Leu Ser Tyr Gly Glu  
485 490 495

Asp Leu Gln Met Asp Trp Asp Gly Arg Gly Arg Leu Leu Val Lys Leu  
500 505 510

Ser Pro Val Tyr Ala Gly Lys Thr Cys Gly Leu Cys Gly Asn Tyr Asn  
515 520 525

Gly Asn Gln Gly Asp Asp Phe Leu Thr Pro Ser Gly Leu Ala Glu Pro  
530 535 540

Arg Val Glu Asp Phe Gly Asn Ala Trp Lys Leu His Gly Asp Cys Gln  
545 550 555 560

Asp Leu Gln Lys Gln His Ser Asp Pro Cys Ala Leu Asn Pro Arg Met  
565 570 575

Thr Arg Phe Ser Glu Glu Ala Cys Ala Val Leu Thr Ser Pro Thr Phe  
580 585 590

Glu Ala Cys His Arg Ala Val Ser Pro Leu Pro Tyr Leu Arg Asn Cys  
595 600 605

Arg Tyr Asp Val Cys Ser Cys Ser Asp Gly Arg Glu Cys Leu Cys Gly

ES 2 843 642 T3

610

615

620

Ala Leu Ala Ser Tyr Ala Ala Ala Cys Ala Gly Arg Gly Val Arg Val  
625 630 635 640

Ala Trp Arg Glu Pro Gly Arg Cys Glu Leu Asn Cys Pro Lys Gly Gln  
645 650 655

Val Tyr Leu Gln Cys Gly Thr Pro Cys Asn Leu Thr Cys Arg Ser Leu  
660 665 670

Ser Tyr Pro Asp Glu Glu Cys Asn Glu Ala Cys Leu Glu Gly Cys Phe  
675 680 685

Cys Pro Pro Gly Leu Tyr Met Asp Glu Arg Gly Asp Cys Val Pro Lys  
690 695 700

Ala Gln Cys Pro Cys Tyr Tyr Asp Gly Glu Ile Phe Gln Pro Glu Asp  
705 710 715 720

Ile Phe Ser Asp His His Thr Met Cys Tyr Cys Glu Asp Gly Phe Met  
725 730 735

His Cys Thr Met Ser Gly Val Pro Gly Ser Leu Leu Pro Asp Ala Val  
740 745 750

Leu Ser Ser Pro Leu Ser His Arg Ser Lys Arg Ser Leu Ser Cys Arg  
755 760 765

Pro Pro Met Val Lys Leu Val Cys Pro Ala Asp Asn Leu Arg Ala Glu  
770 775 780

Gly Leu Glu Cys Thr Lys Thr Cys Gln Asn Tyr Asp Leu Glu Cys Met  
785 790 795 800

Ser Met Gly Cys Val Ser Gly Cys Leu Cys Pro Pro Gly Met Val Arg  
805 810 815

His Glu Asn Arg Cys Val Ala Leu Glu Arg Cys Pro Cys Phe His Gln  
820 825 830

Gly Lys Glu Tyr Ala Pro Gly Glu Thr Val Lys Ile Gly Cys Asn Thr  
835 840 845

Cys Val Cys Arg Asp Arg Lys Trp Asn Cys Thr Asp His Val Cys Asp  
850 855 860

ES 2 843 642 T3

Ala Thr Cys Ser Thr Ile Gly Met Ala His Tyr Leu Thr Phe Asp Gly  
865 870 875 880

Leu Lys Tyr Leu Phe Pro Gly Glu Cys Gln Tyr Val Leu Val Gln Asp  
885 890 895

Tyr Cys Gly Ser Asn Pro Gly Thr Phe Arg Ile Leu Val Gly Asn Lys  
900 905 910

Gly Cys Ser His Pro Ser Val Lys Cys Lys Lys Arg Val Thr Ile Leu  
915 920 925

Val Glu Gly Glu Ile Glu Leu Phe Asp Gly Glu Val Asn Val Lys  
930 935 940

Arg Pro Met Lys Asp Glu Thr His Phe Glu Val Val Glu Ser Gly Arg  
945 950 955 960

Tyr Ile Ile Leu Leu Leu Gly Lys Ala Leu Ser Val Val Trp Asp Arg  
965 970 975

His Leu Ser Ile Ser Val Val Leu Lys Gln Thr Tyr Gln Glu Lys Val  
980 985 990

Cys Gly Leu Cys Gly Asn Phe Asp Gly Ile Gln Asn Asn Asp Leu Thr  
995 1000 1005

Ser Ser Asn Leu Gln Val Glu Glu Asp Pro Val Asp Phe Gly Asn  
1010 1015 1020

Ser Trp Lys Val Ser Ser Gln Cys Ala Asp Thr Arg Lys Val Pro  
1025 1030 1035

Leu Asp Ser Ser Pro Ala Thr Cys His Asn Asn Ile Met Lys Gln  
1040 1045 1050

Thr Met Val Asp Ser Ser Cys Arg Ile Leu Thr Ser Asp Val Phe  
1055 1060 1065

Gln Asp Cys Asn Lys Leu Val Asp Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Val  
1070 1075 1080

Cys Ile Tyr Asp Thr Cys Ser Cys Glu Ser Ile Gly Asp Cys Ala  
1085 1090 1095

Cys Phe Cys Asp Thr Ile Ala Ala Tyr Ala His Val Cys Ala Gln  
1100 1105 1110

ES 2 843 642 T3

His Gly Lys Val Val Thr Trp Arg Thr Ala Thr Leu Cys Pro Gln  
1115 1120 1125

Ser Cys Glu Glu Arg Asn Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Glu Cys Glu  
1130 1135 1140

Trp Arg Tyr Asn Ser Cys Ala Pro Ala Cys Gln Val Thr Cys Gln  
1145 1150 1155

His Pro Glu Pro Leu Ala Cys Pro Val Gln Cys Val Glu Gly Cys  
1160 1165 1170

His Ala His Cys Pro Pro Gly Lys Ile Leu Asp Glu Leu Leu Gln  
1175 1180 1185

Thr Cys Val Asp Pro Glu Asp Cys Pro Val Cys Glu Val Ala Gly  
1190 1195 1200

Arg Arg Phe Ala Ser Gly Lys Lys Val Thr Leu Asn Pro Ser Asp  
1205 1210 1215

Pro Glu His Cys Gln Ile Cys His Cys Asp Val Val Asn Leu Thr  
1220 1225 1230

Cys Glu Ala Cys Gln Glu Pro Gly Gly Leu Val Val Pro Pro Thr  
1235 1240 1245

Asp Ala Pro Val Ser Pro Thr Thr Leu Tyr Val Glu Asp Ile Ser  
1250 1255 1260

Glu Pro Pro Leu His Asp Phe Tyr Cys Ser Arg Leu Leu Asp Leu  
1265 1270 1275

Val Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu Ser Glu Ala Glu Phe  
1280 1285 1290

Glu Val Leu Lys Ala Phe Val Val Asp Met Met Glu Arg Leu Arg  
1295 1300 1305

Ile Ser Gln Lys Trp Val Arg Val Ala Val Val Glu Tyr His Asp  
1310 1315 1320

Gly Ser His Ala Tyr Ile Gly Leu Lys Asp Arg Lys Arg Pro Ser  
1325 1330 1335

Glu Leu Arg Arg Ile Ala Ser Gln Val Lys Tyr Ala Gly Ser Gln  
1340 1345 1350

ES 2 843 642 T3

Val Ala Ser Thr Ser Glu Val Leu Lys Tyr Thr Leu Phe Gln Ile  
1355 1360 1365

Phe Ser Lys Ile Asp Arg Pro Glu Ala Ser Arg Ile Ala Leu Leu  
1370 1375 1380

Leu Met Ala Ser Gln Glu Pro Gln Arg Met Ser Arg Asn Phe Val  
1385 1390 1395

Arg Tyr Val Gln Gly Leu Lys Lys Lys Val Ile Val Ile Pro  
1400 1405 1410

Val Gly Ile Gly Pro His Ala Asn Leu Lys Gln Ile Arg Leu Ile  
1415 1420 1425

Glu Lys Gln Ala Pro Glu Asn Lys Ala Phe Val Leu Ser Ser Val  
1430 1435 1440

Asp Glu Leu Glu Gln Gln Arg Asp Glu Ile Val Ser Tyr Leu Cys  
1445 1450 1455

Asp Leu Ala Pro Glu Ala Pro Pro Pro Thr Leu Pro Pro His Met  
1460 1465 1470

Ala Gln Val Thr Val Gly Pro Gly Leu Arg Asn Ser Met Val Leu  
1475 1480 1485

Asp Val Ala Phe Val Leu Glu Gly Ser Asp Lys Ile Gly Glu Ala  
1490 1495 1500

Asp Phe Asn Arg Ser Lys Glu Phe Met Glu Glu Val Ile Gln Arg  
1505 1510 1515

Met Asp Val Gly Gln Asp Ser Ile His Val Thr Val Leu Gln Tyr  
1520 1525 1530

Ser Tyr Met Val Thr Val Glu Tyr Pro Phe Ser Glu Ala Gln Ser  
1535 1540 1545

Lys Gly Asp Ile Leu Gln Arg Val Arg Glu Ile Arg Tyr Gln Gly  
1550 1555 1560

Gly Asn Arg Thr Asn Thr Gly Leu Ala Leu Arg Tyr Leu Ser Asp  
1565 1570 1575

His Ser Phe Leu Val Ser Gln Gly Asp Arg Glu Gln Ala Pro Asn

## ES 2 843 642 T3

1580

1585

1590

Leu Val Tyr Met Val Thr Gly Asn Pro Ala Ser Asp Glu Ile Lys  
 1595 1600 1605

Arg Leu Pro Gly Asp Ile Gln Val Val Pro Ile Gly Val Gly Pro  
 1610 1615 1620

Asn Ala Asn Val Gln Glu Leu Glu Arg Ile Gly Trp Pro Asn Ala  
 1625 1630 1635

Pro Ile Leu Ile Gln Asp Phe Glu Thr Leu Pro Arg Glu Ala Pro  
 1640 1645 1650

Asp Leu Val Leu Gln Arg Cys Cys Ser Gly Glu Gly Leu Gln Ile  
 1655 1660 1665

Pro Thr Leu Ser Pro Ala Pro Asp Cys Ser Gln Pro Leu Asp Val  
 1670 1675 1680

Ile Leu Leu Leu Asp Gly Ser Ser Ser Phe Pro Ala Ser Tyr Phe  
 1685 1690 1695

Asp Glu Met Lys Ser Phe Ala Lys Ala Phe Ile Ser Lys Ala Asn  
 1700 1705 1710

Ile Gly Pro Arg Leu Thr Gln Val Ser Val Leu Gln Tyr Gly Ser  
 1715 1720 1725

Ile Thr Thr Ile Asp Val Pro Trp Asn Val Val Pro Glu Lys Ala  
 1730 1735 1740

His Leu Leu Ser Leu Val Asp Val Met Gln Arg Glu Gly Gly Pro  
 1745 1750 1755

Ser Gln Ile Gly Asp Ala Leu Gly Phe Ala Val Arg Tyr Leu Thr  
 1760 1765 1770

Ser Glu Met His Gly Ala Arg Pro Gly Ala Ser Lys Ala Val Val  
 1775 1780 1785

Ile Leu Val Thr Asp Val Ser Val Asp Ser Val Asp Ala Ala Ala  
 1790 1795 1800

Asp Ala Ala Arg Ser Asn Arg Val Thr Val Phe Pro Ile Gly Ile  
 1805 1810 1815

ES 2 843 642 T3

Gly Asp Arg Tyr Asp Ala Ala Gln Leu Arg Ile Leu Ala Gly Pro  
1820 1825 1830

Ala Gly Asp Ser Asn Val Val Lys Leu Gln Arg Ile Glu Asp Leu  
1835 1840 1845

Pro Thr Met Val Thr Leu Gly Asn Ser Phe Leu His Lys Leu Cys  
1850 1855 1860

Ser Gly Phe Val Arg Ile Cys Met Asp Glu Asp Gly Asn Glu Lys  
1865 1870 1875

Arg Pro Gly Asp Val Trp Thr Leu Pro Asp Gln Cys His Thr Val  
1880 1885 1890

Thr Cys Gln Pro Asp Gly Gln Thr Leu Leu Lys Ser His Arg Val  
1895 1900 1905

Asn Cys Asp Arg Gly Leu Arg Pro Ser Cys Pro Asn Ser Gln Ser  
1910 1915 1920

Pro Val Lys Val Glu Glu Thr Cys Gly Cys Arg Trp Thr Cys Pro  
1925 1930 1935

Cys Val Cys Thr Gly Ser Ser Thr Arg His Ile Val Thr Phe Asp  
1940 1945 1950

Gly Gln Asn Phe Lys Leu Thr Gly Ser Cys Ser Tyr Val Leu Phe  
1955 1960 1965

Gln Asn Lys Glu Gln Asp Leu Glu Val Ile Leu His Asn Gly Ala  
1970 1975 1980

Cys Ser Pro Gly Ala Arg Gln Gly Cys Met Lys Ser Ile Glu Val  
1985 1990 1995

Lys His Ser Ala Leu Ser Val Glu Leu His Ser Asp Met Glu Val  
2000 2005 2010

Thr Val Asn Gly Arg Leu Val Ser Val Pro Tyr Val Gly Gly Asn  
2015 2020 2025

Met Glu Val Asn Val Tyr Gly Ala Ile Met His Glu Val Arg Phe  
2030 2035 2040

Asn His Leu Gly His Ile Phe Thr Phe Thr Pro Gln Asn Asn Glu  
2045 2050 2055

ES 2 843 642 T3

Phe Gln Leu Gln Leu Ser Pro Lys Thr Phe Ala Ser Lys Thr Tyr  
2060 2065 2070

Gly Leu Cys Gly Ile Cys Asp Glu Asn Gly Ala Asn Asp Phe Met  
2075 2080 2085

Leu Arg Asp Gly Thr Val Thr Thr Asp Trp Lys Thr Leu Val Gln  
2090 2095 2100

Glu Trp Thr Val Gln Arg Pro Gly Gln Thr Cys Gln Pro Ile Leu  
2105 2110 2115

Glu Glu Gln Cys Leu Val Pro Asp Ser Ser His Cys Gln Val Leu  
2120 2125 2130

Leu Leu Pro Leu Phe Ala Glu Cys His Lys Val Leu Ala Pro Ala  
2135 2140 2145

Thr Phe Tyr Ala Ile Cys Gln Gln Asp Ser Cys His Gln Glu Gln  
2150 2155 2160

Val Cys Glu Val Ile Ala Ser Tyr Ala His Leu Cys Arg Thr Asn  
2165 2170 2175

Gly Val Cys Val Asp Trp Arg Thr Pro Asp Phe Cys Ala Met Ser  
2180 2185 2190

Cys Pro Pro Ser Leu Val Tyr Asn His Cys Glu His Gly Cys Pro  
2195 2200 2205

Arg His Cys Asp Gly Asn Val Ser Ser Cys Gly Asp His Pro Ser  
2210 2215 2220

Glu Gly Cys Phe Cys Pro Pro Asp Lys Val Met Leu Glu Gly Ser  
2225 2230 2235

Cys Val Pro Glu Glu Ala Cys Thr Gln Cys Ile Gly Glu Asp Gly  
2240 2245 2250

Val Gln His Gln Phe Leu Glu Ala Trp Val Pro Asp His Gln Pro  
2255 2260 2265

Cys Gln Ile Cys Thr Cys Leu Ser Gly Arg Lys Val Asn Cys Thr  
2270 2275 2280

Thr Gln Pro Cys Pro Thr Ala Lys Ala Pro Thr Cys Gly Leu Cys  
2285 2290 2295

ES 2 843 642 T3

Glu Val Ala Arg Leu Arg Gln Asn Ala Asp Gln Cys Cys Pro Glu  
2300 2305 2310

Tyr Glu Cys Val Cys Asp Pro Val Ser Cys Asp Leu Pro Pro Val  
2315 2320 2325

Pro His Cys Glu Arg Gly Leu Gln Pro Thr Leu Thr Asn Pro Gly  
2330 2335 2340

Glu Cys Arg Pro Asn Phe Thr Cys Ala Cys Arg Lys Glu Glu Cys  
2345 2350 2355

Lys Arg Val Ser Pro Pro Ser Cys Pro Pro His Arg Leu Pro Thr  
2360 2365 2370

Leu Arg Lys Thr Gln Cys Cys Asp Glu Tyr Glu Cys Ala Cys Asn  
2375 2380 2385

Cys Val Asn Ser Thr Val Ser Cys Pro Leu Gly Tyr Leu Ala Ser  
2390 2395 2400

Thr Ala Thr Asn Asp Cys Gly Cys Thr Thr Thr Thr Cys Leu Pro  
2405 2410 2415

Asp Lys Val Cys Val His Arg Ser Thr Ile Tyr Pro Val Gly Gln  
2420 2425 2430

Phe Trp Glu Glu Gly Cys Asp Val Cys Thr Cys Thr Asp Met Glu  
2435 2440 2445

Asp Ala Val Met Gly Leu Arg Val Ala Gln Cys Ser Gln Lys Pro  
2450 2455 2460

Cys Glu Asp Ser Cys Arg Ser Gly Phe Thr Tyr Val Leu His Glu  
2465 2470 2475

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Ser Ala Cys Glu Val Val  
2480 2485 2490

Thr Gly Ser Pro Arg Gly Asp Ser Gln Ser Ser Trp Lys Ser Val  
2495 2500 2505

Gly Ser Gln Trp Ala Ser Pro Glu Asn Pro Cys Leu Ile Asn Glu  
2510 2515 2520

Cys Val Arg Val Lys Glu Glu Val Phe Ile Gln Gln Arg Asn Val

## ES 2 843 642 T3

2525 2530 2535

Ser Cys Pro Gln Leu Glu Val Pro Val Cys Pro Ser Gly Phe Gln  
 2540 2545 2550

Leu Ser Cys Lys Thr Ser Ala Cys Cys Pro Ser Cys Arg Cys Glu  
 2555 2560 2565

Arg Met Glu Ala Cys Met Leu Asn Gly Thr Val Ile Gly Pro Gly  
 2570 2575 2580

Lys Thr Val Met Ile Asp Val Cys Thr Thr Cys Arg Cys Met Val  
 2585 2590 2595

Gln Val Gly Val Ile Ser Gly Phe Lys Leu Glu Cys Arg Lys Thr  
 2600 2605 2610

Thr Cys Asn Pro Cys Pro Leu Gly Tyr Lys Glu Glu Asn Asn Thr  
 2615 2620 2625

Gly Glu Cys Cys Gly Arg Cys Leu Pro Thr Ala Cys Thr Ile Gln  
 2630 2635 2640

Leu Arg Gly Gly Gln Ile Met Thr Leu Lys Arg Asp Glu Thr Leu  
 2645 2650 2655

Gln Asp Gly Cys Asp Thr His Phe Cys Lys Val Asn Glu Arg Gly  
 2660 2665 2670

Glu Tyr Phe Trp Glu Lys Arg Val Thr Gly Cys Pro Pro Phe Asp  
 2675 2680 2685

Glu His Lys Cys Leu Ala Glu Gly Gly Lys Ile Met Lys Ile Pro  
 2690 2695 2700

Gly Thr Cys Cys Asp Thr Cys Glu Glu Pro Glu Cys Asn Asp Ile  
 2705 2710 2715

Thr Ala Arg Leu Gln Tyr Val Lys Val Gly Ser Cys Lys Ser Glu  
 2720 2725 2730

Val Glu Val Asp Ile His Tyr Cys Gln Gly Lys Cys Ala Ser Lys  
 2735 2740 2745

Ala Met Tyr Ser Ile Asp Ile Asn Asp Val Gln Asp Gln Cys Ser  
 2750 2755 2760

Cys Cys Ser Pro Thr Arg Thr Glu Pro Met Gln Val Ala Leu His  
 2765 2770 2775

Cys Thr Asn Gly Ser Val Val Tyr His Glu Val Leu Asn Ala Met  
 2780 2785 2790

Glu Cys Lys Cys Ser Pro Arg Lys Cys Ser Lys  
 2795 2800

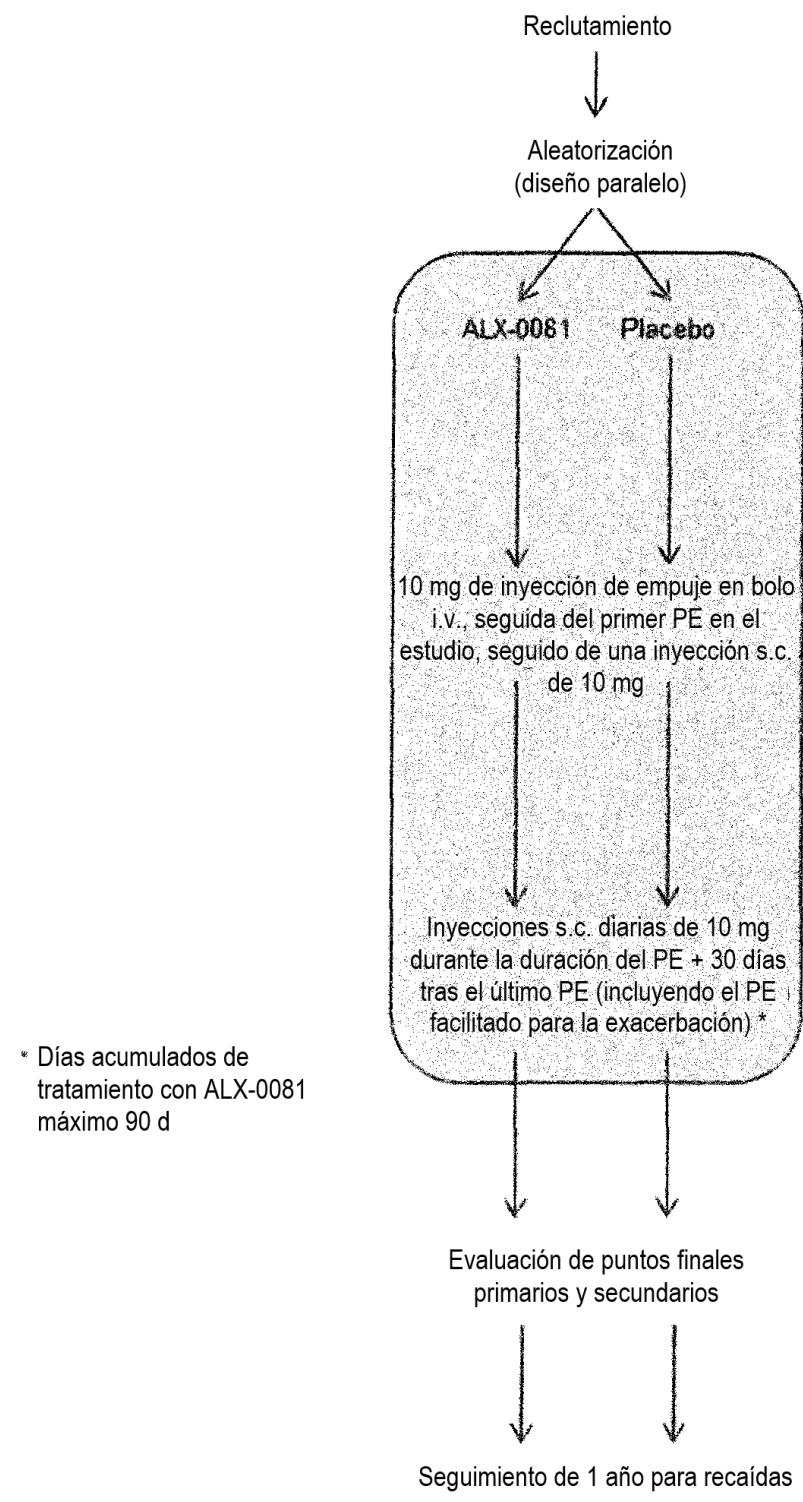
5           <210> 21  
  <211> 5  
  <212> PRT  
  <213> Secuencia artificial  
10           <220>  
  <223> 12A02H1 CDR1  
15           <400> 21  
  Tyr Asn Pro Met Gly  
  1               5  
20           <210> 22  
  <211> 17  
  <212> PRT  
  <213> Secuencia artificial  
25           <220>  
  <223> 12A02H1 CDR2  
30           <400> 22  
  Ala Ile Ser Arg Thr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu  
  1               5               10               15  
35           Gly  
40           <210> 23  
  <211> 19  
  <212> PRT  
  <213> Secuencia artificial  
45           <220>  
  <223> 12A02H1 CDR3  
50           <400> 23  
  Ala Gly Val Arg Ala Glu Asp Gly Arg Val Arg Thr Leu Pro Ser Glu  
  1               5               10               15  
55           Tyr Thr Phe

## REIVINDICACIONES

- 5 1.- Un polipéptido que comprende dos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) anti-factor de von Willebrand (vWF) humano para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, administrando al humano una dosis de 1-80 mg, preferiblemente 5-40 mg, incluso más preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido.
- 10 2.- El polipéptido según la reivindicación 1 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicho polipéptido comprende al menos un ISVD que se une a SEQ ID NO: 20.
- 15 3.- El polipéptido según la reivindicación 1 o 2 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que al menos un ISVD está representado por SEQ ID NO: 19 (12A02H1).
- 20 4.- El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicho polipéptido es idéntico al menos al 90% a SEQ ID NO: 1.
- 25 5.- El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicho polipéptido es ALX 0081 (SEQ ID NO: 1).
- 30 6.- El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicha dosis se administra 1 vez al día o dos veces al día.
- 35 7.- El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicha etapa de administrar el polipéptido de la invención se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días, tal como 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses o incluso más.
- 40 8.- El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que comprende repetir la administración de dicho polipéptido hasta que el número de plaquetas en dicho humano es de al menos 150.000/ $\mu$ l.
- 45 9.- El polipéptido según la reivindicación 8 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano que comprende repetir la administración de dicho polipéptido hasta que el número de plaquetas en dicho humano es de al menos 150.000/ $\mu$ l en al menos 2 mediciones consecutivas.
- 50 10.- El polipéptido según la reivindicación 9 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicha etapa de administrar el polipéptido de la invención se repite durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días, o incluso más de 10 días, tal como 20 días, preferiblemente más de 30 días o incluso más, después de que dicho número de plaquetas sea de al menos 150.000/ $\mu$ l en al menos 2 mediciones consecutivas.
- 55 11.- El polipéptido según la reivindicación 9 o 10 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dichas 2 mediciones consecutivas están separadas al menos 24 h, más preferiblemente 48 h, tal como separadas al menos 3 días, o incluso más, tal como separadas 4, 5, 6 o incluso 7 días, preferiblemente separadas una semana.
- 60 12.- El polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 para su uso en reducir una exacerbación de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicha enfermedad relacionada con vWF se elige de síndrome coronario agudo (ACS), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho inestable o estable, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), preferiblemente TTP.
- 65 13.- Un polipéptido que comprende dos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) anti-factor de von Willebrand (vWF) humano para su uso en reducir el riesgo de exacerbaciones de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, administrando al humano una dosis de 1-80 mg, preferiblemente 5-40 mg, incluso más preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido, en el que el riesgo de exacerbaciones se reduce en al menos un 10%, un 20%, un 30%, un 40% o incluso al menos un 50%, tal como un 60%, un 70%, un 80%, un 90% o incluso hasta un 100%.
- 70 14.- Un polipéptido que comprende dos dominios variables únicos de inmunoglobulina (ISVD) anti-factor de von Willebrand (vWF) humano para su uso en reducir el riesgo de exacerbaciones de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, administrando al humano una dosis de 1-80 mg, preferiblemente 5-40 mg, incluso más preferiblemente 10 mg de dicho polipéptido, en el que el riesgo de exacerbaciones se reduce en un factor de 2 o más, tal como 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o incluso 10, o incluso más, tal como 20, 50 o incluso 100.
- 75 15.- El polipéptido según la reivindicación 13 o 14 para su uso en reducir el riesgo de exacerbaciones de una enfermedad relacionada con vWF en un humano, en el que dicha enfermedad relacionada con vWF se elige de

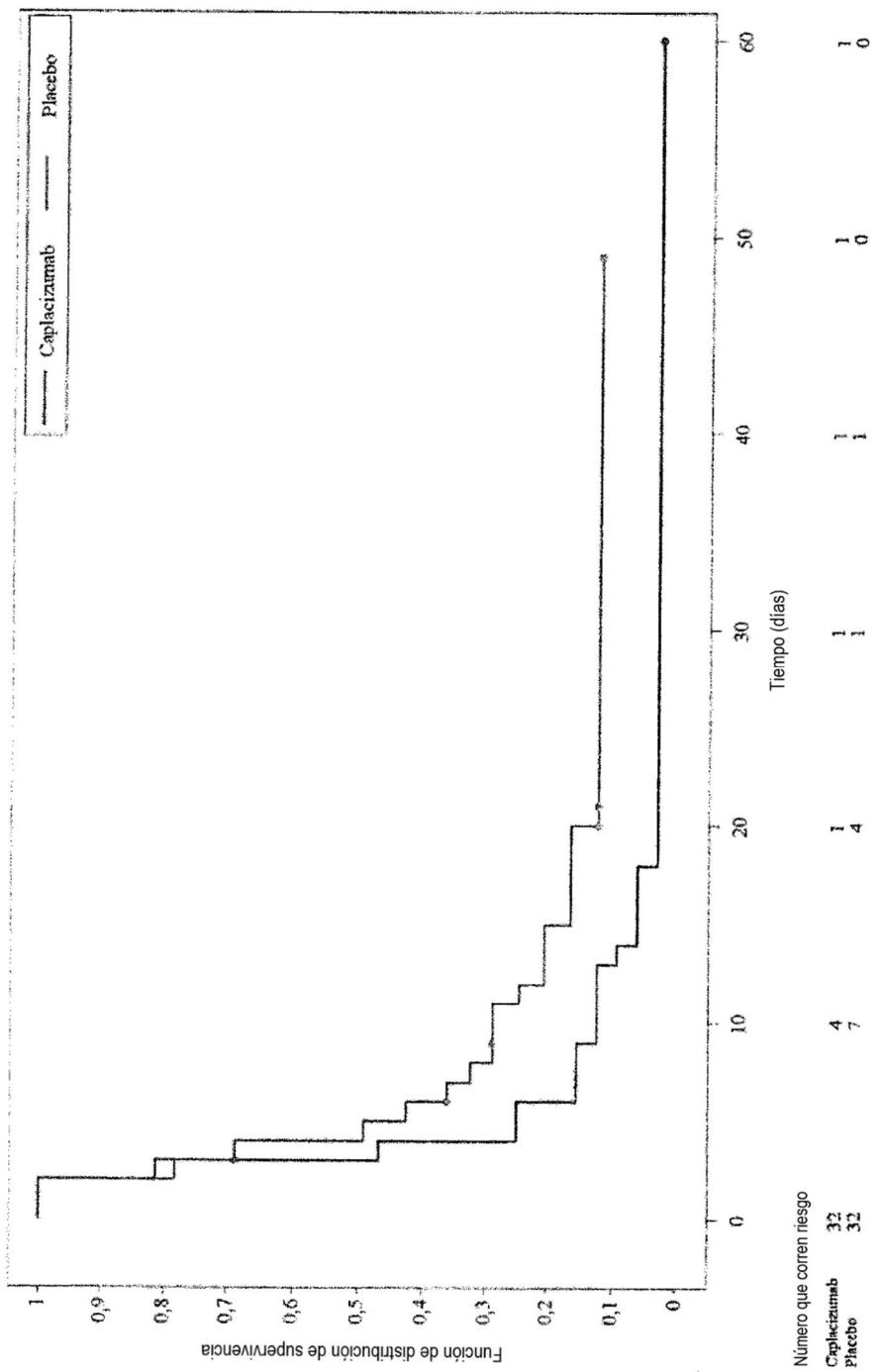
síndrome coronario agudo (ACS), ataque isquémico cerebral transitorio, angina de pecho inestable o estable, accidente cerebrovascular, infarto de miocardio o púrpura trombocitopénica trombótica (TTP), preferiblemente TTP.

Figura 1: diagrama de flujo de tratamiento



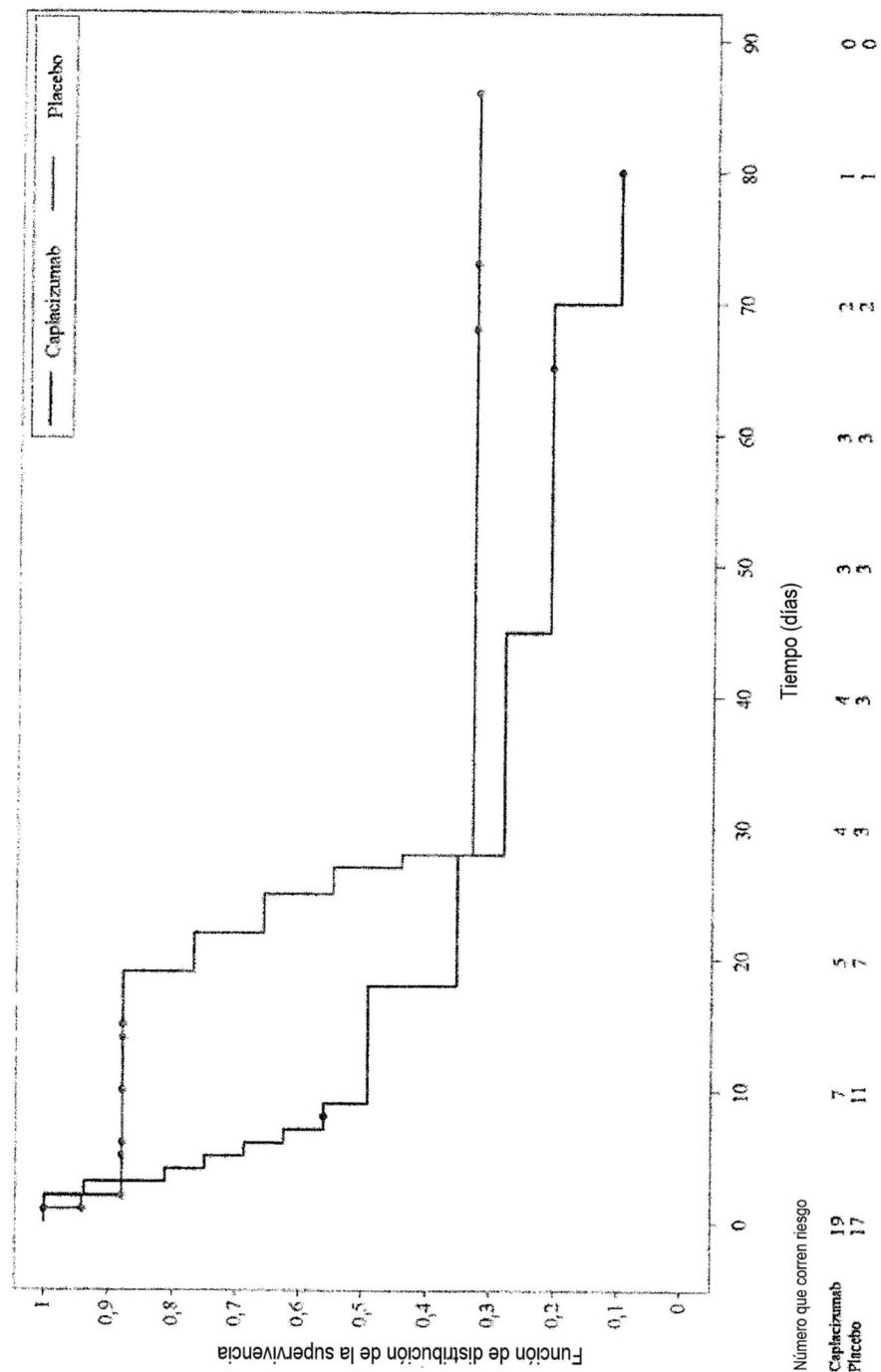
PE = intercambio plasmático

Figura 2 Curvas de tiempo hasta la primera normalización de LDH (población ITT = sujetos con niveles anómalamente altos en el nivel inicial).



Las observaciones censuradas se representan mediante un punto. Cualquier sujeto que todavía corre riesgo a 1 mes FU se censura a 1 mes FU.

Figura 3: Curvas de tiempo hasta la normalización de troponina T o para sujetos con niveles anómalamente altos en el nivel inicial en la población de intención de tratar



Las observaciones censuradas se representan mediante un punto. Cualquier sujeto que todavía corre riesgo a 1 mes FU se censura a 1 mes FU.

Figura 4: Curvas de tiempo hasta la normalización de creatinina para sujetos con niveles anormalmente altos en el nivel inicial en la población de intención de tratar

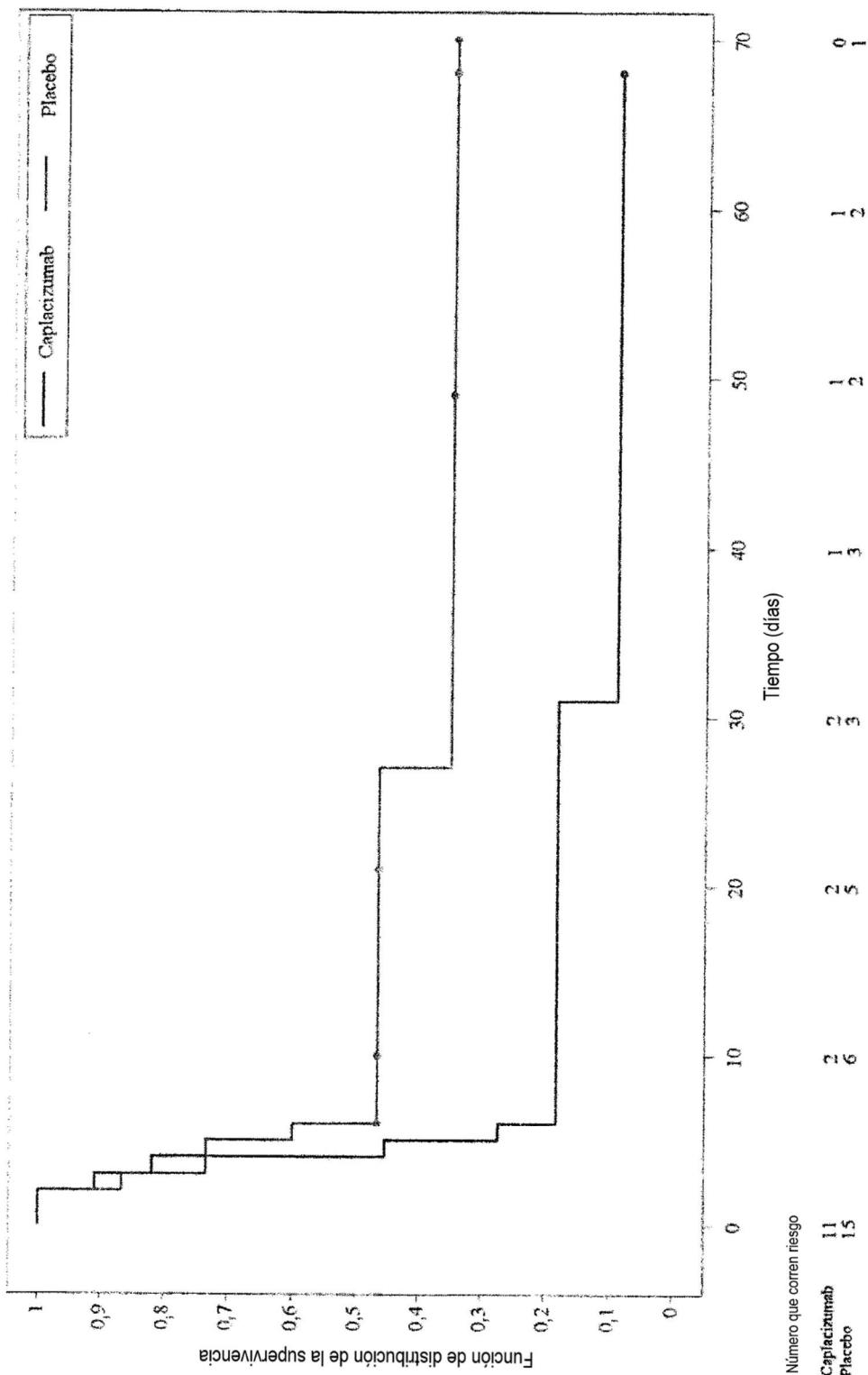


Figura 5

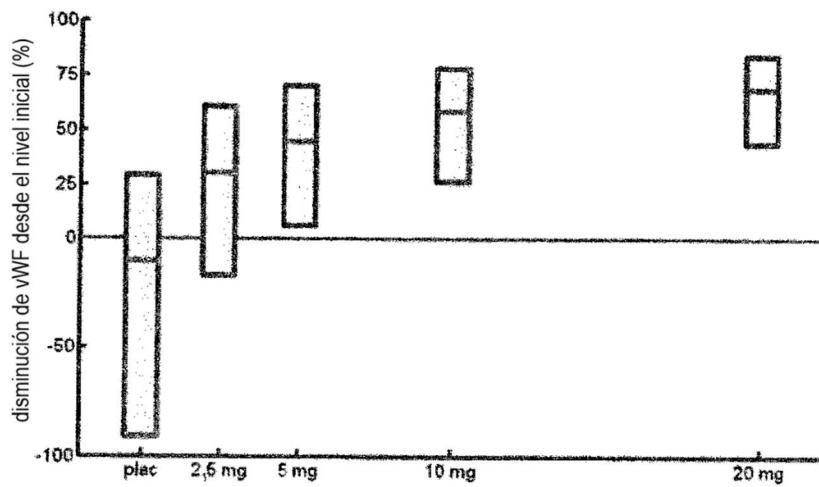


Figura 6

