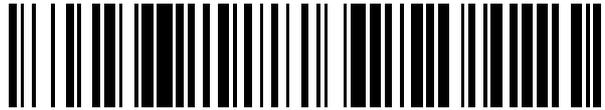


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 406 764**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.06.2007** **E 11157965 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.04.2013** **EP 2364691**

54 Título: **Formulaciones que comprenden antagonistas de VEGF para administración intravítrea**

30 Prioridad:

**16.06.2006 US 814484 P**

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

**10.06.2013**

73 Titular/es:

**REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.**  
**(100.0%)**  
**777 Old Saw Mill River Road**  
**Tarrytown, NY 10591-6707, US**

72 Inventor/es:

**FURFINE, ERIC;**  
**DIX, DANIEL;**  
**GRAHAM, KENNETH S. y**  
**FRYE, KELLY**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 406 764 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Formulaciones que comprenden antagonistas de VEGF para administración intravítrea

**5 Antecedentes de la Invención****Campo de la Invención**

10 La presente invención está dirigida a formulaciones farmacéuticas adecuadas para la administración intravítrea, que comprenden agentes capaces de inhibir el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), y a los métodos para elaborar y utilizar tales formulaciones. La invención incluye formulaciones farmacéuticas líquidas que tienen una estabilidad incrementada, así como formulaciones que se pueden liofilizar y reconstituir para la administración intravítrea.

**15 Estado de la Técnica Relacionada**

La expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es casi ubicua en el cáncer humano, en consonancia con su papel como mediador clave de la neoangiogénesis tumoral. El bloqueo de la función de VEGF, por medio de la unión a la molécula o su receptor VEGFR-2, inhibe el crecimiento de las células tumorales implantadas en múltiples modelos de xenoinjerto diferentes (véase, por ejemplo, Gerber et al. (2000) Cancer Res. 60:6253-6258). Se ha descrito un antagonista de la proteína de fusión específica de VEGF soluble, denominado "trampa de VEGF" (Kim et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:11399-404; Holash et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99: 11393-8).

25 Se conocen formulaciones oftálmicas, véanse por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos Núms. 7.033.604 y 6.777.429. Se describe una formulación oftálmica de un anticuerpo para VEGF en la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.676.941.

30 Comúnmente se utiliza la liofilización (secado por congelación en condiciones controladas) para el almacenamiento de proteínas a largo plazo. La proteína liofilizada es sustancialmente resistente a la degradación, agregación, oxidación, y otros procesos degenerativos mientras se encuentra en estado secado por congelación (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos Núm. 6.436.897).

35 El documento WO 2006/047325 está relacionado con un método para tratar enfermedades neovasculares intraoculares. El documento WO 2005/020972 está relacionado con la terapia combinada para el tratamiento de los trastornos neovasculares oculares. El documento WO 2006/104852 y la Patente de los Estados Unidos 2006/0217311 A1 están relacionados con formulaciones antagonistas de VEGF.

**Breve Resumen de la Invención**

40 Se proporcionan formulaciones estables de un antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF. Se proporcionan formulaciones farmacéuticamente aceptables que comprenden un antagonista "trampa" de VEGF con un portador farmacéuticamente aceptable. En realizaciones específicas, se proporcionan formulaciones líquidas y liofilizadas.

45 En un primer aspecto, se proporciona una formulación oftálmica líquida estable de un antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF, que comprende una proteína de fusión que comprende un componente receptor que consiste esencialmente en un dominio 2 de tipo inmunoglobulina (Ig) de un primer receptor de VEGF y un dominio 3 de Ig de un segundo receptor de VEGF, y un componente multimerizante (también denominado "trampa de VEGF").  
50 El antagonista de la proteína de fusión específica de VEGF consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4 que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308.

En un aspecto, la invención proporciona una formulación oftálmica de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende:

- 55 1. (a) 1-100 mg/ml de un antagonista de VEGF que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;
2. (b) 0,01-5% de uno o más co-disolventes orgánicos que son uno o más de polisorbato, polietilenglicol (PEG), y propilenglicol;
- 60 3. (c) 30-150 mM de un agente de tonicidad seleccionado entre seleccionado entre cloruro de sodio o cloruro de potasio;
4. (d) 5-40 mM de tampón fosfato de sodio; y
5. (e) 1,0-7,5% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol, pH entre aproximadamente 5,8-7,0, en donde la formulación es adecuada para la administración intravítrea.

- 5 En una o más realizaciones específicas, el co-disolvente orgánico puede ser polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80, polietilenglicol (PEG), por ejemplo, PEG 3350, o propilenglicol, o una combinación de los mismos; el agente de tonicidad puede ser cloruro de sodio o cloruro de potasio; el agente estabilizante puede ser sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, o manitol; y el agente tamponador comprende tampón fosfato de sodio 5-40 mM.
- En diferentes realizaciones, el co-disolvente es polisorbato y/o PEG, el agente estabilizante es sacarosa, el agente tamponador es tampón fosfato de sodio, y el agente de tonicidad es cloruro de sodio.
- 10 Más específicamente, la formulación oftálmica líquida estable comprende aproximadamente 40-50 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato aproximadamente 10 mM, polisorbato y/o PEG al 0,01-3%, cloruro de sodio 40-135 mM, y sacarosa al 5,0%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 15 En una realización preferida específica, la formulación oftálmica líquida estable comprende aproximadamente 50 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, polisorbato al 0,1%, y sacarosa al 5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 20 En una realización preferida específica, la formulación oftálmica líquida estable comprende aproximadamente 50 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 50 mM, PEG al 3%, y sacarosa al 5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 25 En una realización preferida específica, la formulación oftálmica líquida estable comprende aproximadamente 40 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 40 mM, polisorbato al 0,03%, y sacarosa al 5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 30 En una realización preferida específica, la formulación oftálmica líquida estable comprende aproximadamente 40 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 135 mM, y polisorbato al 0,03%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 35 En otro aspecto, se proporciona una formulación oftálmica líquida estable que comprende un antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF de 1-100 mg/ml; uno o más co-disolventes orgánicos al 0,01-5% seleccionados entre polisorbato, polietilenglicol (PEG), y propilenglicol; 5-40 mM de tampón fosfato de sodio; y 30-150 mM de uno o más agentes de tonicidad seleccionados entre cloruro de sodio y cloruro de potasio y/o 1,0-7,5% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, o manitol; teniendo un pH entre aproximadamente 5,8-7,0.
- 40 En diversas realizaciones, el antagonista de VEGF está presente a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 mg/ml. En diversas realizaciones, el antagonista de VEGF está presente a una concentración de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, o aproximadamente 80 mg/ml. En una realización preferida, el antagonista de VEGF está presente a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml.
- El agente estabilizante se selecciona entre uno o más de sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol.
- 45 El co-disolvente orgánico se selecciona entre uno o más de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80, polietilenglicol (PEG), por ejemplo, PEG 3350, y propilenglicol.
- El tampón comprende 5-40 mM del tampón fosfato de sodio.
- 50 El agente de tonicidad es una sal seleccionada entre cloruro de sodio o cloruro de potasio, por ejemplo el agente es cloruro de sodio.
- 55 En una realización, la formulación oftálmica líquida estable comprende tampón fosfato de sodio 10 mM, polisorbato de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,1% y/o PEG o propilenglicol a aproximadamente 3%, cloruro de sodio aproximadamente 40 mM, y sacarosa aproximadamente al 5%. En una realización específica, la formulación oftálmica líquida estable comprende tampón fosfato de sodio 10 mM, polisorbato aproximadamente al 0,03%, cloruro de sodio aproximadamente 40 mM, y sacarosa aproximadamente al 5%. En otra realización específica, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,2 a aproximadamente 6,3. En otra realización específica, el pH se logra mezclando fosfato de sodio mono- y di-básico al pH deseado sin titulación ácido/base.
- 60 En una realización específica, la formulación oftálmica líquida estable consiste esencialmente en un antagonista de VEGF a 40 mg/ml, tampón fosfato de sodio 10 mM, polisorbato al 0,03%, cloruro de sodio 40 mM, y sacarosa al 5%, pH 6,2-6,3.+++

En otro aspecto, se proporciona una formulación oftálmica líquida estable que comprende un antagonista de VEGF de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 mg/ml, tampón fosfato de sodio aproximadamente 10 mM, polisorbato aproximadamente al 0,03%, y cloruro de sodio aproximadamente 135 mM, pH de 6,2 a 6,3.

5 En diversas realizaciones, el antagonista de VEGF está presente a una concentración de aproximadamente 10 a aproximadamente 80 mg/ml. En diversas realizaciones, el antagonista de VEGF está presente a una concentración de aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50, aproximadamente 60, aproximadamente 70, o aproximadamente 80 mg/ml. En una realización específica, el antagonista de VEGF está presente a una concentración de aproximadamente 40 mg/ml.

10 En una realización, la formulación oftálmica líquida estable comprende 40 mg/ml de un antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, polisorbato al 0,03%, y cloruro de sodio 135 mM a pH 6,2-6,3. En una realización específica, la formulación oftálmica líquida estable consiste esencialmente en 40 mg/ml de un antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, polisorbato al 0,03%, y cloruro de sodio 135 mM a pH 6,2-6,3.

15 En otro aspecto, se proporciona una formulación liofilizable de un antagonista de VEGF, en donde tras la liofilización seguida de reconstitución, se obtiene una formulación oftálmica líquida estable como se describe en la presente memoria.

20 En otro aspecto, la invención proporciona una formulación liofilizable de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende:

1. (a) 5-50 mg/ml del antagonista de VEGF, preferiblemente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml o 40 mg/ml, que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;
- 25 2. (b) 5-25 mM de tampón fosfato de sodio, pH aproximadamente 5,8-7,0;
3. (c) 0,01-0,15% de un co-disolvente orgánico, seleccionado del grupo que consiste en polisorbato, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, y una combinación de los mismos; y
4. (d) 1-10% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol; o 20-150 mM de un agente de tonicidad, preferiblemente cloruro de sodio; o 1-10% de agente estabilizante y 20-150 mM de agente de tonicidad,

30 en donde la formulación se puede reconstituir de manera que sea adecuada para la administración intravítrea. En diversas realizaciones, el antagonista de VEGF está presente a aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, o aproximadamente 40 mg/ml. En una realización específica, la formulación oftálmica liofilizable de la invención comprende 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, polisorbato al 0,03%, PEG al 0,1%, y sacarosa al 2,5%, pH aproximadamente 6,2-6,3. En realizaciones adicionales, la formulación liofilizable comprende adicionalmente cloruro de sodio. En una realización específica, el cloruro de sodio está presente a una concentración de aproximadamente 20 mM. En otra realización específica, el cloruro de sodio está presente a una concentración de aproximadamente 67,5 mM.

40 En otra realización específica, la formulación oftálmica liofilizable de la invención comprende 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, cloruro de sodio 20 mM, y sacarosa al 2,5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.

45 En otra realización, la formulación oftálmica liofilizable comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 40 mg/ml de un antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, cloruro de sodio 20 mM, y sacarosa al 2,5%, a pH 6,2-6,3. En una realización específica, la formulación oftálmica liofilizable consiste esencialmente en 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 40 mg/ml de antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, cloruro de sodio 20 mM, y sacarosa al 2,5%, a pH 6,2-6,3.

50 En otra realización específica, la formulación oftálmica liofilizable comprende 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, y cloruro de sodio 67,5 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3. En una realización más específica, la formulación oftálmica liofilizable consiste esencialmente en 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, y cloruro de sodio 67,5 mM, pH 6,2-6,3.

55 En otra realización específica, la formulación oftálmica liofilizable comprende 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 40 mg/ml de antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, y cloruro de sodio 67,5 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3. En una realización más específica, la formulación oftálmica liofilizable consiste esencialmente en 5 mg/ml, 10 mg/ml, o 40 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 5 mM, polisorbato al 0,015%, y cloruro de sodio 67,5 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.

60 Generalmente, la formulación reconstituida tiene aproximadamente 2 veces la concentración de la formulación pre-liofilizada, p. ej., una formulación pre-liofilizada de 20 mg proteína de fusión/ml se reconstituye hasta una formulación final de 40 mg de proteína de fusión/ml.

Generalmente, la formulación liofilizada se reconstituye con agua estéril adecuada para inyectables. En una realización, el líquido de reconstitución es agua bacteriostática.

5 En otro aspecto, la invención ofrece un método para producir una formulación liofilizada de un antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF, que comprende someter la formulación liofilizable de la invención a liofilización para generar una formulación liofilizada. La formulación liofilizada se puede liofilizar mediante cualquier método conocido en la técnica para liofilizar un líquido.

10 En otro aspecto relacionado, la invención ofrece un método para producir una formulación liofilizada reconstituida de un antagonista de VEGF, que comprende reconstituir la formulación liofilizada de la invención hasta una formulación reconstituida. En una realización, la formulación reconstituida tiene dos veces la concentración de la formulación pre-liofilizada, p. ej., el método de la invención comprende: (a) producir una formulación pre-liofilizada de un antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF, (b) someter la formulación pre-liofilizada de la etapa (a) a liofilización; y (c) reconstituir la formulación liofilizada de la etapa (b).

La invención ofrece adicionalmente formulaciones oftálmicas proporcionadas en una jeringa o vial previamente cargados, particularmente adecuados para la administración intravítrea.

20 Otros objetos y ventajas se harán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

### Descripción Detallada de la Invención

25 La presente invención no se limita a métodos concretos, y las condiciones experimentales descritas, como tales métodos y condiciones pueden variar. También se entiende que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir realizaciones concretas solamente, y no está destinada a limitar a menos que se indique de otro modo, puesto que el alcance de la presente invención estará limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas.

30 A menos que se establezca de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto normal en la técnica a la cual pertenece la invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales preferidos.

### 35 Descripción General

La manipulación y administración segura de las formulaciones que comprenden proteínas representan desafíos significativos para los formuladores farmacéuticos. Las proteínas poseen propiedades químicas y físicas únicas que presentan problemas de estabilidad: existe una variedad de rutas de degradación para las proteínas, que afectan tanto a la inestabilidad química como física. La inestabilidad química incluye desaminación, agregación, corte de la cadena principal peptídica, y oxidación de residuos de metionina. La inestabilidad física incluye muchos fenómenos, incluyendo, por ejemplo, agregación y/o precipitación.

45 Se puede promover la estabilidad química y física eliminando agua de la proteína. La liofilización (secado por congelación en condiciones controladas) se utiliza comúnmente para el almacenamiento de proteínas a largo plazo. La proteína liofilizada es sustancialmente resistente a la degradación, la agregación, la oxidación, y otros procesos degenerativos mientras está en estado secado por congelación. La proteína liofilizada se puede reconstituir con agua que contiene opcionalmente un conservante bacteriostático (p. ej., alcohol bencílico) antes de la administración.

### Definiciones

55 El término "portador" incluye un diluyente, coadyuvante, excipiente, o vehículo con los cuales se administra una composición. Los portadores pueden incluir líquidos estériles, tales como, por ejemplo, agua y aceites, incluyendo aceites de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético, tal como, por ejemplo, aceite de coco, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares.

60 El término "excipiente" incluye un agente no terapéutico añadido a una composición farmacéutica para proporcionar la consistencia o el efecto estabilizante deseados. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada en polvo, glicerol, propileno, glicol, agua, etanol y similares.

El término "liofilizado" o "secado por congelación" incluye el estado de una sustancia que se ha sometido a un procedimiento de secado tal como la liofilización, donde al menos se ha eliminado un 90% de humedad.

### Antagonistas de VEGF

Un antagonista de VEGF es un compuesto capaz de bloquear o inhibir la acción biológica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), e incluye proteínas de fusión capaces de atrapar el VEGF. El antagonista de VEGF utilizado en la invención consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4 y está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308. En realizaciones específicas, el antagonista de VEGF es expresado en una línea celular de mamífero tal como una célula CHO.

El antagonista de VEGF de los métodos y formulaciones de la invención se puede preparar mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica, o que se descubra. El antagonista de VEGF está preferiblemente sustancialmente libre de proteínas contaminantes en el momento en el que se utiliza para preparar la formulación farmacéuticamente aceptable. Por "sustancialmente libre de proteínas contaminantes" se quiere significar, preferiblemente, que al menos el 90% del peso de proteína de la preparación del antagonista de una proteína de fusión específica de VEGF utilizada para elaborar una formulación es un antagonista de una proteína de fusión de VEGF, más preferiblemente al menos el 95%, muy preferiblemente al menos el 99%. La proteína de fusión está preferiblemente sustancialmente libre de agregados. "Sustancialmente libre de agregados" significa que al menos el 90% del peso de la proteína de fusión no está presente en un agregado en el momento en el que se utiliza la proteína de fusión para preparar la formulación farmacéuticamente eficaz. A menos que se establezca de otro modo, los fosfatos empleados son fosfatos de sodio y se logra un pH de tamponamiento deseado mezclando cantidades apropiadas de fosfato de sodio mono- y di-básico.

### Formulaciones Oftálmicas Líquidas Estables

En un aspecto, la invención proporciona una formulación farmacéuticamente aceptable estable que comprende un antagonista de VEGF, en donde la formulación es una formulación líquida adecuada para uso oftálmico. Preferiblemente, la formulación líquida comprende una cantidad farmacéuticamente eficaz del antagonista de VEGF. La formulación también puede comprender uno o más portadores, tampones, agentes de tonicidad, estabilizadores, y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. Un ejemplo de una formulación líquida farmacéuticamente aceptable comprende un antagonista de VEGF en una cantidad farmacéuticamente eficaz, un tampón, un co-disolvente orgánico tal como polisorbato, un agente de tonicidad tal como NaCl, y un estabilizador tal como sacarosa o trehalosa.

Por consiguiente, la invención proporciona una formulación oftálmica de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende:

1. (a) 1-100 mg/ml de un antagonista de VEGF que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;
2. (b) 0,01-5% de uno o más co-disolventes orgánicos que son uno o más de polisorbato, polietilenglicol (PEG), y propilenglicol;
3. (c) 30-150 mM de un agente de tonicidad seleccionado entre cloruro de sodio o cloruro de potasio;
4. (d) 5-40 mM de tampón fosfato de sodio; y
5. (e) 1,0-7,5% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol, pH entre aproximadamente 5,8-7,0, en donde la formulación es adecuada para la administración intravítrea.

La estabilidad se determina de numerosas maneras en momentos especificados, incluyendo determinación del pH, inspección visual del color y la apariencia, determinación del contenido de proteína total mediante métodos conocidos en la técnica, p. ej., espectroscopía de UV, y la pureza se determina, por ejemplo, mediante SDS-PAGE, HPLC de exclusión por tamaños, determinación de la actividad mediante bioanálisis, isoelectroenfoque, y cuantificación de isoaspartato. En un ejemplo de bioanálisis útil para determinar la actividad antagónica de VEGF, se utiliza una línea celular a BAF/3 VEGFR1/EPOR para determinar la unión a VEGF165 del antagonista de VEGF de la invención.

Las formulaciones líquidas se pueden almacenar en un entorno privado de oxígeno. Se pueden generar entornos privados de oxígeno almacenando las formulaciones en un gas inerte tal como, por ejemplo, nitrógeno o argón. Las formulaciones líquidas se almacenan preferiblemente a aproximadamente 5°C.

### Formulaciones Liofilizadas Oftálmicas

En un aspecto de la invención, se proporciona una formulación oftálmicamente aceptable que comprende un antagonista de VEGF, en donde la formulación es una formulación liofilizable. Las formulaciones liofilizables se pueden reconstituir en disoluciones, suspensiones, emulsiones, o cualquier otra forma adecuada para su

administración o uso. Las formulaciones liofilizables se preparan típicamente primero en forma de líquidos, después se congelan y liofilizan. El volumen líquido total antes de la liofilización puede ser menor, igual, o mayor que el volumen final reconstituido de la formulación liofilizada. El proceso de liofilización es bien conocido por los expertos normales en la técnica, e incluye típicamente la sublimación del agua de una formulación congelada en condiciones controladas.

Por consiguiente, la invención proporciona una formulación liofilizable de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende:

1. (a) 5-50 mg/ml del antagonista de VEGF, preferiblemente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml o 40 mg/ml, que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;

2. (b) 5-25 mM de tampón fosfato de sodio, pH aproximadamente 5,8-7,0;

3. (c) 0,01-0,15% de un co-disolvente orgánico, seleccionado del grupo que consiste en polisorbato, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, y una combinación de los mismos; y

4. (d) 1-10% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol; o 20-150 mM de un agente de tonicidad, preferiblemente cloruro de sodio; o 1-10% del agente estabilizante y 20-150 mM del agente de tonicidad, en donde la formulación puede ser reconstituida de modo que sea adecuada para la administración intravítrea.

Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar a un amplio intervalo de temperaturas. Las formulaciones liofilizadas se pueden almacenar por debajo de 25°C, por ejemplo, refrigeradas a 2-8°C, o a la temperatura ambiente (p. ej., aproximadamente 25°C). Preferiblemente, las formulaciones liofilizadas se almacenan por debajo de aproximadamente 25°C, más preferiblemente, a aproximadamente 4-20°C; por debajo de aproximadamente 4°C; por debajo de aproximadamente -20°C; aproximadamente -40°C; aproximadamente -70°C, o aproximadamente -80°C. La estabilidad de la formulación liofilizada se puede determinar de numerosas maneras conocidas en la técnica, por ejemplo, mediante la apariencia visual de la torta y/o mediante el contenido de humedad.

Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen típicamente para su uso mediante la adición de una disolución acuosa para disolver la formulación liofilizada. Se puede utilizar una amplia variedad de disoluciones acuosas para reconstituir una formulación liofilizada. Preferiblemente, las formulaciones liofilizadas se reconstituyen utilizando agua. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyen preferiblemente con una disolución que consiste esencialmente en agua (p. ej., USP WFI, o agua para inyectables) o agua bacteriostática (p. ej., USP WFI con alcohol bencílico al 0,9%). Sin embargo, también se pueden utilizar disoluciones que comprenden tampones y/o excipientes y/o uno o más portadores farmacéuticamente aceptables.

Las formulaciones secadas por congelación o liofilizadas se preparan típicamente a partir de líquidos, esto es, a partir de disoluciones, suspensiones, emulsiones, y similares. De este modo, el líquido que va a experimentar el secado por congelación o la liofilización comprende preferiblemente todos los componentes deseados en una formulación líquida reconstituida final. Como resultado, cuando se reconstituya una formulación secada por congelación o liofilizada dará una formulación líquida deseada tras la reconstitución.

## Ejemplos

Antes de describir los presentes métodos, se debe entender que esta invención no se limita a métodos concretos, y que las condiciones experimentales descritas, tales como los métodos y las condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología utilizada en la presente memoria tiene el propósito de describir solamente reacciones concretas, y no se pretende que sea limitante, puesto que el alcance de la presente invención solamente estará limitado por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado comúnmente comprendido por un experto en la técnica a la cual pertenece esta invención. Aunque se puede utilizar cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente memoria en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación los métodos y materiales preferidos.

### **Ejemplo 1. Estabilidad de Formulación Líquida de Trampa de VEGF de 50 mg/ml Almacenada a 5°C en Viales de Vidrio de 3 ml.**

Se almacenó una formulación líquida oftálmica que contenía Trampa de VEGF de 50 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, polisorbato 20 al 0,1%, sacarosa al 5%, y pH 6,25, a 5°C en viales de vidrio de 3 ml y se sometieron a ensayo las muestras a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. Se determinó la estabilidad mediante SE-HPLC. Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se midió la turbidez a una DO<sub>405</sub> nm; y el porcentaje de proteína recuperada y la pureza mediante HPLC de exclusión por tamaños.

**Tabla 1. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 50 mg/ml (VGFT-SS065)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez (DO <sub>405</sub> nm)	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% de Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,00	6,2	100	98,8
3	Pasa	0,00	6,2	101	98,7
6	Pasa	0,01	6,3	100	98,3
9	Pasa	0,01	6,3	101	98,3
12	Pasa	0,01	6,3	104	98,4
18	Pasa	0,01	6,3	96	98,1
24	Pasa	0,01	6,3	105	98,1

**Ejemplo 2. Estabilidad de Formulación Líquida de Trampa de VEGF de 50 mg/ml Almacenada a 6°C en Viales de Vidrio de 3 ml.**

5 Se almacenó una formulación líquida que contenía Trampa de VEGF de 50 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 10 mM, NaCl 50 mM, polietilenglicol 3350 al 3%, sacarosa al 5%, y pH 6,25, a 5°C en viales de vidrio de 3 ml y se sometieron a ensayo las muestras a los 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses. Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 2. Se determinaron la turbidez, el porcentaje de proteína recuperada y la pureza como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 2. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 50 mg/ml (VGFT-SS065)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% de Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,00	6,2	100	98,9
3	Pasa	0,00	6,1	104	98,5
6	Pasa	0,01	6,3	99	98,3
9	Pasa	0,00	6,3	102	97,6
12	Pasa	0,01	6,3	103	98,0
18	Pasa	0,00	6,3	113	97,7
24	Pasa	0,00	6,2	106	97,6

**Ejemplo 3. Estabilidad de Formulación Líquida de Trampa de VEGF de 40 mg/ml Almacenada a 5°C en Viales de Vidrio de 3 ml.**

15 Se almacenó una formulación líquida que contenía Trampa de VEGF de 40 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 10 mM, NaCl 40 mM, polisorbato 20 al 0,03%, sacarosa al 5%, y pH 6,3, a 5°C en viales de vidrio de 3 ml y se sometieron a ensayo las muestras a los 0,5, 1, 2, 3, y 4 meses. Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 3. Se determinaron la turbidez, el porcentaje de proteína recuperada y la pureza como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 3. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 40 mg/ml (VGFT-SS207)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% de Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,00	6,3	100	99,5
0,5	Pasa	0,00	6,3	99	99,4
1	Pasa	0,00	6,2	98	99,5
2	Pasa	0,00	6,2	95	99,2
3	Pasa	0,01	6,4		
4	Pasa	0,01	6,3		

**Ejemplo 4. Estabilidad de Formulación Líquida de Trampa de VEGF de 40 mg/ml Almacenada a 5°C en una jeringa de Vidrio Pre-cargada.**

5 Se almacenó una formulación líquida que contenía Trampa de VEGF de 40 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 10 mM, NaCl 40 mM, polisorbato 20 al 0,03%, sacarosa al 5%, y pH 6,3, a 5°C en una jeringa de vidrio tipo Luer pre-cargada con un émbolo recubierto con FluroTec 4023/50 y se sometieron a ensayo las muestras a los 0,5, 1, 2, 3, y 4 meses. Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 4. Se determinaron la turbidez, el porcentaje de proteína recuperada y la pureza como se ha descrito anteriormente.

10 **Tabla 4. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 40 mg/ml (VGFT-SS207)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% de Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,00	6,3	100	99,4
0,5	Pasa	0,00	6,3	100	99,3
1	Pasa	0,00	6,3	100	99,4
2	Pasa	0,00	6,3	97	99,1
3	Pasa	0,01	6,4		
4	Pasa	0,01	6,3		

**Ejemplo 5. Estabilidad de Formulación Líquida de Trampa de VEGF de 40 mg/ml Almacenada a 5°C en Viales de Vidrio de 3 ml.**

15 Se almacenó una formulación líquida que contenía Trampa de VEGF de 40 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 10 mM, NaCl 135 mM, polisorbato 20 al 0,03%, y pH 6,3, a 5°C en viales de vidrio de 3 ml y se sometieron a ensayo las muestras a los 0,5, 1, 2, 3, y 4 meses. Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 5. Se determinaron la turbidez, el porcentaje de proteína recuperada y la pureza como se ha descrito anteriormente.

20 **Tabla 5. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 40 mg/ml (VGFT-SS203)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% de Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,00	6,3	100	99,3
0,5	Pasa	0,00	6,2	87	99,2
1	Pasa	0,00	6,2	88	99,1
2	Pasa	0,00	6,3	103	99,2
3	Pasa	0,00	6,3	88	99,0
4	Pasa	0,00	6,2	85	98,9
5	Pasa	0,00	6,3	84	99,0

**Ejemplo 6. Estabilidad de Formulación Líquida de Trampa de VEGF de 40 mg/ml Almacenada a 5°C en una Jeringa de Vidrio Pre-cargada de 1 ml.**

25 Se almacenó una formulación líquida que contenía Trampa de VEGF de 40 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 10 mM, NaCl 135 mM, polisorbato 20 al 0,03%, y pH 6,3, a 5°C en una jeringa de tipo Luer de vidrio precargada de 1 ml con un émbolo recubierto con FluroTec 4023/50 y se sometieron a ensayo las muestras a los 0,5, 1, 2, 3, y 4 meses. Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 6. Se determinaron la turbidez, el porcentaje de proteína recuperada y la pureza como se ha descrito anteriormente.

30

**Tabla 6. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 40 mg/ml (VGFT-SS203)**

Meses	Apariencia Visual	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% de Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,00	6,3	100	99,2
0,5	Pasa	0,01	6,3	101	99,2
1	Pasa	0,00	6,3	101	99,2
2	Pasa	0,00	6,3	-	-
3	Pasa	0,01	6,3	102	99,1
4	Pasa	0,01	6,3	103	98,8
5	Pasa	0,00	6,3	99	98,9

**Ejemplo 7. Estabilidad de Formulación de Trampa de VEGF de 20 mg/ml Liofilizada Almacenada a 5° C en Viales de Vidrio de 3 ml y Reconstituida hasta 40 mg/ml.**

Se liofilizaron 0,8 ml de una formulación líquida que contenía trampa de VEGF de 20 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 5 mM, NaCl 20 mM, polisorbato 20 al 0,015%, sacarosa al 2,5%, y pH 6,3, en viales de vidrio de 3 ml. Las muestras se almacenaron a 5°C y se sometieron a ensayo a los 1, y 2 meses. La trampa de VEGF se reconstituyó a una concentración final de trampa de VEGF de 40 mg/ml (volumen final de 0,4 ml). Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 7 (t = tiempo en meses; \* = apariencia visual; \*\* = tiempo de reconstitución). Se determinaron la turbidez, el porcentaje de proteína recuperada y la pureza como se ha descrito anteriormente.

**Tabla 7. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 20 mg/ml Liofilizada (VGFT-SS216)**

t	Ap.* Vis.*	Tiempo de Recons.** (min)	Ap. Vis.* Líquido Reconstituido	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,6	Pasa	0,00	6,3	100	99,5
1	Pasa	0,6	Pasa	0,01	6,3	106	99,4
2	Pasa	0,4	Pasa	0,01	6,2	103	99,3

**Ejemplo 8. Estabilidad de Formulación de Trampa de VEGF de 20 mg/ml Liofilizada Almacenada a 5°C en Viales de Vidrio de 3 ml.**

Se liofilizaron 0,8 ml de una formulación líquida que contenía trampa de VEGF de 20 mg/ml (SEQ ID NO: 4), fosfato 5 mM, NaCl 67,5 mM, polisorbato 20 al 0,015%, y pH 6,3, en viales de vidrio de 3 ml. Las muestras se almacenaron a 5°C y se sometieron a ensayo a los 1, 2, y 3 meses. La trampa de VEGF se reconstituyó a una concentración final de trampa de VEGF de 40 mg/ml (volumen final de 0,4 ml). Los resultados de estabilidad se muestran en la Tabla 8 (t = tiempo en meses; \* = apariencia visual; \*\* = tiempo de reconstitución).

**Tabla 8. Estabilidad de Proteína de Trampa de VEGF de 20 mg/ml Liofilizada (VGFT-SS216)**

t	Ap. Vis.*	Tiempo de Recons.** (min)	Ap. Vis. Líquido Reconstituido	Turbidez	pH	% de Trampa de VEGF Recuperada	% Trampa de VEGF en Configuración Nativa
0	Pasa	0,7	Pasa	0,00	6,3	100	99,0
1	Pasa	0,7	Pasa	0,01	6,2	105	98,9
2	Pasa	0,4	Pasa	0,01	6,2	103	98,9

#### Aspectos Comparativos de la Descripción

Los aspectos comparativos de la descripción son los siguientes.

(1) una formulación oftálmica de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende

SEQ ID NO: 4; (a) 1-100 mg/ml de un antagonista de VEGF que comprende la secuencia de aminoácidos del

(b) 0,01-5% de uno o más co-disolventes orgánicos que son uno o más de polisorbato, polietilenglicol (PEG), y propilenglicol;

5 (c) 30-150 mM de un agente de tonicidad seleccionado entre cloruro de sodio o cloruro de potasio; y,

(d) 5-40 mM de tampón fosfato de sodio; y que comprende opcionalmente de manera adicional 1,0-7,5% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, o manitol, pH entre aproximadamente 5,8-7,0.

10 (2) Una formulación oftálmica de acuerdo con el apartado (1), que comprende aproximadamente 1-100 mg/ml, preferiblemente 10-80 mg/ml, del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, NaCl 40 mM, polisorbato al 0,03%, y sacarosa al 5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.

(3) Una formulación oftálmica de acuerdo con el apartado (2), que comprende un antagonista de VEGF a una concentración seleccionada del grupo que consiste en 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, y 80 mg/ml.

15 (4) Una formulación oftálmica de acuerdo con uno cualquiera de los apartados (1) a (3), que comprende 10-80 mg/ml de antagonista de VEGF, fosfato de sodio 10 mM, polisorbato al 0,03%, y cloruro de sodio 135 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.

(5) Una formulación liofilizable de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende

20 (a) 5-50 mg/ml del antagonista de VEGF, preferiblemente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml o 40 mg/ml que comprende la secuencia de aminoácidos del SEQ ID NO: 4;

(b) 5-25 mM de tampón fosfato de sodio, pH aproximadamente 5,8-7,0;

(c) 0,01-0,15% de un co-disolvente orgánico, seleccionado del grupo que consiste en polisorbato, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, y una combinación de los mismos; y, opcionalmente

25 (d) 1-10% de un agente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol; o 20-150 mM de un agente de tonicidad, preferiblemente cloruro de sodio; o 1 -10% del agente estabilizante y 20-150 mM del agente de tonicidad.

(6) Una formulación liofilizable de acuerdo con el apartado (5), que comprende aproximadamente 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio aproximadamente 10 mM, polisorbato aproximadamente al 0,03%, PEG aproximadamente al 0,1%, y sacarosa aproximadamente al 2,5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.

30 (7) Una formulación liofilizable de acuerdo con el apartado (5), que comprende aproximadamente 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio aproximadamente 5 mM, polisorbato aproximadamente al 0,015%, sacarosa aproximadamente al 2,5%, y que comprende adicionalmente cloruro de sodio aproximadamente 20 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.

35 (8) Una formulación liofilizable de acuerdo con el apartado (6), que comprende aproximadamente 20 mg/ml del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio aproximadamente 5 mM, polisorbato aproximadamente al 0,015%, y que comprende adicionalmente cloruro de sodio aproximadamente 67,5 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.

40 (9) Un método para producir una formulación liofilizada de un antagonista de VEGF, que comprende someter la formulación pre-liofilizada de acuerdo con los apartados (5) a (8) a liofilización para generar una formulación liofilizada.

(10) Una jeringa pre-cargada adecuada para la administración intravítrea que comprende la formulación del apartado (1).

45

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.
- 5 <120> Formulaciones Antagonistas de VEGF Adecuadas para la Administración Intravítrea
- <130> 5050A-WO
- <140> Pendiente de cesión
- 10 <141> 2007-06-14
- <150> 60/814,484
- <151> 2006-06-16
- 15 <160> 4
- <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
- 20 <211> 1453
- <212> ADN
- <213> Secuencia Artificial
- <220>
- 25 <223> Sintética
- <400>
- aagcttgggc tgcagggtcga tgcactctag aggatcgcgc cccgggagag ctogaattcg 60
- caaccaccat ggtcagctac tgggacaccg gggctcctgct gtgcgcgctg ctcagctgtc 120
- tgcttctcac aggatctagt tccggaggta gacctttcgt agagatgtac agtgaaatcc 180
- ccgaaattat acacatgact gaaggagggg agctcgtcat tccctgccgg gttacgtcac 240
- ctaacaatcac tgttacttta aaaaagtttc cacttgacac tttgatccct gatggaaaaac 300
- gcataatctg ggacagtaga aagggttcca tcatatcaaa tgcaacgtac aaagaaatag 360
- ggcttctgac ctgtgaagca acagtcaatg ggcatattgta taagacaaac tatctcacac 420
- atcgacaaac caatacaatc atagatgtgg ttctgagtcg gtctcatgga attgaactat 480
- ctgttggaga aaagcttgtc ttaaattgta cagcaagaac tgaactaaat gtggggattg 540
- acttcaactg ggaataccct tcttccaagc atcagcataa gaaacttcta aaccgagacc 600
- taaaaaccca gtctgggagt gagatgaaga aatTTTTgag caccttaact atagatggtg 660
- taaccgggag tgaccaagga ttgtcacct gtgcagcatc cagtgggctg atgaccaaga 720
- agaacagcac atttgtcagg gtccatgaaa agggcccggg ogacaaaact cacacatgcc 780
- caccgtgccc agcacctgaa ctctctgggg gaccgtcagt ctctctcttc cccccaaaac 840
- ccaaggacac cctcatgac tcccggaacc ctgaggtcac atgcgtgggt gtggacgtga 900
- gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg 960
- ccaagacaaa gccgcgggag gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca 1020
- ccgtcctgca ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1080
- ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc cgagaaccac 1140
- aggtgtacac cctgccccca tcccgggatg agctgaccaa gaaccaggtc agcctgacct 1200
- gcctggtcaa aggttcttat cccagcgaca tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc 1260
- cggagaacaa ctacaagacc acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttctct 1320
- atagcaagct caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1380
- tgatgcatga ggcctctgac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg tctccgggta 1440
- aatgagcggc cgc 1453
- 30 <210> 2
- <211> 458
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial
- 35 <220>
- <223> Sintética
- 40 <400> 2

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu  
 20 25 30  
 Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45  
 Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu  
 50 55 60  
 Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile  
 65 70 75 80  
 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu  
 85 90 95  
 Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys  
 100 105 110  
 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Val  
 115 120 125  
 Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu Val  
 130 135 140  
 Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn  
 145 150 155 160  
 Trp Glu Tyr Pro Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn Arg  
 165 170 175  
 Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser Thr  
 180 185 190  
 Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr Cys  
 195 200 205  
 Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val Arg  
 210 215 220  
 Val His Glu Lys Gly Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 245 250 255  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 260 265 270  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 275 280 285  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 290 295 300  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 305 310 315 320  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 325 330 335  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 340 345 350  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 355 360 365  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 370 375 380  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 385 390 395 400  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 405 410 415  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 420 425 430  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 435 440 445  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

<210> 3

5 <211> 1377

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

10

<223> Sintética

<400> 3

ES 2 406 764 T3

```

atggtcagct actgggacac cggggtcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60
acaggatcta gttccggaag tgataccggg agacctttcg tagagatgta cagtgaatc 120
cccgaatta tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg gggtacgtca 180
cotaacatca ctggttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa 240
cgcataatct gggacagtag aaagggcttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata 300
gggcttctga cctgtgaagc aacagtcaat ggcattttgt ataagacaaa ctatctcaca 360
catcgacaaa ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta 420
tctgttggag aaaagcttgt cttaaattgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt 480
gacttcaact gggatatacc ttcttcgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac 540
ctaaaaaccc agtctggggag tgagatgaag aaatTTTTga gcacctaac tatagatggt 600
gtaaccggga gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag 660
aagaacagca cttttgtcag ggtccatgaa aaggacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc 720
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttctctc tcccccaaaa acccaaggac 780
accctcatga tctcccgagc ccctgaggtc acatgctgtg tgggtggcgt gagccacgaa 840
gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 900
aagccgctgg aggagcagta caacagcacg taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg 960
caccaggact ggtgtaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 1020
gccccatcg agaaaacccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1080
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgctgggtc 1140
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 1200
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggao tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 1260
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag ggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat 1320
gaggctctgc acaaccacta cagcagaagg agcctctccc tgtctcggg taaatga 1377

```

<210> 4  
 <211> 458  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia Artificial

<220>  
 <223> Sintética

10 <400> 4

Met	Val	Ser	Tyr	Trp	Asp	Thr	Gly	Val	Leu	Leu	Cys	Ala	Leu	Leu	Ser
1				5					10					15	
Cys	Leu	Leu	Leu	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ser	Asp	Thr	Gly	Arg	Pro
			20					25					30		
Phe	Val	Glu	Met	Tyr	Ser	Glu	Ile	Pro	Glu	Ile	Ile	His	Met	Thr	Glu
		35					40					45			
Gly	Arg	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Cys	Arg	Val	Thr	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr
	50					55					60				
Val	Thr	Leu	Lys	Lys	Phe	Pro	Leu	Asp	Thr	Leu	Ile	Pro	Asp	Gly	Lys
	65				70					75				80	
Arg	Ile	Ile	Trp	Asp	Ser	Arg	Lys	Gly	Phe	Ile	Ile	Ser	Asn	Ala	Thr
				85					90					95	
Tyr	Lys	Glu	Ile	Gly	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Ala	Thr	Val	Asn	Gly	His
			100					105					110		
Leu	Tyr	Lys	Thr	Asn	Tyr	Leu	Thr	His	Arg	Gln	Thr	Asn	Thr	Ile	Ile
		115					120					125			

ES 2 406 764 T3

Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu  
 130 135 140  
 Lys Leu Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile  
 145 150 155 160  
 Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu  
 165 170 175  
 Val Asn Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe  
 180 185 190  
 Leu Ser Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu  
 195 200 205  
 Tyr Thr Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Asn Ser Thr  
 210 215 220  
 Phe Val Arg Val His Glu Lys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys  
 225 230 235 240  
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 245 250 255  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 260 265 270  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 275 280 285  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 290 295 300  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 305 310 315 320  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 325 330 335  
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 340 345 350  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu  
 355 360 365  
 Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 370 375 380  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 385 390 395 400  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 405 410 415  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 420 425 430  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 435 440 445  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 450 455

## REIVINDICACIONES

1. Una formulación oftálmica de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende:
- 5 (a) 1-100 mg/ml de un antagonista de VEGF que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;
- (b) 0,01-5% de uno o más co-disolventes orgánicos que son uno o más de polisorbato, polietilenglicol (PEG), y propilenglicol;
- 10 (c) 30-150 mM de un agente de tonicidad seleccionado entre cloruro de sodio o cloruro de potasio;
- (d) 5-40 mM de tampón fosfato de sodio; y
- (e) 1,0-7,5% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol, pH entre aproximadamente 5,8-7,0, en donde la formulación es adecuada para la administración intravítrea.
- 15 2. Una formulación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende aproximadamente 1-100 mg/ml, preferiblemente 10-80 mg/ml, del antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio 10 mM, NaCl 40 mM, polisorbato al 0,03%, y sacarosa al 5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 20 3. Una formulación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende antagonista de VEGF a una concentración seleccionada del grupo que consiste en 10 mg/ml, 20 mg/ml, 40 mg/ml, y 80 mg/ml.
4. Una formulación oftálmica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende 10-80 mg/ml de un antagonista de VEGF, fosfato de sodio 10 mM, polisorbato al 0,03%, y cloruro de sodio 135 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 25 5. Una formulación oftálmica de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende:
- (a) 10 mg/ml o 40 mg/ml de un antagonista de VEGF que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;
- (b) polisorbato 20 al 0,03%;
- 30 (c) cloruro de sodio aproximadamente 40 mM;
- (d) tampón fosfato de sodio 10 mM; y
- (e) sacarosa al 5%, en donde el pH de la formulación es el pH 6,2-6,3.
- 35 6. Una formulación liofilizable de un antagonista del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que comprende
- (a) 5-50 mg/ml del antagonista de VEGF, preferiblemente 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml o 40 mg/ml, que consiste en los aminoácidos 27-457 del SEQ ID NO: 4, que está glicosilado en los residuos de Asn 62, 94, 149, 222 y 308;
- 40 (b) 5-25 mM de tampón fosfato de sodio, pH aproximadamente 5,8-7,0;
- (c) 0,01-0,15% de un co-disolvente orgánico, seleccionado del grupo que consiste en polisorbato, polietilenglicol (PEG), propilenglicol, y una combinación de los mismos; y
- (d) 1-10% de un agente estabilizante seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, sorbitol, glicerol, trehalosa, y manitol; 20-150 mM de un agente de tonicidad, preferiblemente cloruro de sodio; o 1-10% de agente estabilizante y 20-150 mM de agente de tonicidad,
- 45 en donde la formulación puede ser reconstituida de manera que sea adecuada para la administración intravítrea.
7. Una formulación liofilizable de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende aproximadamente 20 mg/ml de antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio aproximadamente 10 mM, polisorbato aproximadamente al 0,03%, PEG aproximadamente al 0,1%, y sacarosa aproximadamente al 2,5%, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 50 8. Una formulación liofilizable de acuerdo con la reivindicación 6, que comprende aproximadamente 20 mg/ml de antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio aproximadamente 5 mM, polisorbato aproximadamente al 0,015%, sacarosa aproximadamente al 2,5%, y que comprende adicionalmente cloruro de sodio aproximadamente 20 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 55 9. Una formulación liofilizable de acuerdo con la reivindicación 7, que comprende aproximadamente 20 mg/ml de antagonista de VEGF, tampón fosfato de sodio aproximadamente 5 mM, polisorbato aproximadamente al 0,015%, y que comprende adicionalmente cloruro de sodio aproximadamente 67,5 mM, pH aproximadamente 6,2-6,3.
- 60 10. Un método para producir una formulación liofilizada de un antagonista de VEGF, que comprende someter la formulación pre-liofilizada de acuerdo con la reivindicación 6 a 9 a liofilización para generar una formulación liofilizada.
11. Una jeringa pre-cargada adecuada para la administración intravítrea que comprende la formulación de una

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5.