

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 906**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 9/10 (2006.01)

A61K 38/43 (2006.01)

A61K 38/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.09.2010 E 10759786 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.03.2016 EP 2480198**

54 Título: **Formulaciones de ADAMTS13 líquidas y liofilizadas estabilizadas**

30 Prioridad:

21.09.2009 US 244353 P

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

17.08.2016

73 Titular/es:

**BAXALTA GMBH (50.0%)
Thurgauerstrasse 130
8152 Glattpark, Opfikon, CH y
BAXALTA INCORPORATED (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MATTHIESSEN, H. PETER;
TURECEK, PETER L. y
SCHWARZ, HANS-PETER**

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 579 906 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de ADAMTS13 líquidas y liofilizadas estabilizadas

5 Antecedentes de la invención

Las proteínas ADAMTS (una desintegrina y metaloproteína con motivos de trombospondina tipo I) son una familia de metaloproteinasas que contienen una serie de dominios conservados, incluido un dominio catalítico dependiente de cinc, un dominio rico en cisteína, un dominio similar a desintegrina y al menos una, y en la mayoría de los casos múltiples repeticiones de trombospondina de tipo I (para una revisión, véase Nicholson *et al.*, BMC Evol Biol. 2005 Feb 4; 5 (1):11). Estas proteínas, que evolutivamente están relacionadas con las familias ADAM y MMP de las metaloproteinasas (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25–31), son enzimas secretadas que se han relacionado con una serie de enfermedades y afecciones, incluyendo púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan; 41 (1): 4–14), trastornos del tejido conjuntivo, cánceres, inflamación (Nicholson *et al.*) y paludismo grave por *plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. 2009 Mar; 5 (3): e1000349). Debido a estas asociaciones, las enzimas ADAMTS se han reconocido como potenciales objetivos terapéuticos para una serie de patologías (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb; 7 (1): 25–31).

Un miembro de la familia ADAMTS, ADAMTS13, escinde el factor de von Willebrand (vWF) entre los residuos Tyr 1605 y Met 1606. La pérdida de actividad de ADAMTS13 se ha relacionado con una serie de afecciones, tal como la PTT (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan; 41 (1): 4–14), la inflamación aguda y crónica (Chauhan *et al.*, J Exp Med. 2008 Sep 1; 205 (9): 2065–74), y, más recientemente, con paludismo grave por *plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. 2009 Mar; 5 (3): e1000349).

La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es un trastorno que se caracteriza por microangiopatía trombótica, trombocitopenia y trombosis microvascular que puede producir varios grados de isquemia e infarto tisular. Clínicamente, se diagnostica a los pacientes con PTT por síntomas tales como trombocitopenia, esquistocitos (fragmentos de eritrocitos) y niveles altos de lactato deshidrogenasa (Moake J L. Thrombotic microangiopathies. N Engl J Med. 2002; 347:589–600; Moake J L. von Willebrand factor, ADAMTS–13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. Semin Hematol. 2004; 41: 4–14; Sadler J E, Moake J L, Miyata T, George J N. Recent advances in thrombotic thrombocytopenic purpura. Hematology (Am Soc Hematol Educ Program). 2004: 407–423; Sadler J E. New concepts in von Willebrand disease. Annu Rev Med. 2005; 56: 173–191).

En 1982, Moake *et al.* descubrieron multímeros inusualmente grandes del factor de von Willebrand factor (UL–vWF) en el plasma de pacientes con PTT crónica recidivante (Moake J L, Rudy C K, Troll J H, Weinstein M J, Colannino N M, Azocar J, Seder R H, Hong S L, Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med. 1982; 307: 1432-1435). La relación entre el UL–vWF y la PTT ha ganado apoyos con hallazgos independientes de Furlan *et al.* y Tsai y Lian de que la mayoría de los pacientes que padecen PTT tienen una deficiencia de una metaloproteasa en plasma, que ahora se sabe que es ADAMTS13, que escinde el vWF (Furlan M, Robles R, Solenthaler M, Wassmer M, Sandoz P, Laemmle B. Deficient activity of von Willebrand factor–cleaving protease in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. Blood. 1997; 89:3097–3103; Tsai H M, Sussman, II, Ginsburg D, Lankhof H, Sixma J J, Nagel R L. Proteolytic cleavage of recombinant type 2A von Willebrand factor mutants R834W and R834Q: inhibition by doxycycline and by monoclonal antibody VP–1. Blood. 1997; 89:1954–1962; Tsai H M, Lian E C. Antibodies to von Willebrand factor–cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. N Engl J Med. 1998;339:1585-1594).

La proteasa ADAMTS13 es una proteína glucosilada de 190 kDa producida principalmente por el hígado (Levy G G, Nichols W C, Lian E C, Foroud T, McClintick J N, McGee B M, Yang A Y, Siemieniak D R, Stark K R, Gruppo R, Sarode R, Shurin S B, Chandrasekaran V, Stabler S P, Sabio H, Bouhassira E E, Upshaw J D, Jr., Ginsburg D, Tsai H M. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature. 2001; 413:488–494; Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor–cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. Blood. 2001; 98:1662–1666; Zheng X, Chung D, Takayama T K, Majerus E M, Sadler J E, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. J Biol Chem. 2001; 276:41059–41063; Soejima K, Mimura N, Hirashima M, Maeda H, Hamamoto T, Nakagaki T, Nozaki C. A novel human metalloprotease synthesized in the liver and secreted into the blood: possibly, the von Willebrand factor–cleaving protease; J Biochem (Tokyo). 2001; 130:475–480; Gerritsen H E, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor–cleaving protease. Blood. 2001; 98:1654–1661).

Se ha demostrado que las mutaciones en el gen de ADAMTS13 producen PTT (Levy G G, Nichols W C, Lian E C, Foroud T, McClintick J N, McGee B M, Yang A Y, Siemieniak D R, Stark K R, Gruppo R, Sarode R, Shurin S B, Chandrasekaran V, Stabler S P, Sabio H, Bouhassira E E, Upshaw J D, Jr., Ginsburg D, Tsai H M. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. Nature. 2001; 413:488–494). La PTT idiopática, a menudo producida por autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS–13, es un trastorno más habitual que se produce en adultos y niños mayores, y puede recurrir a intervalos regulares en el 11–36 % de

los pacientes (Tsai H M, Lian E C. Antibodies to von Willebrand factor–cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1998; 339:1585–1594; Furlan M, Lammle B. Deficiency of von Willebrand factor–cleaving protease in familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Baillieres Clin Haematol.* 1998; 11:509–514).

5 Los autoanticuerpos no neutralizantes también podían inhibir la actividad de ADAMTS a través de la inducción de aclaramiento de la circulación (Scheifflinger F, Knobl P, Trattner B, Plaimauer B, Mohr G, Dockal M, Dorner F, Rieger M. Nonneutralizing IgM and IgG antibodies to von Willebrand factor–cleaving protease (ADAMTS–13) in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Blood.* 2003; 102: 3241–3243). La actividad de ADAMTS13 en plasma en
10 adultos sanos varía del 50 % al 178 % (Moake J L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126:1430–1433). En la mayoría de los pacientes con PTT familiar o adquirida, la actividad de ADAMTS13 en plasma está ausente o es inferior al 5 % de lo normal. Sin tratamiento, la tasa de mortalidad supera el 90 %, pero la terapia en plasma ha reducido la mortalidad a aproximadamente el 20 % (Moake J L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. *Arch Pathol Lab Med.* 2002; 126:1430–1433).

El vWF sintetizado en megacariocitos y células endoteliales se almacena en gránulos de plaquetas y cuerpos de Weibel–Palade, respectivamente, como vWF ultragrande (UL–vWF) (Moake J L, Rudy C K, Troll J H, Weinstein M J, Colanino N M, Azocar J, Seder R H, Hong S L, Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med.* 1982; 307:1432–1435; Wagner D D, Olmsted J B, Marder V J. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel–Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol.* 1982; 95:355–360; Wagner D D, Bonfanti R. von Willebrand factor and the endothelium. *Mayo Clin Proc.* 1991; 66:621–627; Sporn L A, Marder V J, Wagner D D. von Willebrand factor released from Weibel–Palade bodies binds more avidly to extracellular matrix than that secreted constitutively. *Blood.* 1987; 69:1531–1534; Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman, II. Endothelial cell–derived high molecular weight von
25 Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158:980–985; Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman, I I. Multimeric composition of endothelial cell–derived von Willebrand factor. *Blood.* 1989; 73:2074–2076). Una vez secretados por las células endoteliales, estos multímeros de UL–vWF son escindidos por ADAMTS13 en circulación en una serie de multímeros más pequeños en sitios de escisión específicos dentro de la molécula de vWF (Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman, 11. Endothelial cell–derived high molecular weight von Willebrand factor is converted into the plasma multimer pattern by granulocyte proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 158:980–985; Dent J A, Galbusera M, Ruggeri Z M. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest.* 1991; 88:774–782; Furlan M, Robles R, Affolter D, Meyer D, Baillo P, Lammle B. Triplet structure of von Willebrand factor reflects proteolytic degradation of high molecular weight multimers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 90:7503–7507).

ADAMTS13 rompe el enlace Tyr842–Met843 en el dominio A2 central de la subunidad vWF madura y necesita cinc o calcio para su actividad (Dent J A, Berkowitz S D, Ware J, Kasper C K, Ruggeri Z M. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:6306–6310), vWF existe en forma de un "ovillo de hilo" y filamentosa, visto mediante microscopia electrónica (Slayter H, Loscalzo J, Bockenstedt P, Handin R1. Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi–elastic light scattering. *J Biol. Chem.* 1985; 260:8559–8563). Adicionalmente, la microscopia de fuerza atómica confirma que el vWF existe en una conformación globular en condiciones estáticas y un estado filamentoso no plegado tras la exposición a esfuerzos cortantes (Siedlecki C A, Lestini B J, Kottke–Marchant K K, Eppell S J, Wilson D L, Marchant R E. Shear–dependent changes in the three–dimensional structure of human von Willebrand factor. *Blood.* 1996; 88:2939–2950). Esto también se podría producir in vivo cuando un extremo del filamento de vWF se ancla a una superficie.

50 Los trombos de los pacientes con PTT consisten en poca fibrina y principalmente en cWF y plaquetas, lo que sugiere agregación plaquetaria mediada por vWF como causa de la trombosis (Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J, Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb Res.* 1985; 38:469–479). Los pacientes con PTT recidivante tienen multímeros ultragrandes en el plasma. Los multímeros de UL–vWF se acumulan en el tiempo porque la persistencia del inhibidor (ac anti–ADAMTS13) disminuye la actividad de ADAMTS13. Los multímeros de UL–vWF son hiperactivos y se despliegan como resultado de los esfuerzos cortantes que producen agregación plaquetaria, lo que da lugar a trombosis intravascular (Tsai H M. Von Willebrand factor, ADAMTS13, and thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Mol Med.* 2002; 80:639–647; Tsai H M. Deficiency of ADAMTS–13 in thrombotic and thrombocytopenic purpura. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:2038–2040; discusión 2040–2035).

60 Se cree que la presencia de multímeros de UL–vWF hiperreactivos en el plasma debido a deficiencia de ADAMTS13 se pudo asociar con un incremento del riesgo de trombosis arterial relacionado con cardiopatía coronaria.

65 De acuerdo con lo anterior, en la técnica existe la necesidad de formulaciones farmacéuticas de proteínas ADAMTS13 adecuadas para el tratamiento de varias enfermedades y afecciones asociadas con la disfunción de ADAMTS13 y del VWF. La presente invención proporciona, entre otros aspectos, formulaciones de ADAMTS13

adecuadas para su administración farmacéutica, así como procedimientos de tratamiento de sujetos con enfermedades o afecciones asociadas con la disfunción de ADAMTS13 y del VWF.

Breve resumen de la invención

5 En un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 (A13) adecuadas para su administración farmacéutica. De forma ventajosa, en algunas realizaciones, la invención proporciona formulaciones de A13 que se pueden almacenar durante periodos prolongados de tiempo sin perder actividad o se vuelvan excesivamente agregadas. En ciertas realizaciones, las formulaciones de la invención pueden almacenarse durante
10 al menos 6 meses a temperaturas de hasta al menos aproximadamente 37 °C.

15 En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0.

20 En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener el pH entre 6,0 y 8,0.

25 En un aspecto de la invención, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 (A13) recombinantes adecuadas para su administración farmacéutica. En algunas realizaciones, las formulaciones proporcionadas en el presente documento tienen altas actividades específicas y son estables durante el almacenamiento durante periodos de tiempo prolongados.

30 En otro aspecto de la invención, se proporcionan formulaciones que tienen una dimerización o agregación reducida de A13 y rA13. En ciertas realizaciones, las formulaciones proporcionadas en el presente documento retardan la formación de los dímeros de A13 y rA13 y la agregación cuando se almacenan durante periodos de tiempo prolongados. En algunas realizaciones, estas formulaciones son adecuadas para su administración farmacéutica.

35 En un aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento de tratamiento o prevención de un trastorno asociado con la formación y/o presencia de uno o más trombos y a un procedimiento de disgregación de uno o más trombos en un paciente que lo necesite. Los ejemplos de trastornos asociados con la formación y/o la presencia de uno o más trombos son púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria, PTT adquirida, trombosis arterial, infarto de miocardio agudo (IAM), derrame cerebral, septicemia, y coagulación intravascular diseminada (CID). En una realización, los procedimientos de tratamiento o prevención incluyen la administración de una formulación de A13 o rA13 proporcionada en el presente documento.

40 En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de un infarto en un paciente que los necesite. En ciertas realizaciones se proporcionan procedimientos para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con un infarto, incluyendo, sin limitación, infarto de miocardio (ataque cardíaco), embolia pulmonar, acontecimientos cerebrovasculares, tales como derrame cerebral, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (tal como gangrena), síndrome antifosfolipídico, septicemia, arteritis de células gigantes (ACG), hernia y vólvulos. En una realización, los procedimientos de tratamiento o prevención incluyen la administración de una formulación de A13 o rA13 proporcionada en el presente documento.

50 En un aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de formulación de A13 o rA13 con alta estabilidad y/o altas actividades específicas. En ciertas realizaciones, los procedimientos son útiles para formular soluciones y liofilizados, que pueden almacenarse durante periodos de tiempo prolongados a temperaturas de hasta al menos aproximadamente 37 °C sin perder las altas actividades específicas deseables para su administración farmacéutica.

55 En otro aspecto, en el presente documento se proporcionan kits para la administración farmacéutica de A13 o rA13. Los kits de la invención, en ciertas realizaciones, pueden comprender formulaciones líquidas o liofilizadas que pueden almacenarse durante periodos de tiempo prolongados.

Breve descripción de los dibujos

60 **Figura 1.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2) tampón fosfato o (3) citrato sódico. Las soluciones se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante hasta 6 meses. **(A)** La actividad FRETs-VWF73 y **(B)** la concentración de la proteína ADAMTS13, medida mediante ELISA, se determinaron en los puntos temporales indicados.

65 **Figura 2.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2)

tampón fosfato o (3) citrato sódico y se liofilizó. Las formulaciones liofilizadas se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante hasta 6 meses. Las formulaciones de ADAMTS13 se reconstituyeron con agua estéril y **(A)** la actividad FRETs–VWF73 y **(B)** la concentración de la proteína ADAMTS13, medida mediante ELISA, se determinaron en los puntos temporales indicados.

5 **Figura 3.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2) tampón fosfato o (3) citrato sódico y las muestras se cargaron directamente en una columna de filtración en gel Superose 6 o se liofilizaron y reconstituyeron con agua estéril antes de cargarse. Las formulaciones de ADAMTS13 se analizaron después mediante filtración en gel.

10 **Figura 4.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, e histidina 20 mM a pH 7,0. Las soluciones se almacenaron **(A)** 4 °C o **(B)** 37 °C durante hasta 6 meses. Las formulaciones de ADAMTS13 se analizaron después mediante filtración en gel en los puntos temporales indicados.

15 **Figura 5.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM a pH 7,0 y después se liofilizó. A continuación, las formulaciones liofilizadas se almacenaron a **(A)** 4 °C o **(B)** 37 °C durante hasta 6 meses. Las formulaciones de ADAMTS13 se reconstituyeron en agua estéril en los puntos temporales indicados y se analizaron mediante filtración en gel.

20 **Figura 6.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, e histidina 20 mM a pH 7,0 y se almacenó **(A)** en solución o **(B)** liofilizada a 4 °C o 37 °C durante hasta 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron en agua estéril y las muestras se almacenaron en solución y las formulaciones liofilizadas se caracterizaron por análisis de dispersión dinámica de luz.

25 **Figura 7.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % y tampón fosfato sódico 20 mM a pH 7,0 y se almacenó **(A)** en solución o **(B)** liofilizada a 4 °C o 37 °C durante hasta 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron en agua estéril y las muestras se almacenaron en solución y las formulaciones liofilizadas se caracterizaron por análisis de dispersión dinámica de luz.

30 **Figura 8.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % y citrato trisódico 20 mM a pH 7,0 y después se almacenó **(A)** en solución o **(B)** liofilizada a 4 °C o 37 °C durante hasta 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron en agua estéril y las muestras se almacenaron en solución y las formulaciones liofilizadas se caracterizaron por análisis de dispersión dinámica de luz.

35 **Figura 9.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM a pH 7,0 y después se liofilizó. Las muestras liofilizadas se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante 3 meses y después se reconstituyeron en agua estéril. A continuación, las muestras de ADAMTS13 se caracterizaron mediante espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier y los resultados se compararon con la muestra recién formulada y liofilizada.

40 **Figura 10.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2) tampón fosfato o (3) citrato sódico. Las soluciones se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril y la pureza de todas las muestras se determinó mediante análisis de HPLC de fase inversa.

45 **Figura 11.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2) tampón fosfato o (3) citrato sódico. Las muestras de las formulaciones en solución también se liofilizaron y se reconstituyeron con agua estéril. Las formulaciones en solución y liofilizadas reconstituidas se caracterizaron mediante análisis por calorimetría diferencial de barrido.

50 **Figura 12.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2) tampón fosfato o (3) citrato sódico. El diámetro promedio z de ADAMTS13 en las formulaciones se caracterizó mediante análisis de dispersión dinámica de luz.

55 **Figura 13.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 0 %–2 %, manitol al 0 %–3 %, calcio 0 mM–2 mM, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM a pH 7,0, y se analizó mediante filtración en gel. La cromatografía completa se muestra en el panel (A) y una sección aumentada del pico de dímero se muestra en el panel (B).

60 **Figura 14.** La ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM e histidina 20 mM a pH 5,5, 6,5, 7,5, 8,5 y 9,5. Las formulaciones se almacenaron a 4 °C o 40 °C durante 24 horas. La actividad FRETs–VWF73 y la concentración de la proteína ADAMTS13, medida mediante ELISA, se determinaron para las formulaciones al pH indicado.

60 **Figura 15.** ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM a pH 7,0 con (12B y D) y sin (12A y C) CaCl_2 2 mM. Las formulaciones líquidas se almacenaron a 25 °C (12A y B) o 37 °C (12C y D) durante tres semanas. La estabilidad enzimática se midió mediante ensayo FRETs–VWF73 en los puntos temporales indicados.

65 **Figura 16.** **(A)** ADAMTS13 recombinante se cargó en una columna de filtración en gel Superose 6 GL equilibrada con un tampón que contenía Na_2HPO_4 20 mM (pH 7,5) y NaCl 500 mM, y las especies moleculares se separaron por tamaño y forma. Se crearon tres grupos de elución correspondientes a A13 agregada (grupo 1), A13 dimérica

(grupo 2) y A13 monomérica (grupo 3). Después se determinó la actividad FRETs–VWF73 de cada grupo. **(B)** El estado oligomérico y la polidispersidad de las fracciones agrupadas se evaluó adicionalmente mediante análisis por dispersión dinámica de luz.

Figura 17. ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía 2 % de sacarosa, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM a pH 7,0, y NaCl a **(A)** 0 mM, **(B)** 30 mM, **(C)** 60 mM, **(D)** 90 mM, **(E)** 120 mM, o **(F)** 150 mM. A continuación, las composiciones de ADAMTS13 formuladas se liofilizaron y se inspeccionaron visualmente para detectar la aparición de la torta liofilizada resultante.

Figura 18. Las tortas liofilizadas de ADAMTS13 recombinante producidas a partir de las formulaciones que contienen NaCl de 0 a 150 mM se reconstituyeron en agua. Los estados de agregación de las proteínas ADAMTS13 reconstituidas se determinaron mediante análisis de filtración en gel.

Figura 19. ADAMTS13 recombinante se formuló en tampón que contenía polisorbato 80 al 0,05 %, histidina 20 mM a pH 7,0, sacarosa a una concentración de 5 mM a 20 mM, y NaCl a una concentración de 0 a 150 mM. La actividad de la proteína ADAMTS13 en cada formulación se determinó mediante ensayo FRETs–VWF73.

Figura 20. Se liofilizaron los tampones con niveles altos de sal y niveles bajos de sal. El tampón con niveles altos de sal **(A)** contenía histidina 20 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % y CaCl₂ 2 mM, mientras que el tampón con niveles bajos de sal **(B)** contenía histidina 20 mM (pH 7,0), NaCl 30 mM, sacarosa al 1 %, manitol al 3 %, polisorbato 80 al 0,05 % y CaCl₂ 2 mM. A continuación, las dos formulaciones se liofilizaron en condiciones estándar y, después, las tortas liofilizadas resultantes se inspeccionaron visualmente.

Figura 21. El estado multimérico de ADAMTS13 recombinante aislada mediante cromatografía de intercambio catiónico **(A)** antes y **(B)** después de la filtración en gel se analizó mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superose 6 GL.

Figura 22. El estado multimérico de ADAMTS13 recombinante aislada mediante cromatografía de intercambio catiónico **(A)** antes y **(B)** después de filtración en gel se analizó mediante dispersión dinámica de luz.

Figura 23. Protocolos **(A)** estándar **(B)** y extendidos para la liofilización de las formulaciones de rADAMTS13.

Figura 24. Comparación de las tortas liofilizadas de rADAMTS13 producidas mediante liofilización de **(A)** formulaciones de rA13 1 a 4 usando un protocolo de liofilización estándar, **(B)** formulaciones de rA13 1 a 4 usando un protocolo de liofilización extendido, **(C)** formulaciones de rA13 5 a 8 usando un protocolo de liofilización estándar y **(D)** formulaciones de rA13 5 a 8 usando un protocolo de liofilización extendido. Las formulaciones y los protocolos de liofilización usados para la generación de estos datos se pueden encontrar en el ejemplo 12.

Figura 24. Las tortas liofilizadas de ADAMTS13 recombinante producidas a partir de formulaciones que contienen **(A)** NaCl 30 mM o **(B)** NaCl 60 mM, según los protocolos de liofilización estándar (A LYO) o extendidos (B LYO) se reconstituyeron en agua. Los estados de agregación de las proteínas ADAMTS13 reconstituidas se determinaron mediante análisis de dispersión dinámica de luz.

Figura 25. El estado oligomérico y la polidispersidad de las composiciones ADAMTS13 formuladas con **(A)** NaCl 30 mM o **(B)** NaCl 60 mM se evaluó mediante análisis de dispersión dinámica de luz tras la liofilización con un protocolo estándar o extendido.

Figura 26. Estructura del dominio de la proteasa de escisión del factor de von Willebrand humano (VWF) ADAMTS13. El polipéptido precursor de ADAMTS13 consiste en un péptido señal (S), un propéptido (P), seguido de las características estructurales del polipéptido maduro que comprenden un dominio de metaloproteasa catalítico, un dominio similar a desintegrina, un motivo de trombospondina tipo 1 (TSP1), un dominio rico en cisteína y espaciador, 7 repeticiones adicionales de TSP1 y 2 dominios CUB. Diez sitios de N-glucosilación potenciales están marcados por círculos cerrados.

Figura 27. Diámetros hidrodinámicos de las composiciones de ADAMTS13 formuladas con diferentes agentes tamponadores determinadas mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DDL).

Figura 28. Influencia del esfuerzo cortante sobre ADAMTS13 humana recombinante determinada mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DDL).

Figura 29. Estabilidad de congelación-descongelación de ADAMTS13 humana recombinante determinada mediante actividad FRETs.

Figura 30. Estabilidad de congelación-descongelación de ADAMTS13 humana recombinante determinada mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DDL).

Figura 31. Fotoestabilidad de ADAMTS13 humana recombinante liofilizada determinada mediante SE–HPLC.

Figura 32. Fotoestabilidad de ADAMTS13 humana recombinante líquida y liofilizada determinada mediante análisis de dispersión dinámica de luz (DDL).

Figura 33. Fotoestabilidad de ADAMTS13 humana recombinante líquida y liofilizada determinada mediante actividad FRETs.

Figura 34. Influencia de calcio y cinc sobre la actividad FRETs de ADAMTS13 humana recombinante.

Figura 35. Influencia del contenido en sal y azúcar sobre el estado oligomérico de la formulación de ADAMTS13 humana recombinante liofilizada determinada mediante SE–HPLC. El contenido en azúcar de cada formulación deberá notificarse en g/l, en lugar de concentraciones molares (por ejemplo, 20 mM = 20 g/l).

Figura 36. Tortas liofilizadas producidas mediante liofilización de ADAMTS13 humana recombinante formulada de acuerdo con la tabla 15.

Figura 37. Análisis de dispersión dinámica de luz (DDL) del estado oligomérico de ADAMTS13 humana recombinante liofilizada con un programa de liofilización estándar de 3 días, almacenada durante 6 meses a **(panel superior)** 4 °C; **(panel central)** 30 °C; y **(panel inferior)** 40 °C.

Figura 38. Análisis de dispersión dinámica de luz (DDL) del estado oligomérico de una ADAMTS13 humana

recombinante liofilizada con un programa de liofilización extendido de 10 días, almacenada durante 6 meses a **(panel superior) 4 °C; (panel central) 30 °C; y (panel inferior) 40 °C.**

Figura 39. Análisis de dispersión dinámica de luz (DDL) del estado oligomérico de ADAMTS13 humana recombinante formulada a diferentes concentraciones de proteína después de almacenarse a 4 °C, 30 °C y 40 °C.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

ADAMTS13 es una metaloproteasa plasmática que escinde los multímeros del factor de von Willebrand factor (VWF) y regula por disminución su actividad en la agregación plaquetaria. La púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) es una enfermedad grave asociada con un factor de von Willebrand (VWF) inicialmente grande y hemostáticamente hiperactivo y una deficiencia intensa de ADAMTS13. Se ha desarrollado un producto candidato de ADAMTS13 recombinante como tratamiento de sustitución de la proteína recombinante para el tratamiento de la PTT producida por deficiencia de ADAMTS13 (Plaimauer y Scheiflinger, *Semin Hematol.* 2004 Jan;41(1):24–33; Plaimauer B *et al.*, *F. Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3626–32. Epub 2002 Jul 12; y Bruno K *et al.*, *J Thromb Haemost.* 2005 May;3(5):1064–73, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los fines.)

La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de formulaciones líquidas y liofilizadas de proteínas ADAMTS purificadas con una mayor estabilidad que cumplen los requisitos expuestos por la conferencia internacional de armonización de requisitos técnicos de productos farmacéuticos para uso humano (Guías de la ICH, PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2), 2005).

La actividad hemostática del VWF es altamente dependiente del tamaño de los multímeros. La metaloproteasa ADAMTS13 plasmática es la principal proteasa identificada que regula fisiológicamente el tamaño multimérico de VWF. ADAMTS13 se escinde entre Tyr 1605 y Met 1606 en el dominio A2 del VWF, lo que da los fragmentos típicos de la escisión de 176 kDa y 140 kDa y multímeros de VWF más pequeños hallados en la circulación. El gen de ADAMTS13 humana contiene 29 exones y abarca aproximadamente 37 kb en el cromosoma 9q34. El transcrito de 4,7 kb se sintetiza principalmente en las células estrelladas hepáticas, pero también en las células endoteliales vasculares y en las plaquetas, y codifica un producto de traducción primario de 147 residuos de aminoácidos. El polipéptido precursor de ADAMTS13 consiste en un péptido señal y un propéptido que termina en el extremo C en un potencial sitio de escisión para furina, seguido de la secuencia de la proteasa de escisión de VWF madura. El polipéptido maduro de ADAMTS13 (133 residuos de aminoácidos) comprende los rasgos estructurales característicos de todos los miembros de la familia ADAMTS: un dominio de la metaloproteasa de tipo reprotolisina, un dominio similar a desintegrina, una repetición central de trombospondina tipo 1 (TSP1), un dominio rico en cisteína que aloja un motivo de RGD posiblemente importante para las interacciones de la integrina, y un dominio espaciador, seguido después por una combinación única de 7 repeticiones de TSP1 consecutivas (TSP1/n.º 2–8) y dos dominios CUB (figura 26).

ADAMTS13 madura tiene una masa molecular calculada de aproximadamente 145 kDa, mientras que ADAMTS13 derivada de plasma purificada tiene una masa molecular aparente de aproximadamente 180 kDa, probablemente debido a las modificaciones postraduccionales compatibles con las presentes secuencias consenso para 10 potenciales sitios de N-glucosilación, y varios sitios de O-glucosilación y un sitio de C-manosilación en las repeticiones TSP1. La actividad proteolítica del VWF de ADAMTS13 es muy dependiente de cationes divalentes. El motivo del sitio activo en el dominio de la metaloproteasa contiene el motivo altamente conservado HEXXHXXGXXHD con tres residuos de histidina que coordinan un ion de Zn²⁺ catalítico y un sitio de unión a calcio predicho que se ha propuesto que está coordinado por Glu 83, Asp 173, Cys 281 y Asp 284. Los papeles funcionales de los dominios de ADAMTS13 se han estudiado principalmente usando sistemas de ensayo in vitro, que muestran que las regiones en el extremo N desde el dominio de metaloproteasa al dominio espaciador son cruciales para la escisión de VWF. Las repeticiones de TSP1 en el extremo C y los dominios CUB parecen ser importantes para el reconocimiento del sustrato de VWF y la unión a potenciales receptores de la superficie como CD36 sobre las células endoteliales.

Un rendimiento principal del desarrollo de la formulación de la proteína es la identificación de las rutas de inactivación y las rutas de agregación y degradación de la respectiva proteína. Se observó una inactivación completa dependiente del tiempo de la proteína ADAMTS13 humana recombinante en 1 semana a 40 °C en la formulación líquida mediante ensayo de actividad FRETs. Como se divulga en el presente documento, se descubrió que esta inactivación podría reducirse en presencia de Ca²⁺ 2 mM. A 25 °C, la actividad FRETs no disminuyó más en presencia de Ca²⁺. A 4 °C, las formulaciones líquidas de la actividad de ADAMTS13 eran estables durante 24 semanas en ausencia de Ca²⁺.

Además, se descubrió que en formulaciones liofilizadas idénticas se produjo únicamente una ligera inactivación, o ninguna, cuando la formulación se almacenó a 40 °C en ausencia de Ca²⁺. La adición de Ca²⁺ 2 mM o 4 mM no influyó sobre la estabilidad a 40 °C.

De acuerdo con lo anterior, los inventores han descubierto que la agregación dependiente del tiempo de las proteínas ADAMTS13 en la formulación líquida (por ejemplo, almacenada a 40 °C) es un contribuyente principal a la degradación y/o la pérdida de actividad enzimática. Es importante el hecho de que, como proporciona la presente invención, esta agregación se puede reducir sustancialmente mediante liofilización y/o mediante la adición de Ca^{2+} a las formulaciones líquidas. Adicionalmente, se ha descubierto que la adición de un tensioactivo no iónico (por ejemplo, 0,05 % de Tween 80) reduce la formación de agregados de ADAMTS13 en formulaciones liofilizadas. Adicionalmente, se ha descubierto que la presencia de uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar estabilizaba significativamente a ADAMTS13 durante la liofilización y ayuda a la formación de una torta liofilizada mejorada.

II. Definiciones

Como se usa en el presente documento, "ADAMTS13" o "A13" hacen referencia a una metaloproteasa de la familia ADAMTS (una desintegrina y metaloproteasa con motivos de trombospondina de tipo I) que escinde el factor de von-Willebrand (vWF) entre los residuos Tyr 1605 y Met 1606. En el contexto de la presente invención, una proteína ADAMTS13 abarca cualquier proteína ADAMTS13, por ejemplo ADAMTS13 de un mamífero tal como un primate, ser humano (NP_620594), mono, conejo, cerdo, bovino (XP_610784), roedor, ratón (NP_001001322), rata (XP_342396), hámster, jerbo, canino, felino, rana (NP_001083331), pollo (XP_415435), y derivados biológicamente activos de los mismos. También abarca proteínas ADAMTS13 mutantes y variantes que tienen actividad, como lo están fragmentos funcionales y proteínas de fusión de las proteínas ADAMTS13. Adicionalmente, las proteínas ADAMTS13 de la invención pueden comprender adicionalmente marcadores que facilitan la purificación, detección o ambos. Las proteínas ADAMTS13 descritas en el presente documento se pueden modificar adicionalmente con un resto terapéutico o un resto adecuado para imágenes *in vitro* o *in vivo*.

Las proteínas ADAMTS13 humanas incluyen, sin limitaciones, polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos del número de acceso en GenBank NP_620594 o un polipéptido procesado del mismo, por ejemplo un polipéptido en el que el péptido señal (aminoácidos 1 a 29) y/o los propéptidos (aminoácidos 30–74) se han eliminado. En la técnica se conocen muchas variantes naturales de ADAMTS13 y están abarcadas por las formulaciones de la presente invención, algunas de las cuales incluyen mutaciones seleccionadas de R7W, V88M, H96D, R102C, R193W, T196I, H234Q, A250V, R268P, W390C, R398H, Q448E, Q456H, P457L, P475S, C508Y, R528G, P618A, R625H, I673F, R692C, A732V, E740K, A900V, S903L, C908Y, C95G, G982R, C1024G, A1033T, R1095W, R1095W, R1123C, C1213Y, T1226I, G1239V y R1336W. Adicionalmente, las proteínas ADAMTS13 incluyen proteínas naturales y recombinantes que han sido mutadas, por ejemplo, mediante una o más mutaciones conservadoras en un aminoácido no esencial. Preferentemente, los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de ADAMTS13 no se mutarán. Estos incluyen, por ejemplo, residuos que se sabe o se cree que son esenciales para la unión a metales, tales como los residuos 83, 173, 224, 228, 234, 281 y 284, y los residuos hallados en el sitio activo de la enzima, por ejemplo el residuo 225. De un modo similar, en el contexto de la presente invención, las proteínas ADAMTS13 incluyen isoformas alternativas, por ejemplo isoformas que carecen de los aminoácidos 275 a 305 y/o 1.135 a 1.190 de la proteína humana de longitud completa.

Como se usa en el presente documento, la expresión "derivado biológicamente activo" se refiere a cualquier polipéptido con sustancialmente la misma función biológica que ADAMTS13. Las secuencias polipeptídicas de los derivados biológicamente activos pueden comprender deleciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tienen un impacto negativo sustancial sobre la actividad biológica del polipéptido. La actividad biológica de dichos polipéptidos se puede medir, por ejemplo, mediante la reducción o retraso de la adhesión de plaquetas al endotelio, la reducción o retraso de la agregación de plaquetas, la reducción o retraso de la formación de cadenas de plaquetas, la reducción o retraso de la formación de trombos, la reducción o retraso del crecimiento del trombo, la reducción o retraso de la oclusión de vasos, la escisión proteolítica de vWF, la disgregación de trombos o mediante escisión de un sustrato peptídico, por ejemplo un péptido FRETTS-vWF 73 (Kokame *et al.*, Br J Haematol. 2005 Apr;129((1):93–100) o una variante de los mismos.

Asimismo, las proteínas ADAMTS13 se pueden modificar adicionalmente mediante, por ejemplo, modificaciones postraduccionales (por ejemplo, glucosilación en uno o más aminoácidos seleccionados de los humanos 142, 146, 552, 579, 614, 667, 707, 828, 1235, 1354, o cualquier otro sitio natural o modificado por ingeniería) o mediante modificación química o enzimática *ex vivo*, incluyendo, sin limitaciones, glucosilación, modificación mediante polímero hidrosoluble (por ejemplo, PEGilación, sialilación, HESilación, *etc.*), marcaje y similares.

Como se usa en el presente documento, "una unidad de actividad de ADAMTS13" se define como la cantidad de actividad en 1 ml de plasma humano normal combinado, con independencia del ensayo usado. Por ejemplo, una Unidad de actividad ADAMTS13 FRETTS-vWF73 es la cantidad de actividad necesaria para escindir la misma cantidad de sustrato de FRETTS-vWF73 (Kokame *et al.*, Br J Haematol. 2005 Apr;129(1):93–100) escindido por un ml de plasma humano normal combinado.

Como se usa en el presente documento, los términos "ADAMTS13" y "derivado biológicamente activo", respectivamente, también incluyen los polipéptidos obtenidos mediante tecnología de ADN recombinante.

ADAMTS13 recombinante ("rADAMTS13"), por ejemplo ADAMTS13 humana recombinante ("r-hu-ADAMTS13"), puede producirse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Un ejemplo específico se divulga en el documento WO 02/42441, que se incorpora en el presente documento por referencia con respecto al procedimiento de producir ADAMTS13 recombinante. Esto puede incluir cualquier procedimiento conocido en la técnica para (i) la producción de ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) la introducción de ADN recombinante en células procariotas o eucariotas mediante transfección, es decir mediante electroporación o microinyección, (iii) el cultivo de dichas células transformadas, por ejemplo de un modo continuo o discontinuo, (iv) la expresión de ADAMTS13, por ejemplo constitutiva o por inducción, y (v) el aislamiento de dicha ADAMTS13, por ejemplo el medio de cultivo o mediante recolección de las células transformadas, con el fin de (vi) obtener ADAMTS13 recombinante sustancialmente purificada, por ejemplo mediante cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía por afinidad. La expresión "derivado biológicamente activo" incluye también moléculas quiméricas, tales como, por ejemplo, ADAMTS13 (o un derivado biológicamente activo de la misma) en combinación con Ig, con el fin de mejorar las propiedades biológicas/farmacológicas tales como, por ejemplo, la semivida de ADAMTS13 en el sistema de circulación de un mamífero, en particular un ser humano. La Ig podría tener también el sitio de unión a un receptor de Fc mutado opcionalmente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "trombo" se refiere a un coágulo de sangre, especialmente un coágulo de sangre que contiene plaquetas, un microtrombo y/o un émbolo. Dicho trombo puede estar unido a un vaso sanguíneo arterial o venoso o no, y puede bloquear parcial o completamente el flujo de sangre en un vaso sanguíneo arterial o venoso.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "vitamina B3", "nicotinamida", "niacinamida", "niacina", y "ácido nicotínico" se pueden usar indistintamente para hacer referencia a cualquier miembro de la familia B3 de vitaminas.

Tal como se usa en el presente documento, una "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad o dosis suficiente" se refiere a una dosis que produce los efectos para los que se administra. La dosis exacta dependerá del propósito del tratamiento y la puede determinar el experto en la técnica usando técnicas conocidas (véase, Lieberman, Pharmaceutical Dosage Forms (vols. 1 -3, 1992); Lloyd, The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding (1999); Pickar, Dosage Calculations (1999); y Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª Edición, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

Tal como se utiliza en el presente documento, una "concentración fisiológica" de sal se refiere a una concentración de sal de entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitantes de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación, cloruro sódico y cloruro potásico, acetato sódico y potásico, citrato sódico y potásico, fosfato sódico y potásico.

Tal como se utiliza en el presente documento, una "concentración subfisiológica" de sal se refiere a una concentración de sal de menos de aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En realizaciones preferidas, una concentración subfisiológica de sal es inferior a aproximadamente 80 mM de una sal farmacéutica. En otra realización preferida, una concentración subfisiológica de sal es inferior a aproximadamente 60 mM de una sal farmacéutica.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" indica un intervalo aproximado de más o menos 10 % de un valor especificado. Por ejemplo, la expresión "alrededor 20 %" abarca un intervalo de 18-22 %. Tal como se usa en el presente documento, aproximadamente también incluye la cantidad exacta. Por tanto, "aproximadamente 20 %" significa "aproximadamente 20 %" y también "20 %".

Como se usa en el presente documento, "almacenamiento" significa que una formulación no se administra a un sujeto de inmediato una vez preparada, pero se mantiene por un período de tiempo en condiciones particulares (por ejemplo, una temperatura particular, etc.) antes de su usar. Por ejemplo, una formulación líquida o liofilizada puede mantenerse durante días, semanas, meses o años, antes de la administración a un sujeto bajo temperaturas variadas, tales como frigoríficos (de 0 a 10 °C) o temperatura ambiente (por ejemplo, temperatura hasta 32 °C).

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio químicamente definido" se refiere a un medio de crecimiento sintético en el que se conocen la identidad y la concentración de todos los componentes. Los medios químicamente definidos no contienen extractos bacterianos, de levadura, animales o vegetales, aunque pueden incluir o no componentes individuales derivados de plantas o animales (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etc.). Los ejemplos no limitantes de medios químicamente definidos comercialmente disponibles incluyen varios medios EX-Cell® (SAFC Biosciences, Inc), varios medios Eagle modificados por Dulbecco (DME), (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), medio nutriente de Ham (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc), y similares. En la técnica se conocen procedimientos de preparación de medios de cultivo químicamente definidos, por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.171,825 y 6.936,441, el documento WO 2007/077217 y las solicitudes de publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio de cultivo sin oligopéptido" se refiere a un medio sin proteínas que no comprende oligopéptidos, tales como, por ejemplo, oligopéptidos derivados de un hidrolizado de proteínas. En una realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen veinte o más aminoácidos. En una realización de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen quince o más aminoácidos. En otra realización de la invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen diez o más aminoácidos. En una realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen siete o más aminoácidos. En otra realización, el medio no comprende oligopéptidos que tienen cinco o más aminoácidos. En otra realización más, el medio no comprende oligopéptidos que tienen tres o más aminoácidos. De acuerdo con una realización adicional de la presente invención, el medio no comprende oligopéptidos que tienen dos o más aminoácidos. En la técnica se conocen procedimientos de preparación de medios de cultivo sin oligopéptidos, por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.171,825 y 6.936,441, el documento WO 2007/077217 y las solicitudes de publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "medio de cultivo sin suero" se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero animal. A pesar de que muchas veces los medios sin suero son medios químicamente definidos, los medios sin suero pueden estar complementados con proteínas pequeñas o fracciones de proteínas animales o vegetales. En la técnica se conocen procedimientos de preparación de medios de cultivo sin suero, por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936,441, el documento WO 2007/077217 y las solicitudes de publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Tal como se utiliza en el presente documento, la expresión "medio de cultivo sin proteína animal" se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero, proteína o fracción proteica animal. A pesar de que muchas veces los medios de cultivo sin proteínas animales son medios químicamente definidos, los medios de cultivo sin proteínas animales pueden contener hidrolizados de plantas o de levadura. En la técnica se conocen procedimientos de preparación de medios de cultivo sin proteína animal, por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936,441, el documento WO 2007/077217 y las solicitudes de publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Un "vector de expresión" es una construcción de ácido nucleico generada de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico concreto en una célula huésped. El vector de expresión puede formar parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Normalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico que se transcribe unido operablemente a un promotor.

El término "heterólogo", cuando se usa con referencia a porciones de un ácido nucleico, indica que el ácido nucleico comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza. Por ejemplo, el ácido nucleico típicamente se produce de forma recombinante, teniendo dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestas para hacer un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. De manera similar, una proteína heteróloga indica que la proteína comprende dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

Un "promotor" se define como una matriz de secuencias de control de ácido nucleico que dirigen la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en el presente documento, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cerca del sitio de inicio de la transcripción, tales como, en el caso de un promotor de tipo polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos potenciadores o represores distales, que pueden estar localizados tanto como varios miles de pares de bases del sitio de inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. La expresión "unido operablemente" hace referencia a una unión funcional entre la secuencia de control de la expresión de ácido nucleico (tal como un promotor o matriz sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en la que la secuencia de control de la expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

III. Composiciones y formulación de ADAMTS13

En un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de las proteínas ADAMTS13 (A13) y rADAMTS13 (rA13). En una realización, las formulaciones de la invención son estables cuando se almacenan a temperaturas de hasta al menos aproximadamente 40 °C durante al menos aproximadamente 6 meses. En otras realizaciones, las formulaciones proporcionadas en el presente documento retienen una actividad de ADAMTS13 importante cuando se almacenan durante periodos prolongados de tiempo. En aún otras realizaciones, las formulaciones de la invención reducen o retrasan la dimerización, la oligomerización, y/o la agregación de una proteína ADAMTS13.

En una realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que comprenden una cantidad o dosis terapéuticamente eficaz de una proteína ADAMTS13, una concentración subfisiológica o fisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable, una concentración estabilizante de uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar, un tensioactivo no iónico, un agente tamponador que proporciona un pH neutro a la formulación y, opcionalmente, una sal de calcio y/o de cinc. En general, las formulaciones estabilizadas de A13 proporcionadas en el presente documento son adecuadas para su administración farmacéutica. En una realización preferida, la proteína A13 es ADAMTS13 humana o un derivado o fragmento biológicamente activa de la misma.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 son formulaciones líquidas. En otras realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 son formulaciones liofilizadas que se liofilizaron a partir de una formulación líquida como se proporciona en el presente documento.

En ciertas realizaciones de las formulaciones proporcionadas en el presente documento, la proteína ADAMTS13 es una ADAMTS13 humana (HA13) o ADAMTS13 recombinante humana (rhA13), o un derivado o fragmento biológicamente activo de la misma. En una realización, la secuencia de aminoácidos de hA13 es la de número de acceso en GenBank NP_620594. En otra realización, la secuencia de aminoácidos de hA13 comprende los aminoácidos 75 a 1.427 de NP_620594, una variante natural o conservadora de la misma, o un fragmento biológicamente activo de la misma.

En ciertas realizaciones, ADAMTS13 se proporciona en una dosis terapéuticamente eficaz de entre aproximadamente 0,05 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml. En otras realizaciones, ADAMTS13 está presente a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 10 mg/ml. En otras realizaciones más, ADAMTS13 está presente a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 5 mg/ml. En otra realización, ADAMTS13 está presente a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/ml y aproximadamente 2 mg/ml. En aún otras realizaciones, ADAMTS13 puede estar presente a aproximadamente 0,01 mg/ml, o a aproximadamente 0,02 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,04 mg/ml, 0,05 mg/ml, 0,06 mg/ml, 0,07 mg/ml, 0,08 mg/ml, 0,09 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml, 0,3 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,7 mg/ml, 0,8 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,0 mg/ml, 1,1 mg/ml, 1,2 mg/ml, 1,3 mg/ml, 1,4 mg/ml, 1,5 mg/ml, 1,6 mg/ml, 1,7 mg/ml, 1,8 mg/ml, 1,9 mg/ml, 2,0 mg/ml, 2,5 mg/ml, 3,0 mg/ml, 3,5 mg/ml, 4,0 mg/ml, 4,5 mg/ml, 5,0 mg/ml, 5,5 mg/ml, 6,0 mg/ml, 6,5 mg/ml, 7,0 mg/ml, 7,5 mg/ml, 8,0 mg/ml, 8,5 mg/ml, 9,0 mg/ml, 9,5 mg/ml, 10,0 mg/ml, o una concentración mayor. En una realización, la concentración de una formulación de ADAMTS13 relativamente pura se puede determinar mediante espectroscopia de (es decir, la proteína total medida en A_{280}) u otra determinación mayor (por ejemplo, ensayo de Bradford, tinción de plata, peso de un polvo liofilizado, etc.). En otras realizaciones, la concentración de ADAMTS13 se puede determinar mediante un ensayo ELISA de ADAMTS13 (por ejemplo, mg/ml de antígeno).

En aún otras realizaciones, la concentración de ADAMTS13 en una formulación proporcionada por la presente invención puede expresarse como un nivel de actividad enzimática. Por ejemplo, en una realización una formulación de ADAMTS13 puede contener entre aproximadamente 10 unidades de actividad FRET5-VWF73 y aproximadamente 10.000 unidades de actividad FRET5-VWF73 u otra unidad enzimática (UI) de A13 adecuada. En otras realizaciones, la formulación puede contener entre aproximadamente 20 unidades de actividad FRET5-VWF73 (U_{FV73}) y aproximadamente 8.000 unidades de actividad FRET5-VWF73, o entre aproximadamente 30 U_{FV73} y aproximadamente 6.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 40 U_{FV73} y aproximadamente 4.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 50 U_{FV73} y aproximadamente 3.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 75 U_{FV73} y aproximadamente 2.500 U_{FV73} , o entre aproximadamente 100 U_{FV73} y aproximadamente 2.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 200 U_{FV73} y aproximadamente 1.500 U_{FV73} , o entre aproximadamente otros intervalos en ellos. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en este documento contiene entre aproximadamente 150 y aproximadamente 600 U_{FV73} . En ciertas realizaciones, una formulación contiene aproximadamente 10 unidades de actividad FRET5-VWF73 o aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, 3.100, 3.200, 3.300, 3.400, 3.500, 3.600, 3.700, 3.800, 3.900, 4.000, 4.100, 4.200, 4.300, 4.400, 4.500, 4.600, 4.700, 4.800, 4.900, 5.000, 5.100, 5.200, 5.300, 5.400, 5.500, 5.600, 5.700, 5.800, 5.900, 6.000, 6.100, 6.200, 6.300, 6.400, 6.500, 6.600, 6.700, 6.800, 6.900, 7.000, 7.100, 7.200, 7.300, 7.400, 7.500, 7.600, 7.700, 7.800, 7.900, 8.000, 8.100, 8.200, 8.300, 8.400, 8.500, 8.600, 8.700, 8.800, 8.900, 9.000, 9.100, 9.200, 9.300, 9.400, 9.500, 9.600, 9.700, 9.800, 9.900, 10.000 o más unidades de actividad FRET5-VWF73.

Del mismo modo, en ciertas realizaciones, la concentración de ADAMTS13 se puede expresar como una actividad enzimática por unidad de volumen, por ejemplo, unidades enzimáticas de A13 por ml (UI/ml). Por ejemplo, en una realización, una formulación de ADAMTS13 puede contener entre aproximadamente 10 UI/ml y aproximadamente 10.000 UI/ml. En otras realizaciones, la formulación puede contener entre aproximadamente 20 UI/ml y aproximadamente 8.000 UI/ml, o entre aproximadamente 30 UI/ml y aproximadamente 6.000 UI/ml, o entre aproximadamente 40 UI/ml y aproximadamente 4.000 UI/ml, o entre aproximadamente 50 UI/ml y aproximadamente 3.000 UI/ml, o entre aproximadamente 75 UI/ml y aproximadamente 2.500 UI/ml, o entre aproximadamente 100 UI/ml y aproximadamente 2.000 UI/ml, o entre aproximadamente 200 UI/ml y aproximadamente 1.500 UI/ml, o entre aproximadamente otros intervalos en los mismos. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13

proporcionada en el presente documento contiene entre aproximadamente 150 UI/ml y aproximadamente 600 UI/ml. En otra realización preferida, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en el presente documento contiene entre aproximadamente 100 UI/ml y aproximadamente 1.000 UI/ml. En ciertas realizaciones, una formulación contiene aproximadamente 10 UI/ml, o aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, 3.100, 3.200, 3.300, 3.400, 3.500, 3.600, 3.700, 3.800, 3.900, 4.000, 4.100, 4.200, 4.300, 4.400, 4.500, 4.600, 4.700, 4.800, 4.900, 5.000, 5.100, 5.200, 5.300, 5.400, 5.500, 5.600, 5.700, 5.800, 5.900, 6.000, 6.100, 6.200, 6.300, 6.400, 6.500, 6.600, 6.700, 6.800, 6.900, 7.000, 7.100, 7.200, 7.300, 7.400, 7.500, 7.600, 7.700, 7.800, 7.900, 8.000, 8.100, 8.200, 8.300, 8.400, 8.500, 8.600, 8.700, 8.800, 8.900, 9.000, 9.100, 9.200, 9.300, 9.400, 9.500, 9.600, 9.700, 9.800, 9.900, 10.000 o más UI/ml.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 estabilizadas proporcionadas por la presente invención contendrán una concentración subfisiológica o fisiológica de sal, por ejemplo, entre 0 y 0 mM y aproximadamente 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, una formulación de ADAMTS13 contendrá una concentración fisiológica de sal, por ejemplo, entre aproximadamente 100 mM y aproximadamente 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, una formulación de ADAMTS13 contendrá aproximadamente 0 mM, o aproximadamente 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM, 200 mM, o más de una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, la sal es cloruro sódico o potásico.

De forma ventajosa, se ha descubierto que las formulaciones de ADAMTS13 que contienen una concentración subfisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable forman tortas liofilizadas compactas con superficies lisas. Además, se ha encontrado que las formulaciones liofilizadas con niveles bajos de sal de las proteínas ADAMTS13 reducen la agregación de proteínas en comparación con las formulaciones preparadas con concentraciones fisiológicas de sal. De acuerdo con lo anterior, en una realización preferida, la presente invención proporciona formulaciones con niveles bajos de sal de ADAMTS13 que contienen una concentración subfisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización, una formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéutica. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 80 mM de una sal farmacéutica. En otra realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal proporcionada en el presente documento contiene menos de aproximadamente 60 mM de una sal farmacéutica (es decir, sal entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 60 mM). En otra realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal contendrá entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 60 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En aún otras realizaciones, una formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal contendrá aproximadamente 0 mM, o aproximadamente 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, o 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal es una formulación liofilizada. En una realización preferida, la sal es cloruro sódico o potásico.

También se ha descubierto que la inclusión de niveles moderados (es decir, entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 %) de uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar ayuda en la preparación de tortas liofilizadas compactas con superficies lisas y ayuda a estabilizar ADAMTS13 tras la liofilización. De acuerdo con lo anterior, en una realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que contienen entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de uno o más azúcares y/o alcoholes de azúcar. Se puede usar cualquier azúcar, tales como mono-, di- o poli-sacáridos, o glucanos hidrosolubles, incluidos, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, trehalosa, pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, hidroxietilalmidón y carboximetilcelulosa-Na. En una realización particular, se usan sacarosa o trehalosa como aditivo de azúcar. Los alcoholes de azúcar se definen como un hidrocarburo que tiene entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8 átomos de carbono y un grupo hidroxilo. Los ejemplos no limitantes de alcoholes de azúcar que se pueden utilizar en las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en el presente documento incluyen, manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización, se usa manitol como aditivo del alcohol de azúcar. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 contiene tanto un aditivo de azúcar como de alcohol de azúcar.

Los azúcares o alcoholes de azúcar se pueden usar de forma individual o en combinación. En algunas realizaciones, el azúcar, alcohol de azúcar, o combinación de los mismos estarán presentes en la formulación a una concentración de entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 7 %. En una realización, el contenido de azúcar y/o alcohol de azúcar de la formulación estará entre aproximadamente 0,5 % y aproximadamente 5 %. En ciertas realizaciones, el azúcar, alcohol de azúcar, o combinación de los mismos estarán presentes a una concentración de entre aproximadamente 1 % y aproximadamente 5 %. En una realización preferida, el azúcar, alcohol de azúcar, o combinación de los mismos estarán presentes a una concentración de entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 %. En otra realización preferida, el azúcar, alcohol de azúcar, o combinación de los mismos estarán presentes a una concentración de entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 %. En ciertas

realizaciones, la concentración final puede ser de aproximadamente 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, o 7,0 % de azúcar, alcohol de azúcar, o combinación de los mismos. En realizaciones particulares, una formulación proporcionada en el presente documento puede comprender un azúcar a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5,0 % y un alcohol de azúcar a una concentración de aproximadamente 0,5 % a aproximadamente 5,0 %. Se puede usar cualquier combinación de las concentraciones de azúcar y alcohol de azúcar, por ejemplo, un azúcar presente en una concentración de aproximadamente 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, o 7,0 % y un alcohol de azúcar presente a una concentración de aproximadamente 0,5 %, 1 %, 1,5 %, 2 %, 2,5 %, 3 %, 3,5 %, 4 %, 4,5 %, 5 %, 5,5 %, 6,0 %, 6,5 %, o 7,0 %.

De forma ventajosa, también se ha descubierto que la inclusión de un tensioactivo no iónico reduce sustancialmente la agregación de las formulaciones de ADAMTS13. De acuerdo con lo anterior, en una realización, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 que contienen una concentración estabilizante de un detergente no iónico. En la técnica de la ciencia farmacéutica se conocen tensioactivos no iónicos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las formulaciones de la presente invención e incluyen, sin limitaciones, polisorbato 80 (Tween 80), polisorbato 20 (Tween 20) y varios poloxámeros o plurónicos, incluyendo Pluronic F-68, y BRIJ 35, o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el tensioactivo no iónico utilizado en las presentes formulaciones farmacéuticas es polisorbato 80. En ciertas realizaciones, un agente tensioactivo se puede usar en una formulación proporcionada en el presente documento a una concentración entre aproximadamente 0,001 % y aproximadamente 0,2 %. En una realización preferida, el tensioactivo se usa a una concentración de entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 %. En otra realización preferida, el tensioactivo se usa a una concentración de aproximadamente 0,05 %. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la formulación puede incluir un tensioactivo no iónico a una concentración de aproximadamente 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,03 %, 0,04 %, 0,05 %, 0,06 %, 0,07 %, 0,08 %, 0,09 %, 0,1 %, 0,125 %, 0,15 %, 0,175 %, 0,2 %, y similares.

Adicionalmente se descubrió que las formulaciones de ADAMTS13 se estabilizaban cuando se formulaban a un pH neutro de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 que contienen un agente tamponador adecuado para mantener la formulación a un pH neutro. En la técnica se conocen bien agentes tamponadores farmacéuticamente aceptables e incluyen, sin limitaciones, tampones de fosfato, histidina, citrato sódico, HEPES, Tris, Bicina, glicina, N-glicilglicina, acetato sódico, carbonato sódico, glicilglicina, lisina, arginina, fosfato sódico y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el tampón se selecciona de histidina, tampón fosfato, HEPES, y citrato sódico. En una realización preferida, el tampón es histidina o HEPES. En una realización específica, el búfer es histidina. En otra realización específica, el tampón es HEPES. En una realización, el pH de las formulaciones proporcionadas en el presente documento está entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,0. En ciertas realizaciones, el pH de la formulación es de aproximadamente 6,5 o aproximadamente 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 o 9,0. En una realización preferida, el pH de la formulación A13 está entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0. En una realización más preferida, el pH de la formulación A13 está entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización particular, el pH de la formulación A13 es de aproximadamente 7,0. En otra realización particular, el pH de la formulación A13 es de $7,0 \pm 0,2$.

En el presente documento también se demuestra que la inclusión de calcio estabiliza adicionalmente formulaciones de ADAMTS13. De acuerdo con lo anterior, en ciertas realizaciones, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 estabilizadas que contienen calcio entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 20 mM (por ejemplo, cloruro cálcico). En las formulaciones proporcionadas en el presente documento se puede usar cualquier sal de calcio farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitantes de la sal de calcio que se pueden usar incluyen, por ejemplo, CaCl_2 , CaCO_3 , $\text{Ca}(\text{C}_6\text{H}_11\text{O}_7)_2$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{Ca}(\text{C}_{18}\text{H}_{35}\text{O}_2)_2$, y similares. En una realización, el calcio está presente en una formulación de ADAMTS13 de la invención a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM. En otra realización, el calcio está presente en una formulación de ADAMTS13 a una concentración de entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 5 mM. En una realización preferida, el calcio está presente en una formulación de ADAMTS13 a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 4 mM. En ciertas realizaciones, la concentración de calcio es de aproximadamente 0,5 mM, o aproximadamente 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, o 20 mM. En una realización particular, la concentración de calcio es de aproximadamente 2 mM. En otra realización preferida, la concentración de calcio es de aproximadamente. En aún otra realización preferida, la concentración de calcio es de aproximadamente 4 mM.

Del mismo modo, se ha encontrado que en determinadas condiciones, la inclusión de cinc estabiliza adicionalmente una formulación de ADAMTS13 como se proporciona en el presente documento. Por ejemplo, la figura 34 muestra que la inclusión de cinc entre aproximadamente 2 μM y aproximadamente 10 μM estabilizó aún más las formulaciones de ADAMTS13 que contienen calcio. En las formulaciones proporcionadas en el presente documento se puede usar cualquier sal de cinc farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos no limitantes de la sal de cinc que se pueden utilizar incluyen, por ejemplo, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$, y $(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2\text{Zn}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, y similares. En una realización, se usa ZnSO_4 en las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en el presente documento. En algunas realizaciones, el cinc está presente en una formulación de ADAMTS13 de la invención a una concentración de aproximadamente 0,5 μM a aproximadamente 20,0 μM . En una realización preferida, el cinc está incluido en una

formulación de ADAMTS13 a una concentración de entre aproximadamente 0,5 μM a aproximadamente 10,0 μM . En ciertas realizaciones, la concentración de cinc es de aproximadamente 0,5 μM , o aproximadamente 1 μM , 2 μM , 3 μM , 4 μM , 5 μM , 6 μM , 7 μM , 8 μM , 9 μM , o 10 μM .

5 En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en el presente documento pueden comprender adicionalmente uno o más excipientes, vehículos, y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Además, las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden comprender adicionalmente otros medicamentos, vehículos, adyuvantes, diluyentes, mejoradores de la permeación tisular, solubilizantes, y similares. Los expertos en la técnica conocen procedimientos para preparar composiciones y formulaciones para su
10 administración farmacéutica (véase, por ejemplo, REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18^a ED., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

En una realización, las formulaciones de ADAMTS proporcionadas en el presente documento tendrán una tonicidad de entre aproximadamente 200 mOsmol/l y aproximadamente 400 mOsmol/l, o en un intervalo de entre
15 aproximadamente 250 y aproximadamente 350 mOsmol/l. En ciertas realizaciones, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en el presente documento tendrá un tonicidad de, por ejemplo, aproximadamente 200 mOsmol/l, o de aproximadamente 210 mOsmol/l, 220 mOsmol/l, 230 mOsmol/l, 240 mOsmol/l, 250 mOsmol/l, 260 mOsmol/l, 270 mOsmol/l, 280 mOsmol/l, 290 mOsmol/l, 300 mOsmol/l, 310 mOsmol/l, 320 mOsmol/l, 330 mOsmol/l, 340 mOsmol/l, 350 mOsmol/l, 360 mOsmol/l, 370 mOsmol/l, 380 mOsmol/l, 390 mOsmol/l, o 400 mOsmol/l.

Los ejemplos de agentes de tonicidad que pueden usarse en las formulaciones proporcionadas en el presente documento incluyen, sin limitaciones, cloruro sódico, dextrosa, sacarosa, xilitol, fructosa, glicerol, sorbitol, manitol, trehalosa, cloruro potásico, manosa, cloruro cálcico, cloruro de magnesio, otras sales inorgánicas, otros azúcares, otros alcoholes de azúcar, y combinaciones de los mismos. En ciertas realizaciones, una formulación de ADAMTS13
25 puede comprender al menos un agente de tonicidad o por lo menos dos, tres, cuatro, cinco, o más agentes de tonicidad.

Las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en el presente documento pueden formularse para la administración a través de procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa, por ejemplo, como un
30 bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En ciertas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en el presente documento se pueden administrar bien por vía sistémica o por vía local. La administración sistémica incluye, sin limitaciones: vías de administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, sublingual o rectal. La administración local incluye, sin
35 limitaciones: las vías de administración tópica, subcutánea, intramuscular, e intraperitoneal.

En un aspecto de la invención, se proporciona una composición de la proteína ADAMTS13 monomérica. En ciertas realizaciones, la composición de la proteína ADAMTS13 monomérica carece sustancialmente de ADAMTS13 agregada, ADAMTS13 dimérica, o ambas, ADAMTS13 agregada y dimérica. In En algunas realizaciones, la
40 composición monomérica tiene una actividad específica más alta que una composición similar que contiene la proteína ADAMTS13 agregada y/o dimérica. En una realización particular, la composición de ADAMTS13 monomérica se produce mediante un procedimiento que comprende filtración en gel o cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización particular, la proteína ADAMTS13 es una ADAMTS13 humana (hA13) o ADAMTS13 recombinante humana (rhA13), o un derivado o fragmento biológicamente activo de la misma.

En otro aspecto, se proporcionan formulaciones de las composiciones de ADAMTS13 monoméricas. En una realización, la formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable de la proteína ADAMTS13 monomérica. En ciertas realizaciones, la formulación carece sustancialmente de ADAMTS13 agregada, ADAMTS13 dimérica, o
50 ambas, ADAMTS13 agregada y dimérica. En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 monomérica tienen una actividad específica más alta que formulaciones similares que contienen la proteína ADAMTS13 agregada y/o dimérica. En una realización particular, la formulación de ADAMTS13 monomérica se produce mediante un procedimiento que comprende filtración en gel o cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización particular, la proteína ADAMTS13 en la formulación es una ADAMTS13 humana (hA13) o ADAMTS13 recombinante humana (rhA13), o un derivado o fragmento biológicamente activo de la misma. En ciertas
55 realizaciones, la proteína ADAMTS13 monomérica está formulada de acuerdo con una formulación proporcionada en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que comprenden de aproximadamente 0,0.5 mg/ml a aproximadamente 10,0 mg/ml de proteína ADAMTS13, de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable, un azúcar y/o alcohol de azúcar, un agente tensoactivo no iónico, y un agente tamponador. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden comprender
60 adicionalmente calcio y/o cinc. En otras realizaciones, la formulación puede tamponarse a un pH de entre aproximadamente 6,5 y 9,0. En ciertas realizaciones, las formulaciones de A13 son adecuadas para su administración farmacéutica.

65 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13, que

comprende: De 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

5 En una realización, se proporciona una formulación de ADAMTS13 estabilizada que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5 contiene entre aproximadamente 50 unidades por ml y aproximadamente 1.000 unidades por ml de actividad de ADAMTS13. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

15 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 estabilizada que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 1 mM a 10 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

20 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 estabilizadas que comprenden de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, el alcohol de azúcar y/o azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, la mezcla de sacarosa y manitol consiste en aproximadamente sacarosa al 1 % y aproximadamente manitol al 3 %. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

35 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 estabilizadas que comprenden de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; entre aproximadamente 0,01 % y 0,1 % de un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, BRIJ 35, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, el tensioactivo es polisorbato 80. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

45 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 estabilizada que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, en el que el agente tamponador es histidina o HEPES. En ciertas realizaciones, el agente tamponador está presente a una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, preferentemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

55 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 estabilizada que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y aproximadamente 20 μ M. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico.

65 En una realización preferida, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 estabilizada que comprende de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; NaCl de 0 a 60 mM; calcio de 2 mM a 4 mM; manitol del

2 % al 4 %; sacarosa del 0,5 % al 2 %; polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; e histidina de 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2). En una realización, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 µM y aproximadamente 20 µM.

5 En otra realización, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 de niveles bajos de sal que comprenden de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 de niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

15 En una realización, se proporciona una formulación de ADAMTS13 de niveles bajos de sal estabilizada que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5 contiene entre aproximadamente 50 unidades por ml y aproximadamente 1.000 unidades por ml de actividad de ADAMTS13. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

20 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 con niveles bajos de sal estabilizada que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 1 mM a 10 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

30 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 de niveles bajos de sal estabilizadas que comprenden de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, el alcohol de azúcar y/o azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, la mezcla de sacarosa y manitol consiste en aproximadamente sacarosa al 1 % y aproximadamente manitol al 3 %. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

45 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 de niveles bajos de sal estabilizadas que comprenden de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; entre aproximadamente 0,01 % y 0,1 % de un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, BRIJ 35, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, el tensioactivo es polisorbato 80. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 de niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

55 En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 de niveles bajos de sal estabilizadas que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, en el que el agente tamponador es histidina o HEPES. En ciertas realizaciones, el agente tamponador está presente a una concentración entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, preferentemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 de niveles bajos de sal estabilizadas que comprenden 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio de 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente tamponador para mantener un pH de entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En ciertas realizaciones, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y aproximadamente 20 μ M. En ciertas realizaciones, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM, preferentemente calcio entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro sódico o cloruro potásico. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

En una realización preferida, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 de niveles bajos de sal estabilizada que comprende de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente NaCl 100 mM; calcio de 2 mM a 4 mM; manitol del 2 % al 4 %; sacarosa del 0,5 % al 2 %; polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; e histidina de 10 mM a 50 mM (pH 7,0 \pm 0,2). En una realización, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y aproximadamente 20 μ M. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 de niveles bajos de sal es una formulación liofilizada.

En una realización, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 \pm 0,2.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y 20 μ M.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH 7,0 \pm 0,2).

En una realización, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) de niveles

bajos de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 100 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μM y 20 μM .

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

En una realización relacionada, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre

aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y 20 μ M.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

En una realización relacionada, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-wWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 100 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador

es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

5 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

10 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

IV. Estabilidad de las formulaciones de ADAMTS13

15 En ciertas realizaciones, las formulaciones ADAMTS13 proporcionadas en el presente documento pueden ser estables durante un período prolongado de tiempo cuando se almacena a una temperatura determinada, por ejemplo, a aproximadamente -80°C , -20°C , 4°C , 18°C , temperatura ambiente, 25°C , 30°C , 35°C , 37°C , 40°C , o superior. En algunas realizaciones, un período prolongado de tiempo es de al menos aproximadamente una semana. En otras realizaciones, un período prolongado de tiempo puede comprender al menos aproximadamente 2
20 semanas, o al menos aproximadamente 3 semanas, o al menos aproximadamente 1 mes, o al menos aproximadamente 2 meses, o al menos aproximadamente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 16, o 18 meses. En aún otras realizaciones, las formulaciones de la invención pueden ser estables durante al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 o más años.

25 En ciertas realizaciones de la invención, la estabilidad se puede medir mediante una o más propiedades biofísicas y/o enzimáticas de la proteína A13 o rA13 en la formulación. Los ejemplos no limitantes de propiedades que pueden usarse para evaluar la estabilidad incluyen la actividad enzimática, la actividad específica, el grado de mono- o poli-dispersidad de la proteína, el grado de dimerización, oligomerización, o agregación de la proteína, el grado de
30 desdoblamiento de la proteína.

Un experto en la técnica conocerá fácilmente otras medidas de estabilidad que pueden usarse para evaluar la estabilidad de una formulación de ADAMTS13, incluyendo, sin limitaciones, filtración en gel, dispersión dinámica o
35 estática de luz, ultracentrifugación analítica, RP-HPLC, cromatografía de intercambio iónico, espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier, calorimetría, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopia de RMN, espectrometría de masas, dispersión de rayos x de ángulo pequeño (SAX), electroforesis en gel de poli(acrilamida), y similares.

40 En una realización, la presente invención proporciona formulaciones de A13 o rA13 que retienen al menos aproximadamente 50 % de la actividad total de ADAMTS13 después de almacenamiento durante un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, se proporciona una formulación que retiene al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de la actividad total de ADAMTS13 después del almacenamiento durante un período prolongado de tiempo.

45 En otra realización, se proporcionan formulaciones que mantienen al menos aproximadamente el 50 % de la actividad específica de ADAMTS13 después de almacenar durante un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, se proporciona una formulación que retiene al menos aproximadamente 60 %, o al menos aproximadamente 70 %, 80 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % de la actividad específica de ADAMTS13 después del almacenamiento durante un período prolongado de tiempo.
50

En otras realizaciones, las formulaciones de la invención poseerán una actividad específica de al menos aproximadamente 600 U de la actividad FRETS-VWF73 por mg de la proteína ADAMTS13 después del almacenamiento durante un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, una formulación proporcionada en el presente documento tendrá al menos aproximadamente 700 U/mg de A13, o al menos aproximadamente 800
55 U/mg, 900 U/mg, 1.000 U/mg, 1.100 U/mg, 1.200 U/mg, 1.300 U/mg, 1.400 U/mg, 1.500 U/mg, o mayor actividad específica después de un almacenamiento durante un período prolongado de tiempo.

60 En una realización, una formulación de A13 proporcionada en el presente documento tendrá una polidispersidad, tal como se determina mediante análisis de dispersión dinámica de luz, de menos de aproximadamente 50 % después de almacenamiento durante un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, una formulación de A13 tendrá una polidispersidad de menos de aproximadamente 45 %, o menos de aproximadamente 40 %, 35 %, 30 %, 25 %, 20 %, 15 %, 10 %, 5 % de polidispersidad, medida mediante análisis de dispersión dinámica de luz después del almacenamiento durante un periodo de tiempo prolongado.

65 En otra realización de la invención, una formulación de A13 proporcionada en el presente documento tendrá una población de proteína A13 que consiste en al menos aproximadamente 50 % de monómeros de A13 después del

almacenamiento durante un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, una formulación puede tener al menos aproximadamente 60 % de monómeros de A13, o al menos aproximadamente 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un mayor porcentaje de monómeros de A13.

5 V. Expresión y purificación de ADAMTS13

En ciertas realizaciones, una proteína ADAMTS13 usada en las formulaciones proporcionadas en el presente documento puede expresarse, producirse, o purificarse de acuerdo con un procedimiento divulgado previamente, por ejemplo, en los documentos US 6.926,894, US 2005/0266528, US 2007/0015703, la solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 12/437.384, la solicitud de patente de EE.UU. n.º de serie 12/847.999, y el documento WO 2002/42441, todos los cuales se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

A. Células huésped y vectores

15 Se pueden producir proteínas ADAMTS recombinantes mediante expresión en cualquier sistema huésped procarionta o eucariota adecuado. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, sin limitaciones, células de mamífero, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep, y HepG2; células de insecto, por ejemplo, células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, por ejemplo células de *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, las proteínas ADAMTS se pueden expresar en células bacterianas, células de levadura, células de insecto, células de ave, células de mamífero, y similares. Por ejemplo, en una línea humana de células, una línea celular de hámster, o una línea celular murina. En una realización particular, la línea celular es una línea celular CHO, BHK, o HEK. En una realización preferida, la línea celular es una línea celular CHO.

25 En una realización, las células pueden ser cualquier célula de mamífero que se pueda cultivar, preferentemente en un proceso de fabricación (es decir, al menos 1 litro), para producir una proteína ADAMTS deseada tal como ADAMTS13. Los ejemplos incluyen la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.*, 36:59 (1977)); células de riñón de hámster neonato (BHK, ATCC CCL 10); células de ovarios de hámster chino/-DHFR, tal como el subclon DUKX-B11 (CHO, Uriaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243 - -251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma cervical humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humano (Hep G2, HB 8065); tumor de mama de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44 - -68 (1982)); células MRC 5; células FS4 y la línea de hepatoma humano (Hep G2). Preferentemente, la línea celular es una línea celular de roedor, especialmente una línea de células de hámster tales como CHO o BHK.

40 Se puede usar una amplia variedad de vectores para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) y se pueden seleccionar de vectores de expresión eucariotas y procariontas. En ciertas realizaciones, se contempla un vector plasmídico para su uso en la expresión una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13). En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicón y de control que derivan de especies compatibles con la célula huésped en relación con estos huéspedes. El vector puede llevar un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar selección fenotípica en células transformadas. El plásmido comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) operable ligada a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor.

50 Un procedimiento preferido de preparación de clones de células CHO estables que expresan una proteína ADAMTS recombinante es como sigue. Una línea celular CHO deficiente en DHFR DUKX-B11 se transfecta con un vector de expresión de DHFR para permitir la expresión de la proteína recombinante relevante, esencialmente como se describe en la patente de Estados Unidos número 5.250.421 (Kaufman *et al.*, Genetics Institute, Inc.). La selección se lleva a cabo mediante crecimiento en medio sin de hipoxantina/timidina (HT) y amplificación de la región relevante que codifica la expresión de la proteína ADAMTS recombinante y el gen DHFR se consigue mediante propagación de las células en concentraciones crecientes de metotrexato. Cuando sea adecuado, las líneas celulares CHO pueden adaptarse para el crecimiento en medio sin suero y/o proteína, esencialmente como se describe en el documento US 6.100.061 (Reiter *et al.*, Immuno Aktiengesellschaft).

60 En otra realización preferida, las células HEK293 estables se preparan mediante transfección con una construcción que contiene un marcador de selección de higromicina y selección de transformantes mediante resistencia a antibióticos.

65 La capacidad de ciertos virus para infectar las células o entrar en las células a través de endocitosis mediada por receptor, y para integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar genes víricos de forma estable y eficiente los ha convertido en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos foráneos en células (por ejemplo, células de mamífero). De acuerdo con lo anterior, en ciertas realizaciones se usa un vector vírico para

introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para la expresión. El vector vírico comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) operable unida a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor. Como alternativa, el vector vírico puede no contener una secuencia de control y en su lugar depender de una

5 secuencia de control dentro de la célula huésped para dirigir la expresión de la proteína ADAMTS. Los ejemplos de vectores víricos no limitantes que se pueden utilizar para liberar un ácido nucleico incluyen vectores adenovíricos, vectores AAV, y vectores retrovíricos.

En una realización, un vector de expresión de adenovirus incluye las construcciones que contienen secuencias de adenovirus suficientes para apoyar el empaquetamiento de la construcción y, en última instancia, expresar una construcción de ADAMTS que se ha clonado en el interior. Los vectores adenovíricos permiten la introducción de secuencias extrañas de hasta 7 kb (Grunhaus *et al.*, Seminar in Virology, 200(2):535–546, 1992)).

10

En otra realización, se puede usar un virus adenoasociado (AAV) para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para la expresión. Los sistemas de AAV se han descrito anteriormente y en general bien conocidos en la técnica (Kelleher y Vos, Biotechniques, 17(6):1110–7, 1994; Cotten *et al.*, Proc Natl Acad Sci USA, 89(13): 6094–6098, 1992; Curiel, Nat Immun, 13(2–3):141–64, 1994; Muzyczka, Curr Top Microbiol Immunol, 158:97–129, 1992). Detalles relativos a la generación y al uso de vectores de rAAV se describen en, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos n.º 5.139.941 y 4.797.368, cada una de ellas incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

15

20

En una realización, se puede usar un vector de expresión retrovírico para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para la expresión. Estos sistemas se han descrito anteriormente y en general son bien conocidos en la técnica (Mann *et al.*, Cell, 33:153–159, 1983; Nicolas y Rubinstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez y Denhardt, eds., Stoneham: Butterworth, pp. 494–513, 1988; Temin, In: Gene Transfer, Kucherlapati (ed.), New York: Plenum Press, pp. 149–188, 1986). En una realización específica, el vector retrovírico es un vector lentivírico (véase, por ejemplo, Naldini *et al.*, Science, 272(5259):263–267, 1996; Zufferey *et al.*, Nat Biotechnol, 15(9):871–875, 1997; Blomer *et al.*, J Virol., 71(9):6641–6649, 1997; las patentes de Estados Unidos n.º 6.013.516 y 5.994.136).

25

30

Los ejemplos no limitantes de vectores para expresión procariota incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD, etc., en los que los promotores utilizados en los vectores de expresión procariotas incluyen lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Los ejemplos de vectores para expresión eucariota incluyen: (i) para expresión en levaduras, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, utilizando promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insecto, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., utilizando promotores tales como PH, p10, MT, Ac5, OpIE2, gp64, polh, etc., y (iii) para expresión en células de mamífero, vectores tales como pSVL, pCMV, pRc/RSV, pcDNA3, pBPV, etc., y vectores derivados de sistemas víricos tales como el virus de vacuna, virus adenoasociados, virus del herpes, retrovirus, etc., utilizando promotores tales como CMV, SV40, EF–1, UbC, RSV, ADV, BPV y β -actina.

35

40

En ciertas realizaciones, la expresión de cultivo celular de ADAMTS13 puede comprender el uso de un microvehículo. La presente invención proporciona, entre otros aspectos, procedimientos de expresión de la proteína ADAMTS a gran escala. En algunas realizaciones, los cultivos celulares de las realizaciones se pueden realizar en grandes biorreactores en condiciones adecuadas para proporcionar áreas de superficie de cultivo específicas de volumen alto para lograr altas densidades de células y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar tales condiciones de crecimiento es el uso de microvehículos de cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. En otra realización, estos requisitos de crecimiento se cumplen mediante el uso de un cultivo celular en suspensión.

45

50 B. Procedimientos de cultivo

En ciertas realizaciones, la expresión de ADAMTS13 puede comprender el uso de un sistema de cultivo celular funcionando en un modo de operación continuo o discontinuo. Por ejemplo, cuando se utilizan cultivos celulares en discontinuo, pueden manejarse en modo de un lote solo, alimentación del lote o lotes repetidos. Asimismo, los cultivos celulares continuos pueden funcionar en modo de, por ejemplo, perfusión, turbidostato o quimiostato. El cultivo celular discontinuo o continuo se puede realizar en condiciones de suspensión o adherencia. Cuando funciona en condiciones de suspensión, las células estarán suspendidas libremente y se mezclarán con el medio de cultivo. Como alternativa, en condiciones de adherencia, las células se unirán a una fase sólida, por ejemplo, un microvehículo, un microvehículo poroso, un vehículo de disco, un cartucho de cerámica, una fibra hueca, una lámina plana, una matriz de gel, y similares.

55

60

Un cultivo discontinuo normalmente es un cultivo celular a gran escala en el que se cultiva un inóculo de células hasta una densidad máxima en un tanque o fermentador, y se recolecta y se procesa como un solo lote. Un cultivo discontinuo alimentado normalmente es un cultivo discontinuo que se suministra con nutrientes frescos (por ejemplo, sustratos limitantes del crecimiento) o aditivos (por ejemplo, precursores de productos). La solución de alimentación normalmente está muy concentrada para evitar la dilución del biorreactor. En un cultivo discontinuo repetido, las

65

células se introducen en un medio de cultivo y se cultivan hasta una densidad celular deseada. Para evitar la aparición de una fase de declive y la muerte celular, el cultivo se diluye después con medio de crecimiento completo antes de que las células alcancen su máxima concentración. La cantidad y la frecuencia de la dilución varían ampliamente y dependen de las características de crecimiento de la línea celular y la comodidad del proceso de cultivo. El proceso se puede repetir tantas veces como sea necesario y, a menos que las células y el medio se descarten en subcultivo, el volumen del cultivo aumentará de forma escalonada a medida que se realiza cada dilución. El volumen creciente puede manipularse con un reactor de tamaño suficiente para permitir diluciones dentro del recipiente o dividiendo el cultivo diluido en varios recipientes. La justificación de este tipo de cultivo es mantener las células en un estado de crecimiento exponencial. Los subcultivos en serie se caracterizan porque el volumen del cultivo está siempre creciendo de forma gradual, puede haber muchas recolecciones, las células continúan creciendo y el proceso puede continuar durante todo el tiempo que se desee. En ciertas realizaciones se puede recuperar una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) después de recolectar el sobrenadante de un cultivo discontinuo.

Un cultivo continuo puede ser un cultivo en suspensión que se suministra continuamente con nutrientes mediante el flujo de entrada de medio fresco, en el que el volumen del cultivo generalmente se mantiene constante mediante la eliminación concomitante del medio gastado. En los procedimientos en quimiostato y turbidostato, el medio extraído contiene células. Por lo tanto, las células que quedan en el recipiente de cultivo de células deben crecer para mantener un estado estacionario. En el procedimiento en quimiostato, la velocidad de crecimiento normalmente se controla mediante el control de la tasa de dilución, es decir, la velocidad a la que se añade medio fresco. La velocidad de crecimiento de las células en el cultivo se puede controlar, por ejemplo, a una velocidad de crecimiento submáxima, mediante alteración de la tasa de dilución. Por el contrario, en el procedimiento de turbidostato, la tasa de dilución se ajusta para permitir la máxima velocidad de crecimiento que las células pueden alcanzar en las condiciones operativas dadas, tales como el pH y la temperatura.

En un cultivo de perfusión, el medio extraído no tiene células, que son retenidas en el recipiente de cultivo, por ejemplo, mediante filtración o mediante procedimientos centrífugos que conducen a la reintroducción de las células en el cultivo. Sin embargo, normalmente, las membranas utilizadas para la filtración no conservan el 100 % de las células y, por lo tanto, se elimina una proporción cuando se extrae el medio. Puede que no sea crucial realizar cultivos de perfusión a velocidades de crecimiento muy altas, ya que la mayoría de las células son retenidas en el recipiente de cultivo.

El sistema de reactor de tanque agitado puede usarse para cultivos celulares discontinuos y continuos realizados en los modos de suspensión o adherentes. En general, el sistema de reactor de tanque agitado puede funcionar como cualquier reactor de tanque agitado convencional con cualquier tipo de agitador tal como Rushton, de perfil hidráulico, de paso variable o marino.

C. Medios de cultivo

ADAMTS13 se puede expresar en medios de cultivo que carecen de proteína añadida de forma exógena. "Medio de cultivo sin proteínas" y términos relacionados hacen referencia al medio de cultivo que carece de proteínas procedentes de una fuente exógena a o distinta de las células en el cultivo, que desprenden proteínas de forma natural durante el crecimiento. En una realización, una proteína ADAMTS13 se puede expresar en un medio que carece de proteínas añadidas de forma exógena (es decir, sin proteínas) y complementado con cinc, calcio, y/o nicotinamida (vitamina B3). En ciertas realizaciones, el medio de cultivo sin proteínas contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg /l y 30 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los ejemplos de medios de cultivo sin proteína se enseñan en las patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, y la solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

En la técnica se conocen procedimientos de preparación de medios de cultivo sin proteína animal y químicamente definidos, por ejemplo en las Patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217 y las solicitudes de publicación de patente de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines. En una realización, el medio de cultivo usado para expresar una proteína ADAMTS13 es medio de cultivo sin proteína animal y sin oligopéptidos. En determinadas realizaciones, el medio de cultivo puede estar químicamente definido. En ciertas realizaciones, los medios de cultivo pueden contener al menos una poliamina a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/l a aproximadamente 10 mg/l.

La proteína ADAMTS13 también se puede expresar en medios de cultivo que carecen de proteína añadida de forma exógena. En una realización, ADAMTS13 se expresa en un medio de cultivo que carece de oligopéptidos añadidos de forma exógena (es decir, sin proteínas) y complementado con cinc, calcio, y/o nicotinamida (vitamina B3). En ciertas realizaciones, el medio de cultivo sin oligopéptido contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg /l y 30 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l. En

una realización específica, la poliamina es putrescina. Los ejemplos de medios de cultivo sin oligopéptido se enseñan en las patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, y la solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

La proteína ADAMTS13 también se puede expresar en medios de cultivo que carecen de suero. En una realización, ADAMTS13 se expresa en un medio de cultivo que carece de suero añadido de forma exógena (es decir, sin suero) y complementado con cinc, calcio, y/o nicotinamida (vitamina B3). En ciertas realizaciones, el medio de cultivo sin suero contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 30 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los ejemplos de medios de cultivo sin suero se enseñan en las patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, y la solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

La proteína ADAMTS13 también se puede expresar en medios de cultivo que carecen de proteínas animales. En una realización, ADAMTS13 se expresa en un medio de cultivo que carece de proteínas o polipéptidos animales añadidos de forma exógena (es decir, sin proteínas animales) y complementado con cinc, calcio, y/o nicotinamida (vitamina B3). En ciertas realizaciones, el medio de cultivo sin proteínas animales contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 30 mg/l, o a o aproximadamente entre 2 mg/l y 8 mg/l. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los ejemplos de medios de cultivo sin proteína animal se enseñan en las patentes de Estados Unidos n.º 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217, las publicaciones de solicitud de patentes de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, y la solicitud de patente de Estados Unidos de n.º de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines.

Las proteínas ADAMTS13 también se pueden expresar en medios de cultivo complementados con calcio, cinc y/o vitamina B3 adicionales, como se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 12/847.999, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines. En ciertas realizaciones, el medio puede ser un medio sin proteínas animales, sin oligopéptidos o químicamente definido. En ciertas realizaciones, el medio sin proteínas animales o sin oligopéptidos se prepara como se enseña en las patentes de Estados Unidos números 6.171.825 y 6.936.441, el documento WO 2007/077217 y las publicaciones de la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines, ambas incorporadas en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines, y complementados con calcio, cinc y/o vitamina B3 adicional. En una realización específica, el medio de cultivo químicamente definido puede ser similar a un medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), que se ha complementado con calcio, cinc, y/o vitamina B3 adicional, con el fin de aumentar la actividad específica de una proteína ADAMTS expresada en una célula cultivada en el medio. En aún otras realizaciones, el medio de cultivo carece de componentes animales. En otra realización, el medio de cultivo contiene proteína, por ejemplo, proteínas animales procedentes de suero tal como suero bovino fetal. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes añadidas exógenamente. En otra realización, las proteínas proceden de un animal que se ha certificado que carece de patógenos.

D. Purificación de ADAMTS13

En la técnica se conocen bien procedimientos para la purificación de ADAMTS13 nativa de plasma combinado. Asimismo, en la técnica también se conocen procedimientos para la expresión y purificación de ADAMTS13 recombinante. Por ejemplo, la expresión y purificación recombinante lo enseñan Plaimauer y Scheiflinger, *Semin Hematol.* 2004 Jan;41(1):24–33; Plaimauer B *et al.*, *F. Blood.* 2002 Nov 15;100(10):3626–32. Epub 2002 Jul 12; Bruno K *et al.*, *J Thromb Haemost.* 2005 May;3(5): 1064–73, y la solicitud de patente de Estados Unidos n.º 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan todas expresamente por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los fines.

Adicionalmente, la presente divulgación proporciona procedimientos adicionales para la purificación de ADAMTS13 recombinante. En una realización, ADAMTS13 recombinante se expresa en células CHO recombinantes y se purifica del medio acondicionado resultante mediante cromatografía de intercambio catiónico POROS HS. Para eliminar ADAMTS13 diméricas, monoméricas y/o agregadas indeseables, la composición se somete después a filtración en gel de exclusión por tamaño. Generalmente, las composiciones de ADAMTS13 también se someterán a al menos una, preferentemente dos, etapas de eliminación o inactivación vírica.

En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento para la preparación de una formulación de ADAMTS13 incluirán adicionalmente al menos una etapa de inactivación o eliminación vírica. En ciertas realizaciones, los procedimientos proporcionados en el presente documento incluirán al menos dos o al menos tres, etapas de inactivación o eliminación vírica. Los ejemplos no limitantes de las etapas de inactivación o eliminación vírica que se pueden usar con los procedimientos proporcionados en el presente documento incluyen

tratamiento con detergente disolvente (Horowitz *et al.*, Blood Coagul Fibrinolysis 1994 (5 Suppl 3):S21–S28 y Kreil *et al.*, Transfusion 2003 (43):1023–1028, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente por referencia en su totalidad para todos los fines, nanofiltración (Hamamoto *et al.*, Vox Sang 1989 (56)230–236 y Yuasa *et al.*, J Gen Virol. 1991 (72 (pt 8)):2021–2024, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los fines.) En una realización preferida, la presente invención proporciona procedimientos para la preparación de una formulación de ADAMTS13 que comprende tratamiento con detergente disolvente y nanofiltración.

En una realización, se proporciona un procedimiento para proporcionar una formulación de proteína ADAMTS13 víricamente segura, comprendiendo el procedimiento las etapas de (a) cultivar una célula que alberga un ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un medio de cultivo; (b) recuperar una porción del sobrenadante del medio de cultivo que contiene la proteína ADAMTS13; (c) enriquecer la proteína ADAMTS13 con una etapa cromatográfica; (d) realizar al menos una etapa de inactivación o eliminación de virus; y (e) formular la composición de ADAMTS13 enriquecida de acuerdo con una formulación proporcionada en el presente documento, proporcionando de este modo una formulación de ADAMTS13 víricamente segura. En una realización, el medio de cultivo contiene cinc, calcio, y, opcionalmente, nicotinamida (vitamina B3). En una realización preferida, la etapa de cultivar una célula comprende un cultivo continuo (por ejemplo, perfusión o cultivo quimostático). En otra realización preferida, el cultivo se mantiene a una temperatura entre 34 °C y 37 °C. En aún otra realización preferida, el cultivo se mantiene a un pH entre 6,9 y 7,2. En una realización, la etapa de eliminación de virus es nanofiltración.

En una realización aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una formulación estabilizada de ADAMTS13, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (a) expresar una proteína ADAMTS13 o un derivado biológicamente activo de la misma, en una célula cultivada en un medio que comprende cinc en una concentración de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 12 µM y calcio a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; (b) purificar la proteína ADAMTS13; y (c) preparar una formulación de acuerdo con una cualquiera de las formulaciones proporcionadas en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una formulación estabilizada de ADAMTS13, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) expresar una proteína ADAMTS13, o un derivado biológicamente activo de la misma, en una célula cultivada en un medio que comprende cinc a una concentración de aproximadamente 2 µM a aproximadamente 12 µM y calcio a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; (ii) purificar la proteína ADAMTS13; y (iii) preparar una formulación que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS–wWF73) por mg de ADAMTS13; (b) de 0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente

tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

- 5 En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

10 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

15 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una formulación estabilizada de ADAMTS13, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) expresar una proteína ADAMTS13, o un derivado biológicamente activo de la misma, en una célula cultivada en un medio que comprende cinc a una concentración de aproximadamente $2 \mu\text{M}$ a aproximadamente $12 \mu\text{M}$ y calcio a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; (ii) purificar la proteína ADAMTS13; y (iii) preparar una formulación que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-wWF73) por mg de ADAMTS13; (b) de 0 mM a 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

20 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

25 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

30 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

35 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

40 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

45 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

50 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una formulación estabilizada de ADAMTS13, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) expresar una proteína ADAMTS13, o un derivado biológicamente activo de la misma, en una célula cultivada en un medio que comprende cinc a una concentración de aproximadamente $2 \mu\text{M}$ a aproximadamente $12 \mu\text{M}$ y calcio a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; (ii) purificar la proteína ADAMTS13; y (iii) preparar una formulación que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-wWF73) por mg de ADAMTS13; (b) de

0 mM a 200 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μM y 20 μM .

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para fabricar una formulación estabilizada de ADAMTS13, comprendiendo el procedimiento las etapas de: (i) expresar una proteína ADAMTS13, o un derivado biológicamente activo de la misma, en una célula cultivada en un medio que comprende cinc a una concentración de aproximadamente 2 μM a aproximadamente 12 μM y calcio a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM; (ii) purificar la proteína ADAMTS13; y (iii) preparar una formulación que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-WF73) por mg de ADAMTS13; (b) de 0 mM a 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

5 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

10 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

15 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

20 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

25 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

1. Tratamiento con disolvente y detergente (D/D)

35 Con el fin de inactivar varios contaminantes víricos que pueden estar presentes en una formulación de ADAMTS13, una o más soluciones intermedias de ADAMTS13 se pueden someter a un tratamiento con detergente disolvente (D/D). En la técnica se conocen bien procedimientos para el tratamiento con detergente de soluciones (para una revisión, véase Pelletier JP *et al.*, Best Pract Res Clin Haematol. 2006; 19 (1): 205–42, cuya divulgación se incorpora expresamente por referencia en el presente documento en su totalidad para todos los fines). En general se puede usar cualquier tratamiento D/D estándar junto con los procedimientos proporcionados en el presente documento. Por

40 ejemplo, más adelante se proporciona un protocolo de ejemplo para un tratamiento D/D.

45 En una realización, a una solución intermedia de ADAMTS13 se añaden Triton X-100, Tween-20, y tri (n-butil) fosfato (TNBP) a concentraciones finales de o aproximadamente 1,0 %, 0,3 % y 0,3 %, respectivamente. Después, la mezcla se agita a una temperatura de o aproximadamente entre 18 °C y 25 °C durante al menos aproximadamente una hora.

2. Nanofiltración y ultra/diafiltración

50 Con el fin de reducir la carga vírica de una formulación de la proteína ADAMTS13 proporcionada en el presente documento, la formulación, o una composición intermedia, puede ser nanofiltrada utilizando un dispositivo de nanofiltración adecuado. En ciertas realizaciones, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro medio de o aproximadamente entre 15 nm y 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, sin limitaciones, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP®, Viresolve NFR® (Millipore), Planova® 15N, 20N, 35N y 75N (Planova). En una realización específica, el nanofiltro puede tener un tamaño medio de poro de o aproximadamente

55 entre 15 y 72 nm, o de o aproximadamente entre 19 y 35 nm, o de o aproximadamente entre 15 nm, 19 nm, 20 nm, 35 nm, o 72 nm. En una realización preferida, el nanofiltro tendrá un tamaño medio de poro de o de aproximadamente 19 nm, 20 nm, o 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA® 20N o PLANOVA® 35N o equivalente del mismo.

60 Después de la nanofiltración, el filtrado se puede concentrar, opcionalmente, mediante ultrafiltración y/o ajustarse la composición del tampón mediante diafiltración. En ciertas realizaciones, la ultrafiltración se lleva a cabo en un casete con una pantalla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un corte de peso molecular nominal (CPMN) de menos de o de aproximadamente 175 kDa o menos de o aproximadamente 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110,

65 CPMN de no más de 30 kDa. En una realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un CPMN de no más de 30 kDa. En otra realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un CPMN de no más de 30 kDa.

3. Liofilización y tratamiento térmico

En aún otras realizaciones, la actividad vírica de una formulación liofilizada de ADAMTS13, que anteriormente puede haberse sometido a otras etapas de inactivación o eliminación vírica, tales como nanofiltración, se puede reducir aún más mediante tratamiento térmico de la composición liofilizada. Los tratamientos térmicos para la inactivación de las cargas víricas en los factores de la sangre son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, véase, Piszkiwicz *et al.*, Thromb Res. 1987 Jul 15;47(2):235–41; Piszkiwicz *et al.*, Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989;(56):44–54; Epstein y Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 Mar;114(3):335–40).

VI. Administración y procedimientos de tratamiento

Las formulaciones se pueden administrar para tratamientos terapéuticos o profilácticos. En general, para aplicaciones terapéuticas, las formulaciones se administran a un sujeto con una enfermedad o afección asociada con la disfunción de ADAMTS13 o del VWF o, de otra manera, que las necesiten, en una "dosis terapéuticamente eficaz". Las formulaciones y cantidades eficaces para estos usos dependerán de la gravedad de la enfermedad o afección y el estado general de salud del paciente. Las administraciones únicas o múltiples de las formulaciones se pueden administrar dependiendo de la dosificación y la frecuencia según sea necesario y tolerado por el paciente.

Un "paciente" o "sujeto" a los efectos de la presente invención incluye tanto seres humanos como otros animales, particularmente mamíferos. Por tanto, las composiciones, formulaciones y procedimientos son aplicables a terapia tanto humana como veterinaria. En otra realización particular, el paciente es un mamífero y, en otra realización, es un ser humano. Otros tratamientos y terapias conocidos para afecciones asociadas con la disfunción de ADAMTS13 o del VWF se pueden utilizar en combinación con las formulaciones y procedimientos proporcionados por la invención.

En un aspecto de la invención, se proporcionan procedimientos de fabricar la formulación estabilizada de rA13 que tiene altas actividades específicas. En una realización, el procedimiento comprende las etapas de expresar una proteína ADAMTS13, o un derivado biológicamente activo de la misma, en una célula cultivada en un medio que comprende cinc a una concentración de aproximadamente 2 μ M a aproximadamente 12 μ M y calcio a una concentración de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 1,5 mM, purificar la proteína A13 y preparar una formulación como se ha descrito anteriormente. En ciertas realizaciones, los medios de cultivo se suplementan adicionalmente con vitamina B3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/l a aproximadamente 20 mg/l.

En otro aspecto, la presente invención proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con una disfunción de ADAMTS13 o del VWF. En otra realización, la invención proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de una enfermedad o afección asociada con la formación y/o presencia de uno o más trombos. En otra realización, la invención proporciona procedimientos de disgregación de uno o más trombos en un sujeto que lo necesite. En aún otras realizaciones, la invención proporciona procedimientos de tratamiento o prevención de un infarto en un sujeto que lo necesite. En general, los procedimientos proporcionados por la invención comprenden la administración de una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con lo proporcionado en el presente documento a un sujeto en necesidad de la misma.

Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados con la formación y/o la presencia de uno o más trombos son púrpura trombocitopénica trombótica (PTT) hereditaria, PTT adquirida, trombosis arterial, infarto de miocardio agudo (IAM), derrame cerebral, septicemia, y coagulación intravascular diseminada (CID).

Los ejemplos no limitantes de trastornos asociados con un infarto incluyen, sin limitaciones, infarto de miocardio (ataque cardíaco), embolia pulmonar, acontecimientos cerebrovasculares, tales como derrame cerebral, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (tal como gangrena), síndrome antifosfolípidos, septicemia, arteritis de células gigantes (ACG), hernia y vólvulos.

A. Tratamiento y profilaxis para la disfunción de ADAMTS13 y del vWF

En una realización aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con una disfunción de ADAMTS13 o del VWF, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con una cualquiera de las formulaciones proporcionadas en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con una disfunción de ADAMTS13 o del VWF, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS–vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la

- formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.
- 5
- 10 En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM
- 15 En otra realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.
- 20
- 25 En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.
- 30 En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.
- 35 En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μM y 20 μM .
- 40 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).
- 45 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con una disfunción de ADAMTS13 o del VWF, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.
- 50
- 55
- 60 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM
- 65 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En

una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

5 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

10 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

15 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

20 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

25 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con una disfunción de ADAMTS13 o del VWF, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

30 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

35 En otra realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

40 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

45 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μM y 20 μM .

5 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH 7,0 \pm 0,2).

10 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con una disfunción de ADAMTS13 o del VWF, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 100 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

25 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

30 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

40 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

45 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 \pm 0,2.

50 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μM y 20 μM .

55 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH 7,0 \pm 0,2).

60 **B. Tratamiento y profilaxis para afecciones y enfermedades trombóticas**

En una realización aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con una cualquiera de las formulaciones proporcionadas en el presente documento.

65

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y 20 μ M.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende calcio

entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

5 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una
10 mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se
15 selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación
20 comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

25 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μM y 20 μM .

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles
30 bajos de sal estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o
35 afección asociada con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de
40 ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún
45 otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre
50 aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre
55 aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una
60 mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre
65 aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una
5 realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir una enfermedad o afección asociada con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 200 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

C. Tratamiento y profilaxis de un infarto

En una realización aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un infarto, comprendiendo el procedimiento administrar a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con una cualquiera de las formulaciones proporcionadas en el presente documento.

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un infarto, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS–vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

En otra realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

En una realización de la formulación de A13 estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y 20 μ M.

En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un infarto, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETS–vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 100 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la

formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

5 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

10 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

15 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

20 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

25 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente 0,5 μ M y 20 μ M.

30 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal estabilizada que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

35 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un infarto, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 200 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de actividad de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

40 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

45 En otra realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

50 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se

selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

5 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

10 En una realización de la formulación de A13 liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

15 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 200 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al 0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH $7,0 \pm 0,2$).

20 En una realización, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar o prevenir un infarto, comprendiendo el procedimiento la administración a un sujeto que lo necesite una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad FRETs-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable de 0 mM a 100 mM; (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 200 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En otra realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 400 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 600 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización más preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 800 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En aún otra realización preferida, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende al menos 1.000 unidades de actividad de A13 por mg de ADAMTS13. En una realización, la formulación estabilizada de ADAMTS13 comprende entre aproximadamente 100 unidades y aproximadamente 2.000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

35 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende calcio entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM. En una realización preferida, la formulación contiene calcio entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM

40 En otra realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 2 % y aproximadamente 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 3 % y aproximadamente 5 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización específica, la formulación comprende aproximadamente 4 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar. En una realización, el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol, y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o el alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

50 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende entre aproximadamente 0,01 % y aproximadamente 0,1 % de un tensioactivo no iónico. En una realización preferida, la formulación comprende aproximadamente 0,05 % de un tensioactivo no iónico. En una realización, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

55 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM. En una realización preferida, la formulación comprende agente tamponador entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización, el agente tamponador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente tamponador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es de entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.

60 En una realización de la formulación de A13 de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, la formulación comprende adicionalmente cinc entre aproximadamente $0,5 \mu\text{M}$ y $20 \mu\text{M}$.

65 En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación de ADAMTS13 (A13) de niveles bajos de sal liofilizada estabilizada, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl de 0 a 60 mM; (c) calcio de 2 mM a 4 mM; (d) manitol del 2 % al 4 %; (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %; (f) polisorbato 80 del 0,025 al

0,1 %; y (g) histidina de 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

VII. Kits de ADAMTS13

5 En otro aspecto de la invención, se proporcionan kits para el tratamiento de una enfermedad o afección asociada con la disfunción de ADAMTS13 o del VWF. En una realización, el kit comprende una formulación de A13 o de rA13, como se ha proporcionado anteriormente. En algunas realizaciones, los kits proporcionados en el presente documento pueden contener una o más dosis de una formulación líquida o liofilizada como se proporciona en el presente documento. Cuando los kits comprenden una formulación de A13 o rA13 liofilizada, generalmente los kits también contendrán un líquido adecuado para la reconstitución de la formulación líquida, por ejemplo, agua estéril o un tampón farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender una formulación de ADAMTS13 preenvasada en una jeringa para la administración por un profesional sanitario o para uso doméstico.

15 En una realización, se proporciona un kit que comprende entre aproximadamente 10 unidades de FRET5-VWF73 y aproximadamente 10.000 unidades de actividad FRET5-VWF73. En otras realizaciones, el kit puede proporcionar, por ejemplo, entre aproximadamente 20 unidades de actividad FRET5-VWF73 (U_{FV73}) y aproximadamente 8.000 unidades de actividad FRET5-VWF73, o entre aproximadamente 30 U_{FV73} y aproximadamente 6.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 40 U_{FV73} y aproximadamente 4.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 50 U_{FV73} y aproximadamente 3.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 75 U_{FV73} y aproximadamente 2.500 U_{FV73} , o entre aproximadamente 100 U_{FV73} y aproximadamente 2.000 U_{FV73} , o entre aproximadamente 200 U_{FV73} y aproximadamente 1.500 U_{FV73} , o entre aproximadamente otros intervalos en ellos. En ciertas realizaciones, un kit puede proporcionar aproximadamente 10 unidades de actividad FRET5-VWF73 o aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, 1.500, 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, 3.100, 3.200, 3.300, 3.400, 3.500, 3.600, 3.700, 3.800, 3.900, 4.000, 4.100, 4.200, 4.300, 4.400, 4.500, 4.600, 4.700, 4.800, 4.900, 5.000, 5.100, 5.200, 5.300, 5.400, 5.500, 5.600, 5.700, 5.800, 5.900, 6.000, 6.100, 6.200, 6.300, 6.400, 6.500, 6.600, 6.700, 6.800, 6.900, 7.000, 7.100, 7.200, 7.300, 7.400, 7.500, 7.600, 7.700, 7.800, 7.900, 8.000, 8.100, 8.200, 8.300, 8.400, 8.500, 8.600, 8.700, 8.800, 8.900, 9.000, 9.100, 9.200, 9.300, 9.400, 9.500, 9.600, 9.700, 9.800, 9.900, 10.000 o más unidades de actividad FRET5-VWF73.

30 En ciertas realizaciones, el kit será para una administración o dosis única de ADAMTS13. En otras realizaciones, el kit puede contener dosis múltiples de ADAMTS13 para su administración. En una realización, el kit puede comprender una formulación de ADAMTS13 preenvasada en una jeringa para la administración por un profesional sanitario o para uso doméstico.

VIII. Ejemplos

A. Ejemplo 1: Expresión de ADAMTS13 recombinante (rA13)

40 Un cultivo celular en quimiostato de la línea celular de CHO recombinante n.º 640-2 que expresa ADAMTS13 humana se cultivó en medio BACD-A 13 químicamente definido complementado con cinc y vitamina B3 adicionales. El cultivo de 10 l se mantuvo durante 53 días y la producción y actividad de la proteína rA13 se controló en el tiempo.

45 Las células recombinantes CHO que expresan ADAMTS13 humana se adaptaron a un medio químicamente definido patentado (medio BCS). Se descongeló un DWCB y el inóculo celular se preparó en un medio de BCS. Las células propagadas del clon de expresión de rA13 n.º 640-2 se transfirieron a un biorreactor de 10 l con impulsores de tipo Rushton y se cultivaron en cultivos discontinuos repetidos con medio BACD-A13 patentado bajo un pH controlado en línea de 7,15-7,20 a 37 °C con una concentración de oxígeno disuelto del 20 % de saturación de aire. Después de cultivar 2 cultivos discontinuos hasta el volumen de trabajo final de 10 litros, el biorreactor se cambió a alimentación con medio continua el día 5 y se realizó durante un período adicional de 48 días en un modo quimiostato.

50 Las muestras del sobrenadante de los biorreactores se tomaron semanalmente y se analizaron para la producción de la proteína rA13 mediante ELISA y la actividad de rA13 mediante ensayo FRET5-VWF73. Los recuentos de células se determinaron mediante tecnología de Nucleocounter. Se midieron las tasas de dilución y se usaron para el cálculo de las velocidades de crecimiento y las productividades volumétricas.

60 En condiciones de cultivo continuo usando medio BACD-A13 químicamente definido complementado con cinc y nicotinamida a una concentración final de 1,432 mg/l de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ y 7,02 mg/l de nicotinamida, se lograron niveles altos de producción de la proteína rA13, entre 0,9 y 1,3 mg/l/D y actividades específicas entre aproximadamente 800 y 1.100 mU/mg de rA13 (tabla 1). En particular, las productividades volumétricas y específicas de las células aumentaron con el tiempo en el cultivo a largo plazo, probablemente debido al aumento de las velocidades de crecimiento y de las tasas de dilución con el tiempo. La alta actividad específica de la rA13 expresada podría, al menos, mantenerse un nivel elevado y constante durante al menos 7 semanas completas en las que el cultivo se cultivó en condiciones quimiostáticas. De hecho, la actividad específica de la rA13 producida en el cultivo realmente aumentó de aproximadamente 800 mU/ μ g de A13 la semana 2 a aproximadamente 1.100 mU/ μ g de A13 la semana 7.

Tabla 1. Datos de fermentación para el experimento discontinuo CP_07/18_M07: hA13 CHO clon n.º 985/1 985 DWCB n.º 01.

N.º de semana del cultivo en quimioestato	Concentración celular	Velocidad de crecimiento específico	Tasa de dilución	FRETS de A13	ELISA de A13	Actividad específica	Rendimiento de FRETS	Rendimiento de A13
	[10 ⁶ células/ml]	[1/d]	[1/d]	[mU/ml]	[g/ml]	[mU/µg]	[U/l/d]	[mg/l/d]
2	1,43	0,36	0,36	1954	2,48	788	713	0,91
3	1,56	0,41	0,40	2254	2,32	972	913	0,94
4	1,46	0,38	0,40	2244	2,41	931	889	0,95
5	1,58	0,43	0,43	2514	2,88	873	1086	1,24
6	1,70	0,51	0,46	2737	2,71	1010	1270	1,26
7	1,76	0,53	0,52	2322	2,18	1065	1200	1,13

5

B. Ejemplo 2: Formulación de ADAMTS13 recombinante (rA13) purificada

ADAMTS13 recombinante se expresó en células CHO recombinantes y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico. La rA13 purificada tenía una concentración final de aproximadamente 750 µg/ml con una actividad específica de aproximadamente 850 mU/µg. La rA13 se formuló en tampón que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 %, a un pH de 7,0 con 20 mM de un agente tamponador seleccionado de (1) histidina, (2) tampón fosfato o (3) citrato sódico. A continuación, las muestras se dividieron de manera uniforme y se liofilizó la mitad de las muestras.

10

15

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril hasta un volumen final igual al de la formulación preliofilizada. Después, una sola alícuota de cada formulación líquida y liofilizada se caracterizó mediante filtración en gel cargando la muestra en una columna de Superose 6 GL (GE Healthcare). Como puede verse en la figura 3, todas las formulaciones dieron lugar a muestras de ADAMTS13 que aparecieron como un único pico correspondiente a la proteína monomérica rA13 mediante filtración en gel.

20

C. Ejemplo 3: Caracterización de la retención de actividad de las formulaciones de rA13 almacenadas a 4 °C y 37 °C

Las muestras de rA13 formuladas y alícuotadas como en el ejemplo 2 se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante un tiempo de hasta 6 meses. Las formulaciones en solución se analizaron para determinar la concentración de la proteína rA13, determinado mediante ELISA, y la actividad de rA13 mediante ensayo FRETS-VWF73 a 0, 1, 2, 3, 12, y 24 semanas (figura 1). Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril hasta un volumen final igual al de la formulación preliofilizada y se analizaron de manera similar a 0, 2, 4, 8, 12, y 24 semanas (figura 2).

25

30

Las formulaciones líquidas de rA13 almacenadas a 4 °C no mostraron pérdida ni en el contenido de antígeno, es decir, la concentración de proteínas, ni en la actividad FRETS-VWF73 a los puntos temporales hasta 6 meses. Como se ve en la figura 1, este fue el caso para las tres formulaciones, tamponadas con histidina, fosfato y citrato sódico, respectivamente. Por el contrario, las formulaciones líquidas, tamponadas con histidina o citrato sódico, exhibieron pérdida casi completa de actividad después de una semana a 37 °C (figura 1A; ◊ = histidina, ◻ = citrato sódico). Esta pérdida de actividad se acompañó de un pico en el contenido de antígeno en una semana para estas muestras, lo que sugiere que las proteínas rA13 estaban siendo desnaturalizadas. La formulación líquida de histidina de rA13 mostró una reducción drástica del contenido de antígeno a los 3 y 6 meses, lo que sugiere que la proteína se estaba degradando. Notablemente, la rA13 líquida formulada con tampón fosfato mostró una actividad significativa a las tres semanas de almacenamiento a 37 °C (figura 1A; ◊ = tampón fosfato). En consonancia, el contenido de antígeno de esta formulación aumentó a una velocidad más lenta, lo que sugiere que la desnaturalización de rA13 se retrasa cuando se formula con tampón fosfato.

35

40

Las formulaciones de rA13 liofilizadas parecían estables durante al menos 6 meses cuando se almacenaron a 4 °C o 37 °C (figura 2). La rA13 liofilizada formulada con tampón fosfato mostró una pérdida gradual de actividad (30 % a los 6 meses) cuando se almacenó a 37 °C, pero no a 4 °C, no obstante, esta pérdida de actividad no se acompañó de un incremento de la disponibilidad del antígeno mediante ELISA (figura 2; ◊ = tampón fosfato). Ninguna otra formulación liofilizada mostró pérdida de actividad ni aumento de la disponibilidad del antígeno cuando se almacenó a 4 °C o 37 °C.

45

D. Ejemplo 4: Estabilidad conformacional de rA13 en formulaciones almacenadas a 4 °C y 37 °C

Las muestras de rA13 formuladas y alícuotadas como en el ejemplo 2 se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante un tiempo de hasta 6 meses. Las conformaciones globales de rA13 formuladas y almacenadas en solución y en

50

estados liofilizados se caracterizaron mediante filtración en gel en los puntos temporales descritos en el ejemplo 3. Se muestran los resultados de los experimentos de filtración en gel realizados con la rA13 formulada con histidina a 0, 1, 2, 3, y 24 semanas para las formulaciones líquidas (figura 4) y 0, 2, 4, 8, 12, y 24 semanas para las formulaciones liofilizadas (figura 5).

5 Las formulaciones líquidas con histidina, almacenadas a 4 °C durante hasta 6 meses, discurrieron principalmente como un monómero sobre la filtración en gel (figura 4A), lo que sugiere que la proteína es muy estable en solución a 4 °C. Este resultado es consistente con los descritos en el ejemplo 3, que mostró que la rA13 formulada con histidina y almacenada en solución a 4 °C durante hasta 6 meses no perdía ninguna actividad FRET–VWF73. Por el
10 contrario, la rA13 formulada con histidina y almacenada a 37 °C, discurrió como una especie de orden más alto/parcial o completamente desnaturalizada, como indican los volúmenes de elución reducidos/tiempos de retención (figura 4B). En consonancia con los resultados observados en el ejemplo 3, la A13 formulada con histidina almacenada se a 37 °C durante 6 meses parecía estar degradada en su mayoría.

15 Los experimentos de filtración en gel se repitieron para cada formulación, almacenadas a 4 °C y a 37 °C, y las áreas relativas bajo los picos eluidos se integraron con el fin de determinar las poblaciones relativas de la rA13 en monómero (3), la rA13 (2) en dímero y la rA13 agregada/desnaturalizada (1) en las formulaciones. Los resultados de los experimentos de filtración en gel realizados con las tres formulaciones liofilizadas almacenadas a 4 °C y a 37 °C durante seis meses se proporcionan en la tabla 2. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril hasta
20 un volumen final igual al de la formulación preliofilizada antes del análisis mediante filtración en gel.

Tabla 2. Área bajo la curva (ABC) relativa para las filtraciones en gel de las formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas reconstituidas

Nº de pico	Área de pico relativa [%]		
	Inicio de liof.	Liof. 6 m 4 °C	Liof. 6 m 37 °C
Liof._His (1)			
1 (agregado)	2,8	3,2	2
2 (dímero)"	11,7	10,7	16,9
3 (monómero)	72,3	73,8	70,1
4	13,2	12,4	11,1
Liof._fosfato (2)			
1 (agregado)	1,4	1,2	15,3
2 (dímero)"	10,1	8,9	32,7
3 (monómero)	74,7	78,4	43,9
4	13,9	11,6	8,1
Liof._citrato (3)			
1 (agregado)	0,9	0,6	1
2 (dímero)"	11,2	9,1	18,8
3 (monómero)	74,2	77,9	70,3
4	13,8	12,4	9,9

25 En consonancia con los resultados observados en el ejemplo 3, las formulaciones liofilizadas de rA13 no mostraron incrementos en la cantidad de dímero ni de las especies agregadas/desnaturalizadas después del almacenamiento a 4 °C durante al menos 6 meses. Del mismo modo, rA13 formulada y se liofilizada con histidina o citrato sódico mostró solo niveles menores de dimerización cuando se almacenó a 37 °C durante al menos 6 meses.
30 Adicionalmente, no había ninguna indicación de que ninguna de estas formulaciones diera como resultado mayores niveles de agregación y/o desnaturalización. Por el contrario, rA13 formulada y se liofilizada con tampón fosfato mostró niveles significativos de la dimerización y agregación y/o desnaturalización, cuando se almacenó a 37 °C durante al menos 6 meses.

35 **E. Ejemplo 5: Caracterización biofísica de las formulaciones de rA13 almacenadas a 4 °C y 37 °C**

Las muestras de rA13 formuladas y alicuotadas como en el ejemplo 2 se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante un tiempo de hasta 6 meses. Como medida de la estabilidad conformacional de la proteína rA13 formulada como se ha descrito anteriormente, se determinaron los radios de Stokes mediante dispersión dinámica de luz para las
40 formulaciones de rA13 en solución (A) y liofilizadas (B) con histidina (figura 6), tampón fosfato (figura 7) y citrato

sódico (figura 8) a cada uno de los puntos temporales indicados.

Adicionalmente, mediante dispersión dinámica de luz se determinaron las tasas de recuento derivadas para cada una de las formulaciones líquidas, antes del almacenamiento. Como puede verse en la figura 12, hay una discontinuidad en el cambio de los radios de Stokes y, por tanto, la estabilidad de rA13, por encima de aproximadamente 35 °C, para las formulaciones de histidina y de citrato sódico, y por encima de aproximadamente 40 °C para la formulación de fosfato. Adicionalmente, aunque la formulación de fosfato tiene un radio de Stokes mayor que las formulaciones de histidina o citrato sódico a temperaturas por debajo de aproximadamente 37 °C, la formulación de fosfato parece ser ligeramente más estable a temperaturas entre aproximadamente 40 °C y 50 °C.

Las muestras liofilizadas formuladas con histidina se almacenaron a 4 °C o 37 °C durante 3 meses y después se reconstituyeron en agua estéril. Para caracterizar si se producían o no cambios conformacionales locales o globales en la rA13 reconstituida se realizó una espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier para las muestras almacenadas a 4 °C y a 37 °C durante 3 meses y se comparó con la A13 recién formulada y liofilizada. Como se puede ver en la figura 9, los espectros de absorbanza para las tres muestras se superponen casi perfectamente, lo que sugiere que no se están produciendo transiciones conformacionales en la rA13 almacenada como una formulación liofilizada en histidina a 4 °C o 37 °C durante 3 meses.

Las formulaciones de rA13 almacenadas a 4 °C o 37 °C durante 6 meses también se caracterizaron mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (rp-HPLC). La rp-HPLC permite la separación de moléculas proteicas estrechamente relacionadas y, por tanto, en muchos casos se puede diferenciar entre versiones modificadas del mismo polipéptido, por ejemplo de carga modificada, parcialmente degradado o parcialmente desplegado. Como se puede ver en la figura 10, todas las formulaciones de rA13 parecen estar estables durante al menos 6 meses a 4 °C, coherente con varios resultados vistos anteriormente.

Las muestras de rA13 formuladas como en el ejemplo 2 se analizaron después mediante calorimetría diferencial de barrido para caracterizar adicionalmente la estabilidad de la proteína rA13 en las diversas formulaciones. La naturaleza bimodal de la curva de la capacidad térmica generada en la figura 11 sugiere que dos dominios de la proteína se pueden desplegar por separado uno de otro, produciéndose la primera transición de desplegado a una temperatura entre 54 °C y 55 °C. Las temperaturas de desplegado para rA13 son similares para las diversas formulaciones. No obstante, la mayor entalpía de transición, como indica el área más grande por debajo de la endotermia, para la formulación de fosfato y, en menor medida, para la formulación de citrato, sugieren formulaciones de A13 ligeramente estabilizadas.

F. Ejemplo 6: Caracterización de la formación de dímeros en las formulaciones de rA13

Con el fin de determinar el efecto de agentes estabilizantes sobre el estado oligomérico de rA13 en solución, la rA13 se formuló en histidina 20 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM y polisorbato 80 al 0,05 % con diferentes combinaciones de sacarosa (de 0 % a 2 %), manitol (de 0 % a 3 %) y calcio (0 mM o 2 mM). A continuación, las diversas formulaciones se analizaron mediante filtración en gel sobre una columna de Sepharose 6 GL (GE Healthcare). Como se ve en la figura 13, diversas combinaciones de los agentes estabilizantes pudieron reducir la cantidad de la formación de dímero de A13 en aproximadamente un 50 %. Los porcentajes de agregados, dímeros/oligos y monómeros para cada formulación se proporcionan en la tabla 14.

Tabla 14. Formulaciones usadas para determinar el efecto de varios agentes tamponadores de la formulación de ADAMTS13.

Lote	CaCl ₂ [mM]	Sacarosa [g/l]	Manitol [g/l]	Agregado [%]	Dímero/oligómero [%]	Monómero [%]
rADAMTS008-1	–	10	20	0,854	46,34	53,04
rADAMTS008-2	2	10	20	1,664	42,08	56,94
rADAMTS008-3	–	10	–	1,932	50,54	48,16
rADAMTS008-4	2	10	–	1,979	41,57	57,14
ADAMTS008-5	–	10	10	1,820	49,8	49,13
rADAMTS008-6	2	10	10	1,748	40,98	58,01
rADAMTS008-7	–	10	30	1,645	47,07	51,88
rADAMTS008-8	2	10	30	2,242	41,23	57,33
rADAMTS008-9	–	–	–	1,540	51,62	47,39
rADAMTS008-10	2	–	–	1,429	39,49	59,62
rADAMTS008-11	–	–	20	1,496	45,7	53,41

rADAMTS008-12	2	-	20	1,428	39,93	59,18
ADAMTS008-13	-	20	-	2,083	48,13	50,56
ADAMTS008-14	2	20	-	1,997	41,43	57,34
rADAMTS008-15	-	20	20	1,904	46,77	52,06
rADAMTS008-16	2	20	20	1,866	41,66	57,2
rADAMTS008-17	-	20	30	1,956	45,97	52,81
rADAMTS00S-18	2	20	30	2,126	41,68	57,07

G. Ejemplo 7: Efecto del pH sobre la estabilidad de la formulación de ADAMTS13

Con el fin de determinar el efecto del pH sobre la estabilidad de rA13 en solución, rA13 se dializó en tampón que contenía histidina 20 mM y NaCl 150 mM, se ajustó a un intervalo de pH de entre 5,5 y 9,5, y se almacenó a 4 °C o 40 °C durante 24 horas. La estabilidad se midió mediante la concentración de antígeno de rA13, determinado mediante ELISA, y la actividad de rA13 mediante FRETS-VWF73, a las 24 horas. Como se ve en la tabla 3 y la figura 14, rADAMTS13 es relativamente estable durante 24 horas a 4 °C cuando se formula en una solución que tiene un pH entre 5,5 y 9,5.

Tabla 3. Estabilidad de ADAMTS13 en formulación líquida cuando se almacena a 4 °C durante 24 horas.

rADAMTS003	FRETS 5012-02-0552		ADAMTS:antígeno 5016-01-0351	
	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]
Material de partida	260792	100 %	2208	100 %
pH 5,5	216356	83 %	1468	66 %
pH 6,5	399216	153 %	2042	92 %
pH 7,5	358512	137 %	2178	99 %
pH 8,5	176649	68 %	2179	99 %
pH 9,5	110622	51 %	1696	77 %

Tabla 4. Estabilidad de ADAMTS13 en formulación líquida cuando se almacena a 40 °C durante 24 horas.

rADAMTS002	FRETS Prot: 5012-02-0297		ADAMTS:antígeno 5016-01-0297	
	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]
Material de partida	281855	100 %	1825	100 %
pH 5,5	4264	2 %	1225	67 %
pH 6,5	12111	4 %	1836	101 %
pH 7,5	7190	3 %	2106	115 %
pH 8,5	4729	2 %	1455	80 %
pH 9,5	<2500		1437	79 %

H. Ejemplo 8: Efecto de niveles bajos de CaCl₂ sobre la estabilidad de la formulación de ADAMTS13

Con el fin de determinar el efecto de niveles bajos de CaCl₂ sobre la estabilidad de rA13 en solución, la rA13 se formuló en un tampón que contiene NaCl 150 mM, sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM a pH 7,0 con (12B y D) y sin (12A y C) CaCl₂ 2 mM. Las formulaciones líquidas se almacenaron a 25 °C o a 37 °C durante tres semanas. A continuación, la estabilidad de la formulación se evaluó mediante la determinación de la actividad FRETS-VWF73 relativa a 0, 1, 2, y 3 semanas. Como puede verse en la figura 15, la adición CaCl₂ 2 mM estabilizó las formulaciones líquidas de rADAMTS13 almacenadas a 25 °C y a 37 °C, en diversos grados. En particular, la adición de niveles bajos de CaCl₂ a las formulaciones líquidas de rADAMTS13 almacenadas a 25 °C confirió una estabilidad de la actividad enzimática de aproximadamente 95 % durante tres semanas, en comparación con una pérdida de actividad del 80 % observada en las formulaciones sin CaCl₂.

I. Ejemplo 9: Actividad FRET–VWF73 de especies oligoméricas de ADAMTS13 recombinante

5 Con el fin de determinar la actividad enzimática de las diferentes especies oligoméricas de la proteína ADAMTS13
 aislada durante la purificación. La rA13 se cargó sobre una columna de filtración en gel Superose 6 GL equilibrada
 con un tampón que contenía Na_2HPO_4 20 mM (pH 7,5) y NaCl 500 mM. Después, las especies moleculares de
 ADAMTS13 se separaron por tamaño y por forma. Las fracciones eluyentes de la columna se combinaron de
 acuerdo con su aparente estado oligomérico, por ejemplo a13 agregada (conjunto 1), A13 dimérica (conjunto 2) y
 10 A13 monomérica (conjunto 3) (figura 16A). Se obtuvo confirmación adicional del estado oligomérico de ADAMTS13
 determinando el radio de Stokes promedio de la proteína en cada conjunto mediante dispersión dinámica de luz
 (figura 16B).

Después se determinó la actividad enzimática de cada conjunto mediante ensayo FRET–VWF73. Como se puede
 ver en la figura 16, la actividad volumétrica de la especie de A13 agregada fue de aproximadamente 218 mU/ml, la
 15 actividad de A13 dimérica fue de aproximadamente 1,435 U/ml y la actividad de A13 monomérica fue de
 aproximadamente 97,905 U/ml. Tras la estandarización de las actividades para el volumen de los conjuntos, más del
 99 % de la actividad total se encuentra en el conjunto de elución correspondiente a la proteína monomérica. Cuando
 las actividades se estandarizan después para la cantidad total de la proteína, se puede ver que el conjunto de
 20 proteína monomérica tiene una actividad específica más alta que la del conjunto de proteína dimérica y del conjunto
 de proteína agregada.

J. Ejemplo 10: Efecto de la concentración de NaCl sobre la liofilización de las formulaciones de ADAMTS13

25 Con el fin de determinar el efecto de la concentración de NaCl sobre la producción de tortas liofilizadas, ADAMTS13
 recombinante se formuló en un tampón que contiene sacarosa al 2 %, polisorbato 80 al 0,05 % e histidina 20 mM
 (pH 7,0) con cantidades variables de NaCl (de 0 a 150 mM). Las formulaciones de ADAMTS13 se liofilizaron
 después en condiciones estándar y se inspeccionaron visualmente para determinar la calidad de las tortas
 liofilizadas resultantes (figura 17). Las tortas liofilizadas producidas a partir de formulaciones de ADAMTS13 que
 30 contienen concentraciones de sal menores (de 0 a 60 mM; figuras 17A-C) tenían estructuras compactas con
 superficies lisas, mientras que las tortas liofilizadas producidas a partir de formulaciones con niveles altos de sal
 (NaCl 120 mM y 150 mM; figuras 17E y F) eran porosas y no compactas, con un aspecto similar a una cuerda o con
 grietas. Las formulaciones de ADAMTS13 que contienen niveles intermedios de NaCl (90 mM; figura 17D) fueron
 parcialmente compactas con una superficie semiporosa o en forma de cráter.

35 Una torta liofilizada porosa, no compacta indica fusión durante el proceso de liofilización. En general se usan
 concentraciones altas de sal para disminuir la temperatura de colapso (o temperatura vítrea) que puede dar lugar a
 la fusión parcial del material congelado durante el proceso de secado primario. Esto puede tener un impacto
 negativo sobre los niveles de agregación de proteínas y/o la recuperación de la actividad enzimática. Por lo tanto, un
 buen aspecto de la torta liofilizada normalmente se correlaciona con una mejor recuperación de la actividad y menos
 40 agregación de la respectiva proteína formulada. De forma ventajosa, la presente invención proporciona
 formulaciones de ADAMTS13 que permiten la producción de tortas liofilizadas de alta calidad. En ciertas
 realizaciones, las formulaciones de la invención proporcionadas en el presente documento permiten formulaciones
 bajas en sal de ADAMTS13, que son particularmente estables durante la liofilización, lo que da lugar a la formación
 de tortas liofilizadas de alta calidad.

45 Una preocupación con el uso de formulaciones de proteínas con niveles bajos de sal es que se puede producir un
 aumento de la agregación de proteínas. Para determinar si este era el caso para las formulaciones de ADAMTS13
 de niveles bajos de sal, las tortas liofilizadas producidas anteriormente se reconstituyeron en agua desionizada y los
 estados de agregación de las proteínas ADAMTS13 reconstituidas se analizaron mediante cromatografía de
 50 exclusión por tamaño. Como puede verse en la figura 18, la concentración de sal de las formulaciones liofilizadas no
 tuvo ningún efecto sobre el estado de agregación de la proteína ADAMTS13 reconstituida (compárese NaCl 0 mM
 con NaCl 150 mM).

A fin de validar adicionalmente el uso de formulaciones de ADAMTS13 con niveles bajos de sal se determinó la
 55 actividad FRET–VWF73 de diversas formulaciones que oscilan de NaCl 0 a 150 mM. Como puede verse en la
 figura 19, la concentración de sal, así como la concentración de sacarosa, de las formulaciones de ADAMTS13 no
 influyeron en la actividad de la proteína ADAMTS13 recombinante. Estos resultados sugieren que las formulaciones
 de proteínas ADAMTS13 recombinantes líquidas y liofilizadas con niveles bajos de sal (es decir, NaCl de 0 a
 100 mM) son muy adecuadas para uso farmacéutico.

K. Ejemplo 11: Formulación liofilizada de ADAMTS13 en tampones con niveles altos de sal y niveles bajos de sal

65 Para comparar las formulaciones liofilizadas de ADAMTS13 recombinante, se prepararon formulaciones con niveles
 altos de sal (NaCl 150 mM) y niveles bajos de sal (NaCl 30 mM). Ambas formulaciones, tanto de niveles altos de sal
 como de niveles bajos de sal, contenían histidina 20 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM, polisorbato 80 al 0,05 % y CaCl_2

2 mM. La formulación con niveles altos de sal contenía adicionalmente sacarosa al 2 % y NaCl 150 mM, mientras que la formulación con niveles bajos de sal contenía sacarosa al 1 %, manitol al 3 %, y NaCl 30 mM. Las dos formulaciones se liofilizaron después en condiciones estándar. La torta liofilizada resultante producida a partir de la formulación de rADAMTS13 con niveles altos de sal no era compacta, no uniforme, grumosa y porosa (figura 20A), mientras que la torta liofilizada producida a partir de la formulación de rADAMTS13 con niveles bajos de sal era compacta, bastante uniforme, y tenía una superficie lisa (figura 20B). Estos resultados sugieren que las formulaciones niveles bajos de sal de rADAMTS13 liofilizadas son muy adecuadas para uso farmacéutico.

L. Ejemplo 12: Purificación de rADAMTS13 para formulaciones liofilizadas

rADAMTS13 recombinante se expresó en células CHO recombinantes y se purificó a partir de medios acondicionados resultantes mediante cromatografía de intercambio catiónico POROS HS. Después, las fracciones recogidas de rADAMTS13 eluidas de la columna HS se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna superase 6 GL: TC10/30, para dimerización y agregación antes y después de la filtración en gel, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (figuras 21A y B, respectivamente) y dispersión dinámica de luz (figuras 22A y B, respectivamente). Como puede verse en la figura 21A, casi el 20 % de la rADAMTS13 total en las fracciones eluidas en HS, antes de la filtración en gel, se encontraban en los estados dimericos, monoméricos, o agregados indeseados. Por el contrario, casi toda la rADAMTS13 combinada de la etapa de filtración en gel es monomérica (figura 21 B). De forma similar, el radio hidrodinámico promedio de la rADAMTS13 eluida en HS (aproximadamente 20,5 nm; figura 22A) fue casi dos veces el de la rADAMTS13 recuperada tras la cromatografía de exclusión por tamaño (aproximadamente 12–13 nm; figura 22B).

M. Ejemplo 13: Comparación de protocolos estándar y extendidos para la liofilización de formulaciones de rADAMTS13

Con el fin de comparar la liofilización de las formulaciones de rADAMTS13 que contienen concentraciones bajas variables de sal (NaCl 30 mM y 60 mM), calcio (CaCl₂ 2 mM y 4 mM) y azúcar (sacarosa al 1 % y trehalosa al 1 %), la rADAMTS13 se purificó mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño, como anteriormente, y formuladas en histidina 20 mM, manitol al 3 %, polisorbato 80 al 0,05 %, con las ocho combinaciones de sal, calcio y azúcar indicadas anteriormente. Todos los viales tenían la misma concentración de rADAMTS13 (190 µg/ml de antígeno). Las formulaciones de rA13 1 a 8 (tablas 5 y 6) se liofilizaron después usando un protocolo de liofilización estándar (3 días; figura 23A) o extendida (11 días; figura 23B). Después de la liofilización, las tortas liofilizadas se inspeccionaron visualmente para determinar las cualidades deseables (figura 24).

Tabla 5. Formulaciones de rADAMTS13 liofilizadas usadas en el protocolo de liofilización estándar.

Formulación de rA13 (LIOF. A)	NaCl (mM)	Histidina (mM)	CaCl ₂ (mM)	Manitol (%)	Sacarosa (%)	Trehalosa (%)	Tween 80 (%)	Evaluación óptica
1	30 mM	20 mM	2 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Hermosa torta liofilizada compacta; superficie lisa desprendida de la pared
2	30 mM	20 mM	2 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 1
3	30 mM	20 mM	4 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Igual que la variante 1
4	30 mM	20 mM	4 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 1
5	60 mM	20 mM	2 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Hermosa torta liofilizada compacta; superficie lisa, periferia porosa y fácilmente desprendida de la pared
6	60 mM	20 mM	2 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 5; superficie fácilmente desprendida de la torta liofilizada
7	60 mM	20 mM	4 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Igual que la variante 5; periferia pulverulenta/lanosa
8	60 mM	20 mM	4 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 5; superficie desprendida de la torta liofilizada; periferia pulverulenta

Tabla 6. Formulaciones de rADAMTS13 liofilizadas usadas en el protocolo de liofilización extendido.

Formulación de rA13 (LIOF. B)	NaCl (mM)	Histidina (mM)	CaCl ₂ (mM)	Manitol (%)	Sacarosa (%)	Trehalosa (%)	Tween 80 (%)	Evaluación óptica
1	30 mM	20 mM	2 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Hermosa torta liofilizada compacta; superficie lisa agrietada desde la periferia
2	30 mM	20 mM	2 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 1
3	30 mM	20 mM	4 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Igual que la variante 1
4	30 mM	20 mM	4 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 1
5	60 mM	20 mM	2 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Igual que la variante 1
6	60 mM	20 mM	2 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 1
7	60 mM	20 mM	4 mM	3 %	1 %	–	0,050 %	Hermosa torta liofilizada compacta; superficie porosa agrietada desde la periferia; periferia lanosa
8	60 mM	20 mM	4 mM	3 %	–	1 %	0,050 %	Igual que la variante 1; superficie agrietada

5 Para determinar el estado multimérico de ADAMTS13 en cada una de las formulaciones, la proteína liofilizada se reconstituyó en agua desionizada y se analizó mediante dispersión dinámica de luz. Como puede verse en la figura 25, las formulaciones liofilizadas preparadas mediante el uso de protocolos de liofilización estándar y extendidos produjeron moléculas de ADAMTS13 principalmente monoméricas (pico a aproximadamente 12 a 13 nm) después de la reconstitución. Aunque el pico de ADAMTS13 correspondiente a la proteína agregada (entre 100 y 110 nm) parece ser aproximadamente la mitad del pico del monómero, un experto en la técnica reconocerá que el eje y es la medición de la intensidad, en lugar de la masa total, y, como tal, el gráfico exagera considerablemente porcentaje de especies de ADAMTS13 que se agregan. También se observa que las formulaciones preparadas con protocolos de liofilización extendidos (líneas discontinuas) contienen formulaciones de ADAMTS13 menos agregadas que las formulaciones preparadas con protocolos de liofilización estándar (líneas continuas), después de la reconstitución en agua desionizada.

15 Con el fin de evaluar la estabilidad de la rADAMTS13 liofilizada en cada una de las formulaciones presentadas anteriormente, las tortas liofilizadas producidas mediante protocolos estándar y extendidos se utilizaron para preparar una serie de viales para almacenamiento con diversas temperaturas durante hasta 36 meses. Como se indica en la tabla 7, los viales que contienen 5 mg o 10 mg de rADAMTS13 liofilizada se prepararon para almacenamiento a +2 – +8 °C (es decir, en condiciones de refrigeración estándar), 30 °C (temperatura ambiente) y 20 40 °C. Todos los viales se analizaron mediante FTIR, SE–HPLC y DDL. Asimismo, se analizó la actividad FRETs y el antígeno de ADAMTS13 para todas las muestras. Las formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas se analizaron después para determinar la actividad FRETs–VWF73 y la estabilidad del antígeno, como se ha indicado anteriormente, a los puntos temporales indicados para determinar la estabilidad de la proteína en las diversas 25 formulaciones liofilizadas. Las tablas 8 y 9 proporcionan los resultados de los ensayos de actividad FRETs–VWF73 de las formulaciones de ADAMTS13 generadas mediante los protocolos liofilización estándar y extendidos, respectivamente. Del mismo modo, la recuperación del antígeno se da en las tablas 10 y 11, para las muestras generadas con los protocolos de liofilización estándar y extendidos respectivamente.

30 **Tabla 7.** Escenario experimental para someter a prueba la estabilidad de las formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas. El escenario corresponde a liofilizaciones tanto de tipo A como de tipo B.

Tampón		Vial												
		0M	1M	2M	3M	4M	6M	9M	12M	15M	18M	24M	30M	36M
–1B	–80 °C	30												
	+2 +8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C		5	5	10	5	5							
–2B	–80 °C	30												
	+2 +8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C		5	5	10	5	5							
–3B	–80 °C	30												
	+2–+8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5

ES 2 579 906 T3

-4B	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C		5	5		5	5							
	-80 °C	30												
	+2-+8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-5B	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C			5	10	5	5							
	-80 °C	30												
	+2-+8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-6B	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C			5	10	5	5							
	-80 °C	30												
	+2-+8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-7B	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C			5	10	5	5							
	-80 °C	30												
	+2-+8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5
-8B	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C			5	10	5	5							
	-80 °C	30												
	+2-+8 °C	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5

Tabla 8. Actividad FRETS-VWF73 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas preparadas mediante protocolos de liofilización estándar.

		0M		1M		2M		3M		4M		6M		9M			
		WH	MW	WH													
-1 A	4°C	126	88	107	100%	-	-	105	83%	107,90	86%	106,00	84%	108,40	86%	104,90	83%
	30°C									100,70	80%	95,30	76%	95,70	76%	99,10	79%
	40°C					98	92%	127	100%	81,50	65%	86,70	69%	88,40	70%		
-2 A	4°C	101	100	101	100%	-	-	98	97%	99,4	98%	99,7	98%	98,2	97%	101,2	100%
	30°C							95	94%	100,1	99%	93	92%	92,1	91%	99,3	98%
	40°C					99	98%	95	94%	93,3	92%	93,5	92%	83,3	82%		
-3 A	4°C	117	119	118	100%	-	-	105	90%	101,9	87%	99,1	84%	104,4	89%	105,8	90%
	30°C							101	85%	97,9	83%	94,1	80%	93,5	80%	98,5	84%
	40°C					114	96%	101	85%	91,7	78%	87,2	74%	87	74%		
-4 A	4°C	113	100	106	100%	-	-	107	95%	97,7	87%	99,9	89%	103	91%	101,8	90%
	30°C							107	95%	97,9	87%	91,9	82%	90	80%	86,5	86%
	40°C					100	94%	122	108%	95,3	85%	88,3	78%	91,2	81%		
-5 A	4°C	109	97	103	100%	-	-	125	115%	94,1	86%	100,2	92%	107,7	99%	104,5	96%
	30°C							107	98%	90,9	86%	91,6	84%	89,2	82%	98	90%
	40°C					106	103%	107	98%	84,5	77%	74,1	68%	80,1	73%		
-6 A	4°C	93	81	87	100%	-	-	103	111%	97,2	104%	94,7	101%	104,5	112%	102,7	110%
	30°C							90	96%	94,4	101%	91,5	98%	91,6	98%	87,3	104%
	40°C					85	97%	90	96%	89,8	96%	84,7	91%	82	88%		
-7 A	4°C	111	102	106	100%	-	-	105	94%	98,9	89%	100,2	90%	103	93%	100,1	90%
	30°C							114	103%	90,6	82%	89,4	81%	85,2	77%	94,4	85%
	40°C					105	99%	114	103%	85,1	77%	77,8	70%	79,6	72%		
-8 A	4°C	101	126	113	100%	-	-	126	125%	104	103%	100,3	99%	101,6	101%	101,5	101%
	30°C							99	98%	88,6	89%	92,9	92%	94,2	93%	92,8	92%
	40°C					98	86%	99	98%	88,1	87%	82,7	82%	89,3	89%		

Tabla 9. Actividad FRETS–VWF73 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas preparadas mediante protocolos de liofilización extendidos

		(U/ml)	(%)	(U/ml)	(%)	(U/ml)	(%)	(U/ml)	(%)	(U/ml)	(%)	(U/ml)	(%)	(U/ml)	(%)
		QM		1M		2M		3M		4M		6M		9M	
-1 B	4°C	-	-	-	-	-	-	101,70	91%	102,40	92%	105,60	95%	100,70	90%
	30°C	112	100%	108	97%	97	87%	93,30	84%	95,60	86%	102,30	92%	93,00	83%
	40°C	-	-	-	-	-	-	101,40	91%	96,80	87%	86,10	77%	-	-
-2 B	4°C	-	-	-	-	-	-	93,9	91%	99,1	96%	107,3	104%	98,8	95%
	30°C	104	100%	106	102%	86	83%	93,4	90%	99,2	96%	101,1	98%	93,9	91%
	40°C	-	-	-	-	-	-	104,2	101%	94,2	91%	92,5	89%	-	-
-3 B	4°C	-	-	-	-	-	-	91,7	83%	101,2	92%	105,1	95%	103,8	94%
	30°C	111	100%	98	88%	94	85%	94,2	85%	95	86%	102,2	92%	91,7	83%
	40°C	-	-	-	-	-	-	102,6	93%	92,7	84%	94,6	86%	-	-
-4 B	4°C	-	-	-	-	-	-	91,8	68%	97,8	72%	102,9	76%	100,5	74%
	30°C	135	100%	87	64%	104	77%	97,8	72%	97,8	72%	102,8	76%	95,2	70%
	40°C	-	-	-	-	-	-	98,6	73%	92,6	68%	83,8	62%	-	-
-5 B	4°C	-	-	-	-	-	-	86,2	78%	97,8	88%	107	97%	95,5	96%
	30°C	111	100%	85	77%	97	87%	92,6	84%	93,1	84%	101	91%	89,1	80%
	40°C	-	-	-	-	-	-	98,2	89%	82,6	75%	78	70%	-	-
-6 B	4°C	-	-	-	-	-	-	88,8	77%	99,2	86%	105,2	91%	101,5	88%
	30°C	116	100%	95	83%	90	78%	97,5	84%	100,2	87%	102,9	89%	91,4	79%
	40°C	-	-	-	-	-	-	100,8	87%	85,8	74%	81,4	70%	-	-
-7 B	4°C	-	-	-	-	-	-	85,8	63%	96,6	71%	102,6	76%	98	72%
	30°C	136	100%	90	66%	97	71%	94,1	69%	95,7	71%	97,9	72%	88,8	66%
	40°C	-	-	-	-	-	-	96,8	73%	84,4	62%	79,8	59%	-	-
-8 B	4°C	-	-	-	-	-	-	88,3	74%	93,1	78%	100,1	84%	98,8	83%
	30°C	119	100%	106	89%	108	91%	95,7	80%	95,4	80%	101	85%	93,7	79%
	40°C	-	-	-	-	-	-	102,5	88%	89,4	75%	80,5	67%	-	-

Tabla 10. Recuperación del antígeno A13 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas preparadas mediante protocolos de liofilización estándar.

		(µg/ml)	(%)												
		QM		1M		2M		3M		4M		6M		9M	
-1 A	4°C	-	-	-	-	-	-	147	103%	148	103%	122	85%	129	90%
	30°C	144	100%	151	105%	131	91%	139	97%	132	92%	136	95%	136	95%
	40°C	-	-	-	-	-	-	140	97%	137	95%	107	75%	-	-
-2 A	4°C	-	-	-	-	-	-	145	93%	137	88%	125	81%	137	88%
	30°C	155	100%	157	101%	142	91%	137	88%	133	86%	154	99%	133	86%
	40°C	-	-	-	-	-	-	137	88%	123	79%	97	63%	-	-
-3 A	4°C	-	-	-	-	-	-	149	104%	146	102%	121	85%	136	95%
	30°C	143	100%	164	115%	141	99%	132	92%	134	94%	132	93%	136	95%
	40°C	-	-	-	-	-	-	130	91%	139	97%	109	76%	-	-
-4 A	4°C	-	-	-	-	-	-	152	98%	142	91%	130	84%	126	81%
	30°C	155	100%	157	101%	142	92%	133	85%	125	80%	129	83%	143	92%
	40°C	-	-	-	-	-	-	131	84%	127	82%	113	73%	-	-
-5 A	4°C	-	-	-	-	-	-	140	102%	154	113%	118	86%	125	91%
	30°C	137	100%	148	108%	143	105%	121	88%	126	92%	141	103%	132	97%
	40°C	-	-	-	-	-	-	122	89%	157	115%	112	82%	-	-
-6 A	4°C	-	-	-	-	-	-	150	109%	134	97%	124	90%	122	88%
	30°C	138	100%	147	107%	145	105%	137	99%	125	90%	143	103%	139	101%
	40°C	-	-	-	-	-	-	127	92%	119	86%	124	90%	-	-
-7 A	4°C	-	-	-	-	-	-	148	102%	153	105%	137	95%	126	87%
	30°C	145	100%	150	104%	137	95%	130	90%	125	86%	148	102%	140	97%
	40°C	-	-	-	-	-	-	128	89%	137	95%	119	82%	-	-
-8 A	4°C	-	-	-	-	-	-	135	92%	146	100%	138	94%	136	93%
	30°C	146	100%	152	104%	131	89%	137	94%	122	84%	170	117%	139	95%
	40°C	-	-	-	-	-	-	123	84%	129	88%	122	83%	-	-

Tabla 11. Recuperación del antígeno A13 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas preparadas mediante protocolos de liofilización extendidos.

		[µg/ml] [%]													
		0M		1M		2M		3M		4M		6M		9M	
-1 B	4°C			-		-		133	118%	137	122%	129	115%	158	141%
	30°C	112	100%	-		144	129%	128	115%	128	114%	145	130%	-	0%
	40°C			138	123%	136	121%	131	117%	132	118%	128	115%	-	
-2 B	4°C			-		-		132	111%	136	114%	131	109%	164	137%
	30°C	120	100%	-		137	115%	128	107%	124	103%	142	119%	-	0%
	40°C			130	109%	143	120%	142	123%	137	115%	134	112%	-	
-3 B	4°C			-		-		137	99%	138	103%	133	99%	170	126%
	30°C	134	100%	-		140	105%	120	90%	123	92%	142	105%	-	0%
	40°C			128	95%	137	102%	132	98%	138	103%	128	95%	-	
-4 B	4°C			-		-		143	103%	141	102%	134	97%	164	118%
	30°C	138	100%	-		153	111%	142	103%	126	91%	156	112%	-	0%
	40°C			123	89%	135	98%	137	99%	142	103%	138	99%	-	
-5 B	4°C			-		-		139	128%	135	124%	132	121%	171	157%
	30°C	109	100%	-		137	125%	121	111%	126	116%	140	128%	-	0%
	40°C			122	112%	132	121%	135	123%	129	118%	125	114%	-	
-6 B	4°C			-		-		146	130%	140	126%	127	113%	174	156%
	30°C	112	100%	-		140	126%	124	111%	126	113%	142	127%	-	0%
	40°C			129	115%	144	129%	135	120%	142	127%	131	117%	-	
-7 B	4°C			-		-		144	117%	146	118%	131	106%	171	138%
	30°C	123	100%	-		149	121%	127	103%	129	105%	136	110%	-	0%
	40°C			128	103%	135	110%	143	116%	136	110%	130	106%	-	
-8 B	4°C			-		-		120	104%	130	113%	131	114%	172	149%
	30°C	115	100%	-		132	114%	126	109%	127	110%	137	119%	-	0%
	40°C			124	107%	141	123%	136	118%	134	116%	128	111%	-	

5

Las tablas 17 y 18 resumen los resultados de FTIR de los diferentes programas de liofilización para las formulaciones de rADAMTS022-1. Ni el tiempo ni la temperatura tuvieron una influencia importante sobre las estructuras secundarias. Asimismo, el programa de liofilización no cambió los elementos estructurales, aparte de la evidente disminución de la hélice alfa a 40 °C para el programa estándar A que no se observó para el programa de liofilización B más largo.

10

Tabla 17. Estructura secundaria de la formulación de rADAMTS13 22 -1A evaluada mediante FTIR.

rADAMTS022-1A	Predicción de hélice α [%]			Predicción de lámina β [%]		
	4 °C	30 °C	40 °C	4 °C	30 °C	40 °C
inicio	6,7			37,7		
1 mes			11,7			36,6
2 meses		11,7	11,3		37,9	36,4
3 meses	10,9	10,7	8,9	36,8	38,4	35,7
4 meses	1,6	12,2	7,4	37,9	39,1	36,1

15

Tabla 18. Estructura secundaria de la formulación de rADAMTS13 22 -1B evaluada mediante FTIR.

rADAMTS022-1B	Predicción de hélice α [%]			Predicción de lámina β [%]		
	4 °C	30 °C	40 °C	4 °C	30 °C	40 °C
inicio	10,8			36,6		
1 mes			11,1			38,6
2 meses		9,3	8,9		37,8	38,4
3 meses	11,2	13,7	12,6	38,9	38,4	34,3
4 meses	6,6	12,8	10,5	35,9	38,5	37,1

20

El estado oligomérico de ADAMTS13 en las formulaciones liofilizadas 1A y 1B se analizó mediante dispersión dinámica de luz durante el transcurso de 6 meses de almacenamiento a 4 °C, 30 °C y 40 °C. Como se ve en las figuras 37 y 38, se observaron mayores niveles de agregados en las muestras preparadas con el programa de liofilización extendido. No obstante, los niveles de agregación no aumentaron sustancialmente durante el tiempo de almacenamiento.

25

De un modo similar, la HPLC se exclusión por tamaño no mostró cambios importantes entre los diferentes

programas de liofilización para las formulaciones de rADAMTS022 tras 6 meses (datos no mostrados). El análisis muestra que no se indujeron agregados tras el almacenamiento a 4 °C, 30 °C y 40 °C durante el transcurso de 3 meses.

5 **N. Ejemplo 14: Expresión y purificación de ADAMTS13 humana recombinante**

La ADAMTS-13 recombinante se genera mediante un clon de células de ovario de hámster chino (CHO) recombinante en un proceso de fermentación en cultivo en suspensión. El medio de crecimiento, desarrollado por Baxter y está a la vez libre de sustancias derivadas de ser humano o de animal y de proteínas recombinantes. Los ejemplos de estos tipos de medios de crecimiento útiles para la expresión de ADAMTS13 se pueden encontrar, por ejemplo, en la solicitud de patente de Estados Unidos n.º de serie 12/847.999. El proceso de fabricación utiliza un procedimiento de cultivo celular continuo (quimioestado). El proceso de purificación comienza con una etapa inicial de eliminación de células mediante filtración. El producto sin células de hasta 4 días después se combina para producir un lote posterior. Los recolectados agrupados y filtrados se concentran mediante ultra/diafiltración y después se someten a una etapa de inactivación del virus con detergente disolvente. Una purificación adicional incluye una etapa de captura cromatográfica (intercambio aniónico), una etapa de nanofiltración (segunda etapa de reducción del virus), una etapa de cromatografía negativa (hidroxiapatita), seguida de una cromatografía en modo mixto (Capto MMC) y una etapa final de concentración cromatográfica y preformulación (intercambio catiónico). La sustancia farmacológica a granel (SFG) preformulada se congela a - 60 °C en un congelador de temperatura controlada.

20 **O. Ejemplo 15: Ensayo FRETs-VWF73 para determinar la actividad de ADAMTS13**

La actividad proteolítica de ADAMTS13 se midió contra un sustrato de inactivación de fluorescencia (FRETs-VWF73, Peptides Institute, Inc; Osaka, Japón) de acuerdo con la descripción del ensayo del fabricante. En pocas palabras, las muestras de rADAMTS13 se diluyeron (en un volumen total de 100 µl) en tampón que contiene Bis-Tris 5 mM, CaCl₂ 25 mM y 0,005 % de Tween 20, y se transfirieron a una placa de microtitulación negra. Las muestras se midieron contra una curva de referencia de muestras de plasma humano diluido (de 80 a 5 mU/ml de plasma). La reacción se inició añadiendo el sustrato (100 µl, FRETs-VWF73; concentración final de 2 µM) y la fluorescencia se midió cada dos minutos durante 45 minutos en un espectrofotómetro de fluorescencia con $\lambda_{exc} = 360$ nm and $\lambda_{em} = 460$ a 30 °C (FLx800, Bio Tek). Los resultados de actividad se leyeron de una curva de referencia de plasma humano. Los datos se expresan como unidades/ml. El plasma humano normal se consideró como 1 unidad/ml.

35 **P. Ejemplo 16: ELISA de antígeno de ADAMTS13**

Las muestras que contienen ADAMTS13 se analizan en un ensayo ELISA usando una IgG policlonal de conejo contra ADAMTS13 humana tanto como captura como en su forma marcada como anticuerpo de detección. El antígeno de ADAMTS13 presente en la muestra se captura mediante el anticuerpo específico de ADAMTS13 en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las muestras se diluyeron en tampón (Tris 250 mM, NaCl 350 mM, 0,5 % de BSA, 0,1 % de Tween 20) y se transfirieron a los pocillos de microtitulación revestidos. El antígeno de ADAMTS13 unido se detecta con IgG anti-ADAMTS13 de conejo conjugada con HRP usando TMB como sustrato (Thermo Art: n.º 34021). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (TECAN SpectraFluorPlus, Tecan Sales Austria, Gröding, Austria) a $\lambda = 450$ nm. Las concentraciones del antígeno de ADAMTS13 (expresado en µg/ml) se calcularon a partir de un patrón de referencia usando diluciones que varían de 250 a 7,81 ng/ml de ADAMTS13 recombinante, que se purificó a partir de recolectados de cultivo de células HEK293 transfectadas de forma estable.

50 **Q. Ejemplo 17: Análisis mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) de ADAMTS13**

La SE-HPLC se realizó usando un purificador AKTA de "serie 900" (GE Healthcare). El sistema estaba equipado con una columna Superose 12 GL (GE Healthcare, TC10/30) que se pasó a un caudal constante de 0,3 ml por minuto a temperatura ambiente. Como tampón de carrera se usó Tris 20mM, acetato sódico 100 mM, cloruro sódico 500 mM a pH 7,4. La muestra se centrifugó (Centrífuga 5415C, Eppendorf, Viena, Austria) durante 5 minutos a 1.000 rpm y se aplicaron 100 µl automáticamente mediante un automuestreador. La absorbancia del efluente de la columna se midió de forma continua a 280 nm.

55 **R. Ejemplo 18: Análisis mediante dispersión dinámica de luz (DDL) de ADAMTS13**

La dispersión dinámica de luz (DDL) se realizó usando un Malvern Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, Reino Unido. WR14 1 XZ) y un Haake Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Alemania) equipado con un cono de 60 mm de diámetro/0,5° de ángulo para las determinaciones de la viscosidad del tampón.

Todas las muestras se centrifugaron (Centrífuga 5415C, Eppendorf, Viena, Austria) durante 5 minutos a 10.000 rpm para determinar el diámetro hidrodinámico de una proteína. 60 µl de la muestra se cargaron en una microcubeta desechable ZEN0040 y la viscosidad del tampón se determinó mediante Rheostress 1. Este parámetro se usa para

analizar el tamaño efectivo de las proteínas mediante DDL. La temperatura de funcionamiento fue de 25 °C con un tiempo de equilibrado de 2 minutos. El ángulo de las proteínas se fijó en 173° de retrodispersión para medir el tamaño y se realizaron 3 carreras por muestra para realizar un promedio de los resultados.

5 Las muestras se midieron mediante el modo de temperatura creciente para monitorizar la influencia de la temperatura sobre una proteína. El procedimiento de medición fue similar a una medición de tamaño normal, a excepción de temperaturas diferentes con un valor creciente de 1 °C/minuto de 15 °C a 80 °C y un tiempo de equilibrado de 2 minutos. Se usó una cubeta de vidrio de volumen bajo DTS2145 para estas pendientes de temperatura.

10 **S. Ejemplo 19: Análisis mediante espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR) de ADAMTS13**

15 La espectroscopia de infrarrojos por transformada de Fourier se realizó usando un espectroscopio de FTIR TENSOR 27 (Bruker Optik GmbH, 76275 Ettlingen, Alemania) equipado con una celda BioATR II de trabajo en modo de reflexión total atenuada. Esta configuración del instrumento se puede usar para analizar la conformación de las formulaciones proteicas.

20 Durante una temperatura de funcionamiento de 20 °C, se cargaron 20 µl de agua en la celda y se midió el barrido de fondo. Después, se cargaron 20 µl de tampón en la celda y se midió contra el barrido de fondo, para restar el agua del tampón. Este procedimiento se repitió con tampón como barrido de fondo para medir la muestra (intervalo de medición de la frecuencia: 4000 – 650 cm⁻¹). Se generó un interferograma y se tradujo a un espectro de transmisión. Se corrigieron espectros diferentes para la misma desviación y se normalizaron con la concentración de proteínas de la muestra. Adicionalmente se calculó la estructura secundaria (% de hélice α, % de lámina β) de la proteína mediante el software de evaluación (OPUS 6,0/Bruker) que contenía una base de datos de □40 proteínas de estructura secundaria conocida.

T. Ejemplo 20: Análisis por fotoirradiación de la estabilidad de ADAMTS13

30 El análisis de fotoestabilidad se realizó usando Atlas Suntest CPS+ Photostability Chamber (Chicago, Illinois, EE.UU.) de acuerdo con el PNT VN-09-45058TB. El CPS+ monitoriza y controla la irradiancia, la temperatura estándar negra y la temperatura del aire de la cámara.

35 La fotoestabilidad se analizó en la misma formulación que se usó para los experimentos de corte y de congelación-descongelación (tabla 12). Las muestras y los controles se analizaron mediante DDL y SE-HPLC. Los resultados se muestran en la figura 31 y la figura 32. Ambas formulaciones (líquida y liofilizada) mostraron los mismos resultados mediante SE-HPLC. El pico de la ADAMTS monomérica disminuyó y el pico de dímero aumentó con el tiempo de irradiación. El diámetro hidrodinámico de la formulación líquida y liofilizada también aumentó ligeramente con el tiempo (figura 32). La formulación liofilizada irradiada durante 10 horas (Recomendada por la ICH Q1B) no mostró ninguna diferencia con el control protegido de luz. La actividad FRETs monitorizada durante la fotoirradiación disminuyó rápidamente en líquido pero menos en las formulaciones liofilizadas, como se muestra en la figura 33. Incluso después de una dosis de fotoirradiación por cuatro, recomendada por las directrices Q1B de la ICH que corresponde a 4,8 M lux-hora, permanecía más del 50 % de la actividad FRETs.

45 Los viales “control” se envolvieron en papel de aluminio para eliminar la exposición a la luz y se colocaron en la cámara de fotoestabilidad junto con las muestras de ensayo. Todas las muestras se colocaron horizontalmente. Un tiempo de irradiación de 10 horas correspondió a de 1,2 a 1,8 millones lux-hora y 765 W/m² de luz UV.. Se retiraron las muestras de la cámara de fotoestabilidad tras 10 horas y se midieron el espectro (190–800 nm) y el valor del pH.

50 **U. Ejemplo 21: Análisis por esfuerzo mecánico de la estabilidad de ADAMTS13**

El esfuerzo cortante se aplicó con un Haake Rheostress1 (Thermo Electron Karlsruhe GmbH, Karlsruhe, Alemania) usando un cono con un diámetro de 60 mm y un ángulo de 0,5°. La temperatura se fijó a 25,0 °C.

55 En pocas palabras, ADAMTS13 humana recombinante, preparada como se ha descrito anteriormente, se formuló como en la tabla 12. Se aplicaron 500µl de muestra de ADAMTS13 por carrera y se sometieron a esfuerzo a 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 y 600 rpm durante 15 minutos. Después, la muestra se transfirió a un vial de Eppendorf. Las mediciones de DDL se aplicaron para monitorizar si el potencial esfuerzo cortante inducía desplegado o agregación parcial. Como se muestra en la figura 28, se formaron agregados un esfuerzo cortante de 60 200 rpm.

Tabla 12. Formulación usada para el análisis del esfuerzo mecánico de la estabilidad de ADAMTS13.

Sustancias tampón		BAX930 FL
NaCl	[mM]	150
Histidina	[mM]	20

Sacarosa	[%]	2
Polisorbato 80	[%]	0,05
pH		7,0

V. Ejemplo 22: Efectos de varios agentes tamponadores sobre las formulaciones de ADAMT13

Para determinar el efecto de varios tampones sobre la estabilidad y la conformación de las formulaciones de ADAMTS13, ADAMTS13 humana recombinante, expresada y purificada como se ha descrito anteriormente, se dializó contra diferentes tampones (tabla 13) y se analizó mediante dispersión dinámica de luz (DDL) para identificar las preferencias básicas de tampón de ADAMTS13. Como se puede ver en la figura 27, se encontraron los diámetros hidrodinámicos de ADAMTS13 más pequeños cuando la proteína se había formulado en los tampones de histidina o de HEPES.

Tabla 13. Formulaciones usadas para determinar el efecto de varios agentes tamponadores de la formulación de ADAMTS13.

Sustancias tampón		-1	-2	-3	-4	-5
NaCl	[mM]	150	150	150	150	150
Histidina	[mM]	20	–	–	–	–
Hepes	[mM]	–	20	–	–	–
Fosfato sódico	[mM]	–	–	20	–	–
Citrato	[mM]	–	–	–	20	–
EDTA	[mM]	–	–	–	–	20
pH		7,5	7,5	7,5	7,5	7,5

* Todas las formulaciones contenían sacarosa al 2 % y polisorbato 80 al 0,05 %.

W. Ejemplo 23: Análisis de congelación-descongelación de la estabilidad de ADAMTS13

La misma formulación (tabla 12) que se usó para los experimentos de esfuerzo cortante se usó de nuevo para investigar el comportamiento de la proteína durante el esfuerzo de congelación-descongelación. Se eligieron dos condiciones de congelación-descongelación 20 °C/TA y –80 °C/+37 °C. La figura 29 resume los resultados de las mediciones de la actividad FRETs. Todas las muestras son estables dentro del intervalo de la variación del ensayo (desviación relativa estándar del 25 %). La pérdida de actividad FRETs se observó incluso después de un ciclo de congelación-descongelación de 5 veces. La estabilidad de BAX930 en esta formulación líquida se confirma mediante los resultados de las mediciones de DDL y SE–HPLC. No se observaron incrementos de la intensidad de los picos de agregación (entre 100 y 1.000 nm) mediante DDL con independencia de las condiciones de congelación-descongelación (figura 30). De un modo similar, la SE–HPLC no mostró un incremento del nivel de agregación después de repetidos ciclos de congelación-descongelación a –80 °C/+37 °C, sino algún incremento a –20 °C/TA (datos no mostrados).

X. Ejemplo 24: Efecto del calcio y el cinc sobre la actividad FRETs de ADAMTS13

ADAMTS13 humana recombinante, preparada como se ha descrito anteriormente, se trató con EDTA 10 mM y después se dializó contra el tampón que contiene histidina 20 mM y NaCl 190 mM (pH 7,5). Tras la diálisis se añadieron CaCl₂ y ZnCl₂ de nuevo a las formulaciones a diferentes concentraciones. Después se analizó la actividad de las formulaciones de ADAMTS13 que contienen concentraciones diferentes de calcio y cinc para determinar la actividad FRET como se ha descrito anteriormente. Como se puede ver en la figura 34, los niveles crecientes de calcio aumentaron la recuperación de la actividad FRETs. Se consiguió una actividad casi máxima con la inclusión de CaCl₂ 4 mM, tanto en presencia como en ausencia de cinc. A las concentraciones intermedias de calcio (2 mM y 4 mM), la adición de cinc proporcionó un modesto incremento de la actividad FRETs.

Y. Ejemplo 25: Influencia de las concentraciones de sal y azúcar sobre la agregación en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas

Para investigar adicionalmente el efecto que tienen las concentraciones de sal y azúcar sobre las formulaciones liofilizadas de ADAMTS13, el estado oligomérico de varias formulaciones liofilizadas se determinó después de la reconstitución con agua desionizada. En pocas palabras, ADAMTS13 humana recombinante se produjo como se ha descrito anteriormente. Después, las muestras de proteínas se formularon con histidina 20 mM (pH 7,0), cloruro cálcico 2 mM y polisorbato 80 al 0,05 % con los niveles de cloruro sódico y de sacarosa proporcionados en la tabla 15. Las formulaciones se liofilizaron después, como se ha descrito anteriormente, y se reconstituyeron con agua desionizada. A continuación, las características oligoméricas de determinaron mediante análisis SE–HPLC, cuyos resultados se muestran en la tabla 15 y la figura 35. Como se puede ver en las formulaciones que contienen concentraciones bajas de azúcar, los niveles altos de sal (150 mM) aumentan la agregación de ADAMTS13 y reducen el contenido monomérico de la formulación.

Tabla 15. Influencia de la concentración de sal y azúcar sobre la agregación en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas medidas mediante el área de pico en SE-HPLC.

Lote	NaCl [mM]	Sacarosa [g/l]	Osmolaridad [mOsmol]	Agregado [%]	Dímero/oligómero [%]	Monómero [%]
rADAMTS016-1	–	20	80,5	–	8,3	91,9
rADAMTS016-2	30	20	141,0	–	10,8	89,2
rADAMTS016-3	60	20	196,5	–	9,4	90,6
rADAMTS016-4	90	20	258,0	–	9,2	90,8
rADAMTS016-5	120	20	307,5	–	9,9	90,1
rADAMTS016-6	150	20	359,5	–	9,5	90,5
rADAMTS016-7	60	15	175,5	–	10,0	90,0
ADAMTS016-8	150	15	341,0	–	9,6	90,4
rADAMTS016-9	60	10	163,5	–	9,1	90,9
rADAMTS016-10	150	10	328,5	1,1	9,8	89,0
rADAMTS016-11	60	5	147,0	–	10,0	90,0
rADAMTS016-12	150	5	314,5	0,7	10,4	88,8

- 5 A continuación se usó la misma formulación mostrada en la tabla 15 para evaluar la calidad de la torta liofilizada p la liofilización de las formulaciones de ADAMTS13. Como se resume en la tabla 16 y se muestra en la figura 36, la presencia de concentraciones altas de cloruro sódico (150 mM) no dio lugar a ninguna torta liofilizada. Por el contrario, las mejores tortas liofilizadas se obtuvieron con formulaciones que contenían cloruro sódico a entre 0 mM y 60 mM en presencia de sacarosa al 2 %.

10

Tabla 16. Calidad de la torta liofilizada producida para varias formulaciones de ADAMTS13 humana recombinante.

Lote	Cuantificación de la torta liofilizada
rADAMTS016-1	Torta liofilizada compacta, superficie lisa y desprendida de la pared de cristal
rADAMTS016-2	Torta liofilizada compacta, superficie lisa y desprendida de la pared de cristal
rADAMTS016-3	Torta liofilizada compacta, superficie lisa y desprendida de la pared de cristal
rADAMTS016-4	Torta liofilizada compacta porosa, superficie rugosa, parcialmente desprendida de la pared de cristal
rADAMTS016-5	Torta liofilizada porosa, superficie rugosa, parcialmente desprendida de la pared de cristal
rADAMTS016-6	Sin torta liofilizada, solo película ligera
rADAMTS016-7	Torta liofilizada compacta porosa, superficie rugosa, parcialmente desprendida de la pared de cristal
rADAMTS016-8	Sin torta liofilizada, solo película ligera
rADAMTS016-9	Película lisa ligera
rADAMTS016-10	Superficie lisa, pulverulenta
rADAMTS016-11	Sin torta liofilizada, solo película ligera
rADAMTS016-12	Superficie lisa, pulverulenta

Z. Ejemplo 26: Ensayo de esfuerzo de temperatura a largo plazo

15

Para caracterizar adicionalmente la estabilidad de las formulaciones liofilizadas de ADAMTS13 se inició un segundo ensayo de esfuerzo a largo plazo. Para este ensayo se formuló una ADAMTS13 humana recombinante a tres concentraciones de proteínas finales de acuerdo con la tabla 19. En la formulación se incluyó un segundo azúcar (manitol), ya que se descubrió que estabilizaba la proteína durante la liofilización y proporcionó una torta liofilizada compacta con una superficie lisa. Todas las muestras del ensayo de esfuerzo se caracterizaron mediante DDL (figura 39), SE-HPLC (tabla 20) y FTIR. La actividad FRETS (tabla 21) y el ELISA de antígeno de A13 (tabla 22) también se midieron con el tiempo para todas las formulaciones.

20

Tabla 19. Formulación de rADAMTS13 en tampón His para el ensayo de esfuerzo (rADAMTS025)

Concentración [U FRETS/ml]		rADAMTS025-1	r-ADAMTS025-2	ADAMTS025-3
		600	300	150
NaCl	[mM]	30	30	30
Histidina	[mM]	20	20	20
CaCl ₂	[mM]	2	2	2
Polisorbato 80	[%]	0,05	0,05	0,05
Sacarosa	[%]	1	1	1
Manitol	[%]	3	3	3
pH		7,0	7,0	7,0

Tabla 20. Influencia de la concentración de ADAMTS13 alta sobre el nivel de agregación determinado mediante SE-HPLC (rADAMTS025).

Lote	Agregado [%]	Dímero/oligómero [%]	Monómero [%]
rADAMTS025-1 inicio	0,15	4,40	95,45
rADAMTS025-1 3 meses + 4 °C	0,29	4,60	95,10
rADAMTS025-1 2 meses 30 °C	0,36	4,44	95,20
rADAMTS025-1 3 meses 30 °C	0,31	5,22	94,47
rADAMTS025-1 1 mes 40 °C	0,19	5,30	94,51
rADAMTS025-1 2 meses 40 °C	0,23	5,34	94,43
rADAMTS025-1 3 meses 40 °C	0,43	5,67	93,90

Tabla 21. Actividad FRET5-VWF73 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas.

		[U/ml]		[U/ml]		[U/ml]		[U/ml]		[U/ml]		[U/ml]		[U/ml]		
		Preformulación	Antes de filtración	Antes Liof.	0M	1M	2M	3M	4M	6M	0M	1M	2M	3M	4M	6M
-1 A	4°C	685,6	559	528	522	100%	-	-	441	84%	482,20	92%	462,40	89%	411,80	79%
	30°C				475	91%	402	77%	441,80	85%	416,30	80%	386,70	74%		
	40°C				236,6	43%	229,9	41%	231,6	42%	220,7	38%	210,7	34%		
-2 A	4°C	685,6	278	258	252	100%	-	-	227	90%	236,6	94%	229,9	91%	210,7	84%
	30°C				243	96%	209	83%	212	84%	205,8	82%	181,2	72%		
	40°C				115	41%	112,4	40%	114	41%	103,1	38%	107,1	39%		
-3 A	4°C	685,6	129	122	117	100%	-	-	106	91%	115	96%	112,4	96%	107,1	92%
	30°C				111	95%	98	84%	99,1	85%	95,5	82%	84,4	72%		
	40°C				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 22. Recuperación del antígeno de A13 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas.

		[µg/ml]		[µg/ml]		[µg/ml]		[µg/ml]		[µg/ml]		[µg/ml]		
		Preformulación	Antes de filtración	Antes Liof.	0M	1M	2M	3M	4M	0M	1M	2M	3M	4M
-1 A	4°C	1044,898	602	590	586	100%	-	-	600	102%	671	114%	588	100%
	30°C				574	98%	630	107%	682	116%	562	96%		
	40°C				324	54%	321	53%	348	56%	323	53%	344	57%
-2 A	4°C	1044,898	324	339	321	100%	-	-	348	108%	355	111%	344	107%
	30°C				321	100%	347	108%	351	110%	336	105%		
	40°C				150	46%	152	47%	169	51%	177	54%	166	51%
-3 A	4°C	1044,898	150	152	127	100%	-	-	169	133%	166	131%	162	128%
	30°C				147	101%	165	130%	176	133%	166	131%		
	40°C				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

REIVINDICACIONES

1. Una formulación estabilizada de ADAMTS13, que comprende:
 - 5 (a) de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13;
 - (b) menos de 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable
 - (c) calcio de 0,5 mM a 20 mM;
 - (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar;
 - (e) un tensioactivo no iónico; y
 - 10 (f) un agente tamponador para mantener un pH entre 6,0 y 8,0.
2. La formulación de la reivindicación 1, que comprende entre 50 unidades y 1000 unidades de actividad de ADAMTS13 por ml.
- 15 3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que la sal es cloruro sódico o cloruro potásico.
4. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende
 - (a) calcio entre 1,0 mM y 10,0 mM; o
 - 20 (b) calcio entre 2,0 mM y 4,0 mM.
5. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende entre el 2 % y el 6 % de un azúcar y/o alcohol de azúcar.
- 25 6. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el azúcar y/o alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol y una combinación de los mismos.
7. La formulación de la reivindicación 6, en la que el azúcar y/o alcohol de azúcar comprende sacarosa y manitol.
- 30 8. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende entre el 0,01 % y el 0,1 % de un tensioactivo no iónico.
9. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, Pluronic F-68, y BRIJ 35.
- 35 10. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende entre 5 mM y 100 mM de un agente tamponador.
11. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el agente tamponador es histidina o HEPES.
- 40 12. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el pH de la formulación es $7,0 \pm 0,2$.
- 45 13. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende
 - (a) de 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13;
 - (b) NaCl de 0 mM a 60 mM;
 - (c) calcio de 2 mM a 4 mM;
 - 50 (d) manitol del 2 % al 4 %;
 - (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %;
 - (f) polisorbato 80 del 0,025 % al 0,1 %; y
 - (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).
- 55 14. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende
 - (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13;
 - (b) NaCl de 0 mM a 60 mM;
 - (c) calcio de 2 mM a 4 mM;
 - 60 (d) manitol del 2 % al 4 %;
 - (e) sacarosa del 0,5 % al 2 %;
 - (f) polisorbato 80 del 0,025 % al 0,1 %; y
 - (g) histidina de 10 mM a 50 mM ($\text{pH } 7,0 \pm 0,2$).
- 65 15. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que comprende adicionalmente cinc entre 0,5 μM y 20 μM .

16. Una formulación liofilizada de ADAMTS13, en la que la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

5 17. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que la proteína ADAMTS13 es ADAMTS13 humana.

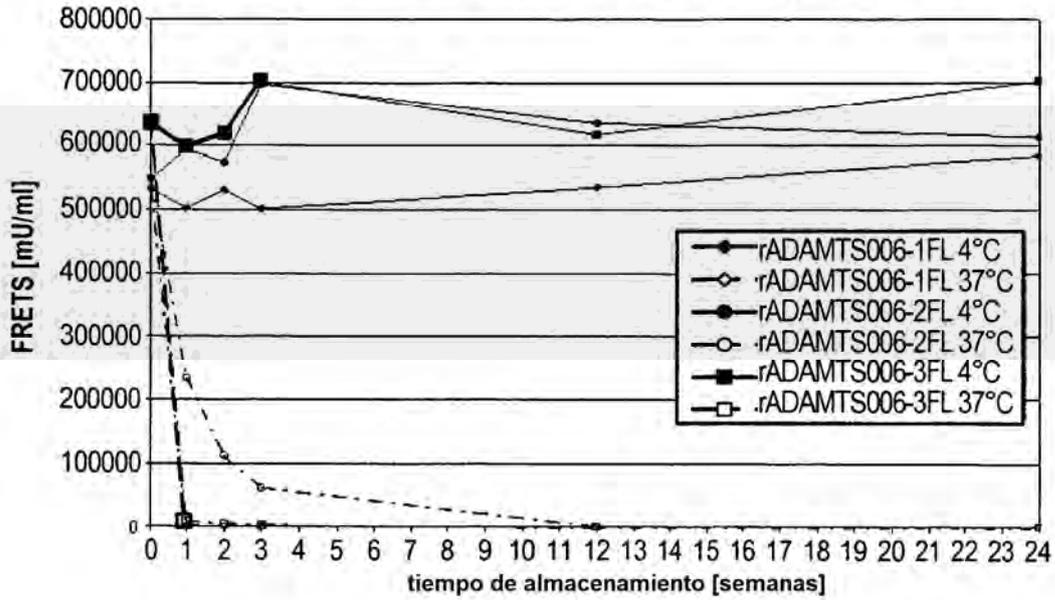
18. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que la proteína ADAMTS13 es ADAMTS13 recombinante.

10

Figura 1

A

Actividad FRETs de las formulaciones de rADAMTS006
(-1: tampón His; -2: tampón fosfato; -3: tampón citrato)



B

Antígeno de ADAMTS13 de formulaciones líquidas de rADAMTS006
(-1: tampón His; -2: tampón fosfato; -3: tampón citrato)

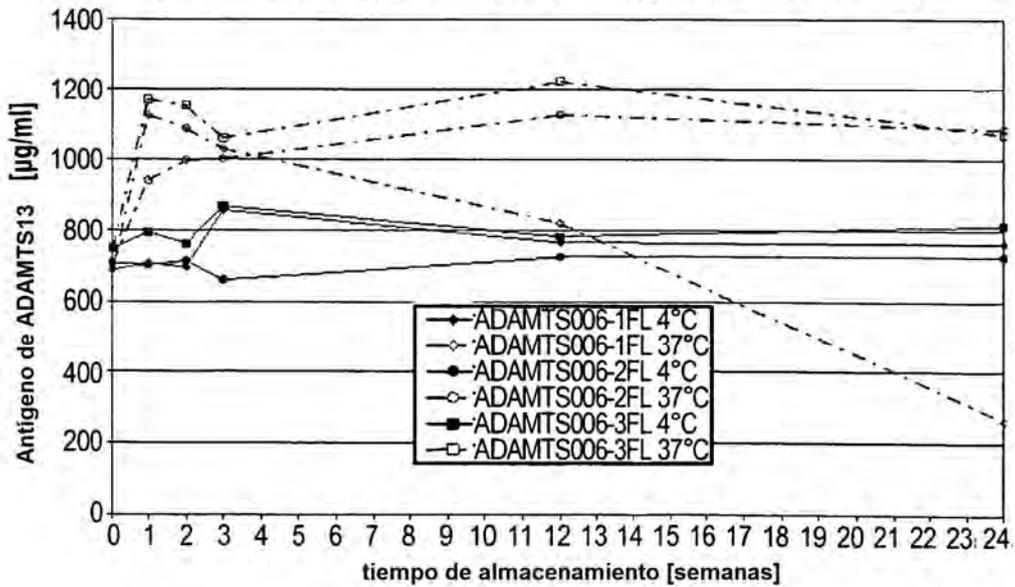


Figura 2

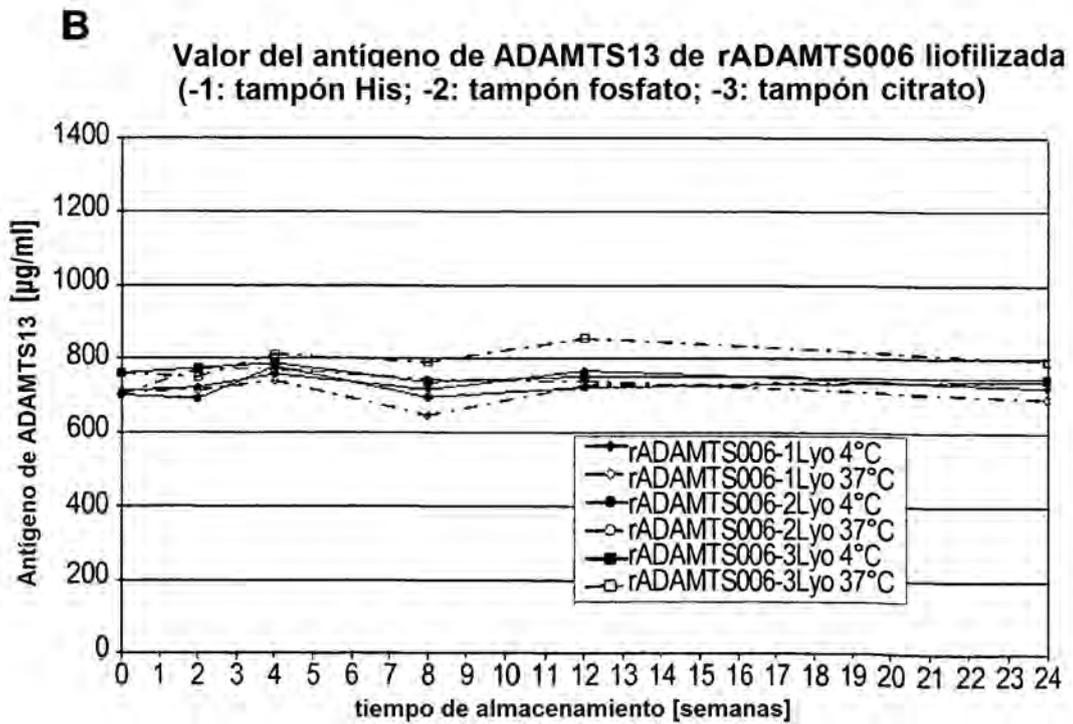
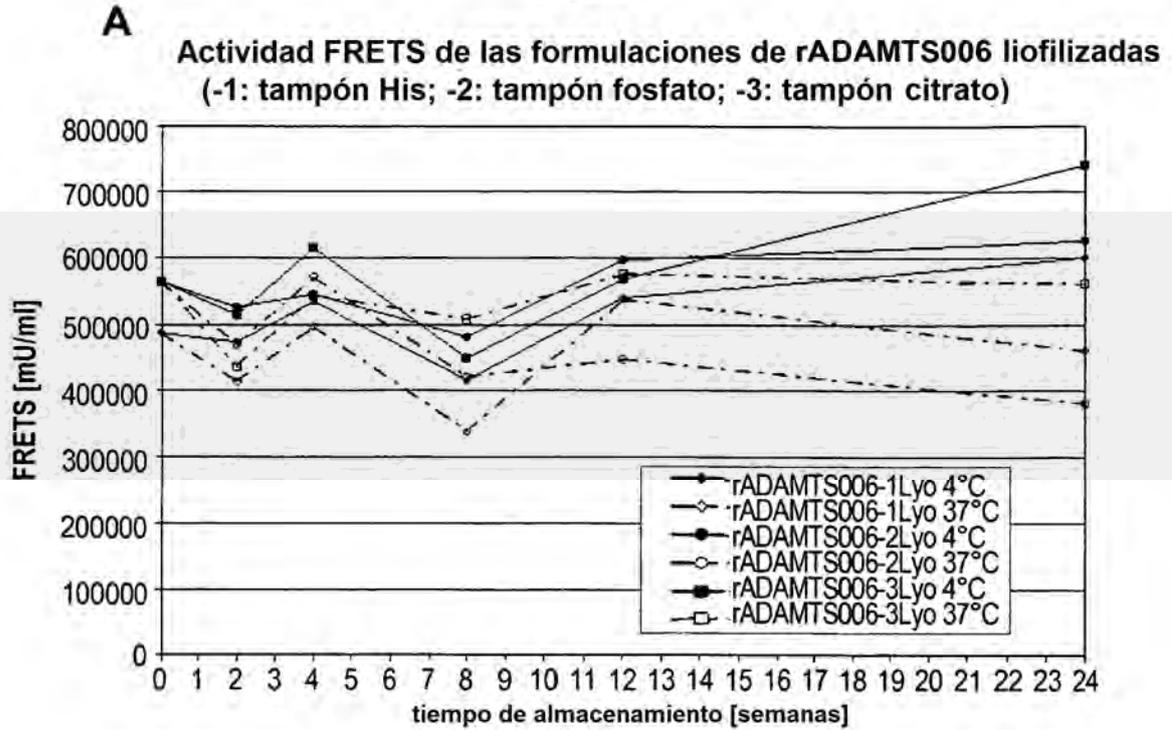


Figura 3

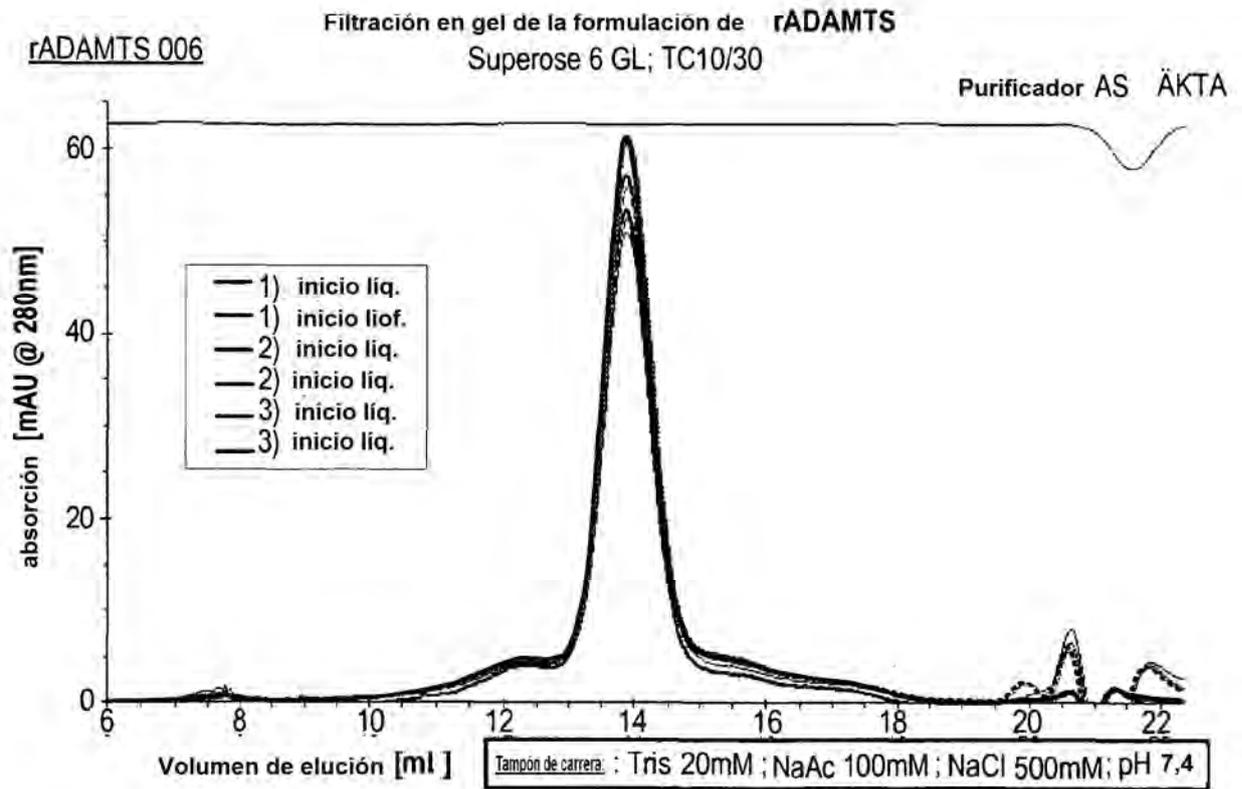


Figura 4

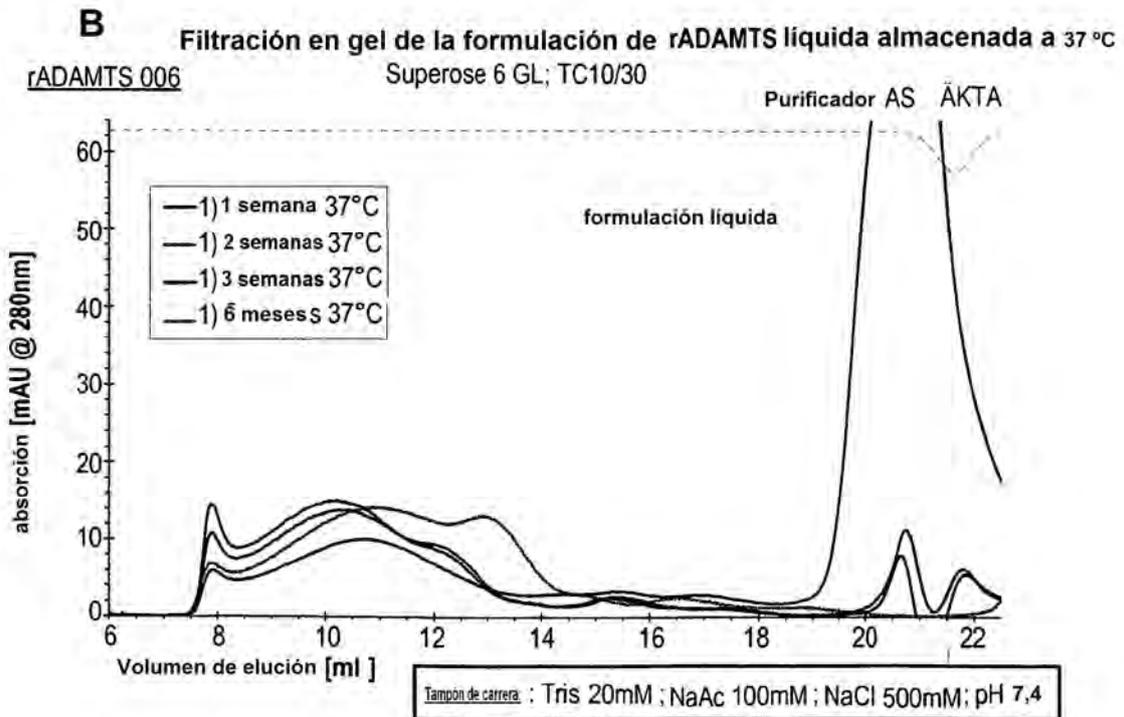
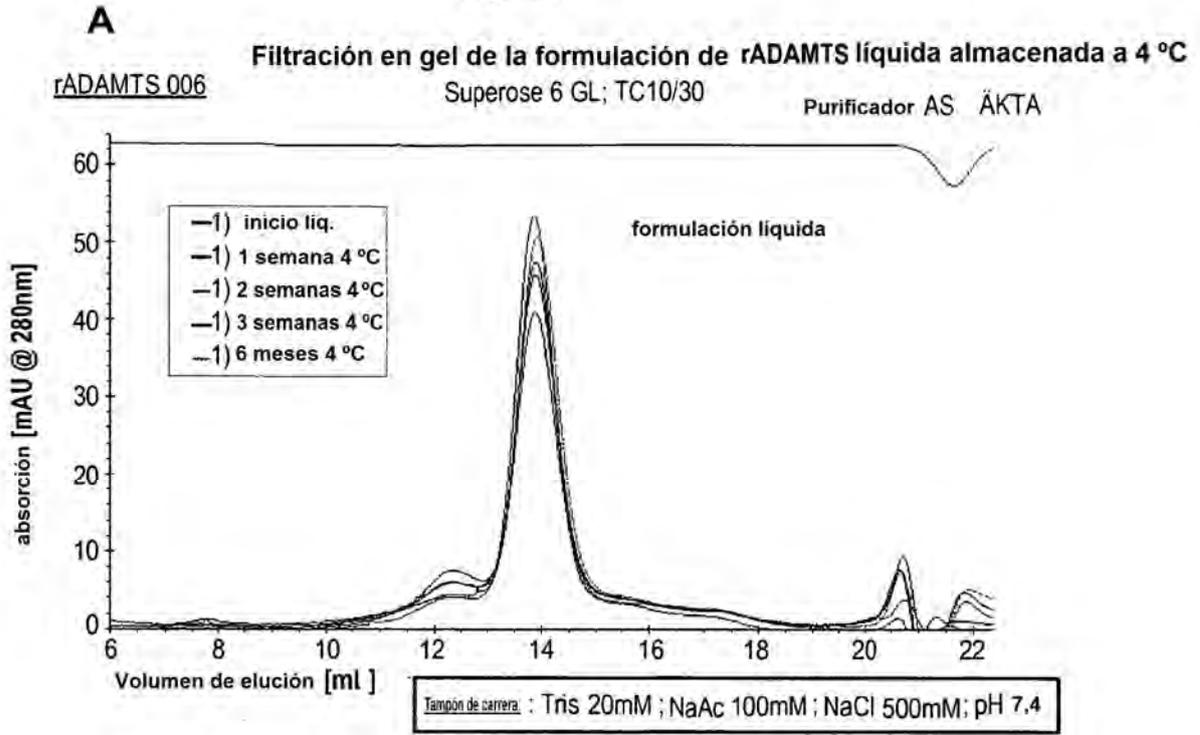


Figura 5

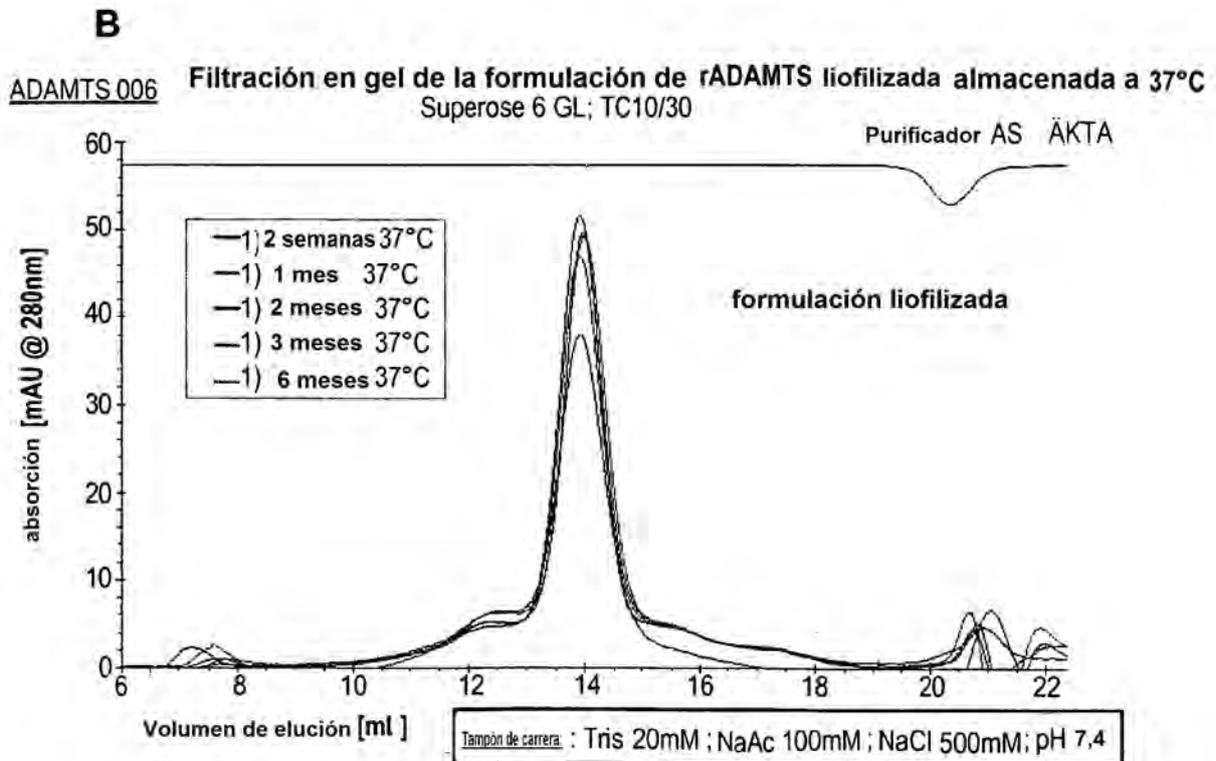
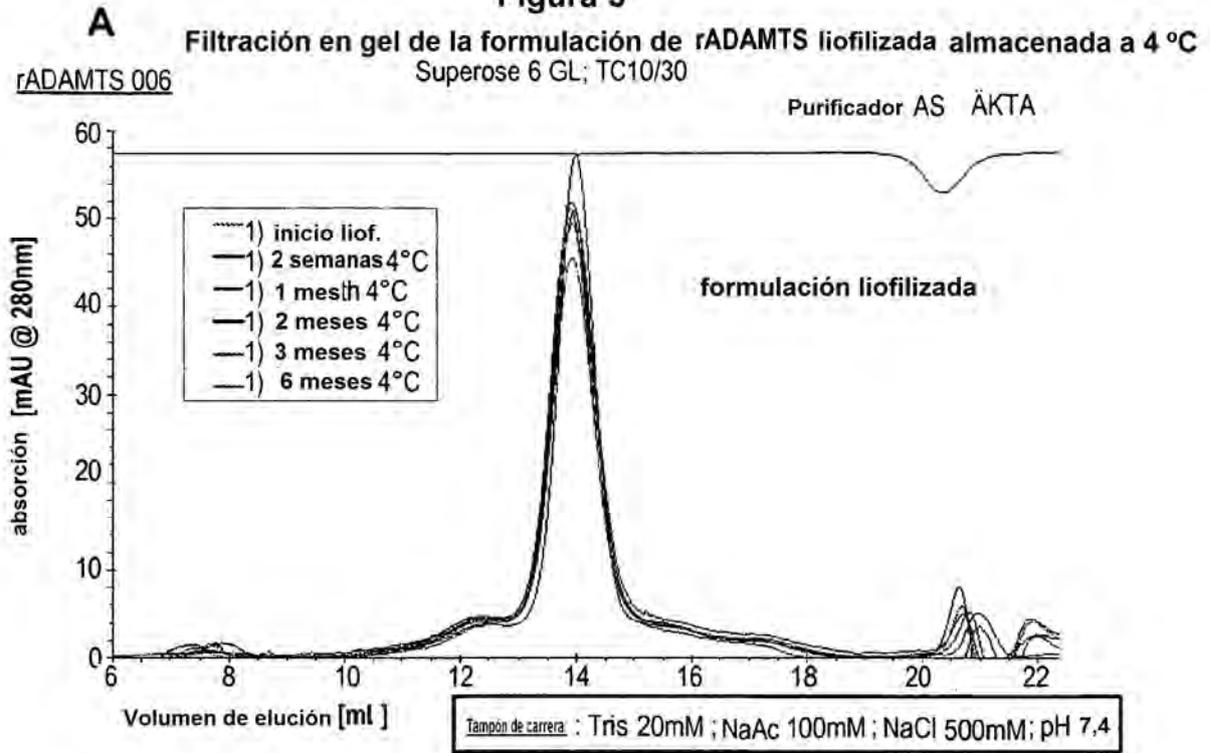


Figura 6

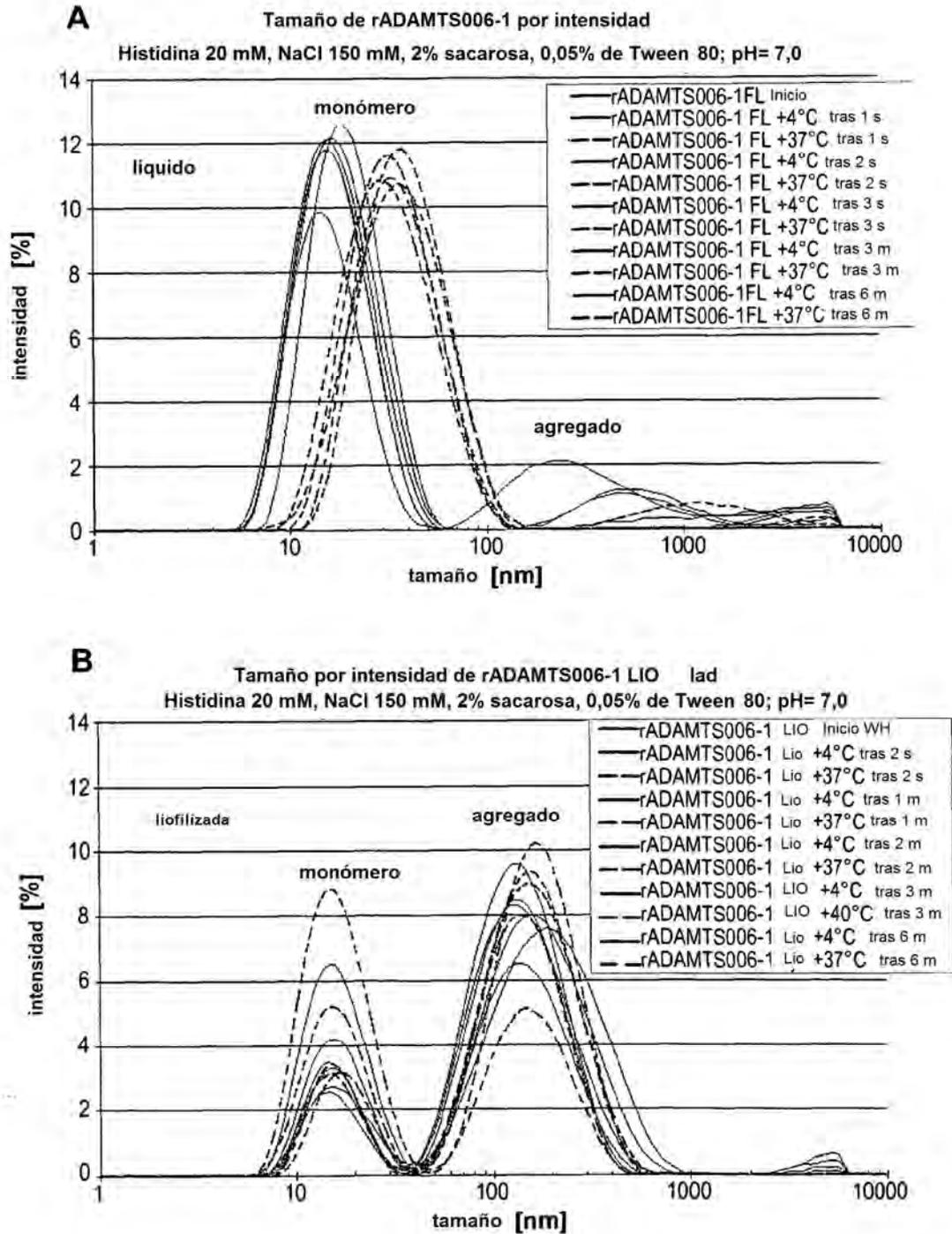


Figura 7

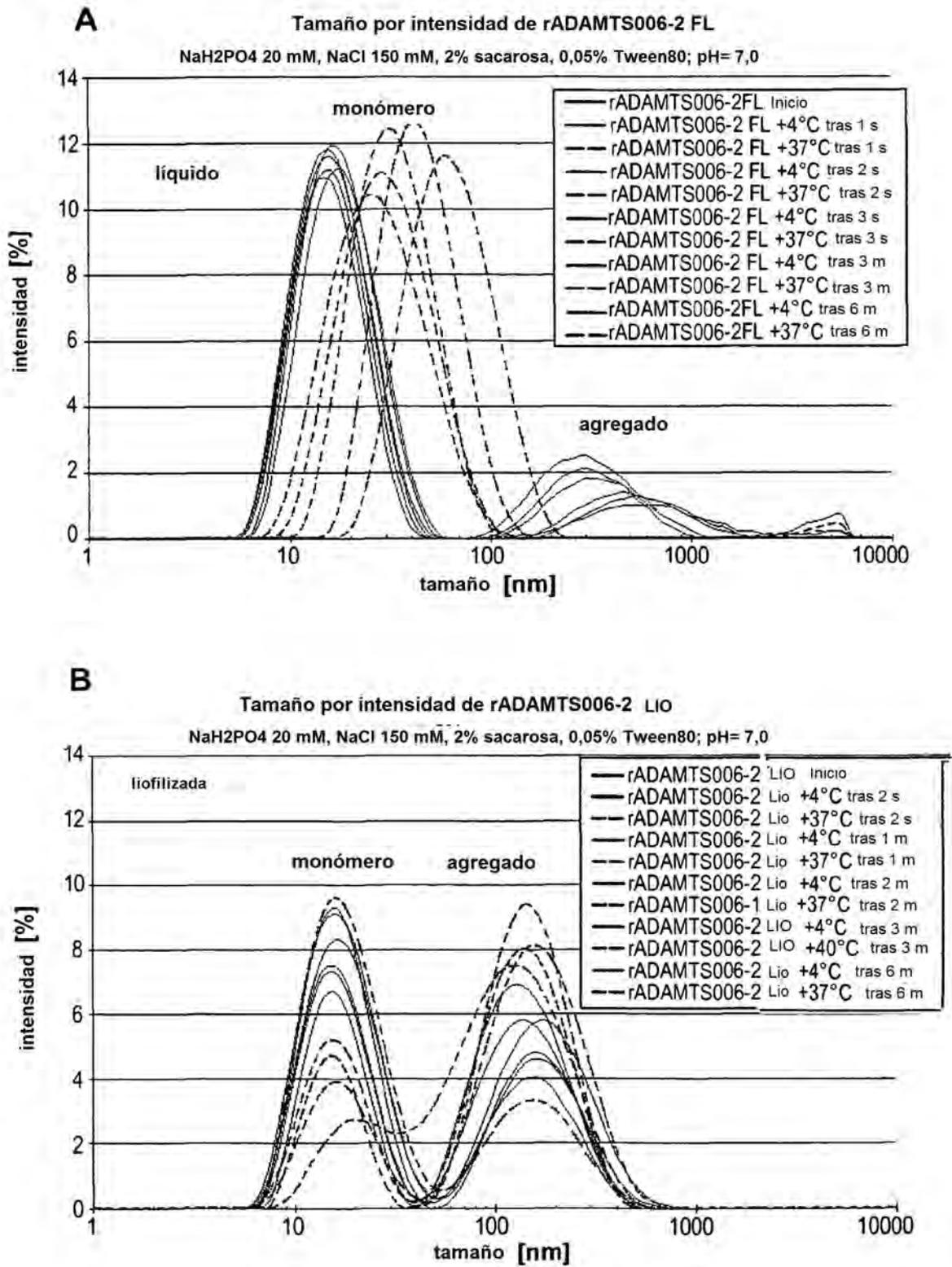


Figura 8

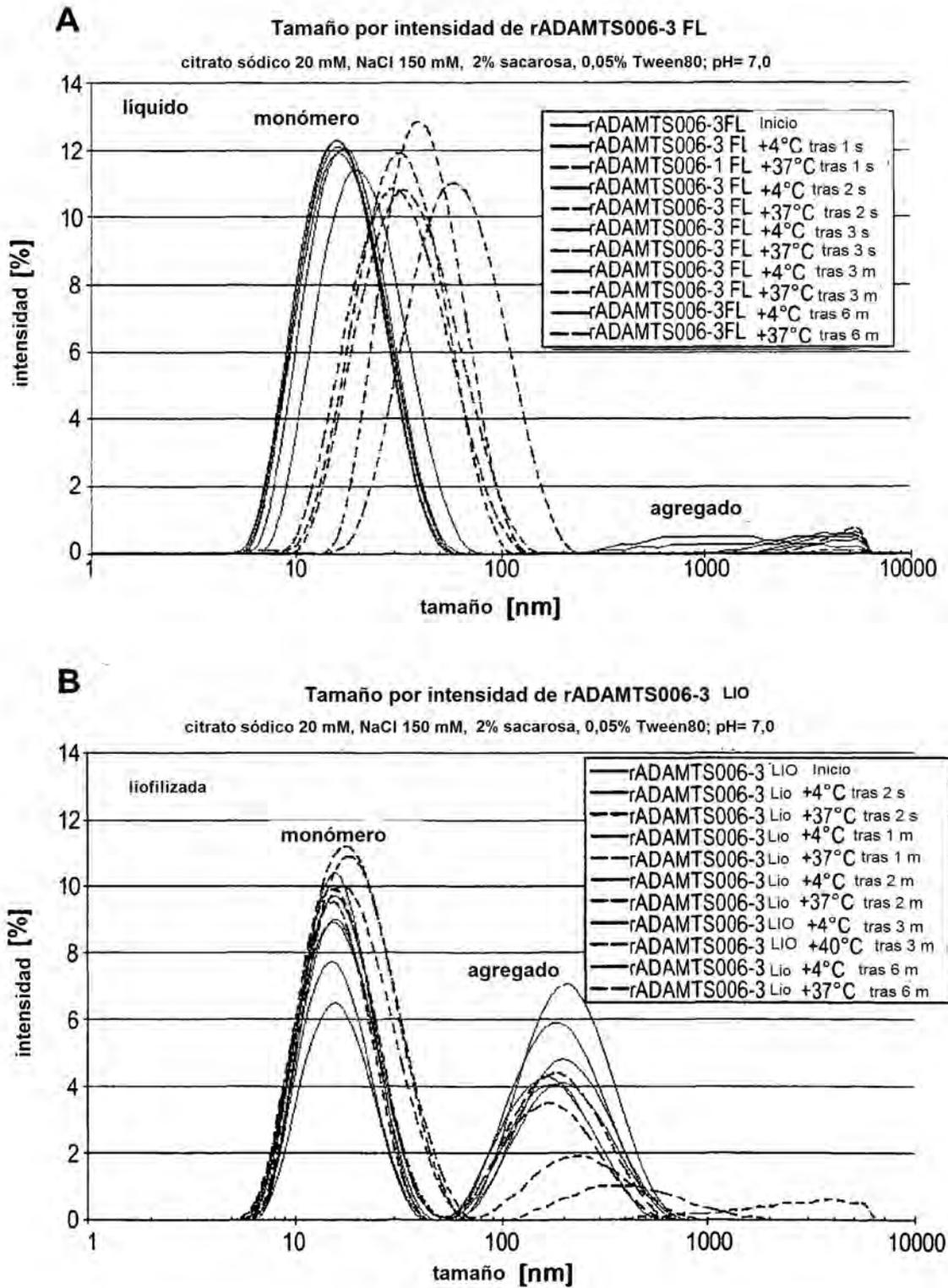


Figura 9

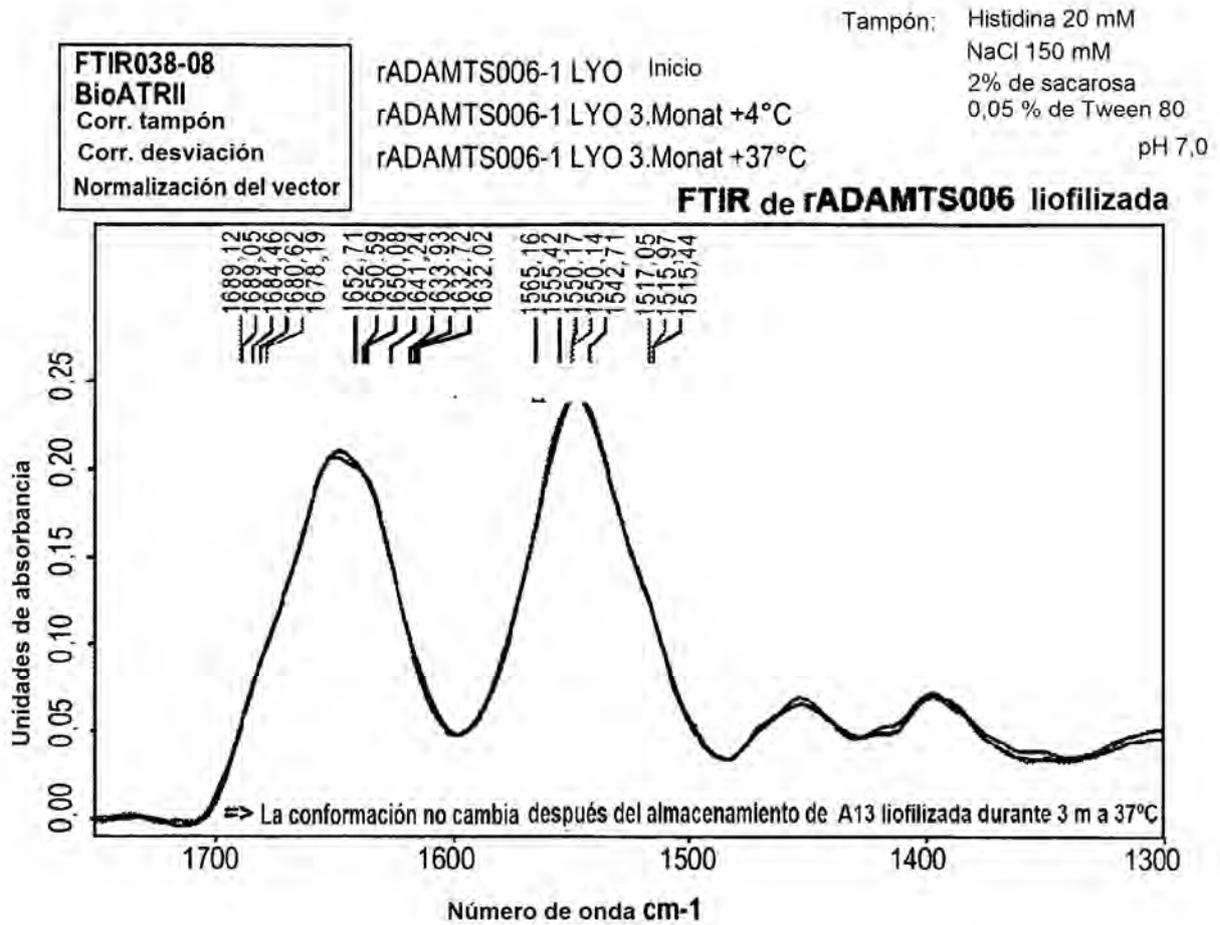


Figura 10

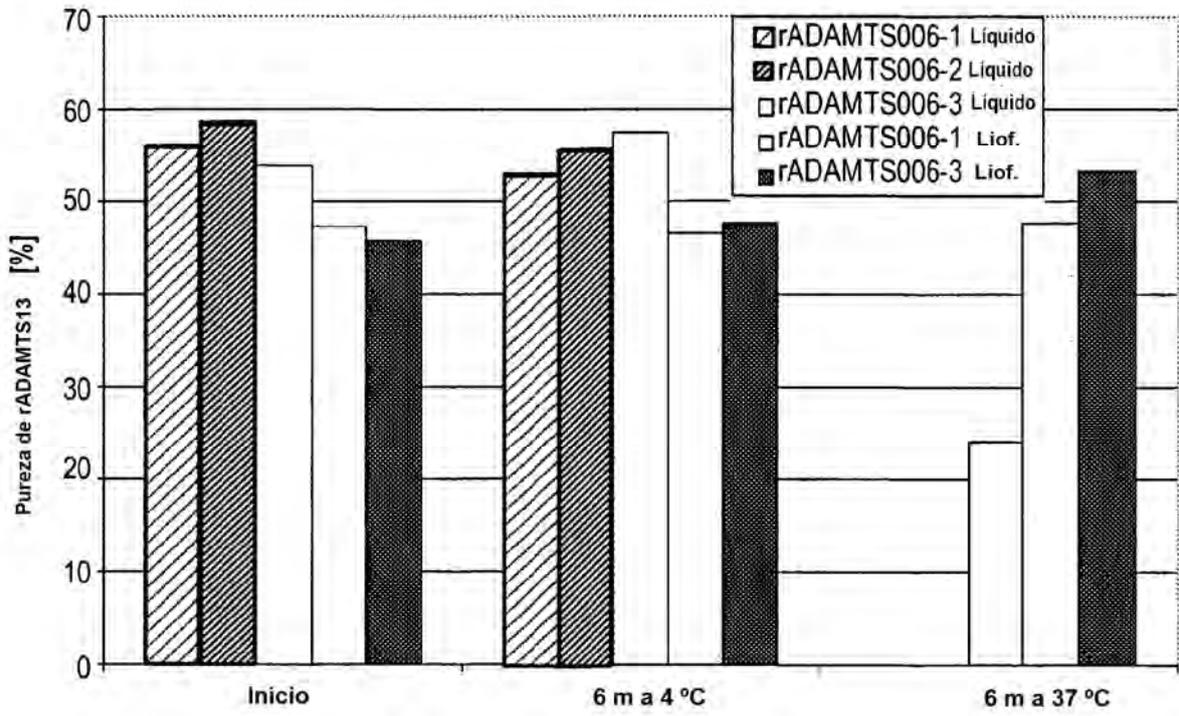


Figura 11

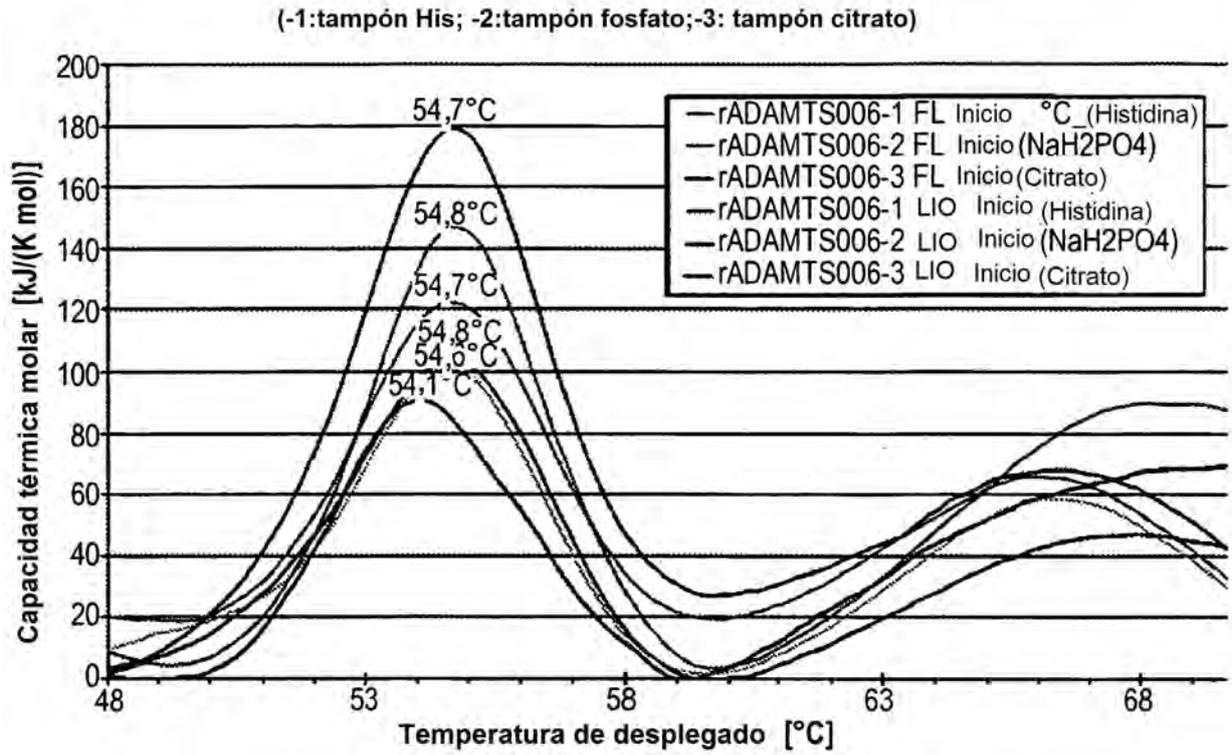
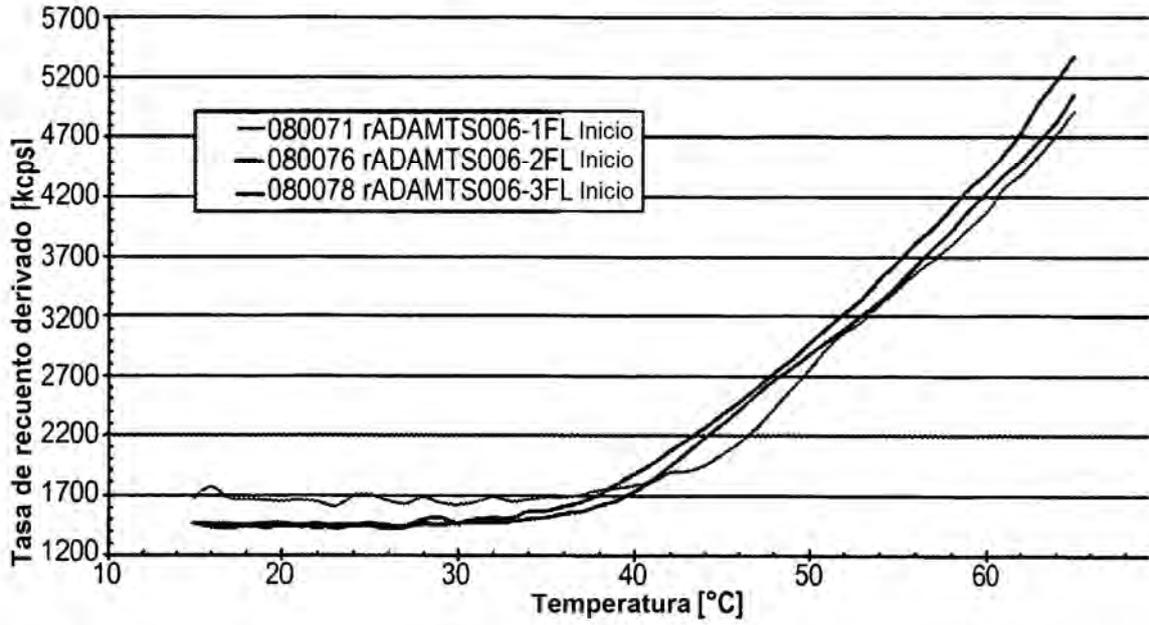


Figura 12

Tasa de recuento derivado de formulaciones de **rADAMTS006**
 (-1:tampón His; -2:tampón fosfato;-3: tampón citrato)



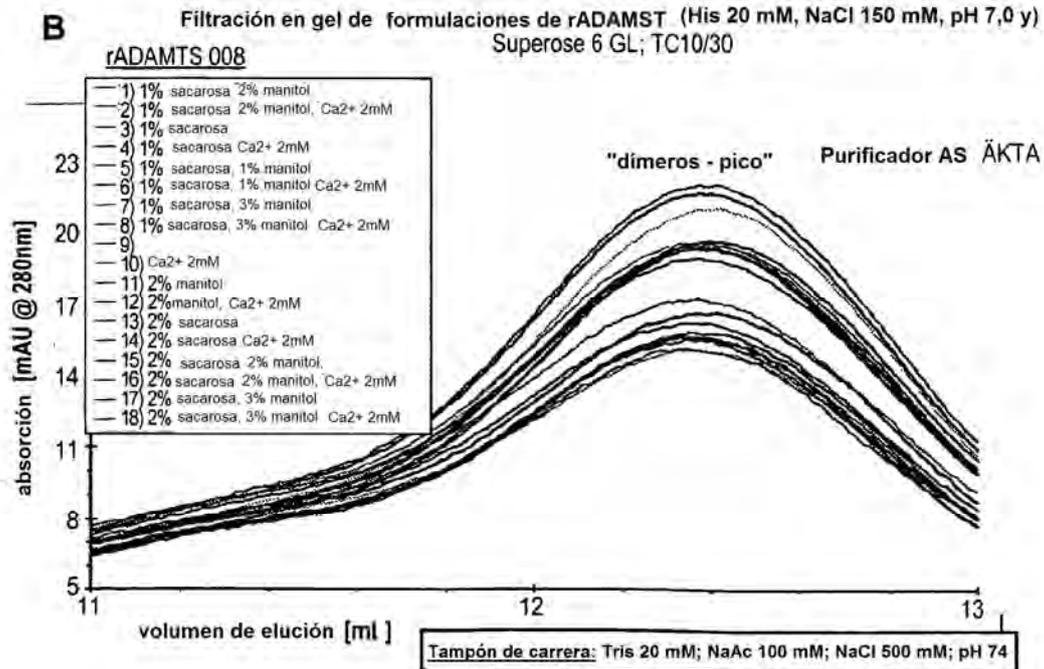
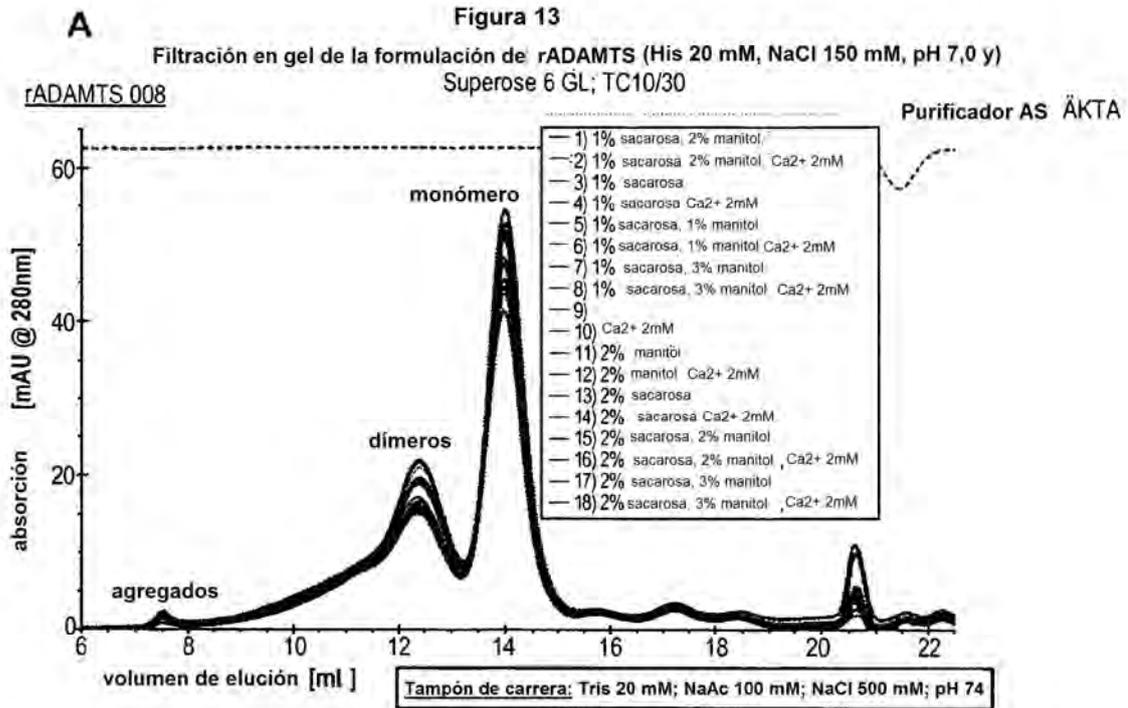


Figura 14

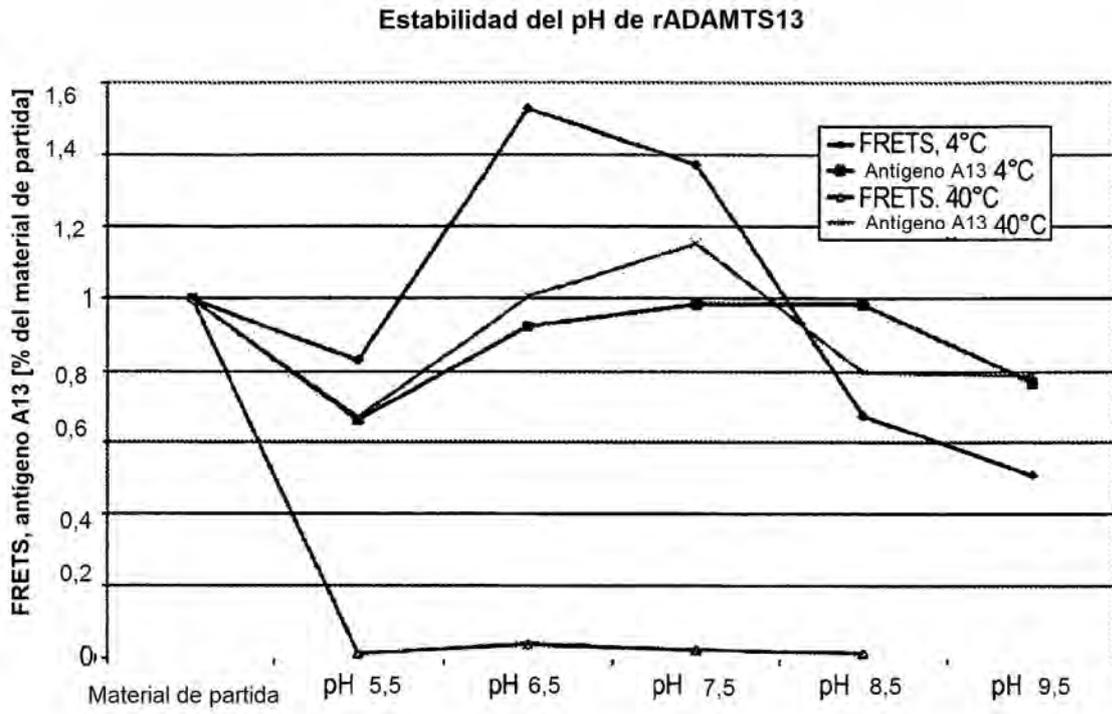


Figura 15

Actividad FRETs de formulaciones líquidas de rADAMTS13
 (His 20 mM, NaCl 150 mM, 2% de sacarosa, 0,05% de Tween, pH 7,0)
 Variante A+C sin CaCl₂ 2mM ; Variante B+D con CaCl₂

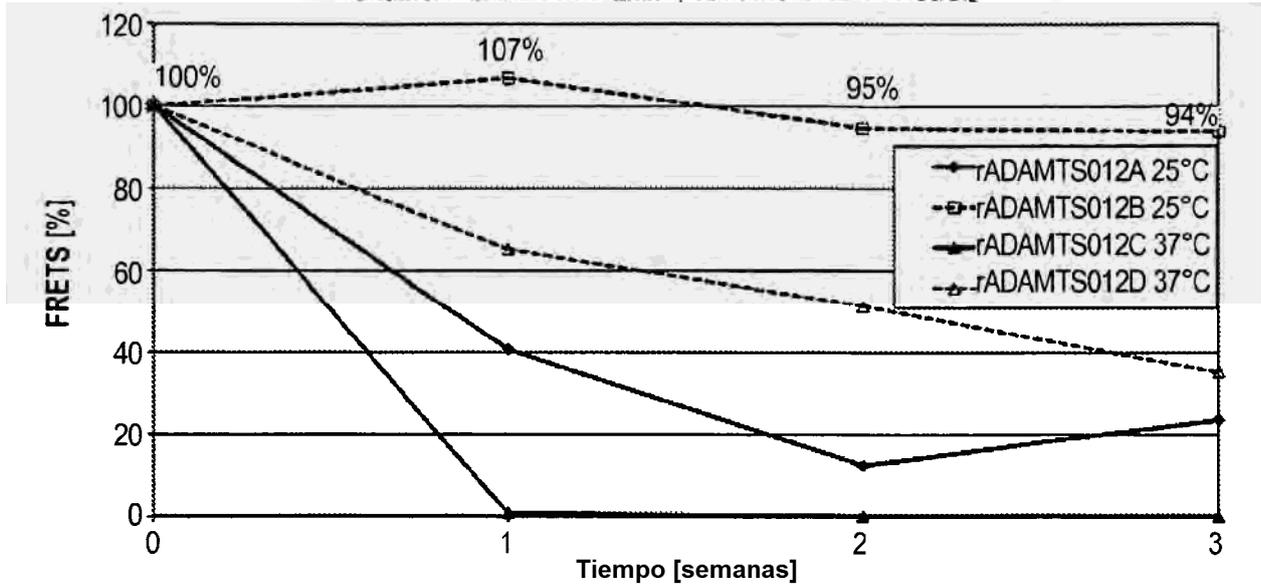


Figura 16

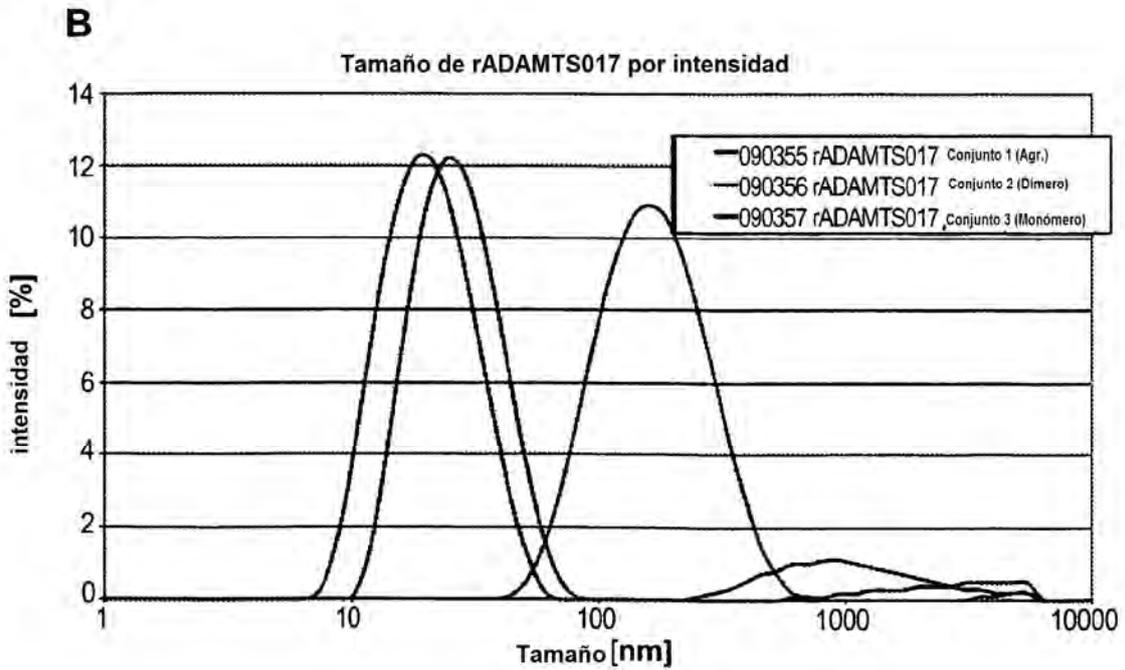
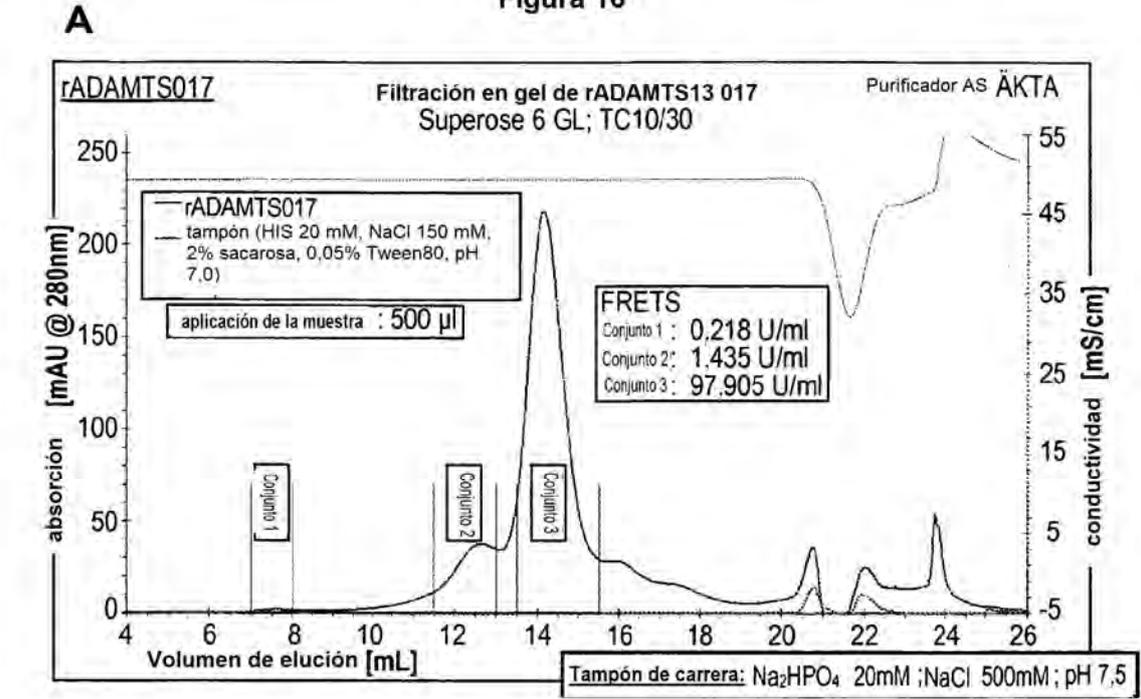


Figura 17

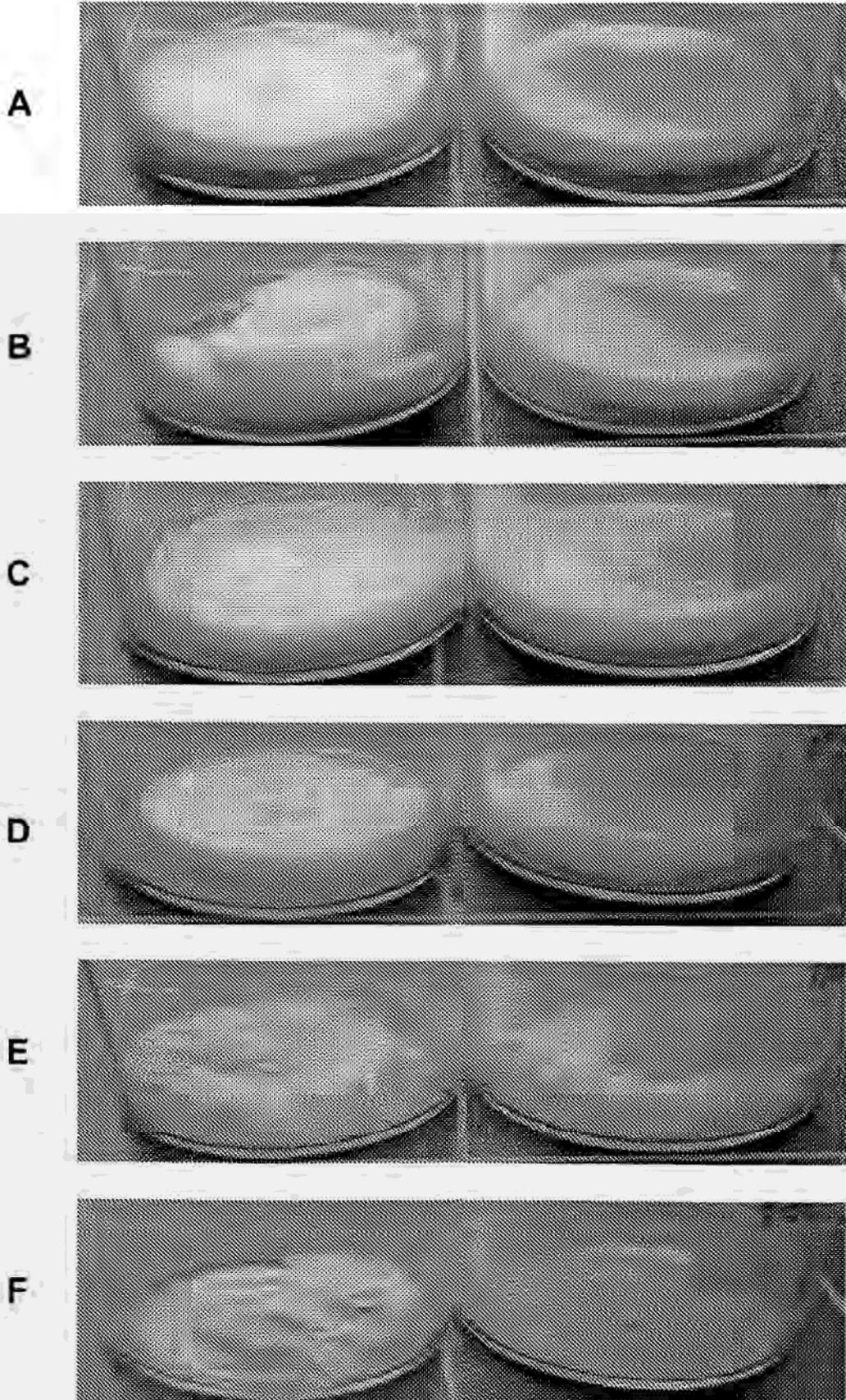


Figura 18

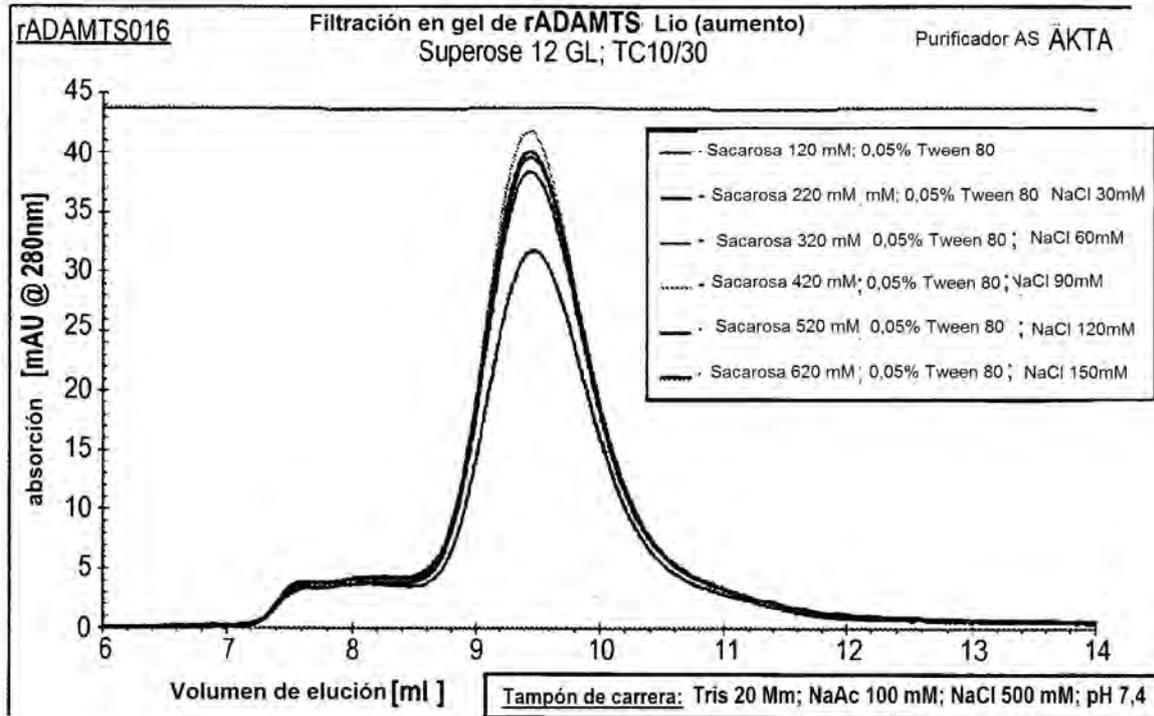


Figura 19

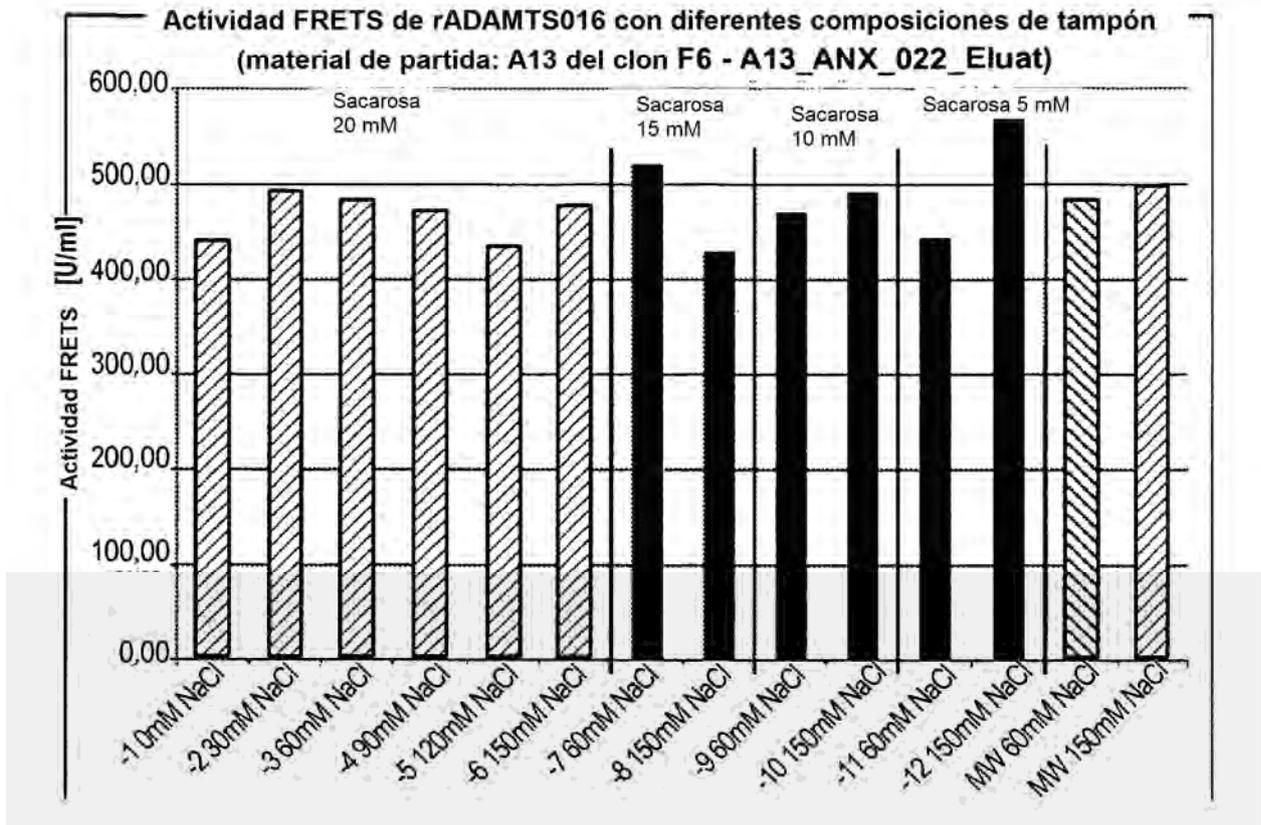
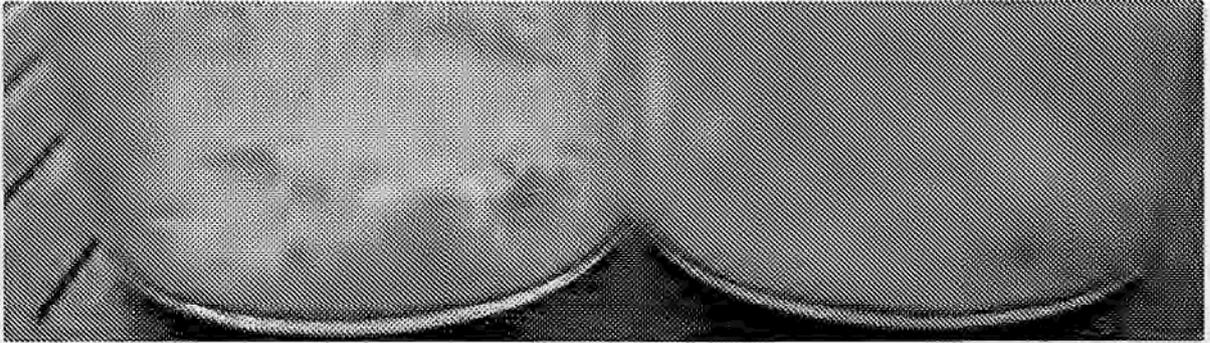


Figura 20

A



B

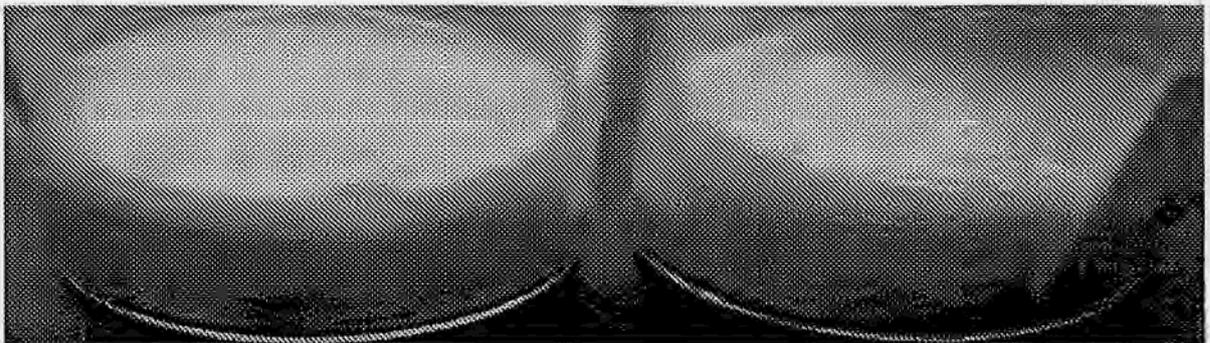


Figura 21

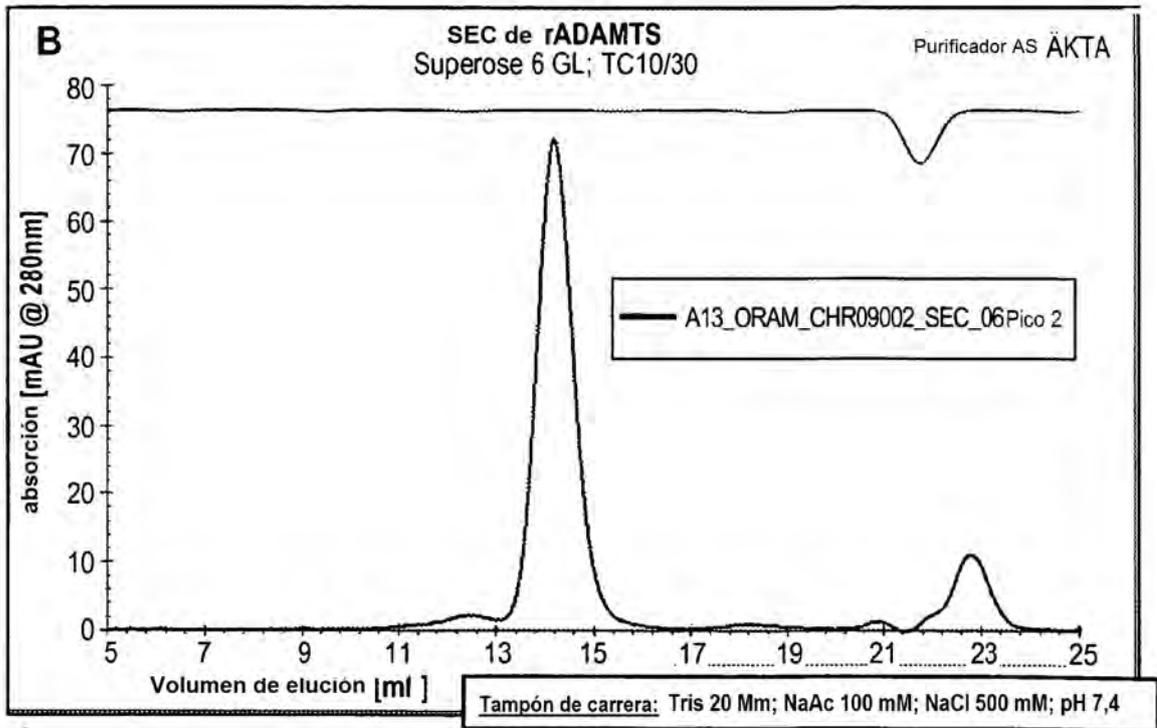
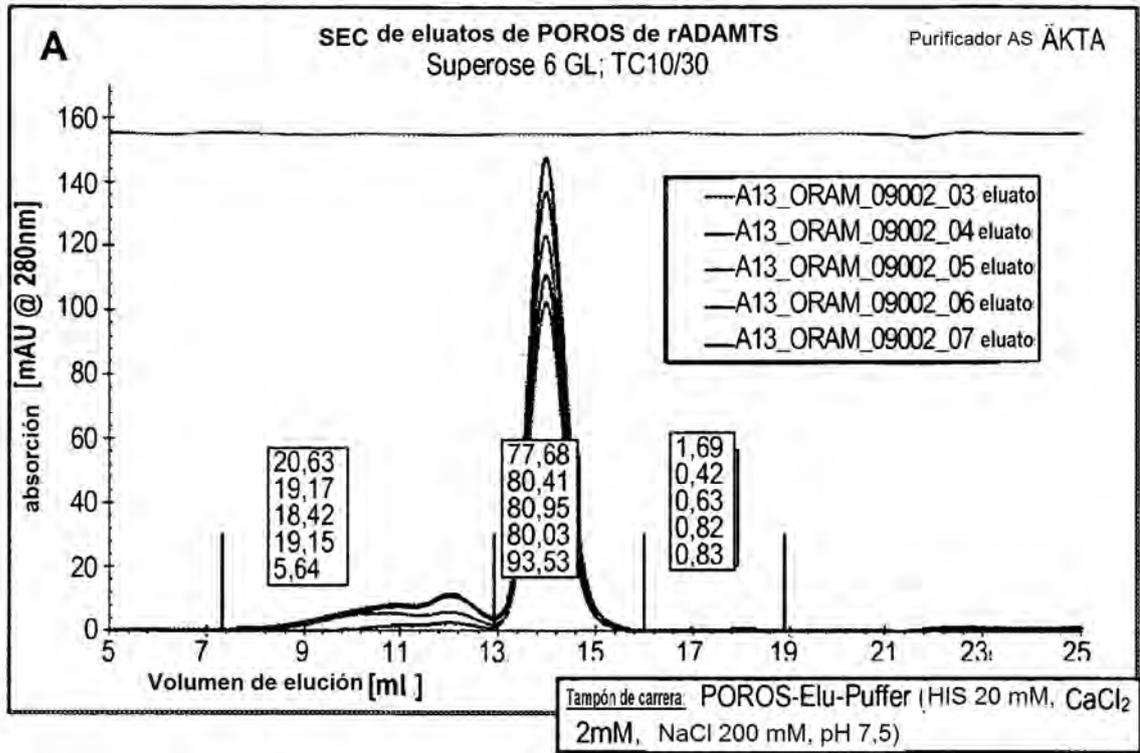


Figura 22A

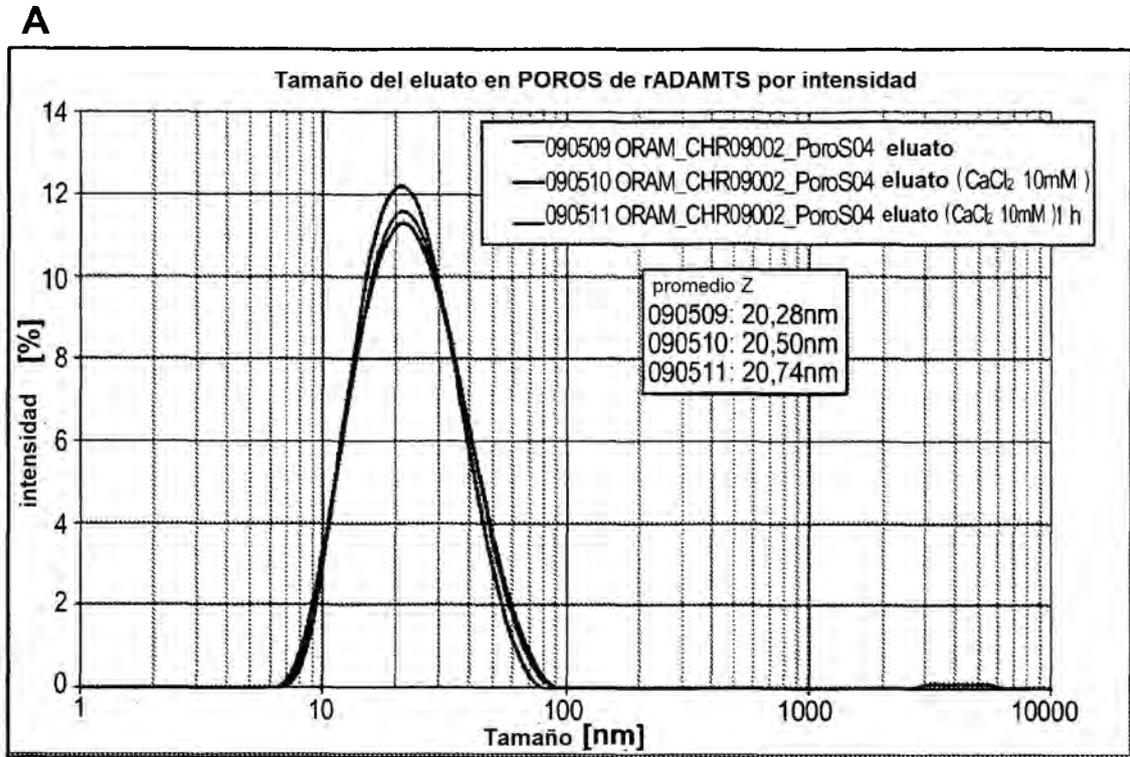


Figura 22B

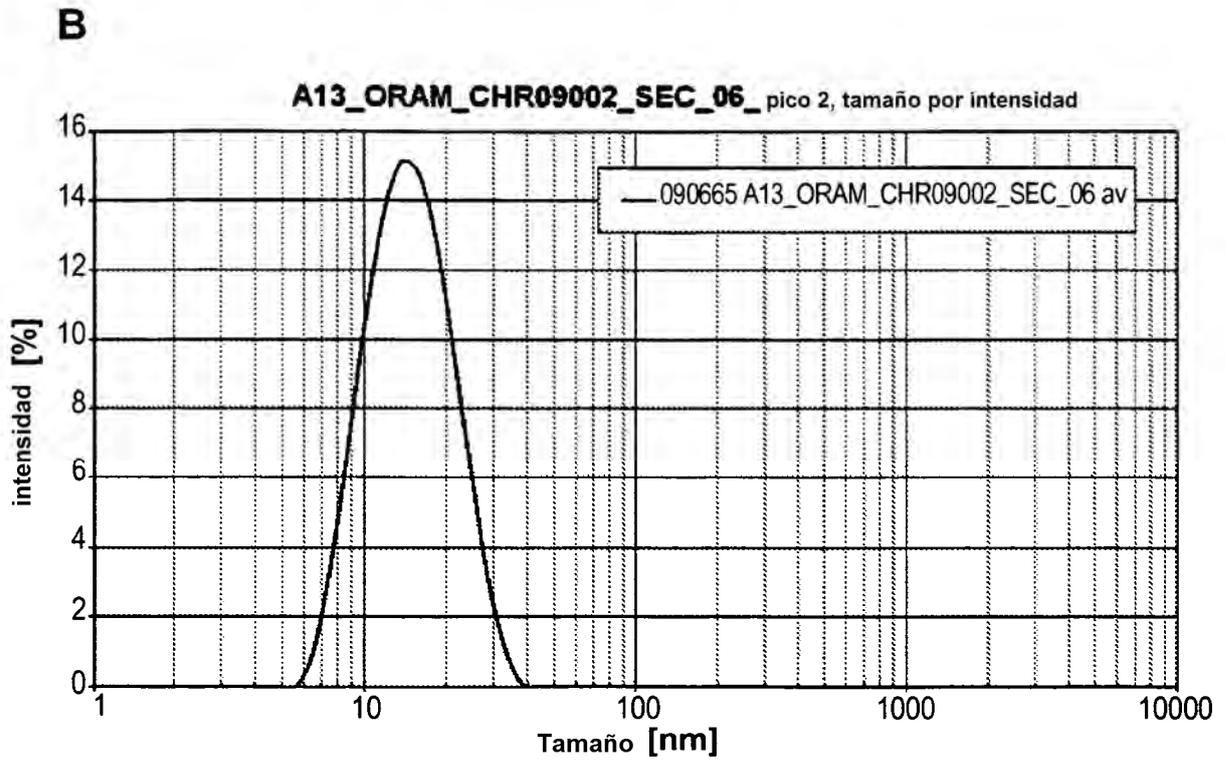
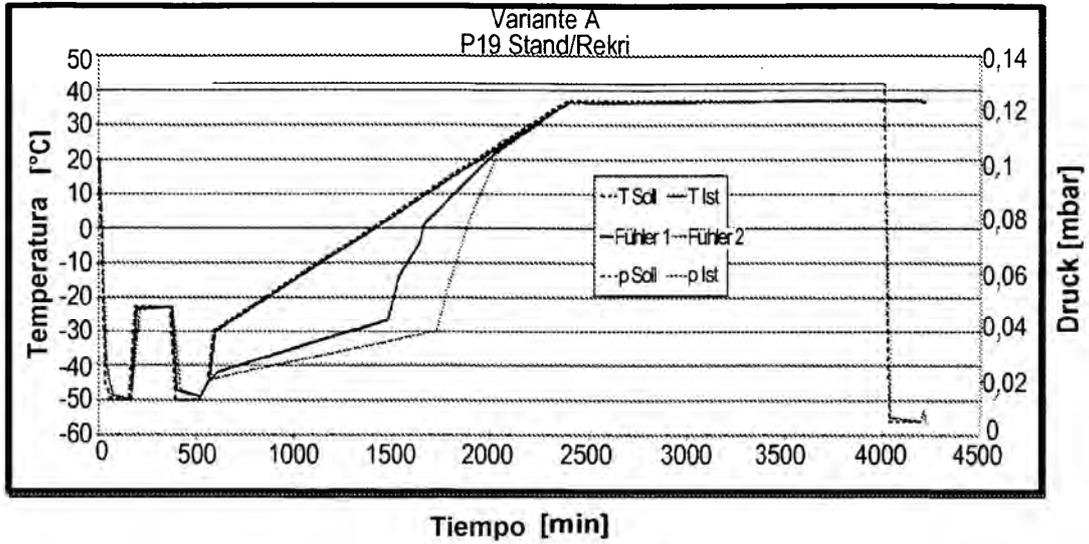


Figura 23

A



B

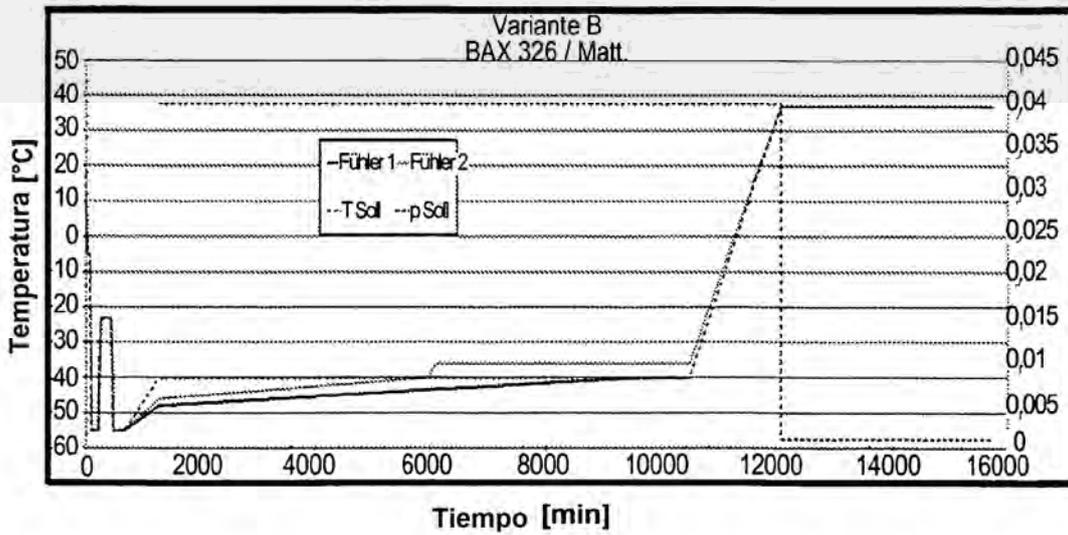


Figura 24A

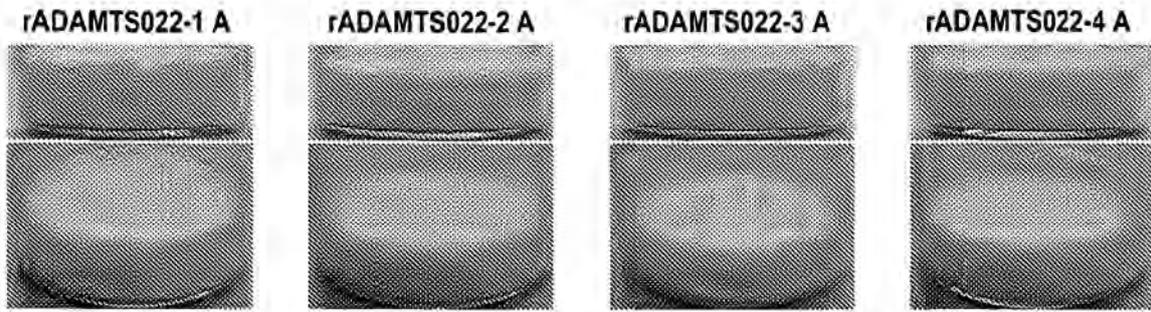


Figura 24B

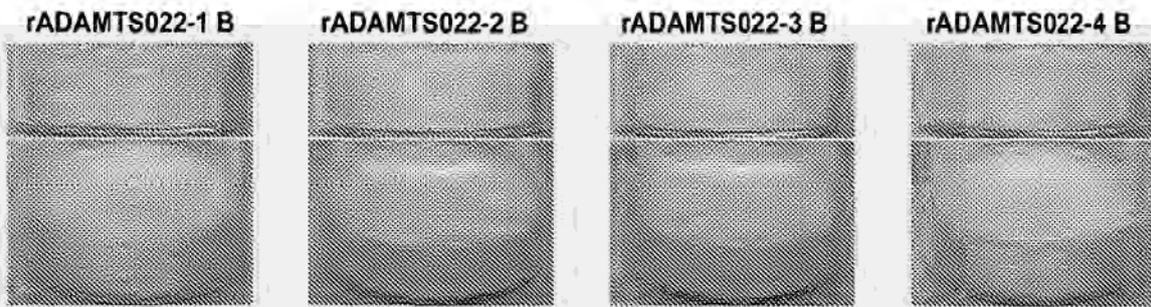
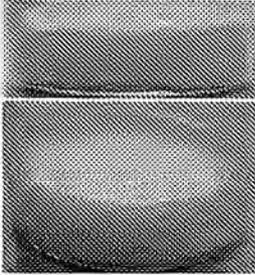
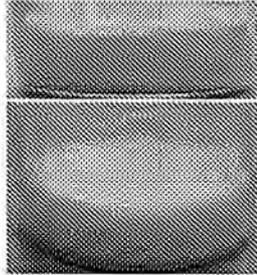


Figura 24C

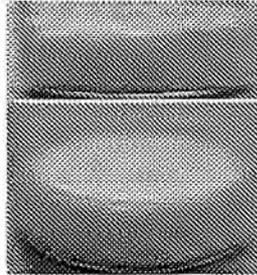
rADAMTS022-5 A



rADAMTS022-6 A



rADAMTS022-7 A



rADAMTS022-8 A

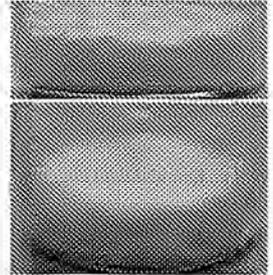
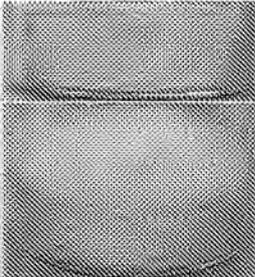
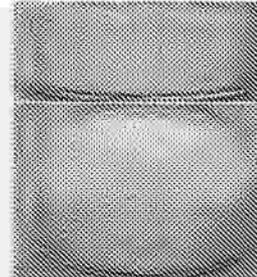


Figura 24D

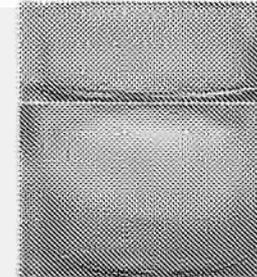
rADAMTS022-5 B



rADAMTS022-6 B



rADAMTS022-7 B



rADAMTS022-8 B

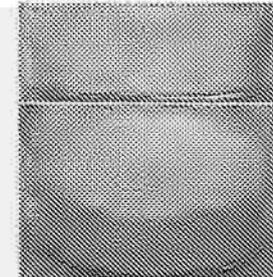


Figura 25

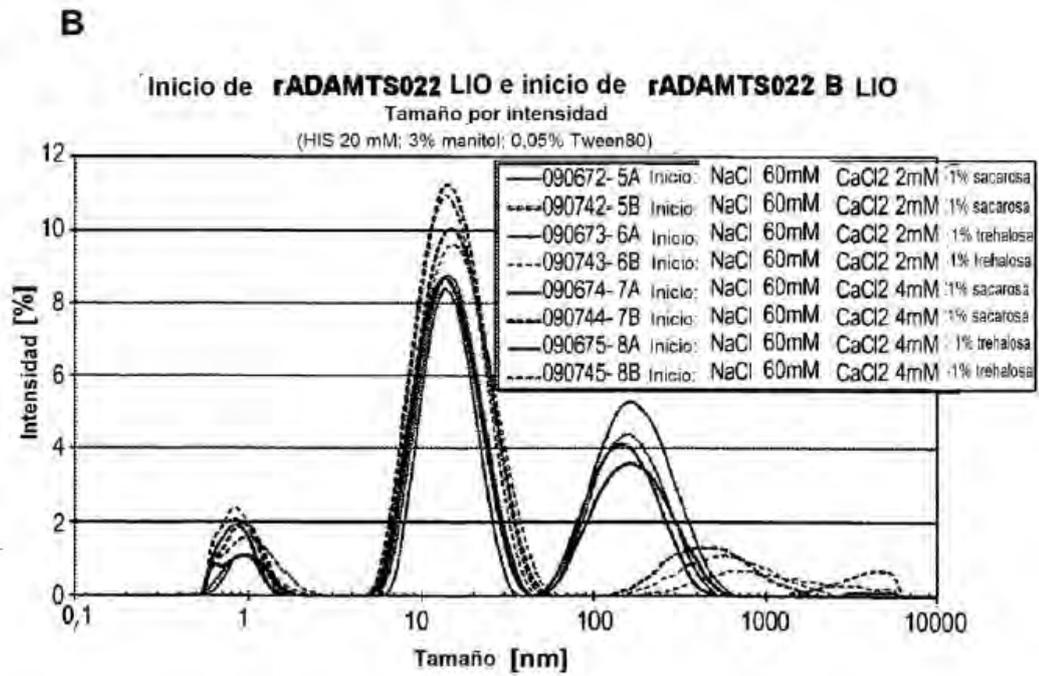
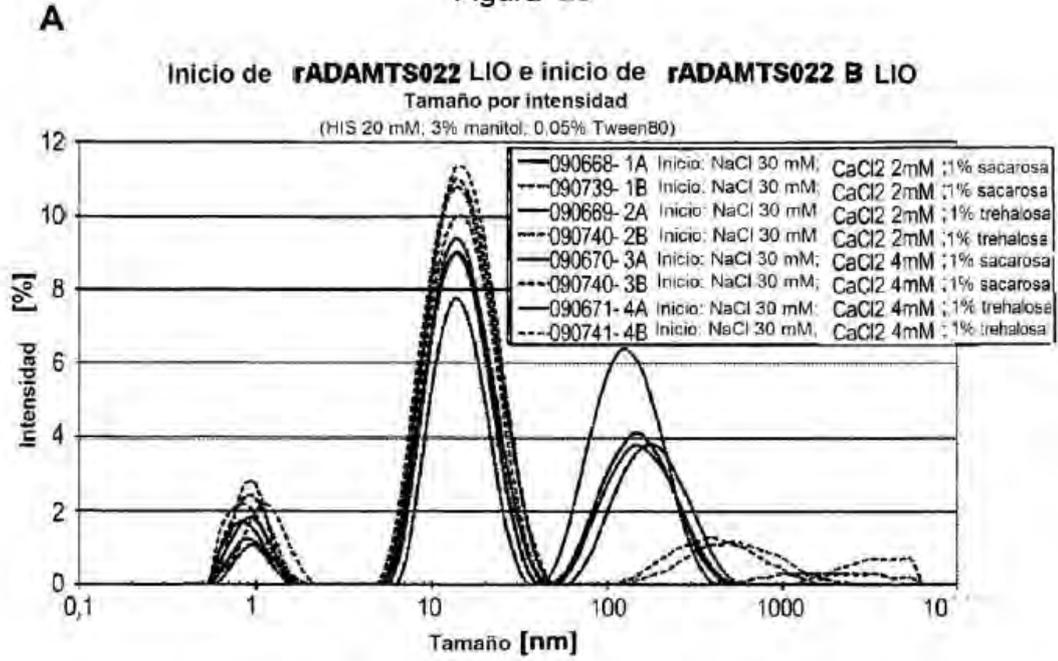


Figura 26

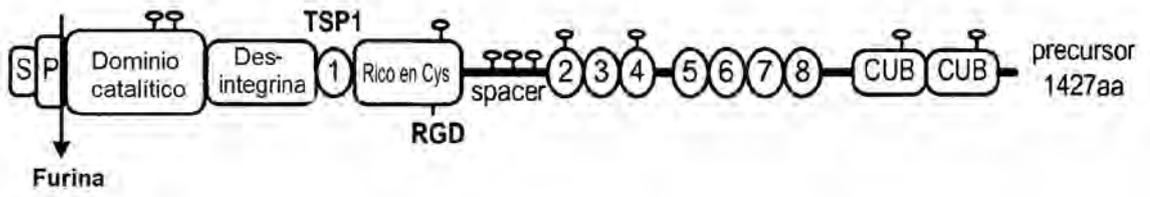


Figura 27

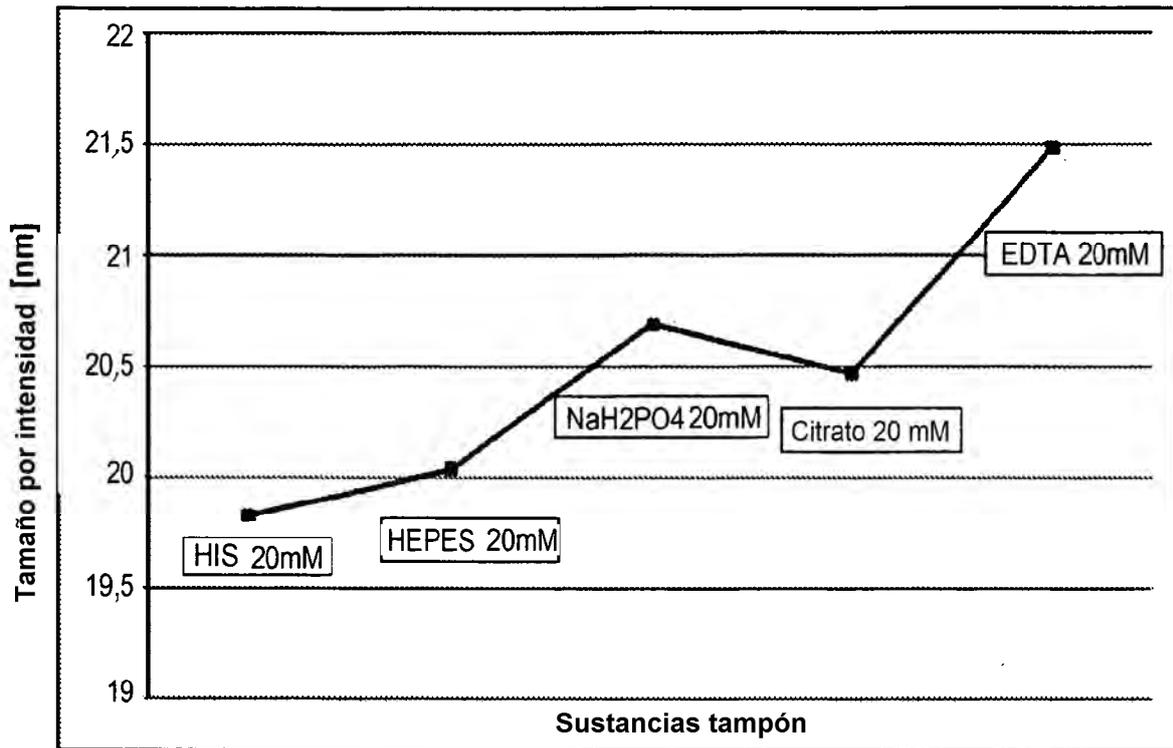


Figura 28

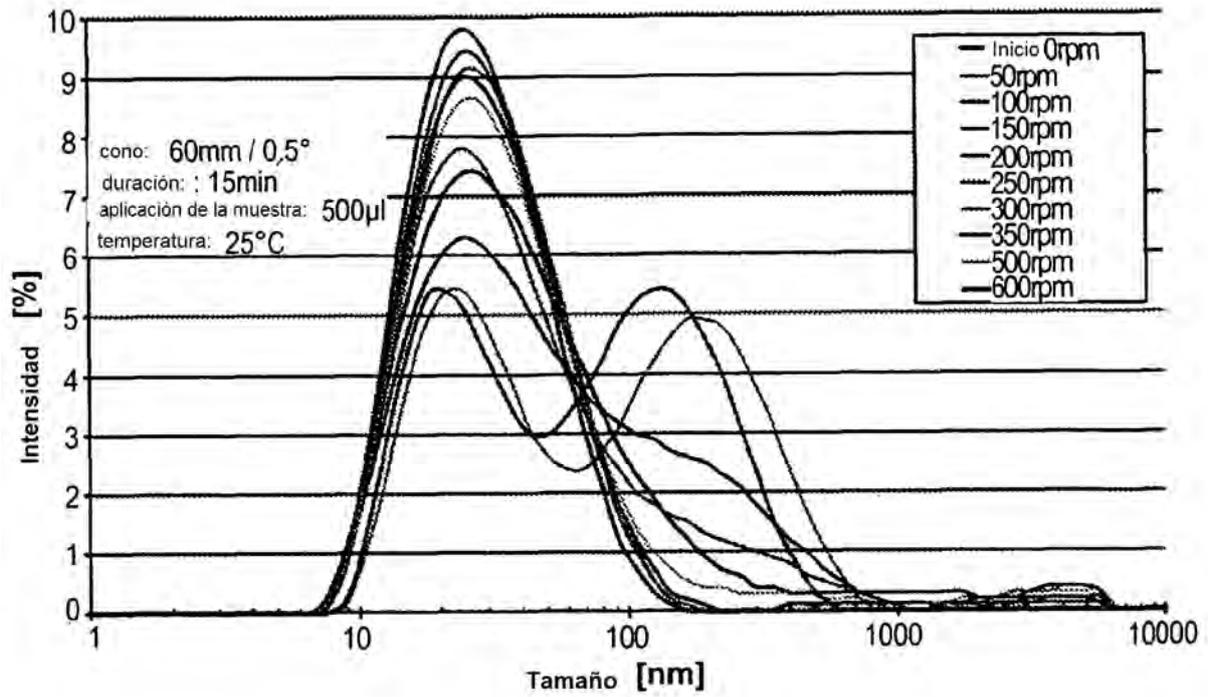


Figura 29

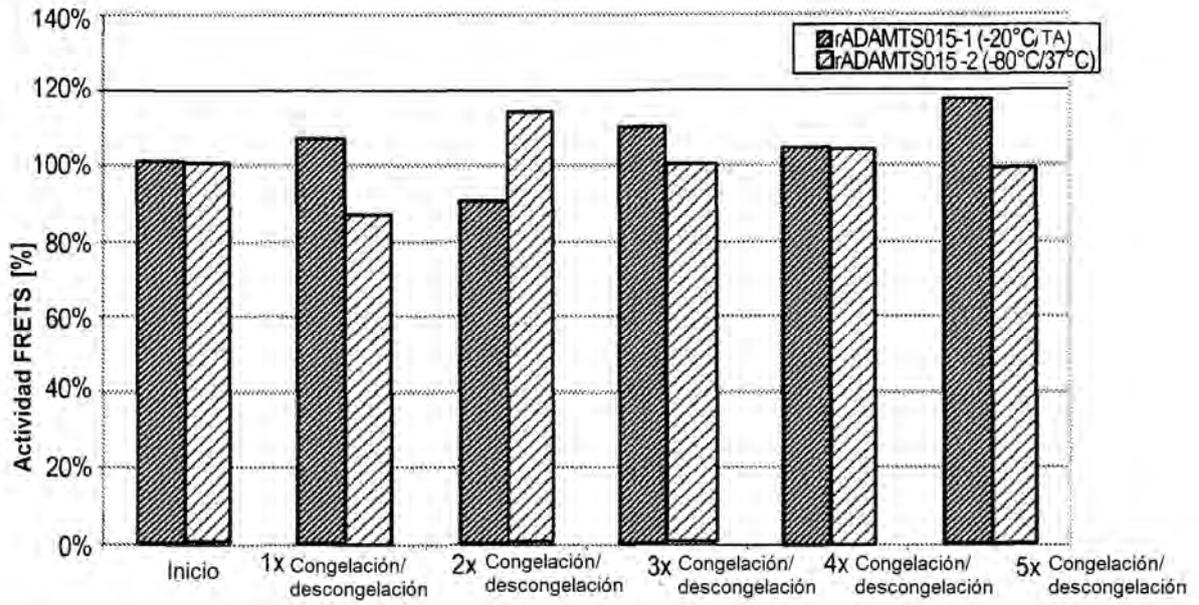


Figura 30

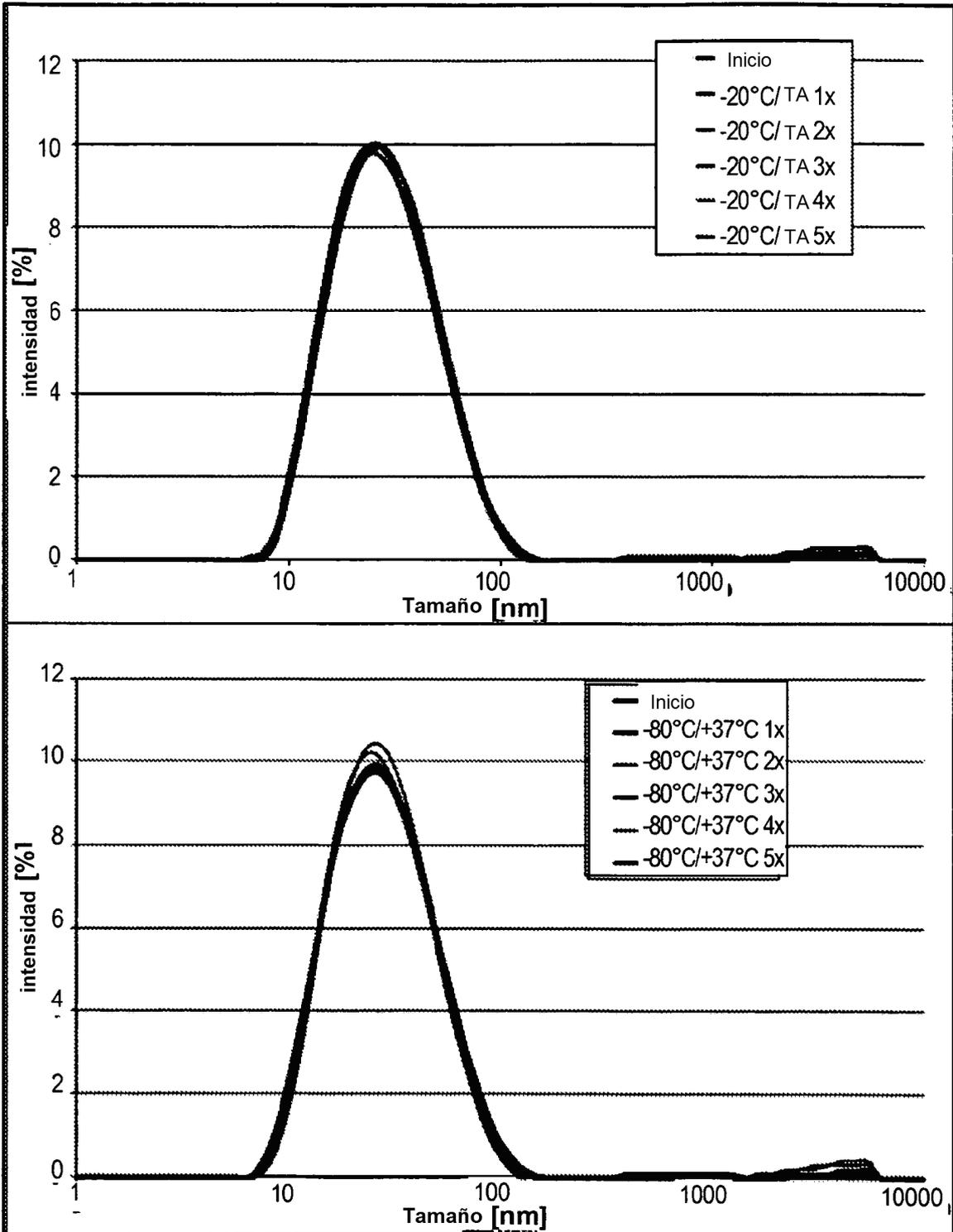


Figura 31

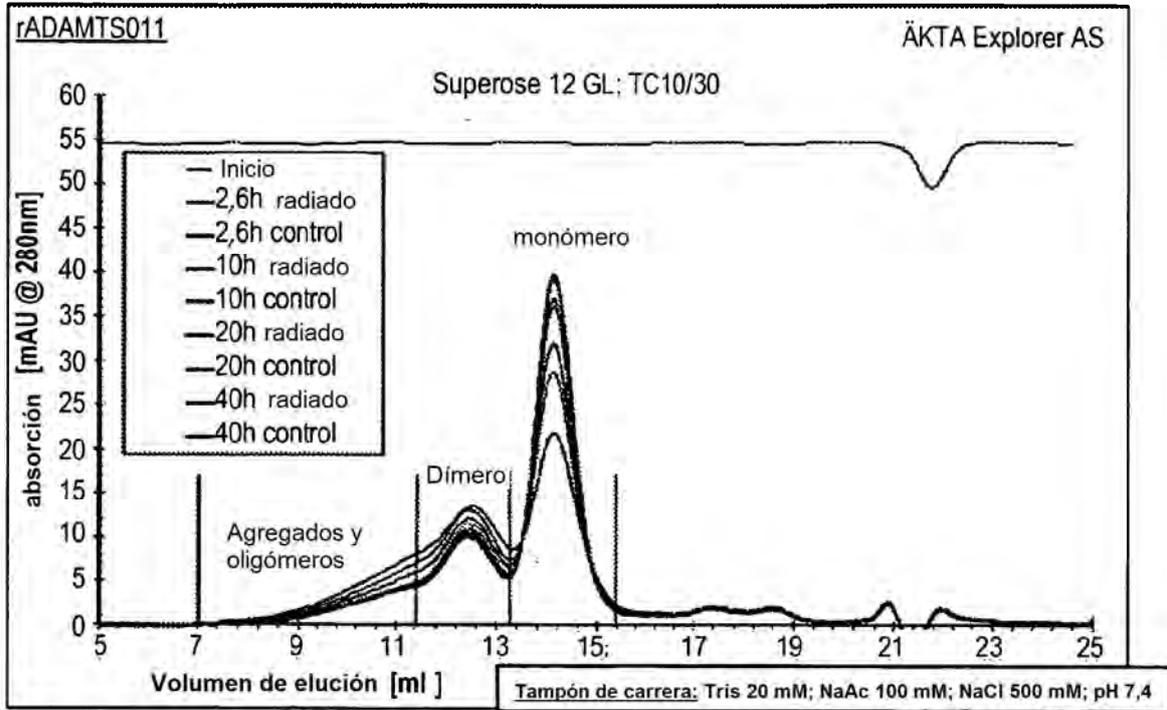


Figura 32

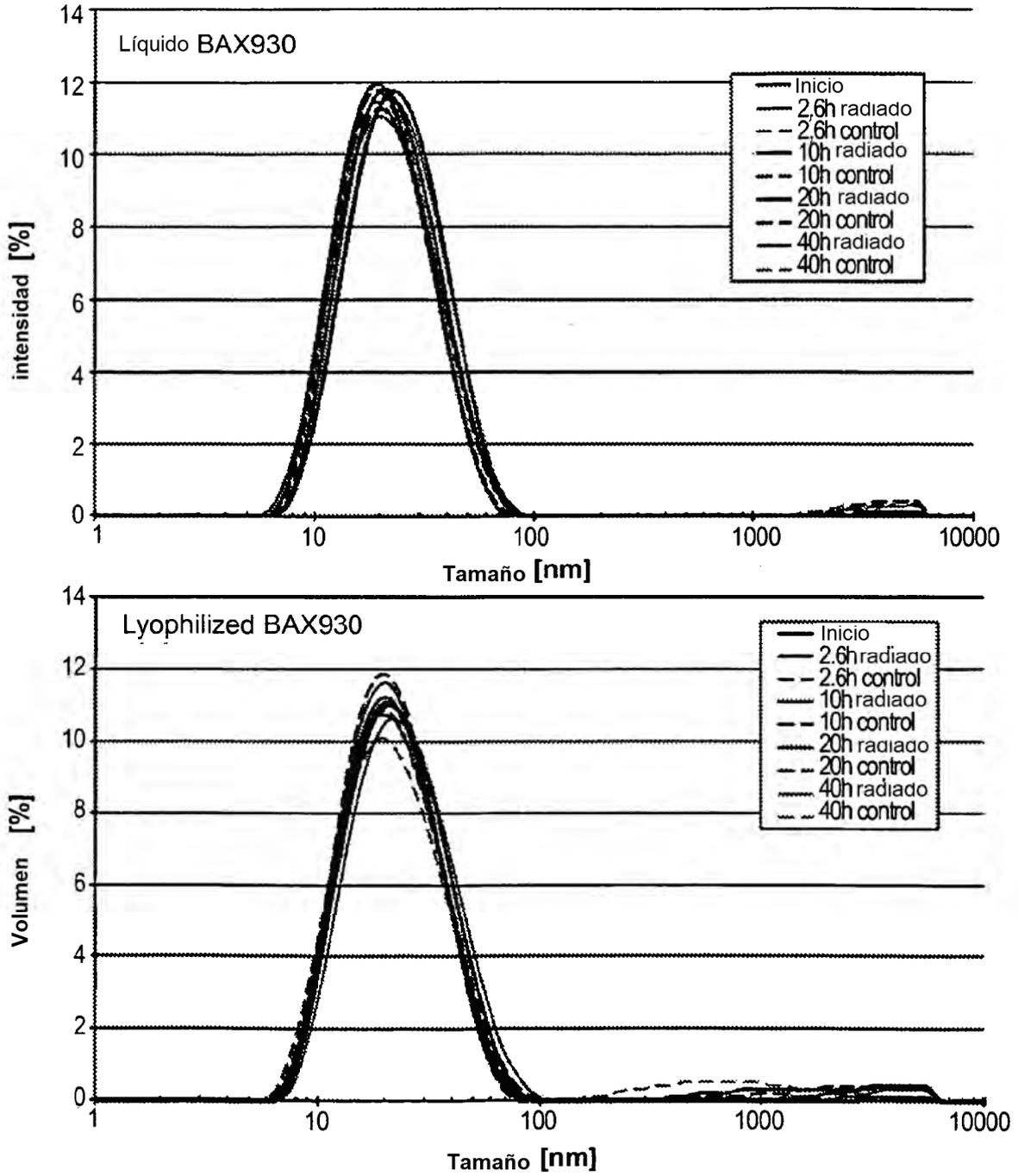


Figura 33

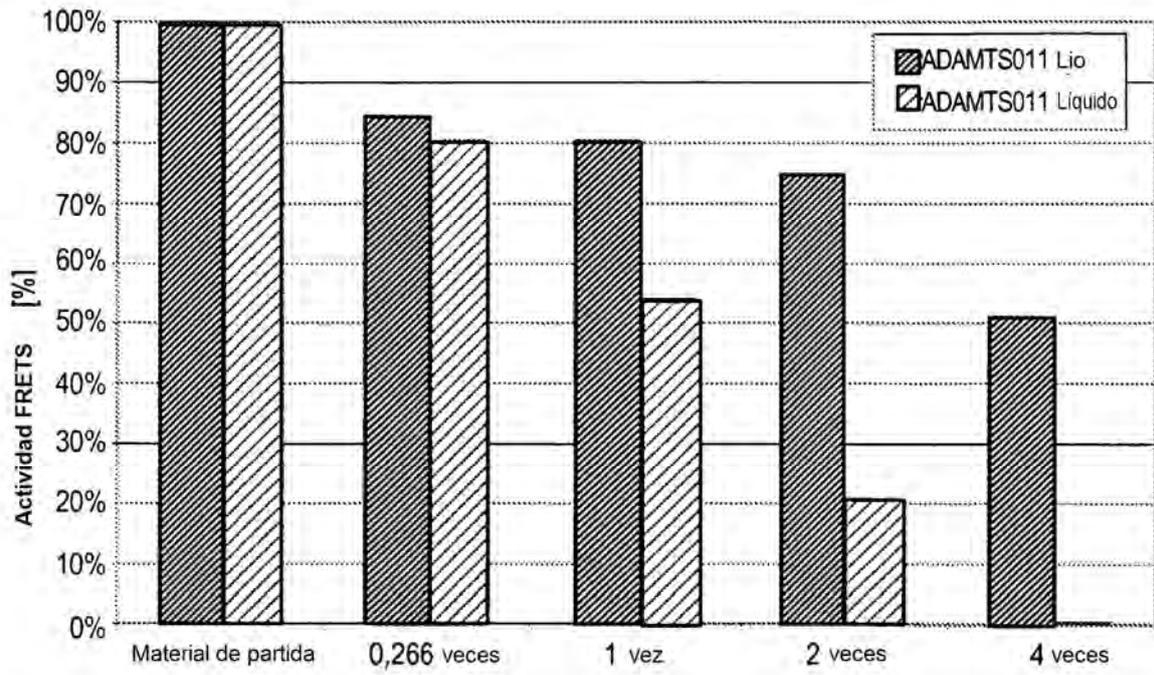


Figura 34

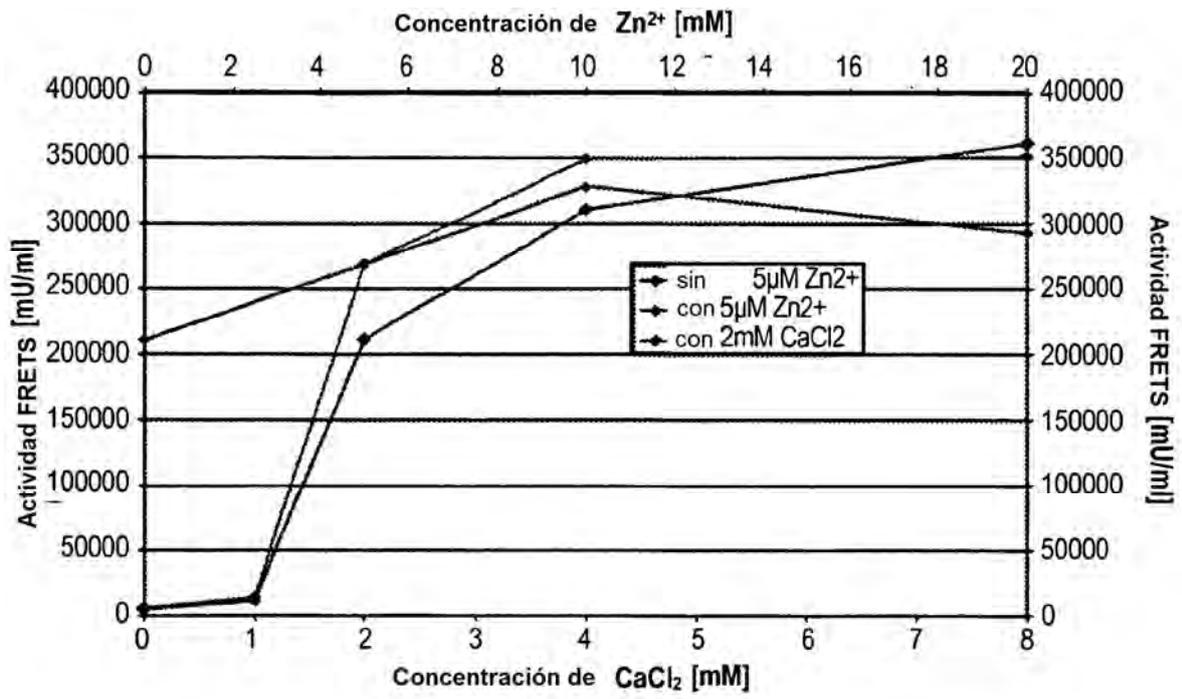


Figura 35

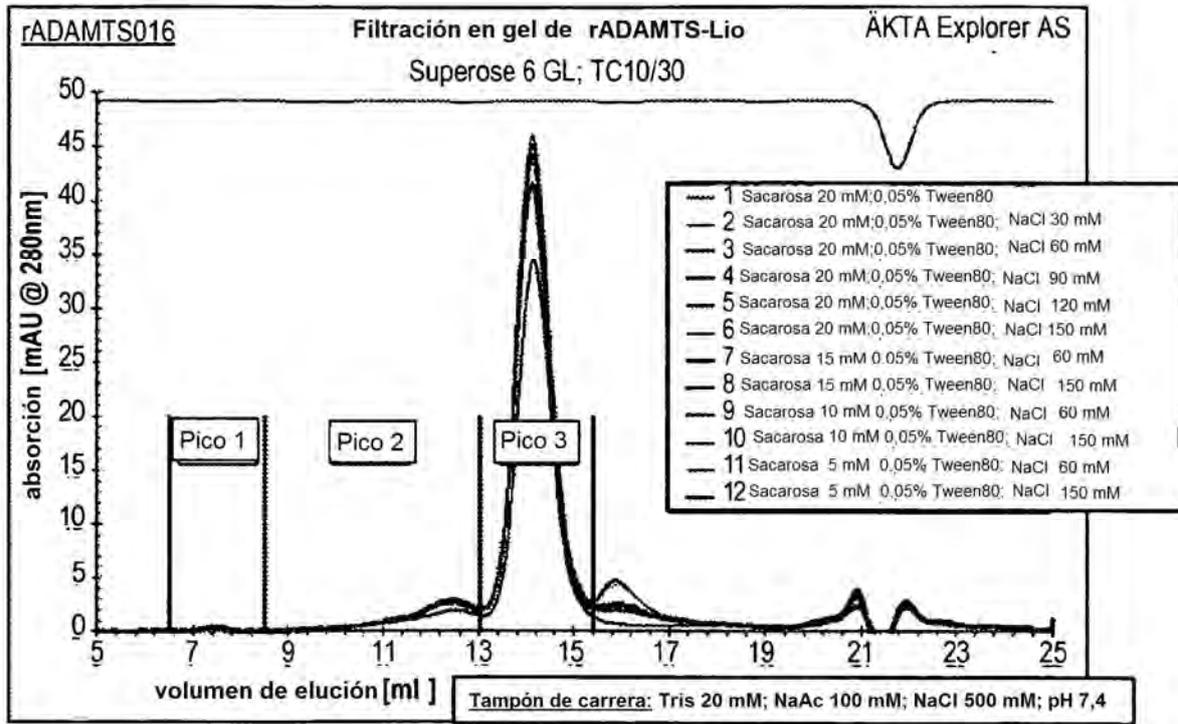


Figura 36

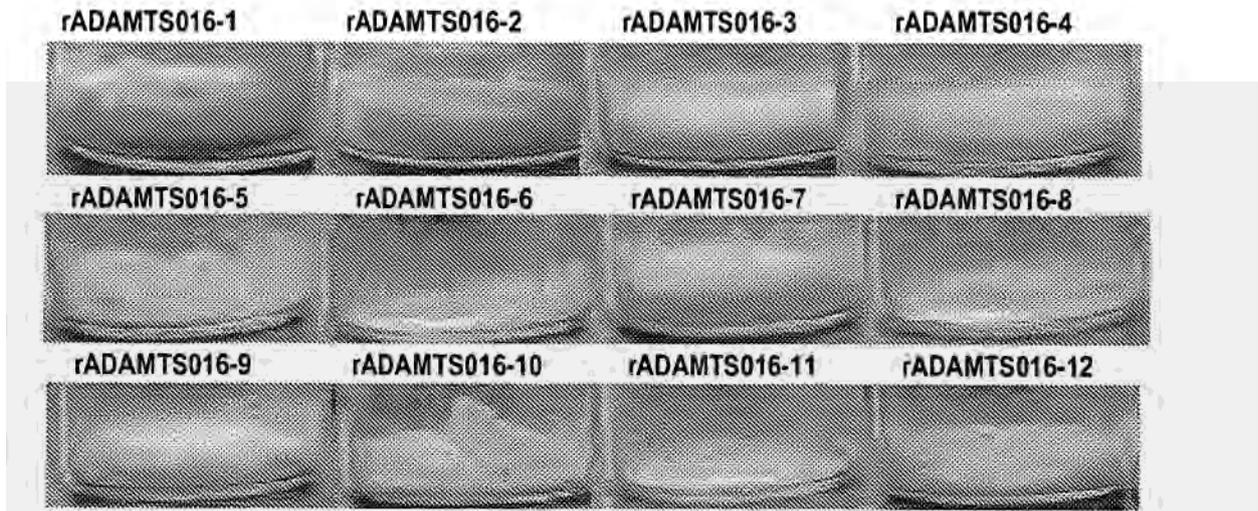


Figura 37

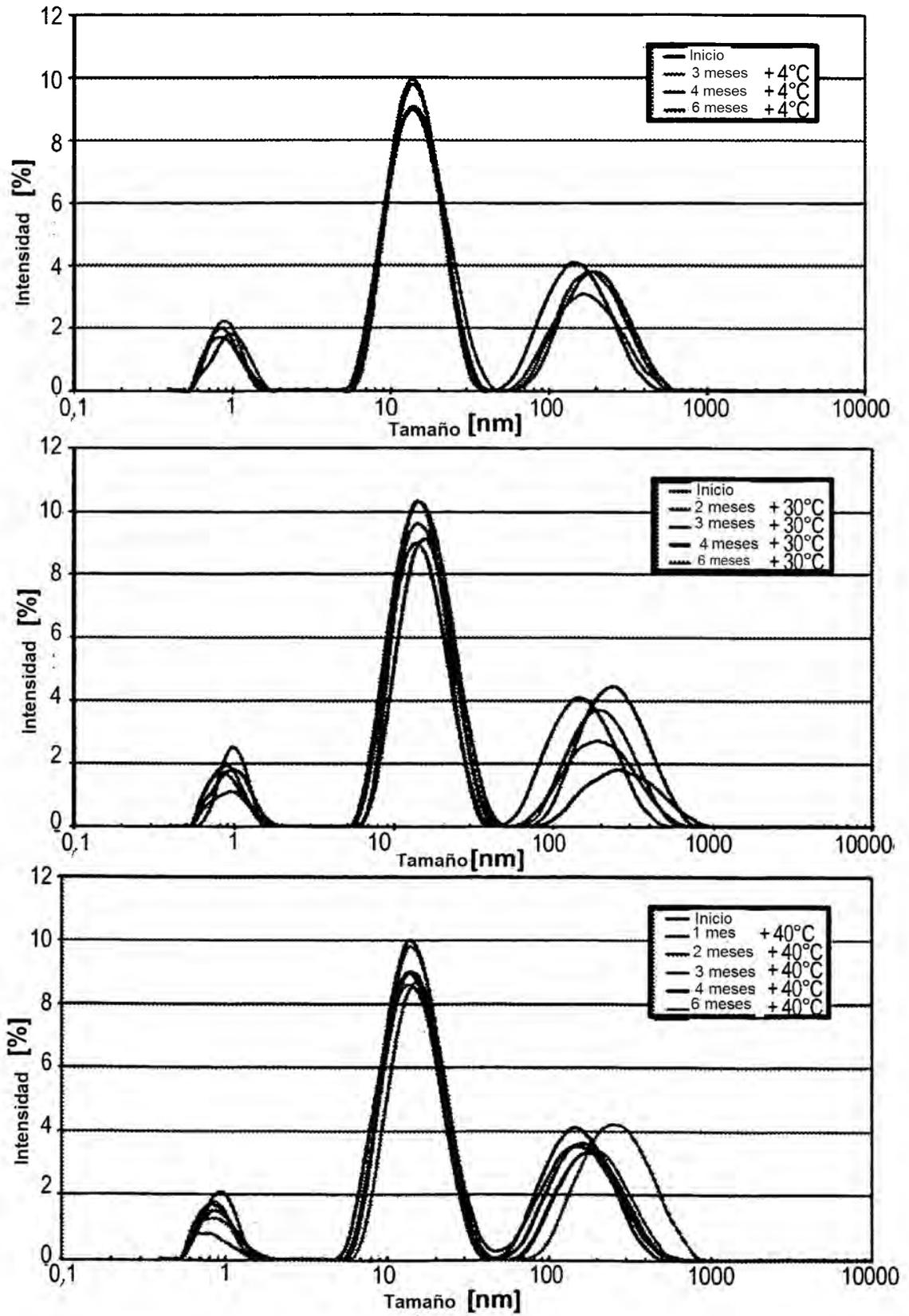


Figura 38

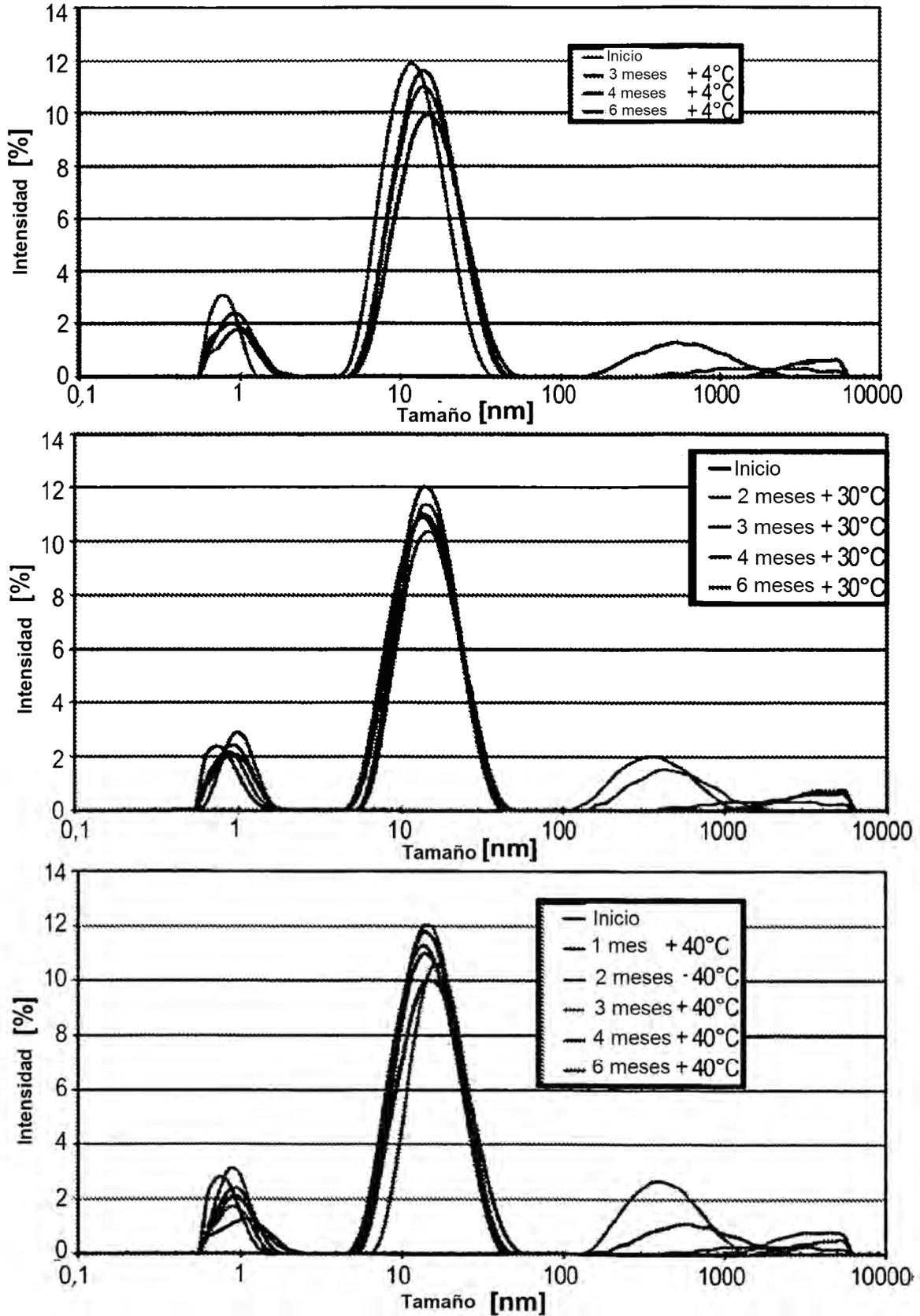


Figura 39

