Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

T=F=5

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

SOLICITU

No. 12-060193- -00007-0000

Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

PATENTE DE IN

DIVISIONAL

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 14-234028- -00000-0000

Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

21. **EXPEDIENTE No.**

54. **TITULO:** **FORMULACIONES DE ADAMTS13 LIOFILIZADAS Y LÍQUIDAS ESTABILIZADAS**

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL **A61K 9/00**

71. SOLICITANTE: **BAXTER INTERNATIONAL, INC., y BAXTER HEALTHCARE, S.A.,**

DOMICILIO: **Illinois, Estados Unidos de América y Glattpark (Opfikon Suiza**.

74. **APODERADO** **SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ**

22. **BOGOTÁ, D.C.**

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-234028- -00000-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060193- -00007-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

DIRECCIÓN DE NUEVA: CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FU:

1. Identificación del Tramite

[ ] **Conversión** [X] **División** [ ] **Fusión**

[X] Patente de Invención [ ] Patente de Modelo de Utilidad

2. Datos del solicitante

Persona Natural [ ] Persona Jurídica [X]

BAXTER INTERNATIONAL, INC. // BAXTER HEALTHCARE S.A.

Nombre o denominación / Nombre o razón social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra [ ]

Documento de identificación: [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [ ] Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución	Dirección del titular	Ciudad
Estados Unidos de América Suiza	One Baxter Parkway, Deefield, Thurgauerstasse 130,	Illinois 60015, CH-8152 Glattpark Opfikon,

[ ] **Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la dirección de correo electrónico**

3. Datos del apoderado:

SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	C.C. 22.468.787	147463 CSJ
Apellidos y Nombre	**Documento de identificación**	**Tarjeta profesional**

Dirección y domicilio		Ciudad
Carrera 11 No. 86-53, Piso 6, Bogotá D.C., Colombia		Bogotá D.C.
Dirección electrónica	**No. Fax**	**Número telefónico**
notificaciones@clarkemodet.com.co	6350824	6181088

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo de poder general

P-3274

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente_____	Expediente	Expediente_____
_____	12-060.193	_____
_____		_____
De: _____	De: _____	De: _____
A: _____	A: _____	A: _____

5. Comprobante de Pago No. **Fecha**

6. Anexos

- [ ] Comprobante de pago de la tasa para la presentación de la corrección y/o modificación
- [ ] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- [ ] Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- [ ] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [ ] Copia de la solicitud y sus anexos en formato magnético

7. Firma	
SILVANA MARIA LÓPEZ DÍAZ	
Nombre y apellidos	**Firma**
C.C. 22.468.787	**Tarjeta Profesional T.P. 147463 CSJ**

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	Espacio reservado para el adhesivo de radicación

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	**TIPO DE SOLICITUD**	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capitulo II

2	**DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)**			
	Solicitud Internacional No.	**PCT/US2010/049723**	**Fecha**	**21 de Septiembre de 2010**
	Publicación Internacional No.	**WO 2011/035335 A3**	**Fecha**	**24 de Marzo de 2011**

3 **TÍTULO DE LA INVENCIÓN** (200 caracteres o espacios máximos)

FORMULACIONES DE ADAMTS13 LIOFILIZADAS Y LÍQUIDAS ESTABILIZADAS

4 **CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 9/00**

5 **SOLICITANTE (S)** ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria

APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL	NOMBRE	IDENTIFICACIÓN	TIPO
BAXTER INTERNATIONAL, INC., y BAXTER HEALTHCARE, S.A.,			

6 **DATOS DEL SOLICITANTE**

DIRECCIÓN: **One Baxter Parkway, Deerfield, y Thurgauerstrasse 130, CH-8152,**

No. TELÉFONO:

CORREO ELECTRONICO:

CIUDAD: **Illinois 60015 y Glattpark (Opfikon),**

PAÍS DE RESIDE NCIA: **Estados Unidos de América y Suiza.**

LUGAR DE CONSTITUCIÓN: **Estados Unidos de América y Suiza.**

7 **INVENTOR (ES)** **VER HOJA COMPLEMENTARIA**

APELLIDOS	NOMBRES	NACIONALIDAD

DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:

8 **DATOS INVENTOR (ES)**

DIRECCIÓN	CIUDAD	ESTADO	PAÍS RESIDENCIA

OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.

9 ☐ **REPRESENTANTE LEGAL** ☒ **APODERADO**

APELLIDOS	NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LOPEZ DIAZ	**SIVANA MARIA**	**C.C.22.468.787 T.P. 147463 CSJ**

DIRECCIÓN **Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6**

No. TELÉFONO **6181088**

CIUDAD **Bogotá, D.C.**

PAÍS **Colombia**

CORREO ELECTRÓNICO **notificaciones@clarkemodet.com.co**

10 **DECLARACIONES DE PRIORIDAD** ☒ SI ☐ NO

(33) PAÍS DE ORIGEN	CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA AAA/MM/DD
Estados Unidos de América	**US**	**61/244.353**	**2009/09/21**

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.

12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES

Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.

13	REDUCCIÓN DE TASAS

Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.

☐ SI ☐ NO

Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.

Micro, pequeñas y medianas empresas ☐

Universidades públicas o privadas ☐

Entidades sin ánimo de lucro ☐

Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos

14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO

Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.

15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-058778// 14-111235	Fecha 04/06/2014 21/10/2014

16	FIRMA DEL APODERADO :

SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ
C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ

17	ANEXOS

Documentación Técnica
Solicitud Internacional en castellano

1. ☒ Descripción — N° de folios: 171
2. ☒ Reivindicaciones — N° Reivindicaciones: 48
3. ☒ Dibujos y/o figuras — N° folios 41
4. ☒ Resumen.
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.
7. ☐ Arte final 12 x 12.
8. ☐ Anexo formato digital.

Documentación Jurídica

9. ☒ Poderes, si fuera el caso. Ver expediente original
10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.
11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.
12. ☐ Copia de la licencia o autorizaoión de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.
13. **Reducción de tasas**

Micro, pequeñas o medinas empresas

☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.

☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.

Universidades públicas o privadas

☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación

Entidades sin ánimo de lucro

☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.
☐ Hoja de información complementaria.
☐ Otros, especificar

14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.
17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

3

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0058778

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 09:25:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
RECIBO DE CA	999999999	58593	04/06/2014		31.561.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-*****-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-234028- -00000-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060193- -00007-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

4

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 111235

Bogotá D.C., Octubre 21 de 2014 - 09:55:23

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	58704	04/06/2014		31.000.00
RECIBO DE CA	999999999	94072	03/09/2014		212.000.00
RECIBO DE CA	999999999	94073	03/09/2014		212.000.00
RECIBO DE CA	999999999	105664	03/10/2014		212.000.00
RECIBO DE CA	999999999	105711	03/10/2014		515.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
38	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	1.178.000.00
				$1.178.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-234028- -00000-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060193- -00007-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

5

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA *RELACIÓN DE ANEXOS*	
Dependencia: 2020	Fecha: 14 / 10 / 22 (AAAA MM DD)	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐		
Radicador:		Planilla:

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	12-060193	07	
2	14-2340028	0	
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	**Soporte Documental**
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:
El cd anexo contiene:
1 archivo en formato PDF, los cuales son procesados y subidos al sistema

Claudia

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	LISTA DE CHEQUEO ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCIÓN ☐ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **Art 33 Decisión 486/00**

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

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

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

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

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

Completa ☐ Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

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

Completa ☐ Incompl

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 14-234028- -00000-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 6

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 12-060193- -00007-0000
Fecha: 2014-10-22 15:59:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 6

ANEXOS

INVENTORES

1.) **MATTHIESSEN, H., Peter**
(Vorgartenstr. 129-143/1/5, A-1020 Viena, Austria);

2.) **TURECEK, Peter, L.**
(Hauptstrasse 59g, A-3400 Klosterneuburg, Austria);

3.) **SCHWARZ, Hans-Peter**
(Weimarer Strasse 76, A-1180 Vienna,, Austria).

Formulaciones de adamts13 liofilizadas y líquidas estabilizadas

Referencias cruzadas a solicitudes relacionadas

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos No. 61/244.353, presentada el 21 de setiembre de 2009, que se incorpora expresamente en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

Declaración relativa a derechos sobre invenciones realizadas en virtud de investigación o desarrollo patrocinado federalmente

[0002] NO CORRESPONDE

Referencia a apéndice de "listado de secuencias", tabla o listado en programa informático presentado en disco compacto

[0003] NO CORRESPONDE

Antecedentes de la invención

[0004] Las proteínas ADAMTS (desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina tipo I) son una familia de metaloproteinasas que contienen una serie de dominios conservados, incluyendo un dominio catalítico dependiente de zinc, 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 tipo I (para ver más detalles, remitirse a Nicholson *et al.*, BMC Evol Biol. 2005 Feb 4;5(1):11). Estas proteínas, que están evolutivamente relacionadas con las familias ADAM y MMP de metaloproteinasas (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25-31), son enzimas secretadas que se han vinculado con una serie de

enfermedades y trastornos, entre ellos, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan;41(1):4-14), trastornos del tejido conjuntivo, cánceres, inflamación (Nicholson *et al.*), y malaria 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 objetivos terapéuticos potenciales para una cantidad de patologías (Jones GC, Curr Pharm Biotechnol. 2006 Feb;7(1):25-31).

[0005] 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 la actividad de ADAMTS13 se ha vinculado con una serie de trastornos, tales como TTP (Moake JL, Semin Hematol. 2004 Jan;41(1):4-14), inflamación aguda y crónica (Chauhan *et al.*, J Exp Med. 2008 Sep 1;205(9):2065-74) y, más recientemente, malaria grave por *plasmodium falciparum* (Larkin *et al.*, PLoS Pathog. 2009 Mar;5(3):e1000349).

[0006] La púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) es un trastorno caracterizado por microangiopatía trombótica, trombocitopenia y trombosis microvascular que puede causar diversos grados de isquemia tisular e infarto. Clínicamente, los pacientes con TTP se diagnostican por síntomas tales como trombocitopenia, esquistocitos (fragmentos de eritrocitos) y niveles elevados de deshidrogenasa láctica (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).

[0007] En 1982, Moake et al. descubrieron multímeros del factor de von Willebrand (UL-vWF) inusualmente grandes en el plasma de pacientes con TTP crónica que habían sufrido recaídas (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 UL-vWF y TTP se vio respaldada por descubrimientos independientes de Furlan et al. y Tsai and Lian, de que la mayoría de los pacientes que padecía TTP carecía de una metaloproteasa del plasma, que ahora se conoce como 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, I I, 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).

[0008] La proteasa ADAMTS13 es una proteína glicosilada de 190 kDa producida predominantemente 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).

[0009] Se ha demostrado que las mutaciones en el gen ADAMTS13 provocan TTP (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 TTP idiopática, a menudo causada por autoanticuerpos que inhiben la actividad de ADAMTS-13, es un trastorno más común que se manifiesta en adultos y jóvenes y puede volver a aparecer en intervalos regulares en 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).

[0010] Los autoanticuerpos no neutralizantes también podrían inhibir la actividad de ADAMTS al inducir la eliminación desde la circulación (Scheiflinger 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 adultos saludables está en el rango de 50% a 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 TTP familiar o adquirida, la actividad de ADAMTS13 en plasma está ausente o es menor que 5% de lo normal. Sin tratamiento, la tasa de mortalidad supera el 90%, pero el tratamiento de plasma ha reducido la mortalidad aproximadamente 20% (Moake J L. Thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic uremic syndrome. Arch Pathol Lab Med. 2002; 126:1430-1433).

[0011] El factor vWF sintetizado en megacariocitos y células endoteliales se almacena en gránulos de plaquetas y cuerpos de Weibel-Palade, respectivamente, como vWF ultra grande (UL-vWF) (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; 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, I I. 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; 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 de las células endoteliales, estos multímeros UL-vWF se escinden de la ADAMTS13 en circulación en una serie de multímeros más pequeños en sitios específicos de escisión dentro de la molécula de vWF (Tsai H M, Nagel R L, Hatcher V B, Sussman, I I. 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, Baillod 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).

[0012] La ADAMTS13 se escinde en el enlace Tyr842-Met843 en el dominio A2 central de la subunidad vWF madura y requiere zinc o

calcio para la 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). El factor vWF existe en forma de ovillo y filamentosa según se observa por microscopía electrónica (Slayter H, Loscalzo J, Bockenstedt P, Handin R I. Native conformation of human von Willebrand protein. Analysis by electron microscopy and quasi-elastic light scattering. J Biol. Chem. 1985; 260:8559-8563). Asimismo, la microscopía de fuerza atómica confirma que el factor vWF sale en una conformación globular bajo condiciones estáticas y un estado filamentoso no desplegado tras la exposición a la fuerza cortante (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 podría ocurrir también *in vivo* cuando un extremo del filamento vWF se fija a una superficie.

[0013] Los trombos de pacientes con TTP consisten en poca fibrina y mayoritariamente vWF y plaquetas, lo que sugiere aglomeración de plaquetas 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 TTP que sufren recaídas tienen multímeros ultra grandes en el plasma. Los multímeros UL-vWF se acumulan con el tiempo porque la persistencia del inhibidor (anti ADAMTS13 Ab) disminuye la actividad de ADAMTS13. Los multímeros UL-vWF son hiperactivos y se despliegan como resultado de la fuerza cortante que provoca la

aglomeración de plaquetas, lo que resulta en 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; discussion 2040-2035).

[0014] Se cree que la presencia de multímeros UL-vWF hiperreactivos en el plasma debido a la falta de ADAMTS13 podría estar asociada con un riesgo superior de trombosis arterial vinculada con la enfermedad cardíaca coronaria.

[0015] En consecuencia, existe la necesidad en la técnica de formulaciones farmacéuticas de proteínas ADAMTS13 adecuadas para el tratamiento de diversas enfermedades y trastornos asociados con la disfunción de ADAMTS13 y VWF. Entre otros aspectos, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 adecuadas para la administración farmacéutica, así como métodos para tratar sujetos con enfermedades o trastornos asociados con la disfunción de ADAMTS13 y VWF.

Breve compendio de la invención

[0016] En un aspecto, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 (A13) adecuadas para la administración farmacéutica. En forma ventajosa, en algunas realizaciones, la invención proporciona formulaciones de A13 que se pueden almacenar por prolongados períodos de tiempo sin perder actividad ni tornarse demasiado aglomeradas. En determinadas realizaciones, las formulaciones de la invención se pueden almacenar durante al menos 6 meses a temperaturas de hasta al menos aproximadamente 37°C.

[0017] En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el pH entre 6,0 y 8,0.

[0018] En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde la formulación está liofilizada a partir de una formulación líquida que comprende (a) 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el pH entre 6,0 y 8,0.

[0019] En un aspecto de la invención se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 recombinante (rA13) adecuadas para la administración farmacéutica. En algunas realizaciones, las formulaciones proporcionadas en la presente tienen actividades específicas elevadas y permanecen estables luego de almacenarse por períodos prolongados de tiempo.

[0020] En otro aspecto de la invención se proporcionan formulaciones que tienen una dimerización o aglomeración reducidas de A13 y rA13. En algunas realizaciones, las formulaciones proporcionadas en la presente retrasan la formación de aglomeración y dímeros de A13 y rA13 cuando se almacenan por períodos prolongados de tiempo. En algunas realizaciones, estas formulaciones son adecuadas para la administración farmacéutica.

[0021] En un aspecto, la presente invención se relaciona con un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con la

formación y/o presencia de uno o más trombos y con un método para desintegrar uno o más trombos en un paciente que lo necesita. Los ejemplos de trastornos asociados con la formación y/o presencia de uno o más trombos son púrpura trombocitopénica trombótica hereditaria (TTP), TTP adquirida, trombosis arterial, infarto agudo de miocardio (AMI), accidente cerebrovascular, sepsis y coagulación intravascular diseminada (DIC). En una realización, los métodos para tratar o prevenir incluyen la administración de una formulación de A13 y rA13 proporcionada en la presente.

[0022] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir un infarto en un paciente que lo necesita. En determinadas realizaciones, se proporcionan métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociados con un infarto, incluyendo, a modo no taxativo, infarto de miocardio (ataque cardíaco), embolia pulmonar, eventos cerebrovasculares, tales como accidente cerebrovascular, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (tales como gangrena), síndrome antifosfolípido, sepsis, arteritis de células gigantes (GCA), hernia y vólvulo. En una realización, los métodos para tratar o prevenir incluyen la administración de una formulación de A13 y rA13 proporcionada en la presente.

[0023] En un aspecto, la presente invención proporciona métodos para elaborar formulaciones de A13 y rA13 con alta estabilidad y/o actividades específicas elevadas. En algunas realizaciones, los métodos son útiles para formular soluciones y liofilizados que se pueden almacenar por períodos prolongados de tiempo a temperaturas de hasta al menos aproximadamente 37°C sin perder las actividades específicas elevadas deseables para administración farmacéutica.

[0024] En otro aspecto, se proporcionan en la presente kits para la administración farmacéutica de A13 o rA13. En algunas realizaciones, los kits de la invención pueden comprender formulaciones líquidas o liofilizadas que se pueden almacenar por períodos prolongados de tiempo.

Breve descripción de los dibujos

[0025] **Figura 1.** Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio. Las soluciones se almacenaron a 4°C o 37°C por hasta 6 meses. **(A)** La actividad de FRETS-VWF73 y **(B)** la concentración de proteína ADAMTS13 medidas según ELISA, se determinaron en los puntos de tiempo indicados.

[0026] **Figura 2.** Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio y se liofilizó. Las formulaciones liofilizadas se almacenaron a 4°C o 37°C por hasta 6 meses. Las formulaciones de ADAMTS13 se reconstituyeron con agua estéril y **(A)** la actividad de FRETS-VWF73 y **(B)** la concentración de proteína ADAMTS13 medidas según ELISA, se determinaron en los puntos de tiempo indicados.

[0027] **Figura 3.** Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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

amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio. Las muestras se cargaron directamente en una columna de filtración sobre gel Superose 6 o se liofilizaron y se reconstituyeron con agua estéril antes de cargarse. Las formulaciones de ADAMTS13 se analizaron mediante filtración sobre gel.

[0028] Figura 4. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 **(A)** 4°C o **(B)** 37°C por hasta 6 meses. Las formulaciones de ADAMTS13 se analizaron por filtración sobre gel en los puntos de tiempo indicados.

[0029] Figura 5. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, e histidina 20 mM a pH 7,0 y luego se liofilizó. Las formulaciones liofilizadas se almacenaron a **(A)** 4°C o **(B)** 37°C por hasta 6 meses. Las formulaciones de ADAMTS13 se reconstituyeron en agua estéril en los puntos de tiempo indicados y se analizaron mediante filtración sobre gel.

[0030] Figura 6. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 una solución o **(B)** se liofilizó a 4°C o 37°C por hasta 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron en agua estéril y las muestras almacenadas en solución y las formulaciones liofilizadas se caracterizaron mediante análisis de dispersión de luz dinámica.

[0031] Figura 7. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2%,

polisorbato 80 al 0,05%, y solución amortiguadora de fosfato de sodio 20 mM a pH 7,0 y se almacenó **(A)** en una solución o **(B)** se liofilizó a 4°C o 37°C por hasta 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron en agua estéril y las muestras almacenadas en solución y las formulaciones liofilizadas se caracterizaron mediante análisis de dispersión de luz dinámica.

[0032] Figura 8. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, y citrato trisódico 20 mM a pH 7,0 y se almacenó **(A)** en una solución o **(B)** se liofilizó a 4°C o 37°C por hasta 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron en agua estéril y las muestras almacenadas en solución y las formulaciones liofilizadas se caracterizaron mediante análisis de dispersión de luz dinámica.

[0033] Figura 9. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora que contenía NaCl 150 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, e histidina 20 mM a pH 7,0 y luego se liofilizó. Las muestras liofilizadas se almacenaron a 4°C o 37°C durante 3 meses, y luego se reconstituyeron en agua estéril. Las muestras de ADAMTS13 se caracterizaron mediante espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier y los resultados se compararon con una muestra recientemente formulada y liofilizada.

[0034] Figura 10. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio. Las soluciones se almacenaron a 4°C o 37°C por 6 meses. Las formulaciones liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril y la pureza de

todas las muestras se determinó mediante análisis HPLC en fase inversa.

[0035] Figura 11. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio. Las muestras de las formulaciones en solución se liofilizaron y se reconstituyeron con agua estéril. La solución y las formulaciones liofilizadas reconstituidas se caracterizaron mediante análisis de calorimetría diferencial de barrido.

[0036] Figura 12. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio. El diámetro promedio z de ADAMTS13 en las formulaciones se caracterizó mediante análisis de dispersión de luz dinámica.

[0037] Figura 13. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 sobre gel. Se muestra la cromatografía completa en el panel **(A)**, y una sección aumentada del pico del dímero en el panel **(B)**.

[0038] Figura 14. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 por 24 horas. La actividad de FRETS-VWF73 y la

concentración de la proteína ADAMTS13 medidas según ELISA, se determinaron para las formulaciones con los pH indicados.

[0039] Figura 15. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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) por tres semanas. La estabilidad de enzimas se midió mediante el ensayo de FRETS-VWF73 a los puntos de tiempo indicados.

[0040] Figura 16. (A) Se cargó ADAMTS13 recombinante en una columna de filtración sobre gel Superose 6 GL equilibrada con una solución amortiguadora 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 aglomerado (grupo 1), A13 dimérico (grupo 2) y A13 monomérico (grupo 3). Luego se determinó la actividad de FRETS-VWF73 de cada grupo. **(B)** Se evaluó el estado oligomérico y la polidispersidad de las fracciones agrupadas mediante análisis de dispersión de luz dinámica.

[0041] Figura 17. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora que contenía sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, 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. Las composiciones de ADAMTS13 formuladas se liofilizaron y se inspeccionó visualmente la apariencia de la torta liofilizada.

[0042] Figura 18. Se reconstituyeron en agua las tortas liofilizadas de ADAMTS13 recombinante producidas a partir de formulaciones que contenían NaCl de 0 a 150 mM. Se determinaron

los estados de acumulación de las proteínas ADAMTS13 reconstituidas mediante análisis de filtración sobre gel.

[0043] Figura 19. Se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora 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 de FRETS-VWF73.

[0044] Figura 20. Se liofilizaron soluciones amortiguadoras con alto contenido de sal y bajo contenido de sal. La solución amortiguadora con alto contenido de sal **(A)** contenía histidina 20 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM, sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05%, y $CaCl_2$ 2 mM, mientras que la solución amortiguadora con bajo contenido 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 $CaCl_2$ 2 mM. Las dos formulaciones se liofilizaron bajo condiciones estándar y las tortas liofilizadas resultantes se inspeccionaron visualmente.

[0045] Figura 21. Se analizó el estado multimérico de ADAMTS13 recombinante aislada por cromatografía de intercambio catiónico **(A)** antes y **(B)** después de filtración sobre gel mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superose 6 GL.

[0046] Figura 22. Se analizó el estado multimérico de ADAMTS13 recombinante aislada por cromatografía de intercambio catiónico **(A)** antes y **(B)** después de filtración sobre gel mediante dispersión de luz dinámica.

[0047] Figura 23. Protocolos estándar **(A)** y **(B)** extendidos para la liofilización de formulaciones de rADAMTS13.

[0048] Figura 24. Comparación de tortas liofilizadas de rADAMTS13 producidas por 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 protocolos de liofilización usados para la generación de estos datos se pueden encontrar en el ejemplo 12.

[0049] Figura 24. Se reconstituyeron en agua tortas liofilizadas de ADAMTS13 recombinante producidas a partir de formulaciones que contenían **(A)** NaCl 30 mM o **(B)** NaCl 60 mM, bajo protocolos de liofilización estándar (A LYO) o extendidos (B LYO). Se determinaron los estados de acumulación de las proteínas ADAMTS13 reconstituidas mediante análisis de dispersión de luz dinámica.

[0050] Figura 25. Se evaluó el estado oligomérico y la polidispersidad de las composiciones de ADAMTS13 formuladas con **(A)** NaCl 30 mM o **(B)** NaCl 60 mM mediante análisis de dispersión de luz dinámica luego de la liofilización con un protocolo estándar o extendido.

[0051] Figura 26. Estructura de dominio de la proteasa ADAMTS13 que escinde el factor de von Willebrand (VWF) humano. El polipéptido ADAMTS13 precursor consiste en un péptido señal (S), un propéptido (P), seguido de las características estructurales del polipéptido maduro que comprende un dominio metaloproteasa catalítico, un dominio similar a desintegrina, un motivo de trombospondina tipo 1 (TSP1), un dominio espaciador y rico en cisteína, 7 repeticiones TSP1 adicionales y 2 dominios CUB. Hay

diez sitios posibles de N-glicosilación marcados por círculos cerrados.

[0052] Figura 27. Diámetros hidrodinámicos de composiciones de ADAMTS13 formuladas con diferentes agentes amortiguadores según se determinó por análisis de dispersión de luz dinámica (DLS).

[0053] Figura 28. Influencia de la fuerza cortante sobre ADAMTS13 recombinante humana según se determinó por el análisis de dispersión de la luz dinámica (DLS).

[0054] Figura 29. Estabilidad de congelación-descongelación de ADAMTS13 recombinante humana según se determinó por la actividad de FRETS.

[0055] Figura 30. Estabilidad de congelación-descongelación de ADAMTS13 recombinante humana según se determinó por el análisis de dispersión de la luz dinámica (DLS).

[0056] Figura 31. Fotoestabilidad de ADAMTS13 recombinante humana liofilizada según se determinó mediante SE-HPLC.

[0057] Figura 32. Fotoestabilidad de ADAMTS13 recombinante humana líquida y liofilizada según se determinó por el análisis de dispersión de la luz dinámica (DLS).

[0058] Figura 33. Fotoestabilidad de ADAMTS13 recombinante humana líquida y liofilizada según se determinó por la actividad de FRETS.

[0059] Figura 34. Influencia de calcio y zinc en la actividad de FRETS de ADAMTS13 recombinante humana.

[0060] Figura 35. Influencia del contenido de sal y azúcar en el estado oligomérico de una formulación de ADAMTS13 recombinante humana liofilizada según se determinó mediante SE-HPLC. El contenido de azúcar de cada formulación se debe informar en g/L,

en lugar de concentraciones molares (por ejemplo, 20 mM = 20 g/L).

[0061] Figura 36. Tortas liofilizadas producidas por liofilización de ADAMTS13 recombinante humana formulada de acuerdo con la tabla 15.

[0062] Figura 37. Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) del estado oligomérico de ADAMTS13 recombinante humana con un programa estándar de liofilización de 3 días, almacenada durante 6 meses a **(panel superior)** 4°C; **(panel central)** 30°C; y **(panel inferior)** 40°C.

[0063] Figura 38. Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) del estado oligomérico de ADAMTS13 recombinante humana con un programa extendido de liofilización de 10 días, almacenada durante 6 meses a **(panel superior)** 4°C; **(panel central)** 30°C; y **(panel inferior)** 40°C.

[0064] Figura 39. Análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) del estado oligomérico de ADAMTS13 recombinante humana formulada con diferentes concentraciones de proteínas luego de almacenarse a 4°C, 30°C y 40°C.

Descripción detallada de la invención

I. Introducción

[0065] La ADAMTS13 es una metaloproteasa del plasma que escinde los multímeros del factor von Willebrand (VWF) y regula hacia abajo su actividad en la aglomeración de plaquetas. La púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) es una enfermedad grave asociada con un factor von Willebrand factor (VWF) inusualmente grande e hiperactivo hemostáticamente y una grave deficiencia en ADAMTS-13. Se ha desarrollado un producto candidato de ADAMTS13

recombinante como una terapia de sustitución de proteína recombinante para el tratamiento de la TTP causada por la deficiencia de ADAMTS13 (Plaimauer and 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; and Bruno K *et al.*, J Thromb Haemost. 2005 May;3(5):1064-73, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.)

[0066] La presente invención se basa en parte en el descubrimiento de formulaciones líquidas y liofilizadas de proteínas ADAMTS purificadas con mayor estabilidad que cumplen con los requisitos establecidos por la Conferencia Internacional sobre Armonización de Requisitos Técnicos de Productos Farmacéuticos para Uso Humano (ICH Guideline, PHARMACEUTICAL DEVELOPMENT Q8(R2), 2005).

[0067] La actividad hemostática de VWF depende en gran medida del tamaño de los multímeros. La metaloproteasa del plasma ADAMTS13 es la proteasa principal identificada que regula fisiológicamente el tamaño multimérico del VWF. La ADAMTS13 se escinde entre Tyr 1605 y Met 1606 en el dominio A2 del VWF produciendo los fragmentos de escisión típicos de 176 kDa y 140 kDa y multímeros VWF más pequeños encontrados en la circulación. El gen ADAMTS13 humano contiene 29 exones y abarca aproximadamente 37 kb en el cromosoma 9q34. El transcrito 4,7 kb se sintetiza predominantemente en células estrelladas hepáticas, pero también en células endoteliales vasculares y plaquetas y codifica un producto de traducción primaria de 1427 residuos de aminoácidos. El polipéptido ADAMTS13 precursor consiste en un péptido señal y un propéptido con un extremo C terminal en un sitio de furina potencial para escisión, seguido de una secuencia de proteasa

madura que escinde el VWF. El polipéptido ADAMTS13 maduro (1353 residuos de aminoácidos) comprende las características estructurales típicas de todos los miembros de la familia ADAMTS: un dominio metaloproteasa similar a reprolisina, un dominio similar a desintegrina, una repetición central de trombospondina tipo 1 (TSP1), un dominio rico en cisteína que aloja un motivo RGD posiblemente importante para las interacciones de integrina, y un dominio espaciador, en lo sucesivo seguido de una combinación única de 7 repeticiones consecutivas de TSP1 (TSP1/#2-8) y dos dominios CUB (Figura 26).

[0068] La ADAMTS13 madura tiene una masa molecular calculada de aproximadamente 145 kDa, mientras que la ADAMTS13 purificada derivada de plasma tiene una masa molecular aparente de 180 kDa, probablemente debido a las modificaciones pos-translacionales que concuerdan con las actuales secuencias de consenso para 10 sitios posibles de N-glicosilación y diversos sitios de O-glicosilación y un sitio de C-manosilación en las repeticiones TSP1. La actividad proteolítica VWF de ADAMTS13 depende en gran medida de cationes divalentes. El motivo del sitio activo en el dominio de metaloproteasa contiene el motivo HEXXHXXGXXHD altamente conservado con tres residuos de histidina que coordinan un ion Zn2+ catalítico y un sitio de unión de calcio previsto propuesto para coordinarse por Glu 83, Asp 173, Cys 281 y Asp 284. Los roles funcionales de los dominios ADAMTS13 han sido estudiados principalmente usando sistemas de ensayo *in vitro*, demostrando que las regiones N-terminal desde la metaloproteasa hasta el dominio espaciador son cruciales para la escisión del VWF. Aparentemente, las repeticiones de TSP1 C-terminal y los dominios CUB son importantes para el reconocimiento del sustrato de VWF y

se unen a receptores de superficie potenciales, como CD36 en las células endoteliales.

[0069] Una salida importante del desarrollo de formulaciones de proteínas es la identificación de vías de inactivación y vías de aglomeración o degradación de las respectivas proteínas. Se observó una inactivación completa dependiente del tiempo de la proteína ADAMTS13 recombinante humana dentro de 1 semana a 40°C en una formulación líquida mediante el ensayo de análisis de FRETS. Tal como se describe en la presente, se descubrió que esta inactivación podría reducirse en presencia de Ca^{2+} 2 mM. A 25°C, la actividad de FRETS ya no disminuía en presencia de Ca^{2+}. A 4°C, la actividad de las formulaciones líquidas de ADAMTS13 quedaba estable durante 24 semanas en ausencia de Ca^{2+}.

[0070] Asimismo, se descubrió que en formulaciones liofilizadas idénticas se producía una pequeña inactivación o no había inactivación cuando la formulación se almacenaba a 40°C en ausencia de Ca^{2+}. La adición de Ca^{2+} 2 mM o 4 mM no influía la estabilidad a 40°C.

[0071] En consecuencia, los inventores han descubierto que la aglomeración de las proteínas ADAMTS13 dependiente del tiempo en formulaciones líquidas (por ejemplo, almacenadas a 40° C) contribuye en gran medida a la degradación y/o pérdida de la actividad enzimática. Es importante destacar que, tal como se indica en la presente invención, esta aglomeración se puede reducir significativamente mediante liofilización y/o por la adición de Ca^{2+} a las formulaciones líquidas. Adicionalmente, se ha descubierto que la adición de un tensioactivo no iónico (por ejemplo, Tween 80 al 0,05%) reduce la formación de aglomerados de ADAMTS13 en las formulaciones liofilizadas. Además, se halló que

la presencia de una o más azúcares y/o alcoholes de azúcar estabilizaban el ADAMTS13 significativamente durante la liofilización y contribuían a la formación de una torta liofilizada mejorada.

II. Definiciones

[0072] Tal como se usa en la presente, "ADAMTS13" o "A13" se refiere a una metaloproteasa de la familia ADAMTS (desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina tipo I) que escinde el factor von Willebrand (vWF) entre los residuos Tyr 1605 y Met 1606. En el contexto de la presente invención, una proteína ADAMTS13 comprende 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, gerbo, canino, felino, rana (NP_001083331), pollo (XP_415435), y derivados biológicamente activos de las mismas. Las proteínas ADAMTS13 mutantes y variantes que tengan actividad también están comprendidas, así como los fragmentos funcionales y las proteínas de fusión de las proteínas ADAMTS13. Asimismo, las proteínas ADAMTS13 de la invención pueden comprender además etiquetas que facilitan la purificación, la detección o ambas. Las proteínas ADAMTS13 descritas en la presente también se pueden modificar con un resto terapéutico o restos adecuados detectados por imágenes *in vitro* o *in vivo*.

[0073] Las proteínas ADAMTS13 humanas incluyen, a modo no taxativo, polipéptidos que comprenden la secuencia de aminoácidos con el número de acceso de GenBank NP_620594 o un polipéptido procesado del mismo, por ejemplo, un polipéptido del que se ha eliminado el péptido señal (aminoácidos 1 a 29) y/o propéptido

(aminoácidos 30-74). En la técnica se conocen numerosas variantes naturales de ADAMTS13 humano, y quedan comprendidas 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, C951G, G982R, C1024G, A1033T, R1095W, R1095W, R1123C, C1213Y, T1226I, G1239V y R1336W. Adicionalmente, las proteínas ADAMTS13 incluyen proteínas naturales y recombinantes que han mutado, por ejemplo, por una o más mutaciones conservadoras en un aminoácido no esencial. Preferiblemente, los aminoácidos esenciales para la actividad enzimática de ADAMTS13 no mutarán. Estos incluyen, por ejemplo, los residuos que se sabe o se presume que son esenciales para la unión de metales, tales como los residuos 83, 173, 224, 228, 234, 281 y 284, y los residuos encontrados en el sitio activo de la enzima, por ejemplo, el residuo 225. En forma similar, en el contexto de la presente invención, las proteínas ADAMTS13 incluyen isoformas alternativas, por ejemplo, isoformas sin los aminoácidos 275 a 305 y/o 1135 a 1190 de la proteína humana de longitud completa.

[0074] Tal como se usa en la presente, el término “derivado biológicamente activo” se refiere a cualquier polipéptido con esencialmente la misma función biológica que ADAMTS13. Las secuencias de polipéptidos de los derivados biológicamente activos pueden comprender eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de uno o más aminoácidos cuya ausencia, presencia y/o sustitución, respectivamente, no tiene ningún impacto negativo significativo en la actividad biológica del polipéptido.

La actividad biológica de dichos polipéptidos se puede medir, por ejemplo, por la reducción o retraso de la adhesión plaquetaria al endotelio, la reducción o retraso de la aglomeración plaquetaria, 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 de trombos, la reducción o retraso de la oclusión de vasos, la escisión proteolítica de vWF, la desintegración de los trombos, o por la escisión de un sustrato de péptido, por ejemplo, un péptido FRETS-VWF73 (Kokame *et al.*, Br J Haematol. 2005 Apr;129(1):93-100) o una variante del mismo.

[0075] Asimismo, las proteínas ADAMTS13 también se pueden modificar, por ejemplo, por modificaciones pos-translacionales (por ejemplo, glicosilación en uno o más aminoácidos seleccionados de los residuos humanos 142, 146, 552, 579, 614, 667, 707, 828, 1235, 1354, o cualquier otro sitio de modificación natural o artificial) o por modificación enzimática o química *ex vivo*, incluyendo, a modo no taxativo, glicosilación, modificación por polímero soluble en agua (por ejemplo, PEGilación, sialilación, HESilación, etc.) marcado y similares.

[0076] Tal como se usa en la presente, "una unidad de actividad de ADAMTS13" se define como la cantidad de actividad en 1 ml de plasma humano normal agrupado, independientemente del ensayo que se esté usando. Por ejemplo, una unidad de actividad de ADAMTS13 FRETS-VWF73 es la cantidad de actividad necesaria para escindir la misma cantidad de sustrato FRETS-VWF73 (Kokame *et al.*, Br J Haematol. 2005 Apr;129(1):93-100) que se escinde por 1 ml de plasma humano normal agrupado.

[0077] Tal como se usan en la presente "ADAMTS13" y "derivado biológicamente activo", respectivamente, también incluyen

polipéptidos obtenidos a través de tecnología de ADN recombinante. La ADAMTS13 recombinante (”rADAMTS13”), por ejemplo, ADAMTS13 recombinante humana (“r-hu-ADAMTS13”), se puede producir por cualquier método conocido en la técnica. Un ejemplo específico se describe en WO 02/42441 que se incorpora a la presente a modo de referencia con respecto al método para producir ADAMTS13 recombinante. Esto puede incluir cualquier método conocido en la técnica para (i) producir ADN recombinante mediante ingeniería genética, por ejemplo, mediante transcripción inversa de ARN y/o amplificación de ADN, (ii) introducir ADN recombinante en células procariotas o eucariotas, es decir, a través de electroporación o microinyección, (iii) cultivar dichas células transformadas, por ejemplo, de una manera continua o por lotes, (iv) expresar ADAMTS13, por ejemplo, constitutivamente o luego de inducción, y (v) aislar dicha ADAMTS13, por ejemplo, del medio de cultivo o al cosechar las células transformadas, a fin de (vi) obtener ADAMTS13 recombinante sustancialmente purificada, por ejemplo, a través de cromatografía de intercambio aniónico o cromatografía de afinidad. El término “derivado biológicamente activo” también incluye moléculas quiméricas tales como, por ejemplo, ADAMTS13 (o un derivado biológicamente activo de la misma) en combinación con Ig, a fin de mejorar las propiedades biológicas/farmacológicas tales como, por ejemplo, la vida media de ADAMTS13 en el sistema circulatorio de un mamífero, en particular, un ser humano. La Ig también podría tener el sitio de unión a un receptor Fc opcionalmente mutado.

[0078] Tal como se usa en la presente, “trombo” se refiere a un coágulo de sangre, especialmente un coágulo de sangre que comprende plaquetas, un microtrombo y/o un émbolo. Dicho trombo

puede estar adherido a un vaso sanguíneo arterial o venoso o no, y puede bloquear parcial o completamente el flujo sanguíneo en un vaso sanguíneo arterial o venoso.

[0079] Tal como se usan en la presente, los términos "vitamina B3", "nicotinamida", "niacinamida", "niacina" y "ácido nicotínico" se pueden usar indistintamente para referirse a cualquier miembro de la familia B3 de vitaminas.

[0080] Tal como se usa en la presente, "cantidad o dosis terapéuticamente eficaz" o "cantidad o dosis suficiente" se refiere a una dosis que produce efectos para los cuales se administra. La dosis exacta dependerá de la finalidad del tratamiento y un experto en la técnica podrá determinarla usando técnicas conocidas (ver, por ejemplo 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*, 20th Edition, 2003, Gennaro, Ed., Lippincott, Williams & Wilkins).

[0081] Tal como se usa en la presente, 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 taxativos de sales farmacéuticamente aceptables incluyen, a modo no taxativo, cloruro de sodio y potasio, acetato de sodio y potasio, citrato de sodio y potasio, fosfato de sodio y potasio.

[0082] Tal como se usa en la presente, una "concentración subfisiológica" de sal se refiere a una concentración de sal de menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En realizaciones preferidas, una concentración

subfisiológica de sal es menos de aproximadamente 80 mM de una sal farmacéutica. En otra realización preferida, una concentración subfisiológica de sal es menos de aproximadamente 60 mM de una sal farmacéutica.

[0083] Tal como se usa en la presente, el término "aproximadamente" denota un rango aproximado de más o menos 10% de un valor especificado. Por ejemplo, la expresión "aproximadamente 20%" comprende un rango de 18-22%. Tal como se usa en la presente, "aproximadamente" también incluye la cantidad exacta. Por lo tanto, "aproximadamente 20%" significa "aproximadamente 20%" y también "20%".

[0084] Tal como se usa en la presente, "almacenamiento" significa que una formulación no es administrada inmediatamente a un sujeto una vez preparada, sino que se conserva por un período de tiempo bajo condiciones particulares (por ejemplo, a una temperatura particular, etc.) antes de usarse. Por ejemplo, una formulación líquida o liofilizada se puede conservar por días, semanas, meses o años, antes de su administración a un sujeto bajo diversas temperaturas, tales como refrigeración (0° a 10 °C) o temperatura ambiente (por ejemplo, temperaturas hasta 32 °C).

[0085] Tal como se usa en la presente, "medio definido químicamente" se refiere a un medio de cultivo sintético en el cual se conoce la identidad y concentración de todos sus componentes. Los medios definidos químicamente no contienen extractos bacteriales, levaduras, extractos animales o de plantas, a pesar de que pueden o no incluir componentes individuales derivados de animales o plantas (por ejemplo, proteínas, polipéptidos, etc.). Los ejemplos no taxativos de medios definidos químicamente disponibles comercialmente incluyen

diversos medios EX-CELL® (SAFC Biosciences, Inc.), diversos medios de cultivo modificados Eagle de Dulbecco (DME) (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.), mezcla de nutrientes de Ham (Sigma-Aldrich Co; SAFC Biosciences, Inc.), y similares. Los métodos para preparar medios de cultivo definidos químicamente son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0086] Tal como se usa en la presente, el término "medio de cultivo libre de oligopéptido" se refiere a un medio libre de proteínas que no comprende oligopéptidos, tales como, por ejemplo, oligopéptidos derivados de un hidrolizado de proteína. 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 adicional, 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. Los métodos para preparar medios de cultivo libres de oligopéptidos son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las

Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0087] Tal como se usa en la presente, el término "medio de cultivo libre de suero" se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero animal. Si bien a veces los medios libres de suero son medios definidos químicamente, éstos pueden estar complementados con proteínas específicas de animales o plantas o fracciones de proteínas. Los métodos para preparar medios de cultivo libres de suero son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0088] Tal como se usa en la presente, el término "medio de cultivo libre de proteína animal" se refiere a un medio de cultivo que no está complementado con un suero, proteína o fracción de proteína animal. Si bien a veces los medios de cultivo libres de proteína animal son medios definidos químicamente, éstos pueden contener hidrolizados de plantas o levaduras. Los métodos para preparar medios de cultivo libres de proteína animal son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se

incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0089] Un "vector de expresión" es un constructo de ácido nucleico, generado de forma recombinante o sintética, con una serie de elementos de ácido nucleico especificados que permiten la transcripción de un ácido nucleico particular en una célula huésped. El vector de expresión puede ser parte de un plásmido, virus o fragmento de ácido nucleico. Generalmente, el vector de expresión incluye un ácido nucleico a transcribirse operativamente unido a un promotor.

[0090] El término "heterólogo", cuando se usa referido 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 se produce generalmente en forma recombinante, tiene dos o más secuencias de genes no relacionados dispuestos para formar un nuevo ácido nucleico funcional, por ejemplo, un promotor de una fuente y una región codificante de otra fuente. En forma similar, una proteína heteróloga indica que la proteína indica dos o más subsecuencias que no se encuentran en la misma relación entre sí en la naturaleza (por ejemplo, una proteína de fusión).

[0091] Un "promotor" se define como una gama de secuencias de control de ácido nucleico que dirige la transcripción de un ácido nucleico. Tal como se usa en la presente, un promotor incluye secuencias de ácido nucleico necesarias cercanas al sitio de inicio de la transcripción, tal como en el caso de un promotor de polimerasa II, un elemento TATA. Un promotor también incluye opcionalmente elementos represores o mejoradores distales, que pueden estar ubicados a varios miles de pares base del lugar de

inicio de la transcripción. Un promotor "constitutivo" es un promotor que es activo bajo la mayoría de las condiciones ambientales y de desarrollo. Un promotor "inducible" es un promotor que es activo bajo regulación ambiental o de desarrollo. El término "unido operativamente" se refiere a una unión funcional entre la secuencia de control de expresión de ácido nucleico (tal como un promotor, o gama de sitios de unión del factor de transcripción) y una segunda secuencia de ácido nucleico, en donde la secuencia de control de expresión dirige la transcripción del ácido nucleico correspondiente a la segunda secuencia.

III. Formulación y composiciones de ADAMTS13

[0092] 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 al almacenarse a temperaturas de hasta al menos aproximadamente 40°C durante al menos aproximadamente 6 meses. En otras realizaciones, las formulaciones proporcionadas en la presente retienen una actividad significativa de ADAMTS13 al almacenarse por períodos prolongados de tiempo. En otras realizaciones, las formulaciones de la invención reducen o retrasan la dimerización, oligomerización y/o aglomeración de una proteína ADAMTS13.

[0093] En una realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que comprende una cantidad o dosis terapéuticamente efectiva de una proteína ADAMTS13, una concentración subfisiológica a fisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable, una concentración estabilizadora de una o más azúcares y/o alcoholes de azúcar, un tensioactivo no

iónico, un agente amortiguador que proporciona un pH neutro a la formulación, y opcionalmente una sal de calcio y/o zinc. En general, las formulaciones estabilizadas de A13 proporcionadas en la presente son adecuadas para la administración farmacéutica. En una realización preferida, la proteína A13 es ADAMTS13 humana un derivado o fragmento de la misma biológicamente activo.

[0094] En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 son formulaciones líquidas. En otras realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 son formulaciones liofilizadas que se liofilizan a partir de una formulación líquida tal como se proporciona en la presente.

[0095] En algunas realizaciones de las formulaciones proporcionadas en la presente, la proteína ADAMTS13 es ADAMTS13 (hA13) humana o ADAMTS13 (rhA13) recombinante humana, o un derivado o fragmento de la misma biológicamente activo. En una realización, la secuencia de aminoácido de hA13 tiene el número de acceso de GenBank NP_620594. En otra realización, la secuencia de aminoácido de hA13 comprende los aminoácidos 75 a 1427 de NP_620594, una variante natural o conservadora de los mismos, o un fragmento de los mismos biológicamente activos.

[0096] En ciertas realizaciones, se proporciona ADAMTS13 en una dosis terapéuticamente efectiva entre aproximadamente 0,05 mg/mL y aproximadamente 10 mg/mL. En otras realizaciones, se proporciona ADAMTS13 a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/mL y aproximadamente 10 mg/mL. En otras realizaciones adicionales, se proporciona ADAMTS13 a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/mL y aproximadamente 5 mg/mL. En otra realización, se proporciona ADAMTS13 a una concentración de entre aproximadamente 0,1 mg/mL y aproximadamente 2 mg/mL. En otras

realizaciones adicionales, ADAMTS13 puede estar presente a una concentración de 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 puede determinarse mediante espectroscopía (es decir, proteína total medida a A_{280}) u otra determinación en masa (por ejemplo, ensayo Bradford, tinción con plata, peso de un polvo liofilizado, etc.). En otras realizaciones, la concentración de ADAMTS13 se puede determinar por un ensayo ELISA de ADAMTS13 (por ejemplo, antígeno mg/mL).

[0097] En otras realizaciones adicionales, la concentración de ADAMTS13 en una formulación proporcionada por la presente invención se puede expresar como un nivel de actividad enzimática. Por ejemplo, en una realización, una formulación de ADAMTS13 puede contener entre aproximadamente 10 unidades de actividad FRETS-VWF73 y aproximadamente 10.000 unidades de actividad FRETS-VWF73 u otra unidad enzimática (IU) adecuada de A13. En otras realizaciones, la formulación puede contener entre aproximadamente 20 unidades de actividad FRETS-VWF73 (U_{FV73}) y aproximadamente 8,000 unidades de actividad FRETS-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 rangos de los mismos. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en la presente contiene entre aproximadamente 150 y aproximadamente 600 U_{FV73}. En algunas realizaciones, una formulación contiene aproximadamente 10 unidades de actividad FRETS-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 FRETS-VWF73.

[0098] En forma similar, en algunas realizaciones, la concentración de ADAMTS13 puede expresarse como una actividad enzimática por unidad de volumen, por ejemplo, unidades enzimáticas 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 rangos de los mismos. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en la presente contiene entre aproximadamente 150 UI/mL y aproximadamente 600 UI/mL. En otra realización preferida, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en la presente contiene entre aproximadamente 100 UI/mL y aproximadamente 1.000 UI/mL. En algunas 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.

[0099] En algunas realizaciones, las formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 proporcionadas por la presente invención contendrán una concentración de sal subfisiológica a fisiológica, por

ejemplo, entre 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 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 de sodio o potasio.

[0100] De manera ventajosa, se descubrió que las formulaciones de ADAMTS13 que contienen una concentración subfisiológica de una sal farmacéuticamente aceptable forman tortas liofilizadas compactas con superficies suaves. Asimismo, se ha descubierto que las formulaciones liofilizadas de proteínas ADAMTS13 con bajo contenido de sal reducen la aglomeración de proteínas en comparación con formulaciones preparadas con concentraciones fisiológicas de sal. En consecuencia, en una realización preferida, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 con bajo contenido de sal 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 bajo contenido de sal proporcionada en la presente contiene menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéutica. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal proporcionada en la

presente contiene menos de aproximadamente 80 mM de una sal farmacéutica. En otra realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal proporcionada en la presente contiene menos de aproximadamente 60 mM de una sal farmacéutica (es decir, entre aproximadamente 0 mM y aproximadamente 60 mM de sal). En otra realización preferida, una formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal contendrá entre aproximadamente 30 mM y aproximadamente 60 mM de una sal farmacéuticamente aceptable. En otras realizaciones, una formulación de ADAMTS13 con bajo contenido 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 bajo contenido de sal es una formulación liofilizada. En una realización preferida, la sal es cloruro de sodio o potasio.

[0101] También se ha descubierto que la inclusión de niveles moderados (es decir, entre aproximadamente 2% y aproximadamente 6%) de una o más azúcares y/o alcoholes de azúcar contribuye a la preparación de tortas liofilizadas compactas con superficies suaves y ayudan a estabilizar la ADAMTS13 tras la liofilización. Por consiguiente, en una realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que contienen entre aproximadamente 2% y aproximadamente 6% de una o más azúcares y/o alcoholes de azúcar. Se puede usar cualquier azúcar, tales como mono, di y polisacáridos, o glucanos solubles en agua, incluyendo, por ejemplo, fructosa, glucosa, manosa, sorbosa, manosa, xilosa, maltosa, lactosa, sacarosa, dextrano, trehalosa,

pululano, dextrina, ciclodextrina, almidón soluble, almidón hidroxietilo y carboximetilcelulosa. En una realización particular, se usa 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 y un grupo hidroxilo. Los ejemplos no taxativos de alcoholes de azúcar que se pueden usar en las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente incluyen manitol, sorbitol, inositol, galactitol, dulcitol, xilitol y arabitol. En una realización, se usa manitol como aditivo de alcohol de azúcar. En una realización preferida, una formulación de ADAMTS13 contiene un azúcar y un aditivo de alcohol de azúcar.

[0102] Los azúcares y los alcoholes de azúcar se pueden usar individualmente o en combinación. En algunas realizaciones, el azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos estará presente 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 será entre aproximadamente 0,5% y aproximadamente 5%. En determinadas realizaciones, el azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos estará presente a una concentración de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 5%. En una realización preferida, el azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos estará presente a una concentración de entre aproximadamente 2% y aproximadamente 6%. En otra realización preferida, el azúcar, alcohol de azúcar o una combinación de los mismos estará presente a una concentración de entre aproximadamente 3% y aproximadamente 5%. En algunas realizaciones, la concentración final podrá ser 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 una combinación de los mismos. En realizaciones particulares, una formulación proporcionada en la presente 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 concentraciones de azúcar y alcohol de azúcar, por ejemplo, un 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% 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%.

[0103] En forma ventajosa, también se descubrió que la inclusión de un tensioactivo no iónico reduce significativamente la aglomeración de las formulaciones de ADAMTS13. En consecuencia, en una realización, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 que contienen una concentración estabilizadora de un detergente no iónico. Los tensioactivos no iónicos farmacéuticamente aceptables que se pueden usar en las formulaciones de la presente invención son conocidos en la técnica de la ciencia farmacéutica e incluyen, a modo no taxativo, polisorbato 80 (Gwen 80), polisorbato 20 (Gwen 20) y diversos poloxámeros o plurónicos, incluyendo plurónico F-68 y BRIJ 35, o mezclas de los mismos. En una realización preferida, el tensioactivo no iónico usado en las presentes formulaciones farmacéuticas es Polysorbate 80. En algunas realizaciones, se puede usar un tensioactivo en una formulación proporcionada en la presente a una concentración de 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 algunas 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.

[0104] Asimismo, 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 lo tanto, en algunas realizaciones, se proporcionan formulaciones de ADAMTS13 que contienen un agente amortiguador adecuado para mantener la formulación a un pH neutro. Los agentes amortiguadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica e incluyen, a modo no taxativo, solución amortiguadora de fosfato, histidina, citrato de sodio, HEPES, Tris, Bicine, glicina, N-glicilglicina, acetato de sodio, carbonato de sodio, glicilglicina, lisina, arginina, fosfato de sodio y mezclas de los mismos. En realizaciones preferidas, el agente amortiguador se selecciona de histidina, solución amortiguadora de fosfato, HEPES y citrato de sodio. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización específica, el agente amortiguador es histidina. En otra realización específica, el agente amortiguador es HEPES. En una realización, el pH de las formulaciones proporcionadas en la presente es entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 9,0. En algunas realizaciones, el pH de la formulación es 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 es entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 8,0. En una realización más preferida, el pH de la formulación A13 es entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización particular, el pH de la formulación A13 es aproximadamente 7,0. En otra realización particular, el pH de la formulación A13 es aproximadamente 7,0±0,2.

[0105] También se ha demostrado en la presente que la inclusión de calcio estabiliza aún más las formulaciones de ADAMTS13. En consecuencia, en algunas realizaciones, se proporcionan formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 que contienen calcio entre aproximadamente 0,5 mM y aproximadamente 20 mM (por ejemplo, cloruro de calcio). Cualquier sal de calcio farmacéuticamente aceptable se puede usar en las formulaciones proporcionadas en la presente. Los ejemplos no taxativos de sal de calcio que se puede usar incluye, por ejemplo, $CaCl_2$, $CaCO_3$, $Ca(C_6H_{11}O_7)_2$, $Ca_3(PO_4)_2$, $Ca(C_{18}H_{35}O_2)_2$, 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 algunas realizaciones, la concentración de calcio es 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 aproximadamente 2 mM. En otra realización preferida, la concentración de calcio es aproximadamente 3 mM. En otra realización preferida adicional, la concentración de calcio es aproximadamente 4 mM.

[0106] En forma similar, se ha descubierto que bajo ciertas condiciones, la inclusión de zinc estabiliza aún más una formulación de ADAMTS13 proporcionada en la presente. Por ejemplo, la figura 34 muestra que la inclusión de entre 2 µM y aproximadamente 10 µM de zinc estabiliza aún más las formulaciones de ADAMTS13 que contienen calcio. Cualquier sal de zinc farmacéuticamente aceptable se puede usar en las formulaciones proporcionadas en la presente. Los ejemplos no taxativos de sal de zinc que se pueden usar incluyen, por ejemplo, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_3 \cdot 2H_2O$, $Zn_3(PO_4)_2$ y $(C_6H_5O_7)_2Zn_3 \cdot 2H_2O$, y similares. En una realización, se usa $ZnSO_4$ en las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente. En algunas realizaciones, el zinc 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 zinc se incluye en una formulación de ADAMTS13 a una concentración de aproximadamente 0,5 µM a aproximadamente 10,0 µM. En algunas realizaciones, la concentración de zinc es 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.

[0107] En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente comprenden además uno o más excipientes, vehículos y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables. Además, las formulaciones proporcionadas en la

presente pueden comprender otros agentes medicinales, vehículos, adyuvantes, diluyentes, potenciadores de penetración tisular, solubilizantes y similares. Los métodos para preparar las composiciones y formulaciones para administración farmacéutica son conocidos por los expertos en la técnica (ver, por ejemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (1990)).

[0108] En una realización, las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente tendrán una tonicidad en un rango entre aproximadamente 200 mOsmol/L y aproximadamente 400 mOsmol/L, o en un rango entre aproximadamente 250 y aproximadamente 350 mOsmol/L. En algunas realizaciones, una formulación de ADAMTS13 proporcionada en la presente tendrá una tonicidad, por ejemplo de 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.

[0109] Los ejemplos de agentes de tonicidad que se pueden usar en las formulaciones proporcionadas en la presente incluyen, a modo no taxativo, cloruro de sodio, dextrosa, sacarosa, xilitol, fructosa, glicerol, sorbitol, manitol, trehalosa, cloruro de potasio, manosa, cloruro de calcio, cloruro de magnesio, otras sales inorgánicas, otros azúcares, otros alcoholes de azúcar y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, una formulación de ADAMTS13 puede comprender al menos un agente de tonicidad o al menos dos, tres, cuatro, cinco o más agentes de tonicidad.

[0110] Las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente pueden formularse para administración a través de métodos conocidos, tales como la administración intravenosa, por ejemplo, como un bolo o por infusión continua durante un período de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente se pueden administrar sistémica o localmente. La administración sistémica incluye, a modo no taxativo: vías de administración oral, subdérmica, intraperitoneal, subcutánea, transnasal, sublingual o rectal. La administración local incluye, a modo no taxativo: vías de administración tópica, subcutánea, intramuscular e intraperitoneal.

[0111] En un aspecto de la invención se proporciona una composición de proteína ADAMTS13 monomérica. En algunas realizaciones, la composición de la proteína ADAMTS13 monomérica está sustancialmente libre de ADAMTS13 aglomerada, ADAMTS13 dimérica, o tanto ADAMTS13 aglomerada como ADAMTS13 dimérica. En algunas realizaciones, la composición monomérica tiene una actividad específica superior que una composición similar que contiene una proteína ADAMTS13 aglomerada y/o dimérica. En una realización particular, la composición de ADAMTS13 monomérica se produce mediante un método que comprende la filtración sobre gel o cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización particular, la proteína ADAMTS13 es ADAMTS13 (hA13) humana o ADAMTS13 (rhA13) recombinante humana, o un derivado o fragmento de la misma biológicamente activo.

[0112] En otro aspecto, se proporcionan formulaciones de las composiciones de ADAMTS13 monomérica. En una realización, la formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable de la proteína ADAMTS13 monomérica. En algunas realizaciones, la formulación está sustancialmente libre de ADAMTS13 aglomerada, ADAMTS13 dimérica, o tanto ADAMTS13 aglomerada como ADAMTS13 dimérica. En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 monomérica tienen una actividad específica superior que formulaciones similares que contienen una proteína ADAMTS13 aglomerada y/o dimérica. En una realización particular, la formulación de ADAMTS13 monomérica se produce mediante un método que comprende la filtración sobre gel o cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización particular, la proteína ADAMTS13 en la formulación es ADAMTS13 (hA13) humana o ADAMTS13 (rhA13) recombinante humana, o un derivado o fragmento de la misma biológicamente activo. En algunas realizaciones, la proteína ADAMTS13 monomérica se formula de acuerdo con una formulación proporcionada en la presente.

[0113] En una realización, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que comprenden de aproximadamente 0,05 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 tensioactivo no iónico y un agente amortiguador. En algunas realizaciones, las formulaciones pueden comprender además calcio y/o zinc. En otras realizaciones, la formulación se puede amortiguar a un pH de entre aproximadamente 6,5 y 9,0. En algunas realizaciones, las formulaciones A13 son adecuadas para la administración farmacéutica.

[0114] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 que comprende: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0115] En una realización, se proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 que comprende: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5; la cual contiene entre aproximadamente 50 unidades por mL y aproximadamente 1000 unidades por mL de actividad de ADAMTS13. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0116] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 1 mM a 10 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0117] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar aproximadamente entre 2% y aproximadamente 6%; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, la mezcla de sacarosa y manitol consiste en aproximadamente sacarosa 1% y manitol 3%. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0118] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; entre aproximadamente entre 0,01% y aproximadamente 0,1% de un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, plurónico F-68, BRIJ 35 y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o alcohol de azúcar es una

mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, el tensioactivo es polisorbato 80. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0119] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, en donde el agente amortiguador es histidina o HEPES. En algunas realizaciones, el agente amortiguador está presente en una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, preferiblemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0120] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente

amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y aproximadamente 20 µM de zinc. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

[0121] En una realización preferida, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; NaCl 0 a 60 mM; calcio 2 mM a 4 mM; manitol al 2% a 4%; sacarosa al 0,5% a 2%; polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; e histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2). En una realización, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y aproximadamente 20 µM de zinc.

[0122] En otra realización, se proporcionan formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH aproximadamente entre 6,5 y 7,5. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0123] En una realización, se proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprende: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100

mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5; la cual contiene entre aproximadamente 50 unidades por mL y aproximadamente 1000 unidades por mL de actividad de ADAMTS13. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0124] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio 1 mM a 10 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0125] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar aproximadamente entre aproximadamente 2% y aproximadamente 6%; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el

pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, la mezcla de sacarosa y manitol consiste en aproximadamente sacarosa 1% y manitol 3%. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0126] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico aproximadamente entre aproximadamente 0,01% y aproximadamente 0,1%; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, plurónico F-68, BRIJ 35 y una combinación de los mismos. En una realización preferida, el azúcar y/o alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol. En una realización particular, el tensioactivo es polisorbato 80. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y

aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0127] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable; calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, en donde el agente amortiguador es histidina o HEPES. En algunas realizaciones, el agente amortiguador está presente en una concentración de entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM, preferiblemente entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM. En otra realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0128] En otra realización, la presente invención proporciona formulaciones estabilizadas de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprenden: 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; menos de aproximadamente 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable;

calcio 0,5 mM a 20 mM; un azúcar y/o alcohol de azúcar; un tensioactivo no iónico; y un agente amortiguador para mantener el pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5. En algunas realizaciones, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y aproximadamente 20 µM de zinc. En algunas realizaciones, la formulación comprende entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 10 mM de calcio, preferiblemente entre aproximadamente 2 mM y aproximadamente 4 mM de calcio. En una realización preferida, la sal farmacéuticamente aceptable es cloruro de sodio o cloruro de potasio. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0129] En una realización preferida, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 con bajo contenido de sal que comprende 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13; NaCl menos de aproximadamente 100 mM; calcio 2 mM a 4 mM; manitol al 2% a 4%; sacarosa al 0,5% a 2%; polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; e histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2). En una realización, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y aproximadamente 20 µM de zinc. En una realización preferida, la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal es una formulación liofilizada.

[0130] 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 de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0131] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0132] En otra realización de la formulación estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0133] En una realización de la formulación estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0134] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0135] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0136] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0137] En una realización, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0138] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0139] En otra realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0140] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0141] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0142] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0143] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0144] En una realización relacionada, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0145] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0146] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0147] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0148] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0149] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0150] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde 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 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0151] En una realización relacionada, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal, en donde la formulación se liofiliza a partir de una formulación líquida que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no

iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0152] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0153] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0154] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0155] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0156] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0157] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13

(A13) con bajo contenido de sal, en donde 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 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

IV. Estabilidad de las formulaciones de ADAMTS13

[0158] En algunas realizaciones, las formulaciones de ADAMTS13 proporcionadas en la presente pueden ser estables por un período prolongado de tiempo al almacenarse a determinada temperatura, 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 más. En algunas realizaciones, el período prolongado de tiempo es al menos aproximadamente una semana. En algunas realizaciones, el período prolongado de tiempo puede comprender al menos aproximadamente 2 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 otras realizaciones adicionales, las formulaciones de la invención pueden permanecer estables durante al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5 o más años.

[0159] En algunas 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 taxativos de las propiedades que se pueden usar para evaluar la estabilidad incluyen actividad enzimática, actividad específica, el grado de mono y polidispersidad de la proteína, el alcance de la dimerización, oligomerización o aglomeración de la proteína, el grado de despliegue de la proteína.

[0160] Un experto en la técnica conocerá fácilmente otras medidas de estabilidad que se pueden emplear para evaluar la estabilidad de una formulación de ADAMTS13, incluyendo, a modo no taxativo, filtración sobre gel, dispersión de luz dinámica o estática, ultracentrifugación analítica, rp-HPLC, cromatografía por intercambio de iones, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, calorimetría, calorimetría diferencial de barrido, espectroscopía de NMR, espectroscopía de masa, dispersión de rayos X a ángulo pequeño (SAX), electroforesis en gel de poliacrilamida y similares.

[0161] En una realización, la presente invención proporciona formulaciones de A13 o rA13 que retienen al menos aproximadamente 50% del total de la actividad de ADAMTS13 tras almacenarse por 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 tras almacenarse por un período prolongado de tiempo.

[0162] En otra realización, se proporcionan formulaciones que mantienen al menos aproximadamente 50% de la actividad específica de ADAMTS13 tras almacenarse por 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 tras almacenarse por un período prolongado de tiempo.

[0163] En otras realizaciones, las formulaciones de la invención poseerán una actividad específica de al menos aproximadamente 600 unidades de actividad de FRETS-VWF73 por mg de la proteína

ADAMTS13 tras almacenarse por un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, una formulación proporcionada en la presente tendrá por lo menos aproximadamente 700 U/mg A13, o al menos aproximadamente 800 U/mg, 900 U/mg, 1000 U/mg, 1100 U/mg, 1200 U/mg, 1300 U/mg, 1400 U/mg, 1500 U/mg, o una actividad específica superior, tras almacenarse por un período prolongado de tiempo.

[0164] En una realización, una formulación de A13 proporcionada en la presente tendrá una polidispersidad, determinada por análisis de dispersión de luz dinámica, de menos de aproximadamente 50% tras almacenarse por un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, una formulación de A13 tendrá una polidispersidad de al menos aproximadamente 45%, o una polidispersidad de menos de aproximadamente 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10% o 5%, medida por análisis de dispersión de luz dinámica, tras almacenarse por un período prolongado de tiempo.

[0165] En otra realización de la invención, una formulación de A13 proporcionada en la presente tendrá una población de proteína A13 que consiste en al menos aproximadamente 50% de monómeros de A13 tras almacenarse por un período prolongado de tiempo. En otras realizaciones, una formulación podrá 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 porcentaje mayor de monómeros de A13.

V. Purificación y expresión de ADAMTS13

[0166] En algunas realizaciones, una proteína ADAMTS13 usada en las formulaciones proporcionadas en la presente se pueden expresar, producir o purificar de acuerdo con un método descrito previamente, por ejemplo, en US 6.926.894, US 2005/0266528, US 2007/0015703, Solicitud de Patente de los Estados Unidos número

de serie 12/437.384, Solicitud de Patente de los Estados Unidos número de serie 12/847.999, y WO 2002/42441, las cuales se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

A. Vectores y células huésped

[0167] Las proteínas ADAMTS recombinantes se pueden producir por expresión en cualquier sistema huésped procariótico o eucariótico. Los ejemplos de células eucariotas incluyen, a modo taxativo, células de mamíferos, tales como CHO, COS, HEK 293, BHK, SK-Hep y HepG2; células de insectos, por ejemplo, células SF9, células SF21, células S2 y células High Five; y células de levadura, por ejemplo, células *Saccharomyces* o *Schizosaccharomyces*. En una realización, las proteínas ADAMTS se pueden expresar en células bacteriales, células de levadura, células de insecto, células de aves, células de mamíferos y similares. Por ejemplo, en una línea celular humana, 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.

[0168] En una realización, las células pueden ser células de cualquier mamífero que se pueden cultivar, preferiblemente 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 por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para desarrollo en cultivo de suspensión, Graham et al., J. Gen Virol., 36:59 (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de

hámster chino/-DHFR, tal como el subclon DUKX-B11 (CHO, Uriaub and Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); células 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 de cuello uterino humano (HeLa, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de riñón de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario 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). Preferiblemente, la línea celular es una línea celular de roedor, especialmente una línea celular de hámster, tal como CHO o BHK.

[0169] Una amplia variedad de vectores se pueden usar para la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) y se pueden seleccionar de vectores de expresión eucarióticos y procarióticos. En algunas realizaciones, se contempla un vector plásmido para uso en la expresión de una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13). En general, los vectores plásmidos que contienen secuencias de control y replicón que se derivan de especies compatibles con la célula huésped se usan en relación con estos huéspedes. El vector puede transportar un sitio de replicación, así como secuencias de marcado que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. El plásmido comprenderá una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADATMS13) ligada operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor.

[0170] A continuación se describe un método preferido para preparar clones de células CHO estables que expresan una proteína ADAMTS recombinante. Se transfecta una línea celular DUKX-B11 CHO con deficiencia de DHFR con un vector de expresión DHRF para permitir la expresión de la proteína recombinante pertinente, básicamente tal como se describe en la Patente de los Estados Unidos número 5.250.421 (Kaufman et al., Genetics Institute, Inc.). La selección se realiza mediante cultivo en un medio libre de hipoxantina/timidina (HT) y se logra la amplificación de la región pertinente que codifica la expresión de la proteína ADAMTS recombinante y el gen DHFR mediante la propagación de las células en concentraciones en aumento de metotrexato. Cuando corresponda, las líneas celulares CHO se pueden adaptar para cultivarse en medio libre de suero y/o proteína, básicamente como se describe en US 6.100.061 (Reiter et al, Immuno Aktiengesellschaft).

[0171] En otra realización preferida, se preparan células HEK293 estables transfectando con un constructor que contiene un marcador seleccionable de higromicina y selecciónate transformadores mediante resistencia a antibióticos.

[0172] La capacidad de determinados virus de infectar las células o de entrar en ellas mediante endocitosis mediada por receptores y de integrarse en el genoma de la célula huésped y expresar los genes virales de forma estable y eficiente los han transformado en candidatos atractivos para la transferencia de ácidos nucleicos ajenos a las células (por ejemplo, células de mamíferos). Por consiguiente, en algunas realizaciones, se usa un vector viral para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. El vector viral comprenderá una

secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) ligada operativamente a una o más secuencias de control, por ejemplo, un promotor. Alternativamente, el vector viral puede no contener una secuencia de control y se basará en cambio en una secuencia de control dentro de la célula huésped para impulsar la expresión de la proteína ADAMTS. Los ejemplos no taxativos de vectores virales que se pueden usar para llevar un ácido nucleico incluyen vectores adenovirales, vectores AAV y vectores retrovirales.

[0173] En una realización, un vector de expresión de adenovirus incluye aquellos constructos que contienen secuencias de adenovirus suficientes para soportar el empaque del constructo y expresar en última instancia un constructo de ADAMTS que se haya clonado en su interior. Los vectores adenovirales permiten la introducción de secuencias ajenas hasta 7 kb (Grunhaus et al., Seminar in Virology, 200(2):535-546, 1992)).

[0174] En otra realización, se puede usar un virus adeno-asociado (AAV) para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. Los sistemas AAV se han descrito previamente y son conocidos generalmente en la técnica (Kelleher and 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). Los detalles relacionados con la generación y uso de los vectores rAAV se describen, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos número 5.139.941 y 4.797.368, las cuales se incorporan en su totalidad en la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0175] En una realización, se puede usar un vector de expresión retroviral para introducir una secuencia de nucleótidos que codifica una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) en una célula huésped para su expresión. Estos sistemas se han descrito previamente y son conocidos generalmente en la técnica (Mann et al., Cell, 33:153-159, 1983; Nicolas and Rubinstein, In: Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses, Rodriguez and 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 retroviral es un vector lentiviral (ver, 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; Patentes de los Estados Unidos número 6.013.516 y 5.994.136).

[0176] Los ejemplos no taxativos de vectores para expresión procariótica incluyen plásmidos tales como pRSET, pET, pBAD, etc., en donde los promotores usados en los vectores de expresión procariótica incluyen lac, trc, trp, recA, araBAD, etc. Los ejemplos de vectores para expresión eucariótica incluyen: (i) para expresión en levadura, vectores tales como pAO, pPIC, pYES, pMET, que usan promotores tales como AOX1, GAP, GAL1, AUG1, etc.; (ii) para expresión en células de insectos, vectores tales como pMT, pAc5, pIB, pMIB, pBAC, etc., que usan 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 virales, tales como vaccinia virus, virus adeno-asociados, virus del

herpes, retrovirus, etc., que usan promotores tales como CMV, SV40, EF-1, UbC, RSV, ADV, BPV y β-actina.

[0177] En algunas realizaciones, la expresión de cultivo celular de ADAMTS13 puede comprender el uso de un microvehículo. La presente invención proporciona, entre otros aspectos, métodos de expresión de la proteína ADAMTS a gran escala. En algunas realizaciones, los cultivos celulares de las realizaciones se pueden llevar a cabo en grandes biorreactores bajo condiciones adecuadas para proporcionar áreas superficiales de cultivo específico de gran volumen para lograr altas densidades celulares y expresión de proteínas. Un medio para proporcionar dichas condiciones de desarrollo es usar microvehículos para el cultivo celular en biorreactores de tanque agitado. En otra realización, estos requisitos de cultivo se cumplen a través del uso de un cultivo celular de suspensión.

B. Métodos de cultivo

[0178] En algunas realizaciones, la expresión de ADAMTS13 puede comprender el uso de un sistema de cultivo celular operado en un modo de funcionamiento continuo o por lotes. Por ejemplo, cuando se utilizan cultivos celulares en lotes, se pueden operar en modo de lote único, lote alimentado o lote repetido. Asimismo, los cultivos celulares continuos se pueden operar, por ejemplo, en modo de perfusión, turbidostato o quimiostato. El cultivo celular en lote o continuo se puede realizar bajo condiciones de suspensión o adherencia. Cuando se opera bajo condiciones de suspensión, las células estarán suspendidas libremente y mezcladas dentro del medio de cultivo. Alternativamente, bajo 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, fibra hueca, hoja plana, matriz de gel y simulares.

[0179] Un cultivo en lote es típicamente un cultivo celular a gran escala en el que se cultiva un inóculo celular a una densidad máxima en un tanque o fermentador, y se cosecha y procesa como un único lote. Un cultivo en lote alimentado es típicamente un cultivo en lote que se alimenta con nutrientes nuevos (por ejemplo, sustratos que limitan en crecimiento) o aditivos (por ejemplo, precursores de productos). La solución de alimentación es por lo general altamente concentrada para evitar la dilución del biorreactor. En un cultivo de lote repetido, las células se colocan en un medio de cultivo y se desarrollan a una densidad celular deseada. Para evitar la aparición de una fase de deterioro y muerte celular, el cultivo se diluye con el medio de cultivo completo antes de que las células alcancen su concentración máxima. La cantidad y frecuencia de la dilución varía ampliamente y depende de las características de desarrollo de la línea celular y la conveniencia 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 el subcultivo, el volumen del cultivo aumentará en cada etapa a medida que se haga cada dilución. El volumen en aumento se puede manejar al tener un reactor de suficiente tamaño para permitir las diluciones dentro del recipiente o al dividir el cultivo diluido en varios recipientes. El fundamento de este tipo de cultivo es mantener las células en un estado de crecimiento exponencial. El cultivo en serie se caracteriza por que el volumen del cultivo siempre está aumentando en cada etapa, puede haber múltiples cosechas, las células continúan creciendo y el proceso puede

continuar por el tiempo que se desee. En algunas realizaciones, una proteína ADAMTS (por ejemplo, ADAMTS13) se puede recuperar tras cosechar el sobrenadante de un cultivo en lote.

[0180] Un cultivo continuo puede ser un cultivo de suspensión al que se le suministran continuamente nutrientes por la entrada de flujo de medio nuevo, en el que el volumen del cultivo por lo general se mantiene constante por la eliminación concomitante de medio utilizado. En los métodos de quimiostato y turbidostato, el medio extraído contiene células. Por lo tanto, las células restantes en el recipiente de cultivo celular deben crecer para mantener un estado constante. En el método de quimiostato, la tasa de crecimiento se controla generalmente al controlar la tasa de dilución, es decir, la tasa a la cual se añade el medio nuevo. La tasa de crecimiento de las células en el cultivo puede controlarse, por ejemplo, a una tasa de crecimiento submáxima, por la alteración de la tasa de dilución. En contraste, en el método de turbidostato, se establece una tasa de dilución para permitir la tasa de crecimiento máximo que las células pueden lograr a determinadas condiciones operativas, tal como pH y temperatura.

[0181] En un cultivo de perfusión, se le quitan todas las células al medio extraído y se retienen en el recipiente de cultivo, por ejemplo, mediante métodos de filtración o centrifugación que conducen a la reintroducción de las células en el cultivo. Sin embargo, generalmente las membranas usadas para la filtración no retienen el 100% de las células, por lo que se elimina una proporción cuando se extrae el medio. Es posible que no sea esencial operar los cultivos de perfusión a tasas de crecimiento

muy elevadas, ya que la mayoría de las células se retienen en el recipiente de cultivo.

[0182] El sistema de reactor con tanque con agitación se puede usar para cultivos celulares continuos y de lotes operados en modo de suspensión o adherente. Por lo general, el sistema de reactor con tanque agitado se puede operar como cualquier reactor con tanque agitado convencional con cualquier tipo de agitador, tal como Rushton, álabes hidrodinámicos, palas inclinadas o marino.

C. Medios de cultivo

[0183] La ADAMTS13 se puede expresar en medios de cultivo que están libres de proteínas agregadas exógenamente. "Medio de cultivo libre de proteínas" y los términos relacionados se refieren a un medio de cultivo que carece de proteínas de fuente exógena a las células en el cultivo o que no son las células en el cultivo, que naturalmente liberan proteínas durante el crecimiento. En una realización, una proteína ADAMTS13 se puede expresar en un medio que está libre de proteínas agregadas exógenamente (es decir, libre de proteínas) y se complementa con zinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En algunas realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 30 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los medios de cultivo libres de proteínas ejemplares se describen en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, y Patentes de los

Estados Unidos número de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0184] Los métodos para preparar medios de cultivo libres de proteína animal y medios de cultivo definidos químicamente son conocidos en la técnica, por ejemplo, en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y las Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos. En una realización, el medio de cultivo utilizado para expresar una proteína ADAMTS13 es un medio libre de oligopéptidos o libre de proteínas animales. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede ser definido químicamente. En algunas realizaciones, el medio de cultivo puede contener al menos una poliamina a una concentración de aproximadamente 0,5 mg/L a aproximadamente 10 mg/L.

[0185] La proteína ADAMTS13 también se puede expresar en medios de cultivo que están libres de oligopéptidos agregados exógenamente. En una realización, la ADAMTS13 se expresa en un medio de cultivo que está libre de oligopéptidos agregados exógenamente (es decir, libre de polipéptidos) y se complementa con zinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En algunas realizaciones, el medio de cultivo libre de oligopéptidos contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 30 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los medios de cultivo libres de oligopéptidos ejemplares se describen en las

Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, y Patentes de los Estados Unidos número de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0186] La proteína ADAMTS13 también se puede expresar en medios de cultivo que están libres de suero. En una realización, la ADAMTS13 se expresa en un medio de cultivo que está libre de suero agregado exógenamente (es decir, libre de suero) y se complementa con zinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En algunas realizaciones, el medio de cultivo libre de suero contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 30 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los medios de cultivo libres de suero ejemplares se describen en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, y Patentes de los Estados Unidos número de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0187] La proteína ADAMTS13 también se puede expresar en medios de cultivo que están libres de proteínas animales. En una realización, la ADAMTS13 se expresa en un medio de cultivo que está libre de polipéptidos o proteínas animales agregadas exógenamente (es decir, libre de proteínas animales) y se complementa con zinc, calcio y/o nicotinamida (vitamina B3). En

algunas realizaciones, el medio de cultivo libre de proteínas animales contiene una poliamina. Por ejemplo, a una concentración de al menos 2 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 30 mg/L, o a una concentración o aproximadamente entre 2 mg/L y 8 mg/L. En una realización específica, la poliamina es putrescina. Los medios de cultivo libres de proteínas animales ejemplares se describen en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, Solicitudes de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, y Patentes de los Estados Unidos número de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0188] Las proteínas ADAMTS13 también se pueden expresar en medios de cultivo complementados con calcio, zinc y/o vitamina B3 adicional, tal como se describe en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos número de serie 12/847.999, cuya divulgación se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos. En algunas realizaciones, el medio puede ser un medio libre de proteínas animales, un medio libre de oligopéptidos o un medio definido químicamente. En algunas realizaciones, el medio libre de oligopéptidos o libre de proteínas animales se prepara tal como se describe en las Patentes de los Estados Unidos número 6.171.825 y 6.936.441, WO 2007/077217, y Publicaciones de Solicitud de Patente de los Estados Unidos número 2008/0009040 y 2007/0212770, cuyas divulgaciones se incorporan en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos, y se complementa con calcio, zinc y/o vitamina B3 adicional. En una realización específica, el medio de cultivo definido químicamente puede ser similar a un

medio de cultivo modificado Eagle de Dulbecco (DMEM), que se ha complementado con calcio, zinc y/o vitamina B3 adicional, a fin de aumentar la actividad específica de una proteína ADAMTS expresada en una célula cultivada en el medio. En otras realizaciones adicionales, el medio de cultivo está libre de componentes animales. En otra realización, el medio de cultivo contiene proteínas, por ejemplo, proteínas animales del suero, tal como suero de ternero fetal. En otra realización, el cultivo tiene proteínas recombinantes agregadas exógenamente. En otra realización, las proteínas provienen de animales certificados libres de patógenos.

D. Purificación de ADAMTS13

[0189] Los métodos para la purificación de ADAMTS13 nativa a partir de plasma combinado son bien conocidos en la técnica. Asimismo, los métodos para la expresión y purificación de ADAMTS13 recombinante también son conocidos en la técnica. Por ejemplo, la purificación y expresión recombinante se describe en Plaimauer and 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 los Estados Unidos número de serie 12/847.999, cuyas divulgaciones se incorporan expresamente en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos.

[0190] Adicionalmente, la presente divulgación proporciona métodos adicionales para la purificación de ADAMTS13 recombinante. En una realización, la ADAMTS13 recombinante se expresa en células CHO recombinantes y se purifica a partir del medio acondicionado resultante mediante cromatografía de intercambio de cationes

POROS HS. Para eliminar la ADAMTS13 dimérica, monomérica y/o aglomerada, la composición se somete luego a filtración sobre gel con exclusión por tamaño. Las composiciones de ADAMTS13 generalmente se someterán a al menos una, preferiblemente dos, etapas de inactivación o eliminación viral.

[0191] En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente para la preparación de una formulación de ADAMTS13 incluirán además al menos una etapa de eliminación o inactivación viral. En algunas realizaciones, los métodos proporcionados en la presente incluirán al menos dos o al menos tres etapas de eliminación o inactivación viral. Los ejemplos no taxativos de etapas de eliminación o inactivación viral que se pueden emplear con los métodos proporcionados en la presente incluyen tratamiento con detergente solvente (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 en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos), 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 en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos). En una realización preferida, la presente invención proporciona métodos para la preparación de una formulación de ADAMTS13 que comprende tratamiento con detergente solvente y nanofiltración.

[0192] En una realización, se proporciona un método para proporcionar una formulación de proteína ADAMTS13 con seguridad viral y el método comprende las etapas de (a) cultivar una célula que posee ácido nucleico que codifica una proteína ADAMTS13 en un

medio de cultivo; (b) recuperar una porción del medio de cultivo sobrenadante que contiene la proteína ADAMTS13; (c) enriquecer la proteína ADAMTS13 con una etapa de cromatografía; (d) realizar al menos una etapa de eliminación o inactivación viral; y (e) formular la composición de ADAMTS13 enriquecida de acuerdo con una formulación proporcionada en la presente, proporcionando así una formulación de ADAMTS13 con seguridad viral. En una realización, el medio de cultivo contiene zinc, calcio y opcionalmente nicotinamida (vitamina B3). En una realización preferida, la etapa de cultivar una célula comprende un cultivo continuo (por ejemplo, cultivo de perfusión o quimiostático). En otra realización preferida, el cultivo se mantiene a una temperatura entre 34°C y 37°C. En otra realización preferida adicional, el cultivo se mantiene a un pH 6,9 y 7,2. En una realización, la etapa de eliminación viral es nanofiltración.

[0193] En una realización, la presente invención proporciona un método para elaborar una formulación estabilizada de ADAMTS13 y el método comprende 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 zinc 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; (b) purificar la proteína ADAMTS13; y (c) preparar una formulación de acuerdo con cualquiera de las formulaciones proporcionadas en la presente.

[0194] En una realización, la presente invención proporciona un método para elaborar una formulación estabilizada de ADAMTS13 y el método comprende 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 zinc 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 de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0195] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida,

la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0196] En otra realización de la formulación estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0197] En una realización de la formulación estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0198] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la

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

[0199] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0200] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0201] En una realización, la presente invención proporciona un método para elaborar una formulación estabilizada de ADAMTS13 y el método comprende 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 zinc 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 de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0202] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0203] En otra realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0204] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0205] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0206] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0207] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0208] En una realización, la presente invención proporciona un método para elaborar una formulación estabilizada de ADAMTS13 y el método comprende 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 zinc 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 de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0209] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En

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

[0210] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0211] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0212] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de

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

[0213] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0214] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde 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 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0215] En una realización, la presente invención proporciona un método para elaborar una formulación estabilizada de ADAMTS13 y el método comprende 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 zinc 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 de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0216] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0217] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0218] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0219] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0220] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0221] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal, en donde 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 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

1. Tratamiento con solvente y detergente (S/D)

[0222] A fin de inactivar diversos contaminantes virales que pueden estar presentes en una formulación de ADAMTS13, una o más soluciones intermedias de ADAMTS13 se pueden someter a un tratamiento con solvente y detergente. Los métodos para el tratamiento con detergente de soluciones son bien conocidos en la técnica (para ver más detalles, remitirse a Pelletier JP et al., Best Pract Res Clin Haematol. 2006;19(1):205-42, cuya divulgación se incorpora expresamente en su totalidad a la presente a modo de referencia a todos los efectos). Generalmente, se puede usar cualquier tratamiento estándar S/D en combinación con los métodos proporcionados en la presente. Por ejemplo, a continuación se describe un protocolo ejemplar para un tratamiento de S/D.

[0223] En una realización, se añade Triton X-100, Tween-20, y tri(n-butil)fosfato (TNBP) a una solución intermedia de ADAMTS13 a concentraciones finales de aproximadamente 1,0%, 0,3% y 0,3%, respectivamente. La mezcla luego se agita a una temperatura aproximada entre 18°C y 25°C durante al menos aproximadamente una hora.

2. Nanofiltración y ultra/diafiltración

[0224] A fin de reducir la carga viral de una formulación de proteína ADAMTS13 proporcionada en la presente, la formulación o una composición intermedia se puede nanofiltrar usando un dispositivo adecuado de nanofiltración. En algunas realizaciones, el dispositivo de nanofiltración tendrá un tamaño de poro

promedio de aproximadamente entre 15 nm y 200 nm. Los ejemplos de nanofiltros adecuados para este uso incluyen, a modo no taxativo, DVD, DV 50, DV 20 (Pall), Viresolve NFP®, Viresolve NFR® (Millipore), Planova® 15N, 20N, 35N, y 75N (Planova). En una realización específica, un nanofiltro puede tener un tamaño de poro promedio de aproximadamente entre 15 y 72 nm o aproximadamente entre 19 y 35 nm, o aproximadamente de 15 nm, 19 nm, 20 nm, 35 nm o 72 nm. En una realización preferida, el nanofiltro tendrá un tamaño de poro promedio de aproximadamente 19 nm, 20 nm, o 35 nm, tal como un filtro Asahi PLANOVA® 20N o PLANOVA® 35N o un equivalente del mismo.

[0225] Luego de la nanofiltración, el filtrado se puede concentrar opcionalmente por ultrafiltración y/o la composición amortiguadora ajustada por diafiltración. En algunas realizaciones, la ultrafiltración se lleva a cabo en un cassette con una malla de canal abierto y la membrana de ultrafiltración tiene un punto de corte de peso molecular nominal (NMWCO) de menos de o aproximadamente 175 kDa o menos de o aproximadamente 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 o menos kDa. En una realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 30 kDa. En otra realización preferida, la membrana de ultrafiltración tiene un NMWCO de no más de 30 kDa.

3. Liofilización y tratamiento térmico

[0226] En otras realizaciones adicionales, la actividad viral de una formulación liofilizada de ADAMTS13, que se puede haber sometido previamente a otras etapas de eliminación o inactivación viral tal como nanofiltración, se puede reducir aún más mediante tratamiento térmico de la composición liofilizada. Los

tratamientos térmicos para la inactivación de cargas virales en los factores sanguíneos son bien conocidos en la técnica (por ejemplo, ver Piszkiewicz et al., Thromb Res. 1987 Jul 15;47(2):235-41; Piszkiewicz et al., Curr Stud Hematol Blood Transfus. 1989;(56):44-54; Epstein and Fricke, Arch Pathol Lab Med. 1990 Mar;114(3):335-40).

VI. Administración y métodos de tratamiento

[0227] Las formulaciones se pueden administrar para tratamientos terapéuticos o profilácticos. Por lo general, para las aplicaciones terapéuticas, las formulaciones se administran a un sujeto con una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF o de otro modo que lo necesite, en una "dosis terapéuticamente efectiva". Las formulaciones y cantidades efectivas para estos usos dependerán de la gravedad de la enfermedad o trastorno y el estado general de salud del paciente. Las administraciones únicas o múltiples de las formulaciones se pueden administrar dependiendo de la dosis y frecuencia según lo requiera y tolere el paciente.

[0228] Un "paciente" o "sujeto" a los efectos de la presente invención incluye seres humanos y otros animales, en particular, mamíferos. Por ende, las composiciones, formulaciones y métodos son aplicables a tratamientos en humanos y aplicaciones veterinarias. En una realización particular, el paciente es un mamífero y en otra realización, es un ser humano. Se pueden usar otros tratamientos y terapias para trastornos asociados con una disfunción de ADAMTS13 o VWF en combinación con las formulaciones y métodos proporcionados por la invención.

[0229] En un aspecto de la invención se proporcionan métodos para elaborar una formulación estabilizada de rA13 que tiene

actividades específicas elevadas. En una realización, el método 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 zinc 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, purificar la proteína A13 y preparar una formulación tal como se describe anteriormente. En algunas realizaciones, el medio de cultivo se complementa además con vitamina B3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/L a aproximadamente 20 mg/L.

[0230] En otro aspecto, la presente invención proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF. En otra realización, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con la formación y/o presencia de uno o más trombos. En otra realización, la invención proporciona métodos para desintegrar uno o más trombos en un sujeto que lo necesita. En otras realizaciones adicionales, la invención proporciona métodos para tratar o prevenir un infarto en un sujeto que lo necesita. En general, los métodos proporcionados por la invención comprenden administrar una formulación de ADAMTS13 tal como se indica en la presente a un sujeto que lo necesita.

[0231] Los ejemplos no taxativos de trastornos asociados con la formación y/o presencia de uno o más trombos son púrpura trombocitopénica trombótica hereditaria (TTP), TTP adquirida, trombosis arterial, infarto agudo de miocardio (AMI), accidente cerebrovascular, sepsis y coagulación intravascular diseminada (DIC).

[0232] Los ejemplos no taxativos de enfermedades asociadas con un infarto incluyen, entre otros, infarto de miocardio (ataque cardíaco), embolia pulmonar, eventos cerebrovasculares, tales como accidente cerebrovascular, enfermedad oclusiva de las arterias periféricas (tales como gangrena), síndrome antifosfolípido, sepsis, arteritis de células gigantes (GCA), hernia y vólvulo.

A. Tratamiento y profilaxis de una disfunción de ADAMTS13 y vWF

[0233] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con cualquiera de las formulaciones proporcionadas en la presente.

[0234] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0235] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0236] En otra realización de la formulación estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0237] En una realización de la formulación estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0238] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0239] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0240] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0241] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de

ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0242] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0243] En otra realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0244] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0245] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0246] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0247] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0248] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0249] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0250] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0251] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0252] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre

aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0253] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0254] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde 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 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0255] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0256] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0257] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0258] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0259] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0260] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0261] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal, en donde 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 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

B. Tratamiento y profilaxis para trastornos y enfermedades trombóticas

[0262] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno con la formación y/o presencia de un trombo y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con cualquiera de las formulaciones proporcionadas en la presente.

[0263] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0264] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0265] En otra realización de la formulación estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0266] En una realización de la formulación estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0267] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0268] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0269] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0270] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-

vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0271] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0272] En otra realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0273] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0274] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0275] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0276] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) con

bajo contenido de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0277] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0278] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0279] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0280] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0281] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente

amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0282] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0283] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde 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 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0284] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno relacionado con la formación y/o presencia de un trombo, comprendiendo el método administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0285] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0286] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0287] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0288] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0289] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0290] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal, en donde 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 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

C. Tratamiento y profilaxis para un infarto

[0291] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un infarto y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 de acuerdo con cualquiera de las formulaciones proporcionadas en la presente.

[0292] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un infarto y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0293] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0294] En otra realización de la formulación estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0295] En una realización de la formulación estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0296] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0297] En una realización de la formulación estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0298] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0299] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un infarto y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0300] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0301] En otra realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0302] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0303] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0304] En una realización de la formulación estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0305] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13; (b) NaCl 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5%

a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0306] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un infarto y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 200 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0307] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En

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

[0308] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0309] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0310] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de

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

[0311] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0312] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13), en donde 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 0 a 200 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

[0313] En una realización, la presente invención proporciona un método para tratar o prevenir un infarto y el método comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de ADAMTS13 que comprende (a) al menos 100 unidades de actividad de ADAMTS13 (es decir, actividad de FRETS-vWF73) por mg de ADAMTS13; (b) una sal farmacéuticamente aceptable 0 mM a 100 mM; (c) calcio 0,5 mM a 20 mM; (d) un azúcar y/o alcohol de azúcar; (e) un tensioactivo no iónico; y (f) un agente amortiguador para mantener el 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 otra realización preferida adicional, 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 2000 unidades de actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13.

[0314] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 1,0 mM y aproximadamente 10,0 mM de calcio. En una realización preferida, la formulación contiene entre aproximadamente 2,0 y aproximadamente 4,0 mM de calcio.

[0315] En otra realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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 alcohol de azúcar es una mezcla de sacarosa y manitol.

[0316] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, 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, plurónico F-68 y BRIJ 35. En una realización preferida, el tensioactivo es polisorbato 80.

[0317] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende entre aproximadamente 5 mM y aproximadamente 100 mM de un agente amortiguador. En una realización preferida, la formulación comprende entre aproximadamente 10 mM y aproximadamente 50 mM de un agente amortiguador. En otra realización, el agente amortiguador es histidina o HEPES. En una realización preferida, el agente amortiguador es histidina. En una realización, el pH de la formulación es entre aproximadamente 6,5 y 7,5. En una realización preferida, el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

[0318] En una realización de la formulación liofilizada estabilizada de A13 con bajo contenido de sal, la formulación comprende además entre aproximadamente 0,5 µM y 20 µM de zinc.

[0319] En una realización específica, la presente invención proporciona una formulación liofilizada estabilizada de ADAMTS13 (A13) con bajo contenido de sal, en donde 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 0 a 60 mM; (c) calcio 2 mM a 4 mM; (d) manitol al 2% a 4%; (e) sacarosa al 0,5% a 2%; (f) polisorbato 80 al 0,025 a 0,1%; y (g) histidina 10 mM a 50 mM (pH 7,0 ± 0,2).

VII. Kits de ADAMTS13

[0320] En otro aspecto de la invención se proporcionan kits para el tratamiento de una enfermedad o trastorno asociado con una disfunción de ADAMTS13 o VWF. En una realización, el kit comprende una formulación de A13 o rA13, tal como se proporciona anteriormente. En algunas realizaciones, los kits proporcionados en la presente pueden contener una o más dosis de una formulación líquida o liofilizada, tal como se proporciona en la presente. Cuando los kits comprenden una formulación liofilizada de A13 o rA13, generalmente también contendrán un líquido adecuado para la reconstitución de la formulación líquida, por ejemplo, agua estéril o una solución amortiguadora farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, los kits pueden comprender una formulación de ADAMTS13 preenvasada en una jeringa para ser administrada por un profesional de atención médica o para uso doméstico.

[0321] En una realización, se proporciona un kit que comprende entre aproximadamente 10 unidades de actividad de FRETS-VWF73 y aproximadamente 10.000 unidades de actividad de FRETS-VWF73. En otras realizaciones, el kit puede proporcionar, por ejemplo, entre aproximadamente 20 unidades de actividad de FRETS-VWF73 (U_{FV73}) y aproximadamente 8,000 unidades de actividad de FRETS-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 rangos de los mismos. En

algunas realizaciones, un kit puede proporcionar aproximadamente 10 unidades de actividad FRETS-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 FRETS-VWF73.

[0322] En algunas realizaciones, el kit será para una única administración o dosis de ADAMTS13. En otras realizaciones, el kit puede contener múltiples dosis de ADAMTS13 para administración. En una realización, el kit puede comprender una formulación de ADAMTS13 preenvasada en una jeringa para ser administrada por un profesional de atención médica o para uso doméstico.

VIII. Ejemplos

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

[0323] Se realizó un cultivo celular quimiostático de la línea celular CHO recombinante CHO #640-2 que expresa la proteína ADAMTS13 humana en un medio BACD-A13 definido químicamente complementado con zinc y vitamina B3 adicional. El cultivo de 10

L se mantuvo durante 53 días y se monitoreó la producción de actividad y proteína rA13 con el transcurso del tiempo.

[0324] Se adaptaron células CHO recombinantes que expresan la proteína ADAMTS13 humana a un medio patentado definido químicamente (medio BCS). Se descongeló un DWCB y se preparó un inóculo celular en un medio BCS. Las células propagadas del clon #640-2 de expresión de rA13 se transfirieron a un biorreactor de 10 L con impulsores de tipo Rushton y se cultivaron en cultivos de lote repetido con medio patentado BACD-A13 bajo un pH controlado en línea de 7,15-7,20 a 37°C con una concentración de oxígeno disuelto a 20% de saturación del aire. Luego de que 2 cultivos de lote se cultivaron hasta obtener el volumen final de trabajo de 10 L, el biorreactor se cambió a un medio de alimentación continua en el día 5 y se operó por 48 días más en un medio quimiostático.

[0325] Se tomaron muestras del sobrenadante de los biorreactores en forma semanal y se analizaron para detectar la producción de proteína rA13 mediante el ensayo ELISA y la actividad de rA13 mediante el ensayo FRETS-VWF73. Los conteos celulares se determinaron mediante la tecnología Nucleocounter. Se midieron las tasas de dilución y se usaron para calcular las tasas de crecimiento y productividades volumétricas.

[0326] En condiciones de cultivo continuo usando un medio BACD-A13 definido químicamente y complementado con zinc y nicotinamida a una concentración final de 1,432 mg/L de $ZnSO_4 7H_2O$ y 7,02 mg/L de nicotinamida, se lograron niveles elevados de producción de la proteína rA13, entre 0,9 y 1,3 mg/L/D, y actividades específicas, entre aproximadamente 800 y 1100 mU/µg de rA13 (tabla 1). Notablemente, las productividades volumétricas y específicas de

las células aumentaron con el transcurso del tiempo en el cultivo a largo plazo, probablemente debido al aumento de las tasas de crecimiento y dilución con el tiempo. La actividad específica elevada de la proteína rA13 expresada podría al menos mantenerse a un nivel elevado constante durante al menos las 7 semanas enteras en que se realizó el cultivo en condiciones quimiostáticas. De hecho, la actividad de la proteína rA13 producida en el cultivo aumentó de aproximadamente 800 mU/µg de A13 en la semana 2 a aproximadamente 1100 mU/µg de A13 en la semana 7.

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

Cultivo quimiostático semana N°	Concentración celular	Tasa de crecimiento específica	Tasa de dilución	A13 FRETS	A13 ELISA	Actividad específica	Rendimiento FRETS	Rendimiento 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

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

[0327] Se expresó ADAMTS13 recombinante en células CHO recombinantes y se purificó mediante cromatografía de intercambio de aniones. La proteína rA13 purificada tenía una concentración final de aproximadamente 750 µg/ml con una actividad específica de aproximadamente 850 mU/µg. Se formuló rA13 en una solución amortiguadora 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 amortiguador seleccionado de (1) histidina, (2) solución amortiguadora de fosfato, o (3) citrato de sodio. Las muestras se dividieron en partes iguales y la mitad de las muestras se liofilizaron.

[0328] Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril hasta un volumen final igual al de la formulación preliofilizada. Una única alícuota de cada formulación líquida y liofilizada se caracterizó por filtración sobre gel cargando la muestra en una columna Superose 6 GL (GE Healthcare). Como se muestra en la figura 3, todas las formulaciones dieron como resultado muestras de ADAMTS13 que se manifestaron como un único pico correspondiente a la proteína rA13 monomérica por filtración sobre gel.

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

[0329] Se almacenaron a 4°C o 37°C por hasta 6 meses muestras de rA13 formuladas y divididas en alícuotas como en el ejemplo 2. Las formulaciones en solución se analizaron para detectar la concentración de la proteína rA13, según se determinó mediante ELISA, y la actividad de rA13 mediante ensayo de FRETS-VWF73 a la

semana 0, 1, 2, 3, 12 y 24 (Figura 1). Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril hasta un volumen final equivalente al de la formulación preliofilizada y se analizaron en forma similar a la semana 0, 2, 4, 8, 12 y 24 (Figura 2).

[0330] Las formulaciones líquidas de rA13 almacenadas a 4°C no mostraron pérdida de contenido de antígeno, es decir, concentración de proteína, o actividad de FRETS-VWF73 en los puntos de tiempo hasta los 6 meses. Tal como se muestra en la figura 1, esto se verificó para las tres formulaciones, amortiguadas con histidina, fosfato y citrato de sodio, respectivamente. Por el contrario, las formulaciones líquidas, amortiguadas con histidina o citrato de sodio, mostraron una pérdida casi completa de actividad luego de una semana a 37°C (Figura 1A; ◊ = histidina, □ = citrato de sodio). Esa pérdida de actividad estuvo acompañada con un pico en el contenido de antígeno a la semana uno para estas muestras, lo que sugiere que las proteínas rA13 se estaban desnaturalizando. La formulación líquida con histidina de rA13 mostró un contenido de antígeno reducido drásticamente a los 3 y 6 meses, lo que sugiere que la proteína se estaba degradando. Notablemente, la formulación líquida de rA13 con solución amortiguadora de fosfato mostró una actividad significativa a las tres semanas al almacenarse a 37°C (Figura 1A; ○ = solución amortiguadora de fosfato). Consecuentemente, el contenido de antígeno de esta formulación aumentó a una tasa más lenta, lo que sugiere que la desnaturalización de rA13 se retrasa cuando se formula con solución amortiguadora de fosfato.

[0331] Aparentemente, las formulaciones liofilizadas de rA13 fueron estables durante al menos 6 meses al almacenarse a 4°C o

37°C (Figura 2). Las formulaciones liofilizadas de rA13 con solución amortiguadora de fosfato mostraron una pérdida gradual de actividad (30% a los 6 meses) al almacenarse a 37°C, pero no a 4°C, sin embargo, esta pérdida de actividad no estuvo acompañada por un aumento en la disponibilidad de antígeno mediante ELISA (Figura 2; ○ = solución amortiguadora de fosfato). Ninguna otra formulación liofilizada mostró una pérdida de actividad o aumento en la disponibilidad de antígeno al almacenarse a 4°C o 37°C.

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

[0332] Se almacenaron a 4°C o 37°C por hasta 6 meses muestras de rA13 formuladas y divididas en alícuotas como en el ejemplo 2. Las conformaciones globales de rA13 formulada y almacenada en estado de solución y liofilizada se caracterizaron mediante filtración sobre gel en los puntos de tiempo descritos en el ejemplo 3. Se muestran los resultados de los experimentos de filtración sobre gel con la proteína rA13 formulada con histidina a la semana 0, 1, 2, 3 y 24 para las formulaciones líquidas (Figura 4) y a la semana 0, 2, 4, 8, 12 y 24 para las formulaciones liofilizadas (Figura 5).

[0333] Las formulaciones líquidas con histidina, almacenadas a 4°C por hasta 6 meses, se manifestaron principalmente como monómeras en filtración sobre gel (Figura 4A), lo que sugiere que la proteína es muy estable en solución a 4°C. Este resultado coincide con los descritos en el ejemplo 3, que mostraron que la rA13 formulada con histidina y almacenada en solución a 4°C por hasta 6 meses no perdía ninguna actividad de FRETS-VWF73. Por el contrario, la rA13 formulada con histidina y almacenada a 37°C, se manifestó como un orden más elevado/especie desnaturalizada

parcial o totalmente, tal como se indica por los volúmenes de elución y tiempos de retención reducidos (Figura 4B). De acuerdo con los resultados observados en el ejemplo 3, la A13 formulada con histidina almacenada a 37°C por 6 meses se mostró mayoritariamente degradada.

[0334] Se repitieron los experimentos de filtración sobre gel para cada formulación, almacenada a 4°C y 37°C, y se integraron las áreas relativas debajo de los picos de elución a fin de determinar las poblaciones relativas de rA13 (3) monómero, rA13 (2) dímero y rA13 (1) aglomerada/desnaturalizada en las formulaciones. En la tabla 2 se proporcionan los resultados de los experimentos de filtración sobre gel realizados en las tres formulaciones liofilizadas almacenadas a 4°C y 37°C durante seis meses. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con agua estéril hasta un volumen final igual al de la formulación preliofilizada antes del análisis mediante la filtración sobre gel.

Tabla 2. Área relativa debajo de la curva (AUC) para filtraciones sobre gel de formulaciones liofilizadas de ADAMTS13

reconstituidas.

Pico N°	Área pico relativa [%]		
	Inicio de liofilización	Liofilización 6 m 4 °C	Liofilización 6 m 37 °C
Liofilización His (1)			
1 (aglomerado)	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
Liofilización fosfato (2)			
1 (aglomerado)	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
Liofilización citrato (3)			
1 (aglomerado)	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

[0335] De acuerdo con los resultados observados en el ejemplo 3, las formulaciones liofilizadas de rA13 no mostraron un aumento en la cantidad de especies dímeras o aglomeradas/desnaturalizadas

tras almacenarse a 4°C durante al menos 6 meses. En forma similar, la rA13 formulada y liofilizada con histidina o citrato de sodio mostró sólo niveles menores de dimerización al almacenarse a 37°C durante al menos 6 meses. Asimismo, no hubo ninguna indicación de que estas formulaciones dieran como resultado niveles mayores de aglomeración y/o desnaturalización. En contraste, la rA13 formulada y liofilizada con solución amortiguadora de fosfato mostró niveles significativos de dimerización y aglomeración y/o desnaturalización, al almacenarse a 37°C durante al menos 6 meses.

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

[0336] Se almacenaron a 4°C o 37°C por hasta 6 meses muestras de rA13 formuladas y divididas en alícuotas como en el ejemplo 2. Como medida de la estabilidad conformacional de la proteína rA13 formulada tal como se describe anteriormente, se determinaron los radios de Stokes por dispersión de luz dinámica para las formulaciones en solución (A) y liofilizadas (B) de rA13 con histidina (Figura 6), solución amortiguadora de fosfato (Figura 7) y citrato de sodio (Figura 8), en cada uno de los puntos de tiempo indicados.

[0337] Asimismo, se determinaron las tasas de recuento derivado para cada formulación líquida, antes de almacenarse, mediante dispersión de luz dinámica. Tal como se observa en la figura 12, existe una discontinuidad en el cambio de los radios de Stokes, y por ende, estabilidad de rA13, sobre aproximadamente 35°C para las formulaciones con histidina y citrato de sodio, y sobre aproximadamente 40°C para la formulación con fosfato. Asimismo, si bien la formulación con fosfato tiene un radio de Stokes mayor

que las formulaciones con histidina o citrato de sodio a temperaturas inferiores a aproximadamente 37°C, la formulación con fosfato parece ser un poco más estable a temperaturas entre aproximadamente 40°C y 50°C.

[0338] Las muestras liofilizadas formuladas con histidina se almacenaron a 4°C o 37°C durante 3 meses, y luego se reconstituyeron en agua estéril. A fin de caracterizar si ocurrían o no cambios conformacionales locales o globales en la rA13 reconstituida, se realizó una espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier para las muestras almacenadas a 4°C y 37°C durante 3 meses, y se compararon con una muestra de A13 recientemente formulada y liofilizada. Tal como se observa en la figura 9, los espectros de absorbancia para las tres muestras se superponen casi perfectamente, lo que sugiere que no están ocurriendo transiciones conformacionales en la rA13 almacenada como una formulación liofilizada en histidina a 4°C o 37°C durante 3 meses.

[0339] También se caracterizaron formulaciones de rA13 almacenadas a 4°C o 37°C durante 6 meses mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (rp-HPLC). La rp-HPLC permite la separación de las moléculas de la proteína relacionadas estrechamente y por lo tanto, en muchas instancias, puede diferenciar entre versiones modificadas del mismo polipéptido, por ejemplo, modificado por la carga, parcialmente degradado o parcialmente desplegado. Tal como se observa en la figura 10, todas las formulaciones de rA13 parecen estables durante al menos 6 meses a 4°C, lo que concuerda con varios resultados observados anteriormente.

[0340] A continuación, se analizaron muestras de rA13 formuladas como en el ejemplo 2 mediante calorimetría diferencial de barrido para caracterizar aún más la estabilidad de la proteína rA13 en las diversas formulaciones. La naturaleza bimodal de la curva de capacidad térmica generada en la figura 11 sugiere que dos dominios de la proteína pueden desplegarse separados uno del otro y la primera transición de despliegue ocurre a una temperatura entre aproximadamente 54°C y 55°C. Las temperaturas de despliegue para rA13 son similares para las diversas formulaciones. Sin embargo, la entalpía superior de transición, tal como se indica por el área más grande debajo de la endotermia, para la formulación con fosfato, y en menor medida, la formulación con citrato, sugiere formulaciones ligeramente estabilizadas de A13.

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

[0341] A fin de determinar el efecto de agentes estabilizadores en el estado oligomérico de rA13 en solución, se preparó una formulación de rA13 en histidina 20 mM (pH 7,0), NaCl 150 mM y polisorbato 80 al 0,05% con diferentes combinaciones de sacarosa (0% a 2%), manitol (0% a 3%), y calcio (0 mM o 2 mM). Las diversas formulaciones se analizaron luego mediante filtración sobre gel en una columna Sepharose 6 GL (GE Healthcare). Tal como se observa en la figura 13, las diversas combinaciones de los agentes estabilizadores son capaces de reducir la cantidad de formación de dímeros de A13 en aproximadamente un 50%. En la tabla 14 se indican los porcentajes de aglomerados, dímeros/oligómeros y monómeros para cada formulación.

Tabla 14. Formulaciones usadas para determinar el efecto de diversos agentes amortiguadores de la formulación de ADAMTS13.

Lote	$CaCl_2$ [mM]	Sacarosa [g/l]	Manitol [g/l]	Aglomerado [%]	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
rADAMTS008-5	–	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**	45,70	53.41
rADAMTS008-12	2	–	20	**1,428**	39,93	59,18
rADAMTS008-13	–	20	–	**2,083**	48,13	50,56
rADAMTS008-14	2	20	–	**1,997**	41,43	57,43
rADAMTS008-15	–	20	20	**1,904**	46,77	52,06
rADAMTS008-16	2	20	20	**1,866**	41,66	57,20
rADAMTS008-17	–	20	30	**1,956**	45,97	52,81
rADAMTS008-18	2	20	30	**2,126**	41,68	57,07

G. *Ejemplo 7:* Efecto del pH en la estabilidad de una formulación de ADAMTS13

[0342] A fin de determinar el efecto del pH en la estabilidad de rA13 en solución, se dializó rA13 en una solución amortiguadora que contenía histidina 20 mM y NaCl 150 mM, ajustada a un rango de pH entre 5,5 y 9,5, y almacenada a 4°C o 40°C durante 24 horas. La estabilidad se midió por la concentración de antígeno

de rA13, según se determinó por ELISA, y la actividad de rA13 mediante el ensayo de FRETS-VWF72, a las 24 horas. Tal como se observa en la tabla 3 y la figura 14, rADAMTS13 es relativamente estable por 24 horas a 4°C cuando se formula en una solución con un pH entre 5,5 y 9,5.

Tabla 3. Estabilidad de ADAMTS13 en formulación líquida al almacenarse 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 al almacenarse 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	4790	2%	1455	80%
pH 9,5	<2500		1437	79%

H. *Ejemplo 8:* Efecto de niveles bajos de $CaCl_2$ en la estabilidad de una formulación de ADAMTS13

[0343] A fin de determinar el efecto de niveles bajos de $CaCl_2$ en la estabilidad de rA13 en solución, se formuló rA13 en una solución amortiguadora 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 o 37°C durante tres semanas. La estabilidad de la formulación se evaluó al determinar la actividad relativa de FRETS-VWF73 a la semana 0, 1, 2 y 3. Tal como se puede observar en la figura 15, la adición de $CaCl_2$ 2 mM estabilizó las formulaciones líquidas de rADAMTS13 almacenadas a 25°C y 37°C, a diversos grados. Particularmente, la adición de bajos niveles de $CaCl_2$ a 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 del 80% de la actividad observada en formulaciones sin $CaCl_2$.

I. *Ejemplo 9:* Actividad de FRETS-VWF73 de especies oligoméricas de ADAMTS13 recombinante

[0344] A fin de determinar la actividad enzimática de las diferentes especies oligoméricas de la proteína ADAMTS13 aislada durante la purificación, se cargó rA13 en una columna de filtración sobre gel Superose 6 GL equilibrada con una solución amortiguadora que contenía Na_2HPO_4 20 mM (pH 7,5) y NaCl 500 mM. Las especies moleculares de ADAMTS13 se separaron por tamaño y forma. Se agruparon las fracciones eluidas de la columna de acuerdo con su aparente estado oligomérico, por ejemplo, A13 aglomerada (grupo 1), A13 dimérica (grupo 2) y A13 monomérica

(grupo 3) (Figura 16A). Se obtuvo confirmación adicional del estado oligomérico de ADAMTS13 al determinar el radio de Stokes promedio de la proteína en cada grupo mediante dispersión de luz dinámica (Figura 16B).

[0345] Luego se determinó la actividad enzimática de cada grupo mediante el ensayo de FRETS-VWF73. Tal como se observa en la figura 16, la actividad volumétrica de la especie A13 aglomerada fue aproximadamente 218 mU/ml, la actividad de A13 dimérica fue aproximadamente 1,435 U/ml y la actividad de A13 monomérica fue aproximadamente 97,905 U/ml. Luego de estandarizar las actividades para el volumen de los grupos, se detectó más del 99% de la actividad total en el grupo de elución correspondiente a la proteína monomérica. Cuando las actividades se estandarizan para la cantidad total de proteína, se puede observar que el grupo de proteína monomérica tiene una actividad específica más elevada que el grupo de proteína dimérica y el grupo de proteína aglomerada.

J. *Ejemplo 10:* Efecto de la concentración de NaCl en la liofilización de formulaciones de ADAMTS13

[0346] A fin de determinar el efecto de la concentración de NaCl en la producción de tortas liofilizadas, se formuló ADAMTS13 recombinante en una solución amortiguadora que contenía sacarosa al 2%, polisorbato 80 al 0,05% e histidina 20 mM (pH 7,0) con diferentes cantidades de NaCl (0 a 150 mM). Las formulaciones de ADAMTS13 se liofilizaron bajo condiciones estándar y se inspeccionaron visualmente para detectar la calidad de las tortas liofilizadas resultantes (Figura 17). Las tortas liofilizadas producidas a partir de formulaciones de ADAMTS13 que contenían concentraciones de sal inferiores (0 a 60 mM; figuras 17A-C)

tenían estructuras compactas con superficies suaves, mientras que las tortas liofilizadas producidas a partir de formulaciones con alto contenido de sal (NaCl 120 mM y 150 mM; figuras 17 E y F) eran porosas y no compactas, con una apariencia similar a una cadena o agrietada. Las formulaciones de ADAMTS13 que contenían niveles intermedios de NaCl (90 mM, figura 17D) eran parcialmente compactas con una superficie semiporosa o similar a un cráter.

[0347] Una torta liofilizada porosa y no compacta indica fundición durante el proceso de liofilización. Generalmente, se usan concentraciones de sal elevadas para disminuir la temperatura de colapso (o temperatura de transición vítrea) que puede provocar la fundición parcial del material congelado durante el proceso primario de secado. Esto puede tener un impacto negativo en los niveles de aglomeración de la proteína y/o la recuperación de la actividad enzimática. Por lo tanto, una buena apariencia de la torta liofilizada generalmente está relacionada con una mejor recuperación de la actividad y una menor aglomeración de la proteína formulada correspondiente. En forma ventajosa, la presente invención proporciona formulaciones de ADAMTS13 que permiten la producción de tortas liofilizadas de alta calidad. En algunas realizaciones, las formulaciones de la invención proporcionadas en la presente permiten elaborar formulaciones de ADAMTS13 con bajo contenido de sal, que son particularmente estables durante la liofilización, dando como resultado la formación de tortas liofilizadas de alta calidad.

[0348] Algo que preocupa con el uso de formulaciones de proteína con bajo contenido de sal es que puede ocurrir una mayor aglomeración de la proteína. Para determinar si esto ocurre en las formulaciones de ADAMTS13 con bajo contenido de sal, las

tortas liofilizadas preparadas anteriormente se reconstituyeron en agua desionizada y se analizaron los estados de aglomeración de las proteínas ADAMTS13 reconstituidas mediante cromatografía de exclusión por tamaño. Tal como se observa en la figura 18, la concentración de sal de las formulaciones liofilizadas no causaban efectos en el estado de aglomeración de la proteína ADAMTS13 reconstituida (comparar NaCl 0 mM con NaCl 150 mM).

[0349] Para validar adicionalmente el uso de formulaciones de ADAMTS13 con bajo contenido de sal, se determinó la actividad de FRETS-VWF73 de diversas formulaciones con una concentración de NaCl en el rango de 0 a 150 mM. Tal como se observa 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 con bajo contenido de sal (es decir, NaCl 0 a 100 mM) de proteínas ADAMTS13 recombinantes líquidas y liofilizadas son apropiadas para uso farmacéutico.

K. *Ejemplo 11:* Formulación liofilizada de ADAMTS13 en soluciones amortiguadoras con bajo y alto contenido de sal

[0350] Para comparar formulaciones liofilizadas de ADAMTS13 recombinante, se prepararon formulaciones con alto contenido de sal (NaCl 150 mM) y con bajo contenido de sal (NaCl 30 mM). Ambas formulaciones (con bajo y alto contenido 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 alto contenido de sal contenía además sacarosa al 2% y NaCl 150 mM, mientras que la formulación con bajo contenido de sal contenía además sacarosa al 1%, manitol al 3% y NaCl 30 mM. Las dos formulaciones de liofilizaron bajo

condiciones estándar. La torta liofilizada resultante producida a partir de la formulación de ADAMTS13 con alto contenido de sal era no compacta, no uniforme, agrumada y porosa (Figura 20A), mientras que la torta liofilizada producida a partir de la formulación de ADAMTS13 con bajo contenido de sal era compacta, bastante uniforme y tenía una superficie suave (Figura 20B). Estos resultados sugieren que las formulaciones con bajo contenido de sal de ADAMTS13 liofilizada son apropiadas para el uso farmacéutico.

L. *Ejemplo 12:* Purificación de rADAMTS13 para formulaciones liofilizadas

[0351] Se expresó ADAMTS13 recombinante en células CHO recombinantes y se purificó a partir del medio acondicionado resultante mediante cromatografía de intercambio de cationes POROS HS. Luego se analizaron las fracciones recogidas de rADAMTS13 eluidas de la columna HS mediante cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna 6 GL: TC10/30 para detectar la dimerización y aglomeración antes y después de la filtración sobre gel, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (figuras 21A y B, respectivamente) y dispersión de luz dinámica (figuras 22A y B, respectivamente). Tal como se observa en la figura 21A, casi 20% de la rADAMTS13 total en las fracciones eluidas de HS, antes de la filtración sobre gel, se encontraban en estados diméricos, monoméricos o aglomerados no deseados. En contraste, casi todas las rADAMTS13 agrupadas en la etapa de filtración sobre gel son monoméricas (Figura 21B). En forma similar, el radio hidrodinámico promedio de la rADAMTS13 eluida de HS (aproximadamente 20,5 nM; figura 22A) fue casi el

doble que el de la rADAMTS 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

[0352] A fin de comparar la liofilización de formulaciones de rADAMTS13 que tienen concentraciones variables de bajo contenido de sal (NaCl 30 mM y 60 mM), calcio ($CaCl_2$ 2 mM y 4 mM) y azúcar (sacarosa al 1% y trehalosa al 1%), se purificó rADAMTS13 mediante cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión por tamaño, tal como se describe anteriormente, y se formuló 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 ADAMTS13 (190 µg/mL de antígeno). Las formulaciones de rA13 1 a 8 (tablas 5 y 6) se liofilizaron usando el protocolo de liofilización estándar (3 días; figura 23A) o extendido (11 días; figura 23B). Tras la liofilización, las tortas liofilizadas se inspeccionaron visualmente para detectar las calidades deseadas (Figura 24).

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

Formulación de rA13 (A LYO)	**NaCl (mM)**	**Histidina (mM)**	**$CaCl_2$ (mM)**	**Manitol (%)**	**Sacarosa (%)**	**Trehalosa (%)**	**Tween 80 (%)**	**Evaluación visual**
1	30 mM	20 mM	2 mM	3%	1%	-	0,050%	Torta liofilizada linda y compacta; superficie suave despegada de la pared
2	30 mM	20 mM	2 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 1
3	30 mM	20 mM	4 mM	3%	1%	-	0,050%	Igual a la variante 1
4	30 mM	20 mM	4 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 1
5	60 mM	20 mM	2 mM	3%	1%	-	0,050%	Torta liofilizada linda y compacta; superficie suave, periferia porosa, se despega fácilmente

								de la pared
6	60 mM	20 mM	2 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 5; la superficie se despega fácilmente de la torta liofilizada
7	60 mM	20 mM	4 mM	3%	1%	-	0,050%	Igual a la variante 5; superficie pulverulento o floculante
8	60 mM	20 mM	4 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 5; la superficie se despega de la torta liofilizada; superficie pulverulenta

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

Formulación de rA13 (B LYO)	**NaCl (mM)**	**Histidina (mM)**	**$CaCl_2$ (mM)**	**Manitol (%)**	**Sacarosa (%)**	**Trehalosa (%)**	**Tween 80 (%)**	**Evaluación visual**
1	30 mM	20 mM	2 mM	3%	1%	-	0,050%	Torta liofilizada linda y compacta; superficie suave quebrada desde la periferia
2	30 mM	20 mM	2 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 1
3	30 mM	20 mM	4 mM	3%	1%	-	0,050%	Igual a la variante 1
4	30 mM	20 mM	4 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 1
5	60 mM	20 mM	2 mM	3%	1%	-	0,050%	Igual a la variante 1
6	60 mM	20 mM	2 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 1

7	60 mM	20 mM	4 mM	3%	1%	-	0,050%	Torta liofilizada linda y compacta; superficie porosa quebrada desde la pared; periferia floculante
8	60 mM	20 mM	4 mM	3%	-	1%	0,050%	Igual a la variante 1; superficie quebrada

[0353] Para determinar el estado multimérico de ADAMTS13 en cada una de las formulaciones, la proteína liofilizada se reconstituyó en agua desionizada y se analizó por dispersión de luz dinámica. Tal como se observa en la figura 25, las formulaciones liofilizadas preparadas usando protocolos de liofilización estándar y extendidos produjeron moléculas de ADAMTS13 principalmente monoméricas (pico a aproximadamente 12-13 nm) luego de la reconstitución. Si bien el pico de ADAMTS13 correspondiente a la proteína aglomerada (entre 100 y 110 nm) parece tener la mitad de elevación del pico monómero, un experto en la técnica reconocerá que el eje “y” mide la intensidad, en lugar de la masa total, y como tal el gráfico exagera significativamente el porcentaje de la especie ADAMTS13 que se aglomera. También se observa que las formulaciones preparadas con

protocolos extendidos de liofilización (líneas punteadas) contienen menos ADAMTS13 aglomerada que las formulaciones preparadas con protocolos estándar de liofilización (líneas continuas), tras la reconstitución en agua desionizada.

[0354] A fin de evaluar la estabilidad de la rADAMTS13 liofilizada en cada una de las formulaciones presentadas anteriormente, se usaron las tortas liofilizadas producidas mediante los protocolos estándar y extendidos para preparar una serie de viales para almacenar en diversas temperaturas por hasta 36 meses. Tal como se detalla en la tabla 7, se prepararon viales que contenían 5 mg o 10 mg de rADAMTS13 liofilizada para almacenarse a +2 - +8 °C (es decir, bajo condiciones de refrigeración estándar), 30 °C (temperatura ambiente) y 40 °C. Todos los viales se sometieron a ensayos de FTIR, SE-HPLC y DLS. También se detectó la actividad de FRETS y el antígeno ADAMTS13 en todas las muestras. Las formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas luego se pueden analizar para detectar la actividad de FRETS-VWF73 y la estabilidad del antígeno, tal como se describe anteriormente, en los puntos de tiempo indicados para determinar la estabilidad de la proteína en las diversas formulaciones liofilizadas. Las tablas 8 y 9 muestran los resultados de los ensayos de actividad de FRETS-VWF73 de las formulaciones de ADAMTS13 reconstituidas generadas por los protocolos estándar y extendidos de liofilización, respectivamente. En forma similar, la recuperación de antígeno se proporciona en las tablas 10 y 11, para las muestras generadas con los protocolos estándar y extendido de liofilización, respectivamente.

Tabla 7. Configuración experimental para analizar la estabilidad de formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas. La configuración corresponde a liofilizaciones tipo A y B.

		Vial												
Solución amortiguadora		**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
	TA			5	10	5	5	5	5					
	40 °C		5	5	10	5	5							
-4B	-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							
-5B	-80 °C	30												
	+2-+8	20			10	5	5	5	5	5	5	5	5	5

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

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

		[U/ml]			[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]
		0M				1M		2M		3M		4M		6M		9M	
			WH	MW		WH											
-1 A	4°C	126	88	107	100%	-	-	-	-	107.90	86%	106.00	84%	108.40	86%	104.90	83%
	30°C					-	-	105	83%	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%	-	-	-	-	99.4	98%	99.7	98%	98.2	97%	101.2	100%
	30°C					-	-	98	97%	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%	-	-	-	-	101.9	87%	99.1	84%	104.4	89%	105.8	90%
	30°C					-	-	105	90%	97.9	83%	94.1	80%	93.5	80%	98.5	84%
	40°C					114	96%	101	86%	91.7	78%	87.2	74%	87	74%	-	-
-4 A	4°C	113	100	106	100%	-	-	-	-	97.7	87%	99.9	89%	103	91%	101.8	90%
	30°C					-	-	107	95%	97.9	87%	91.9	82%	90	80%	96.5	86%
	40°C					100	94%	122	108%	95.3	85%	89.3	79%	91.2	81%	-	-
-5 A	4°C	109	97	103	100%	-	-	-	-	94.1	86%	100.2	92%	107.7	99%	104.5	96%
	30°C					-	-	125	115%	93.9	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%	-	-	-	-	97.2	104%	94.7	101%	104.5	112%	102.7	110%
	30°C					-	-	103	111%	94.4	101%	91.5	98%	91.6	98%	97.3	104%
	40°C					85	97%	90	96%	89.8	96%	84.7	91%	82	88%	-	-
-7 A	4°C	111	102	106	100%	-	-	-	-	98.9	89%	100.2	90%	103	93%	100.1	90%
	30°C					-	-	105	94%	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%	-	-	-	-	104	103%	100.3	99%	101.6	101%	101.5	101%
	30°C					-	-	126	125%	89.6	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 de FRETS-VWF73 en formulaciones de ADAMTS13 liofilizadas preparadas mediante protocolos extendidos de liofilización.

		[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]
		0M		1M		2M		3M		4M		6M		9M	
-1 B	4°C	112	100%	-	-	-	-	101.70	91%	102.40	92%	105.60	95%	100.70	90%
	30°C			-	-	97	87%	93.30	84%	95.60	86%	102.30	92%	93.00	83%
	40°C			108	97%	97	87%	101.40	91%	96.80	87%	86.10	77%	-	-
-2 B	4°C	104	100%	-	-	-	-	93.9	91%	99.1	96%	107.3	104%	98.8	95%
	30°C			-	-	86	83%	93.4	90%	99.2	96%	101.1	98%	93.9	91%
	40°C			106	102%	87	84%	104.2	101%	94.2	91%	92.5	89%	-	-
-3 B	4°C	111	100%	-	-	-	-	91.7	83%	101.2	92%	105.1	95%	103.8	94%
	30°C			-	-	94	85%	94.2	85%	95	86%	102.2	92%	91.7	83%
	40°C			98	88%	108	98%	102.6	93%	92.7	84%	94.6	86%	-	-
-4 B	4°C	135	100%	-	-	-	-	91.8	68%	97.6	72%	102.9	76%	100.5	74%
	30°C			-	-	104	77%	97.8	72%	97.8	72%	102.8	76%	95.2	70%
	40°C			87	64%	100	74%	98.6	73%	92.6	68%	83.8	62%	-	-
-5 B	4°C	111	100%	-	-	-	-	86.2	78%	97.8	88%	107	97%	95.5	86%
	30°C			-	-	97	87%	92.6	84%	93.1	84%	101	91%	89.1	80%
	40°C			85	77%	82	74%	98.2	89%	82.6	75%	78	70%	-	-
-6 B	4°C	116	100%	-	-	-	-	88.8	77%	99.2	86%	105.2	91%	101.5	88%
	30°C			-	-	90	78%	97.5	84%	100.2	87%	102.9	89%	91.4	79%
	40°C			95	83%	93	80%	100.8	87%	85.8	74%	81.4	70%	-	-
-7 B	4°C	136	100%	-	-	-	-	85.8	63%	96.6	71%	102.6	76%	98	72%
	30°C			-	-	97	71%	94.1	69%	95.7	71%	97.9	72%	88.8	66%
	40°C			90	66%	93	69%	98.8	73%	84.4	62%	79.8	59%	-	-
-8 B	4°C	119	100%	-	-	-	-	88.3	74%	93.1	78%	100.1	84%	98.8	83%
	30°C			-	-	108	91%	95.7	80%	95.4	80%	101	85%	93.7	79%
	40°C			106	89%	88	74%	102.5	86%	89.4	75%	80.5	67%	-	-

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

		[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]
		0M		1M		2M		3M		4M		6M		9M	
-1 A	4°C			-	-	-	-	147	103%	148	103%	122	85%	129	90%
	30°C	144	100%	-	-	131	91%	139	97%	132	92%	136	95%	136	95%
	40°C			151	105%	140	97%	137	95%	125	87%	107	75%	-	-
-2 A	4°C			-	-	-	-	145	93%	137	88%	125	81%	137	88%
	30°C	155	100%	-	-	142	91%	137	88%	133	86%	154	99%	133	86%
	40°C			157	101%	141	91%	137	88%	123	79%	97	63%	-	-
-3 A	4°C			-	-	-	-	149	104%	146	102%	121	85%	136	95%
	30°C	143	100%	-	-	141	99%	132	92%	134	94%	132	93%	136	95%
	40°C			164	115%	134	94%	130	91%	139	97%	109	76%	-	-
-4 A	4°C			-	-	-	-	152	98%	142	91%	130	84%	126	81%
	30°C	155	100%	-	-	142	92%	133	85%	125	80%	129	83%	143	92%
	40°C			157	101%	136	88%	131	84%	127	82%	113	73%	-	-
-5 A	4°C			-	-	-	-	140	102%	154	113%	118	86%	125	91%
	30°C	137	100%	-	-	143	105%	121	88%	126	92%	141	103%	132	97%
	40°C			148	108%	139	102%	122	89%	157	115%	112	82%	-	-
-6 A	4°C			-	-	-	-	150	109%	134	97%	124	90%	122	88%
	30°C	138	100%	-	-	145	105%	137	99%	125	90%	143	103%	139	101%
	40°C			147	107%	142	103%	127	92%	119	86%	124	90%	-	-
-7 A	4°C			-	-	-	-	148	102%	153	105%	137	95%	126	87%
	30°C	145	100%	-	-	137	95%	130	90%	125	86%	148	102%	140	97%
	40°C			150	104%	142	98%	128	89%	137	95%	119	82%	-	-
-8 A	4°C			-	-	-	-	135	92%	146	100%	138	94%	136	93%
	30°C	146	100%	-	-	131	89%	137	94%	122	84%	170	117%	139	95%
	40°C			152	104%	142	97%	123	84%	129	88%	122	83%	-	-

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

		[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[µg/ml]	[%]	[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%	147	123%	137	115%	134	112%	-	-
-3 B	4°C			-	-	-	-	132	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%	-	-

[0355] 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 influyeron significativamente en las estructuras secundarias. Además, el programa de liofilización no cambió los elementos estructurales, excepto por la disminución aparente de la hélice alfa a 40°C para el programa estándar A, lo cual no se observó en el programa de liofilización B más extendido.

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

rADAMTS022-1A	Predicción hélice α [%]			Predicción hoja 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	14,6	12,2	7,4	37,9	39,1	36,1

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

rADAMTS022-1B	Predicción hélice α [%]			Predicción hoja 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

[0356] Se analizó el estado oligomérico de ADAMTS13 en las formulaciones liofilizadas 1A y 1B mediante dispersión de luz dinámica en el transcurso de 6 meses de almacenamiento a 4°C, 30°C y 40°C. Tal como se observa en las figures 37 y 38, se observaron niveles más altos de aglomeración en las muestras preparadas con el programa extendido de liofilización. Sin embargo, los niveles de aglomeración no aumentaron significativamente en el tiempo de almacenamiento.

[0357] En forma similar, la HPLC de exclusión por tamaño no mostró cambios significativos entre los diferentes programas de liofilización para las formulaciones de rADAMTS022 luego de 6 meses (no se muestran datos). Los análisis muestran que no se indujeron aglomerados tras almacenarse a 4°C, 30°C y 40°C en el transcurso de 3 meses.

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

[0358] Se generó ADAMTS-13 recombinante mediante un clon celular de ovario de hámster chino (CHO) en un proceso de fermentación en un cultivo de suspensión. El medio de cultivo, desarrollado por Baxter, está libre de proteínas recombinantes y sustancias derivadas de humanos o animales. Los ejemplos de estos tipos de medios de cultivo útiles para la expresión de ADAMTS13 se pueden encontrar, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos número de serie 12/847.999. El proceso de fabricación utiliza un método de cultivo celular continuo (quimiostático). El proceso de purificación comienza con una etapa inicial de eliminación celular mediante filtración. El producto libre de células de hasta 4 días seguidos se combina para producir un lote corriente abajo. Las cosechas agrupadas y filtradas se concentran mediante una ultra/diafiltración y luego se someten a una etapa de inactivación de virus con solvente y detergente. La purificación adicional incluye una etapa de captura cromatográfica (intercambio de aniones), una etapa de nanofiltración (segunda etapa de reducción viral), una etapa de cromatografía negativa (hidroxiapatita) seguida de una cromatografía de modo combinado (Capto MMC) y una etapa final de preformulación y concentración cromatográfica (intercambio de

cationes). La sustancia farmacológica preformulada en masa (BDS) se congela a -60°C en un congelador con temperatura controlada.

O. *Ejemplo 15:* Ensayo de FRETS-VWF73 para la actividad de ADAMTS13

[0359] La actividad proteolítica de ADAMTS13 se midió contra un sustrato de extinción de la fluorescencia (FRETS-VWF73, Peptides Institute, Inc; Osaka, Japón) de acuerdo con la descripción del ensayo del fabricante. Brevemente, se diluyeron muestras de rADAMTS13 (en un volumen total de 100 µL) en una solución amortiguadora que contenía Bis-Tris 5 mM, $CaCl_2$ 25 mM y Tween 20 al 0,005% y se transfirió a una placa negra de microtitulación. Las muestras se midieron contra la curva de referencia de muestras de plasma humano diluido (plasma de 80 a 5 mU/mL). La reacción se inició añadiendo el sustrato (100 µL, FRETS-VWF73; concentración final 2 µM) y se midió la fluorescencia cada dos minutos durante 45 minutos en un espectrofotómetro de fluorescencia con lex = 360 nm y lem = 460 a 30°C (FLx800, Bio Tek). Los resultados de la actividad se leyeron en una curva de referencia de plasma humano. Los datos se expresan como Unidad/mL. El plasma humano normal se consideró como 1 Unidad/mL.

P. *Ejemplo 16:* ELISA de antígeno ADAMTS13

[0360] Se analizaron muestras que contenían ADAMTS13 en un ensayo ELISA usando IgG de conejo policlonal dirigido contra ADAMTS13 humana, como captura y en su forma marcada como anticuerpo de detección. El antígeno ADAMTS13 presente en la muestra se captura mediante un anticuerpo específico de ADAMTS13 recubierto en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Las muestras se diluyeron en una solución amortiguadora (Tris 250 mM, NaCl 350 mM, BSA al 0,5%, Tween 20 al 0,1%) y se transfirieron a los

pocillos de microtitulación recubiertos. El antígeno unido a ADAMTS13 se detecta con IgG anti-ADAMTS13 de conejo conjugado HRP usando TMB como sustrato (Thermo Art: # 34021). La absorbancia se midió en un espectrofotómetro (TECAN SpectraFluorPlus, Tecan Sales Austria, Gröding, Austria) a l = 450 nm. Las concentraciones de antígeno ADAMTS13 (expresadas en µg/mL) se calcularon a partir de un estándar de referencia usando diluciones en el rango de 250 a 7,81 ng/mL de ADAMTS13 recombinante que se purificó a partir de cosechas de cultivo celular HEK293 transfectado de forma estable.

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

[0361] Se realizó SE-HPLC usando un purificador ÄKTA serie 900 (GE Healthcare). El sistema estaba equipado con una columna Superose 12 GL (GE Healthcare, TC10/30) que operó a una tasa de flujo constante de 0,3 mL por minuto a temperatura ambiente. Como solución amortiguadora, se usó Tris 20 mM, acetato de sodio 100 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 7,4. La muestra se centrifugó (centrífuga 5415C, Eppendorf, Viena, Austria) durante 5 minutos a 10.000 rpm y se aplicaron 100 µL automáticamente mediante un muestreador automático. La absorbancia del efluente de columna se midió continuamente a 280 nm.

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

[0362] Se realizó un análisis de dispersión de luz dinámica (DLS) usando un dispositivo Malvern Nano Zetasizer ZS (Malvern Instruments Ltd Enigma Business Park, Grovewood Road, Malvern, Worcestershire, Reino Unido, WR14 1XZ) y un dispositivo Haake

Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipado con un cono de 60 mm de diámetro y ángulo de 0,5° para la medición de viscosidad de la solución amortiguadora.

[0363] 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. Se colocaron 60 µL de la muestra en una micro cubeta descartable ZEN0040 y la viscosidad de la solución amortiguadora se determinó mediante Rheostress 1. Este parámetro se usó para analizar el tamaño efectivo de las proteínas mediante DLS. La temperatura de operación era 25°C con un tiempo de equilibrio de 2 minutos. El ángulo de proteínas se fijó a 173° para retrodispersión para medir el tamaño y se realizaron 3 vueltas por muestra para promediar los resultados.

[0364] Las muestras se midieron aumentando el modo de temperatura para monitorear la influencia de la temperatura en una proteína. El procedimiento de medición fue similar a una medición de tamaño normal, excepto por las diferentes temperaturas con un valor en aumento de 1°C por minuto de 15°C a 80°C y un tiempo de equilibrio de 2 minutos. Se usó una cubeta de vidrio de bajo volumen DTS2145 para estos incrementos de temperatura.

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

[0365] Se llevó a cabo una espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier usando un espectroscopio FTIR TENSOR 27 (Bruker Optik GmbH, 76275 Ettlingen, Alemania) equipado con una célula BioATR II operando en un modo de reflexión total atenuado.

La configuración del instrumento se puede usar para analizar la conformación de formulaciones de proteínas.

[0366] Con una temperatura de operación de 20°C, se colocaron 20 µL de agua en la célula y se midieron para detectar el espectro de fondo. A continuación, se colocaron 20 µL de solución amortiguadora en la célula y se midió contra el espectro de fondo, para sustraer el agua de la solución amortiguadora. Este procedimiento se repitió con la solución amortiguadora como espectro de fondo para medir la muestra (rango de medición de frecuencia: 4000 - 650 cm^{-1}). Se generó un interferograma y se tradujo a un espectro de transmisión. Se corrigieron los espectros diferentes para obtener la misma compensación y se normalizaron en la misma concentración de proteína. Asimismo, el software de evaluación (OPUS 6.0 / Bruker), que contenía una base de datos de ~40 proteínas con estructura secundaria conocida, calculó la estructura secundaria (% hélice α, % hoja β) de la proteína.

T. *Ejemplo 20:* Análisis de la estabilidad de ADAMTS13 mediante fotoirradiación

[0367] El análisis de fotoestabilidad se llevó a cabo usando una cámara de fotoestabilidad Atlas Suntest CPS+ (Chicago, Illinois, USA), de acuerdo con SOP VN-09-45058TB. El dispositivo CPS+ monitorea y controla la irradiancia, la temperatura estándar negra y la temperatura del aire de la cámara.

La fotoestabilidad se analizó en la misma formulación que se usó para los experimentos de corte y congelación-descongelación (tabla 12). Las muestras y los testigos se analizaron mediante DLS y SE-HPLC. Los resultados se muestran en las figuras 31 y 32. Ambas formulaciones (líquida y liofilizada) mostraron los mismos

resultados mediante SE-HPLC. El pico monómero de ADAMTS13 disminuyó y el pico 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 (según lo recomendado por ICH Q1B) no mostró ninguna diferencia con el testigo protegido de la luz. La actividad de FRETS monitoreada durante la fotoirradiación disminuyó rápidamente en formulaciones líquidas, pero en menor medida en formulaciones liofilizadas, tal como se muestra en la figura 33. Incluso después de cuatro dosis de fotoirradiación, según recomiendan las pautas de ICH Q1B, que corresponde a 4.8M horas lux, se mantuvo más del 50% de la actividad de FRETS.

[0368] Los viales testigos 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 análisis. Todas las muestras se colocaron en posición horizontal. Un tiempo de irradiación de 10 horas correspondió a 1,2 a 1,8 millones de horas lux y 765W/m² luz UV. Las muestras se retiraron de la cámara de fotoestabilidad luego de 10 horas y se midió el espectro (190-800 nm) y el valor pH.

U. *Ejemplo 21:* Análisis de la estabilidad de ADAMTS13 mediante tensión mecánica

[0369] Se aplicó fuerza cortante con un dispositivo 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 en 25,0°C.

[0370] Brevemente, se formuló ADAMTS13 recombinante humana, preparada tal como se describe anteriormente, del mismo modo que

en la tabla 12. Se aplicaron 500 µL de la muestra de ADAMTS13 por vuelta y se tensionó a 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 500 y 600 rpm durante 15 minutos. Luego la muestra se transfirió a un vial Eppendorf. Las mediciones de DLS se aplicaron para monitorear si la fuerza cortante inducía aglomeración o despliegue parcial. Tal como se muestra en la figura 28, se formaron aglomerados a una fuerza cortante de 200 rpm.

Tabla 12. Formulación usada para el análisis de la estabilidad de ADAMTS13 mediante tensión mecánica.

Sustancias amortiguadoras	**BAX930 FL**
NaCl [mM]	150
Histidina [mM]	20
Sacarosa [%]	2
Polisorbato 80 [%]	0,05
pH	7,0

V. *Ejemplo 22:* Efectos de diversos agentes amortiguadores en formulaciones de ADAMTS13

[0371] Para determinar el efecto que provocaban diversas soluciones amortiguadoras en la estabilidad y conformación de formulaciones de ADAMTS13, se dializó ADAMTS13 recombinante humana, expresada y purificada tal como se describe anteriormente, contra diferentes soluciones amortiguadoras (tabla 13) y se analizó mediante dispersión de luz dinámica (DLS) para identificar las preferencias de soluciones amortiguadoras básicas de ADAMTS13. Tal como se puede observar en la figura 27, se hallaron los diámetros hidrodinámicos más pequeños de ADAMTS13 cuando la proteína se formulaba con soluciones amortiguadoras con histidina o HEPES.

Tabla 13. Formulaciones usadas para determinar el efecto de diversos agentes amortiguadores de la formulación de ADAMTS13.

Agentes amortiguadores	**-1**	**-2**	**-3**	**-4**	**-5**
NaCl [mM]	150	150	150	150	150
Histidina [mM]	20	-	-	-	-
HEPES [mM]	-	20	-	-	-
Fosfato de sodio [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 la estabilidad de ADAMTS13 mediante congelación-descongelación

[0372] La misma formulación (tabla 12) usada para los experimentos de fuerza cortante se usó nuevamente para investigar el comportamiento de la proteína durante la tensión 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 de FRETS. Todas las muestras son estables dentro del rango de variación del ensayo (25% de desviación estándar relativa). No se detectó ninguna pérdida de actividad de FRETS incluso después de 5 ciclos de congelación-descongelación. La estabilidad de BAX930 en esta formulación líquida se confirma por los resultados de las mediciones de DLS y SE-HPLC. No se observó ningún aumento en la intensidad de los picos de aglomeración (entre 100 y 1000 nm)

mediante DLS en forma independiente de las condiciones de congelación-descongelación (Figura 30). En forma similar, la SE-HPLC no mostró ningún aumento en el nivel de aglomeración luego de varios ciclos de congelación-descongelación a -80°C/+37°C pero un cierto aumento a -20°C/TA (no se muestran datos).

X. *Ejemplo 24:* Efecto del calcio y zinc en la actividad FRETS de ADAMTS13

[0373] Se trató ADAMTS13 recombinante humana, preparada tal como se describe anteriormente, con EDTA 10 mM y luego se dializó contra una solución amortiguadora que contenía histidina 20 mM y NaCl 190 mM (pH 7,5). Tras la diálisis, se agregó $CaCl_2$ y $ZnCl_2$ nuevamente a las formulaciones a diferentes concentraciones. Se analizó la actividad de las formulaciones de ADAMTS13 que contenían diferentes concentraciones de calcio y zinc para detectar la actividad de FRET como se describe anteriormente. Tal como se puede observar en la figura 34, mayores niveles de calcio aumentaron la recuperación de la actividad de FRETS. Se alcanzó casi la máxima actividad con la inclusión de $CaCl_2$ 4 mM, en presencia y en ausencia de zinc. A concentraciones intermedias de calcio (2 mM y 4 mM), la adición de zinc proporcionó un aumento modesto en la actividad de FRETS.

Y. *Ejemplo 25:* Influencia de la concentración de sal y azúcar en la aglomeración de formulaciones liofilizadas de ADAMTS13

[0374] Para investigar aún más el efecto de las concentraciones de sal y azúcar sobre las formulaciones liofilizadas de ADAMTS13, se determinó el estado oligomérico de diversas formulaciones liofilizadas tras reconstituirse con agua desionizada. Brevemente, se produjo ADAMTS13 recombinante humana, tal como se

describe anteriormente. Luego se formularon muestras de proteína con histidina 20 mM (pH 7,0), cloruro de calcio 2 mM y polisorbato 80 al 0,05% con los niveles de cloruro de sodio y sacarosa indicados en la tabla 15. Las formulaciones se liofilizaron, tal como se describe antes, y se reconstituyeron con agua desionizada. Se determinaron las características oligoméricas mediante análisis SE-HPLC, cuyos resultados se muestran en la tabla 15 y la figura 35. Tal como se puede observar en las formulaciones que contienen bajas concentraciones de azúcar, los niveles elevados de sal (150 mM) aumentan la aglomeración de ADAMTS13 y reducen el contenido monomérico de la formulación.

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

Lote	NaCl [mM]	Sucrosa [g/l]	Osmolaridad [mOsmol]	Aglomerado [%]	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
rADAMTS016-8	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

[0375] La misma formulación indicada en la tabla 15 se usó para evaluar la calidad de la torta liofilizada producida tras la liofilización de formulaciones de ADAMTS13. Tal como se resume en la tabla 16 y se muestra en la figura 36, la presencia de altas concentraciones de cloruro de sodio (150 mM) no permitió la formación de la torta liofilizada. Por el contrario, las mejores tortas liofilizadas se obtuvieron con formulaciones que contenían cloruro de sodio entre 0 mM y 60 mM en presencia de sacarosa al 2%.

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

Lote	Cuantificación de la torta liofilizada
rADAMTS016-1	torta liofilizada compacta, superficie suave y despegada de la pared de cristal
rADAMTS016-2	torta liofilizada compacta, superficie suave y despegada de la pared de cristal
rADAMTS016-3	torta liofilizada compacta, superficie suave y despegada de la pared de cristal
rADAMTS016-4	torta liofilizada compacta y porosa, superficie áspera, parcialmente despegada de la pared de cristal
rADAMTS016-5	torta liofilizada porosa, superficie áspera, parcialmente despegada de la pared de cristal
rADAMTS016-6	ausencia de torta liofilizada, solo película esponjosa
rADAMTS016-7	torta liofilizada compacta y porosa, superficie áspera, parcialmente despegada de la pared de cristal
rADAMTS016-8	ausencia de torta liofilizada, solo película esponjosa
rADAMTS016-9	película suave y esponjosa
rADAMTS016-10	superficie polvorienta y suave
rADAMTS016-11	ausencia de torta liofilizada, solo película esponjosa
rADAMTS016-12	superficie polvorienta y suave

Z. *Ejemplo 26:* Análisis de estrés térmico a largo plazo

[0376] Para caracterizar aún más la estabilidad de formulaciones liofilizadas de ADAMTS13, se inició un segundo análisis de estrés

térmico a largo plazo. Para este ensayo, se formuló ADAMTS13 recombinante humana a tres concentraciones de proteína finales de acuerdo con la tabla 19. Se incluyó un segundo azúcar (manitol) en la formulación, ya que se descubrió que estabilizaba la proteína durante la liofilización y proporcionaba una torta liofilizada compacta con una superficie suave. Todas las muestras del análisis de estrés se caracterizaron mediante DLS (Figura 39), SE-HPLC (tabla 20) y FTIR. También se midió la actividad de FRETS (tabla 21) y ELISA de antígeno A13 (tabla 22) con el transcurso del tiempo para todas las formulaciones.

Tabla 19. Formulación de rADAMTS13 con solución amortiguadora de His para el ensayo de estrés (rADAMTS025).

	rADAMTS025-1	**rADAMTS025-2**	**rADAMTS025-3**
Concentración [U FRETS/mL]	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 elevada de ADAMTS13 en el nivel de aglomerados según se determinó mediante SE-HPLC (rADAMTS025).

Lote	**Aglomerado [%]**	**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 de FRETS-VWF73 en formulaciones liofilizadas de ADAMTS13.

		[U/ml] Preformulación	[U/ml] Antes de Filtración	[U/ml] Antes de Liofilización	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]	[U/ml]	[%]
					0M		1M		2M		3M		4M		6M	
-1 A	4 °C	685,6	559	528	522	100%	-	-	-	-	482,20	92%	462,40	89%	411,80	79%
	30 °C						-	-	441	84%	471,20	90%	458,30	88%	386,70	74%
	40 °C						475	91%	402	77%	441,80	85%	416,30	80%	367,50	70%
-2 A	4 °C		278	258	252	100%	-	-	-	-	236,6	94%	229,9	91%	210,7	84%
	30 °C						-	-	227	90%	231,6	92%	220,7	88%	198,2	79%
	40 °C						243	96%	209	83%	212	84%	205,8	82%	181,2	72%
-3 A	4 °C		129	122	117	100%	-	-	-	-	115	98%	112,4	96%	107,1	92%
	30 °C						-	-	106	91%	114	97%	103,1	88%	98,2	84%
	40 °C						111	95%	98	84%	99,1	85%	95,5	82%	84,4	72%

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

		[µ/ml] Preformulación	[µ/ml] Antes de filtración	[µ/ml] Antes de liofilización	[µ/ml]	[%]	[µ/ml]	[%]	[µ/ml]	[%]	[µ/ml]	[%]	[µ/ml]	[%]
					0M		1M		2M		3M		4M	
-1 A	4 °C	1044,989	602	590	586	100%	-	-	-	-	671	114%	588	100%
	30 °C						-	-	600	102%	689	118%	582	99%
	40 °C						574	98%	630	107%	682	116%	562	96%
-2 A	4 °C		324	339	321	100%	-	-	-	-	355	111%	344	107%
	30 °C						-	-	348	108%	323	101%	336	105%
	40 °C						321	100%	347	108%	351	110%	353	110%
-3 A	4 °C		150	152	127	100%	-	-	-	-	166	131%	162	128%
	30 °C						-	-	169	133%	177	139%	166	131%
	40 °C						147	116%	165	130%	176	139%	168	133%

[0377] Se entiende que los ejemplos y las realizaciones que se describen en la presente se proporcionan a efectos ilustrativos

solamente y que se sugerirán varias modificaciones y cambios a la luz de los mismos para los expertos en la técnica, y los mismos deben incluirse dentro del espíritu y alcance de esta solicitud y el alcance las reivindicaciones adjuntas. Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patente citadas en la presente se incorporan en la presente a modo de referencia en su totalidad a todos los efectos.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación estabilizada de ADAMTS13 que comprende:

(a) 0.05 mg/ml a 10.0 mg/ml de ADAMTS13;

(b) 0 mM a 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable;

(c) 0.5 mM a 20 mM de calcio;

(d) 2% a 6% de azúcar o alcohol de azúcar;

(e) un tensioactivo no iónico; y

un agente amortiguador para mantener el pH entre 6,0 y 8,0.

2. Una formulación estabilizada acuosa de ADAMTS13 que comprende:

(a) al menos 100 unidades de la actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13;

(b) 0 mM a 100 mM de una sal farmacéuticamente aceptable;

(c) 0,5 mM a 20 mM de calcio;

(d) 2% a 6% de un azúcar y/o alcohol de azúcar;

(e) un tensioactivo no iónico; y

un agente amortiguador para mantener el pH entre 6,0 y 8,0.

3. La formulación de la reivindicación 1 o 2 que comprende entre 50 unidades y 1000 unidades de la actividad de ADAMTS13 por mL.

4. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la sal es cloruro de sodio o cloruro de potasio.

5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende calcio a una concentración entre 1,0 y 10,0 mM.

6. La formulación de la reivindicación 5, que comprende calcio a una concentración entre 2,0 y 4,0 mM.

7. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el azúcar y/o el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manitol y una combinación de los mismos.

8. La formulación de la reivindicación 7, en donde el azúcar y/o el alcohol de azúcar comprende sacarosa y manitol.

9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende entre 0,01% y 0,1% de un tensioactivo no iónico.

10. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el tensioactivo se selecciona del grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80, plurónico F-68 y BRIJ 35.

11. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende un agente amortiguador en una concentración entre 5 mM y 100 mM.

12. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde el agente amortiguador es histidina o HEPES.

13. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el pH de la formulación es 7,0 ± 0,2.

14. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende:

(a) 0,05 mg/ml a 10,0 mg/ml de ADAMTS13;

(b) 0 a 60 mM de NaCl;

(c) 2 mM a 4 mM de calcio;

(d) 2% a 4% de manitol;

(e) 0,5% a 2% de sacarosa;

(f) 0,025 a 0,1% de polisorbato 80; y

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

15. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 que comprende:

(a) al menos 100 unidades de la actividad de ADAMTS13 por mg de ADAMTS13;

(b) 0 a 60 mM de NaCl;

(c) 2 mM a 4 mM de calcio;

(d) 2% a 4% de manitol;

(e) 0,5% a 2% de sacarosa;

(f) 0,025 a 0,1% de polisorbato 80; y

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

16. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, que además comprende zinc a una concentración entre 0,5 µM y 20 µM.

17. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en donde la ADAMTS13 es estable a 4°C durante al menos 6 meses.

18. La formulación de la reivindicación 17, en donde la formulación mantiene al menos 90% de ADAMTS13 activo tras almacenarse a 4°C durante al menos 6 meses.

19. La formulación de la reivindicación 18, en donde la formulación mantiene al menos 95% de la actividad de ADAMTS13 tras almacenarse a 4°C durante al menos 6 meses.

20. La formulación de la reivindicación 19, en donde la formulación mantiene al menos 98% de la actividad de ADAMTS13 tras almacenarse a 4°C durante al menos 6 meses.

21. La formulación acuosa de las reivindicaciones 1 a 20, en donde la formulación es estable a 37° C durante al menos 6 meses.

22. La formulación de la reivindicación 21, en donde la formulación mantiene al menos 80% de la actividad de ADAMTS13 tras almacenarse a 37°C durante al menos 6 meses.

23. La formulación de la reivindicación 22, en donde la formulación mantiene al menos 90% de la actividad de ADAMTS13 tras almacenarse a 37°C durante al menos 6 meses.

24. La formulación de la reivindicación 23, en donde la formulación mantiene al menos 95% de la actividad de ADAMTS13 tras almacenarse a 37°C durante al menos 6 meses.

25. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en donde la proteína ADAMTS13 es al menos 80% pura.

26. La formulación de la reivindicación 25, en donde la proteína ADAMTS13 es al menos 90% pura.

27. La formulación de la reivindicación 26, en donde la proteína ADAMTS13 es al menos 95% pura.

28. La formulación de la reivindicación 27, en donde la proteína ADAMTS13 es al menos 99% pura.

29. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 28, en donde la formulación comprende la proteína ADAMTS13 monomérica.

30. La formulación de la reivindicación 29, en donde el contenido de aglomerados de ADAMTS13 es menor a 5%.

31. La formulación de la reivindicación 30, en donde el contenido de aglomerados de ADAMTS13 se mantiene menor del 5% tras almacenarse durante al menos 6 meses.

32. La formulación de la reivindicación 30, en donde el contenido de aglomerados de ADAMTS13 es menor a 2,5%.

33. La formulación de la reivindicación 32, en donde el contenido de aglomerados de ADAMTS13 se mantiene menor del 2,5% tras almacenarse durante al menos 6 meses.

34. La formulación de la reivindicación 29, en donde el contenido de dímeros de ADAMTS13 es menor a 10%.

35. La formulación de la reivindicación 34, en donde el contenido de dímeros de ADAMTS13 se mantiene menor al 10% tras almacenarse durante al menos 6 meses.

36. La formulación de la reivindicación 34, en donde el contenido de dímeros de ADAMTS13 es menor a 5%.

37. La formulación de la reivindicación 36, en donde el contenido de dímeros de ADAMTS13 se mantiene menor al 5% tras almacenarse durante al menos 6 meses.

38. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 37, en donde la actividad específica de la proteína ADAMTS13 es al menos 600 unidades de actividad de FRETS-VWF73 por mg de proteína ADAMTS13.

39. La formulación de la reivindicación 38, en donde la actividad específica es al menos 800 unidades de actividad de FRETS-VWF73 por mg de proteína ADAMTS13.

40. La formulación de la reivindicación 39, en donde la actividad específica es al menos 1000 unidades de actividad de FRETS-VWF73 por mg de proteína ADAMTS13.

41. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 40, en donde la proteína ADAMTS13 es ADAMTS13 humana.

42. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 41, en donde la proteína ADAMTS13 humana es ADAMTS13 recombinante.

43. Un método para fabricar una formulación estabilizada de ADAMTS13, que comprende 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 zinc a una concentración de 2 µM a 12 µM y calcio a una concentración de 0,5 mM a 1,5 mM;

(b) purificar la proteína ADAMTS13; y

(c) preparar una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42.

44. El método de la reivindicación 43, en donde el medio de cultivo comprende además vitamina B3 a una concentración de 1 mg/L a 20 mg/L.

45. El método de la reivindicación 43 o 44, en donde la proteína ADAMTS13 se expresa en una línea celular de un mamífero.

46. El método de la reivindicación 45, en donde la línea celular de un mamífero se selecciona del grupo que consiste en una línea celular CHO, una línea celular BHK y una línea celular HEK.

47. Un kit que comprende una formulación estabilizada de ADAMTS13 de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 42.

48. El kit de la reivindicación 47, en donde el kit contiene entre 40 IU de actividad de ADAMTS13 y 4000 IU de actividad de ADAMTS13.

RESUMEN

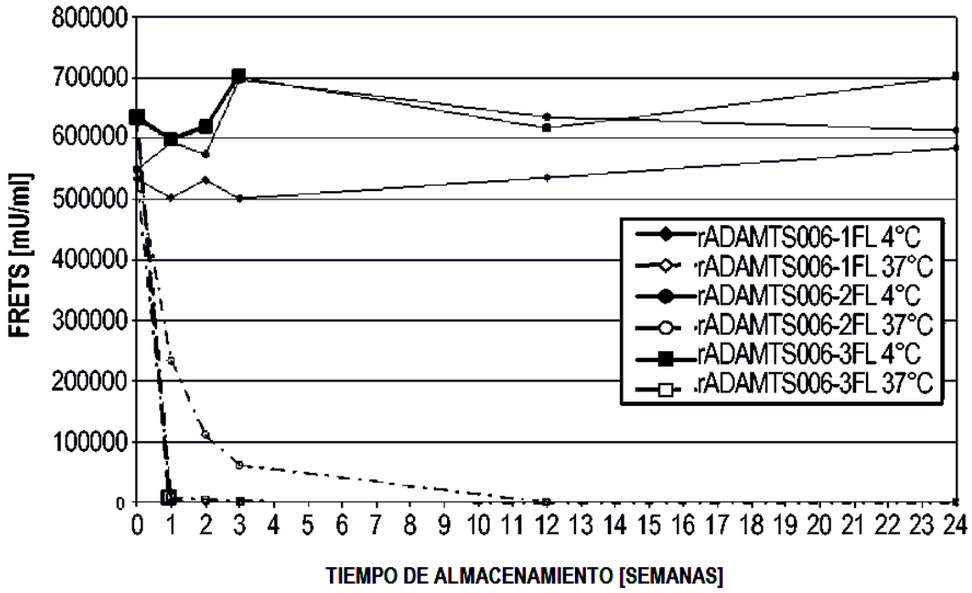
La presente invención se refiere a formulaciones de ADAMTS13 con propiedades mejoradas o deseables. Como tal, la invención proporciona formulaciones líquidas y liofilizadas de ADAMTS13 que son adecuadas para la administración farmacéutica. Entre otros aspectos, la invención también proporciona métodos de tratamiento de varias enfermedades y afecciones relacionadas con el VWF y/o la disfunción de ADAMTS13 en un sujeto. También se proporcionan en la presente kits que comprenden formulaciones de ADAMTS13 útiles para el tratamiento de distintas enfermedades y afecciones

Figura 1

FIGURA 1

A

Actividad FRETS de formulaciones de rADAMTS006 liquida
(-1: Sln. amortiguadora His; -2 Sln. amortiguadora de fosfato; -3: sln amortiguadora de citrato)



B

Antigeno ADAMTS13 de formulaciones rADAMTS006 liquidas
(-1:Sln. amortiguadora His; -2: Sln. amortiguadora de fosfato; -3: sln. amortiguadora de citrato)

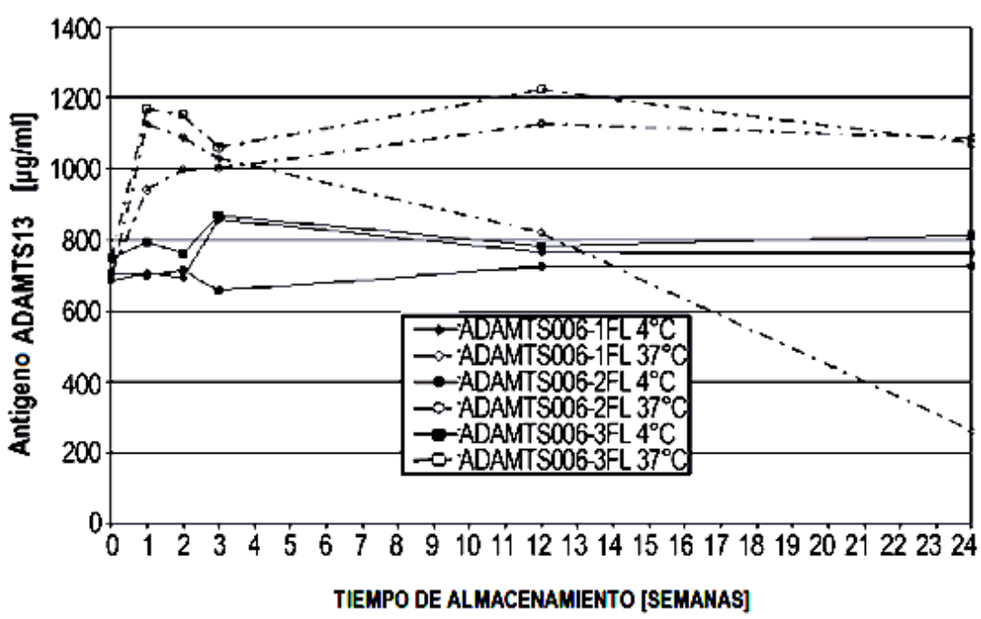
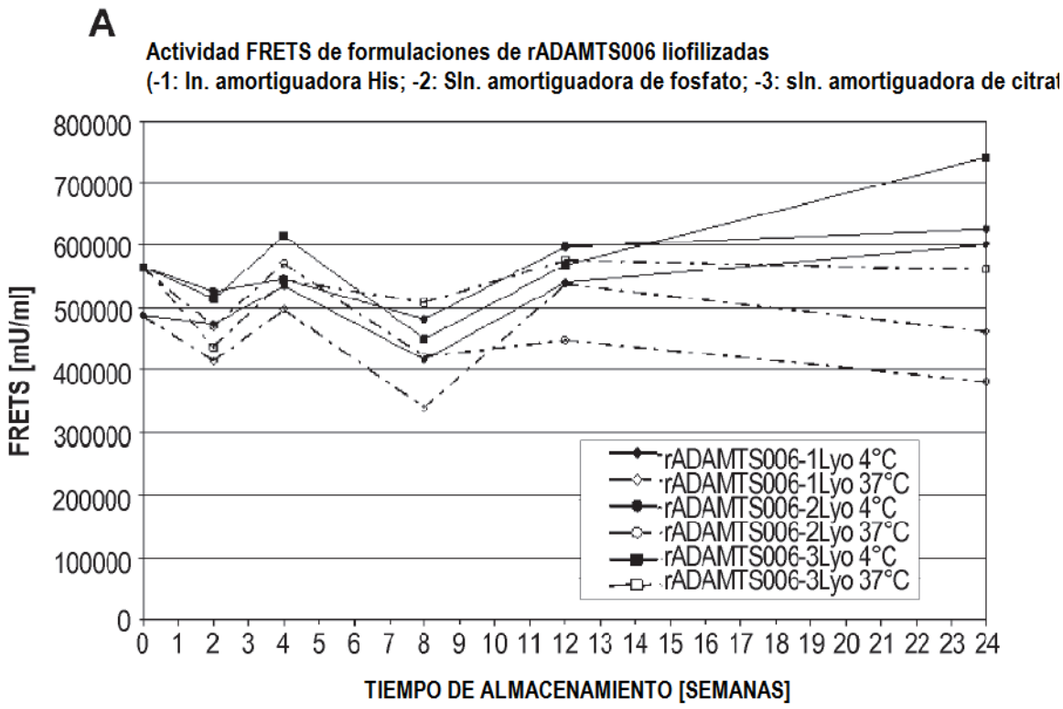


Figura 2


A
Actividad FRETS de formulaciones de rADAMTS006 liofilizadas
(-1: In. amortiguadora His; -2: SIn. amortiguadora de fosfato; -3: sIn. amortiguadora de citrat
FRETS [mU/ml]
800000
700000
600000
500000
400000
300000
200000
100000
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO [SEMANAS]
rADAMTS006-1Lyo 4°C
rADAMTS006-1Lyo 37°C
rADAMTS006-2Lyo 4°C
rADAMTS006-2Lyo 37°C
rADAMTS006-3Lyo 4°C
rADAMTS006-3Lyo 37°C

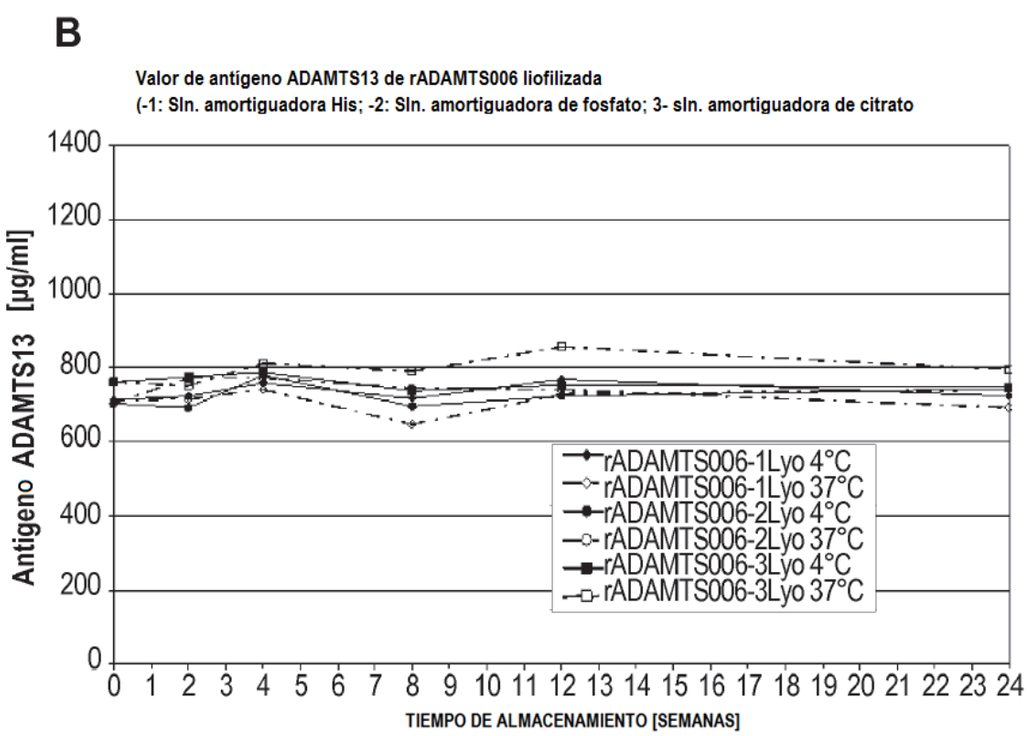

B
Valor de antígeno ADAMTS13 de rADAMTS006 liofilizada
(-1: SIn. amortiguadora His; -2: SIn. amortiguadora de fosfato; 3- sIn. amortiguadora de citrato
Antigeno ADAMTS13 [µg/ml]
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
TIEMPO DE ALMACENAMIENTO [SEMANAS]
rADAMTS006-1Lyo 4°C
rADAMTS006-1Lyo 37°C
rADAMTS006-2Lyo 4°C
rADAMTS006-2Lyo 37°C
rADAMTS006-3Lyo 4°C
rADAMTS006-3Lyo 37°C

Figura 3

Filtración sobre gel de formulación rADAMTS
Supersose 6 GL; TC 10/30

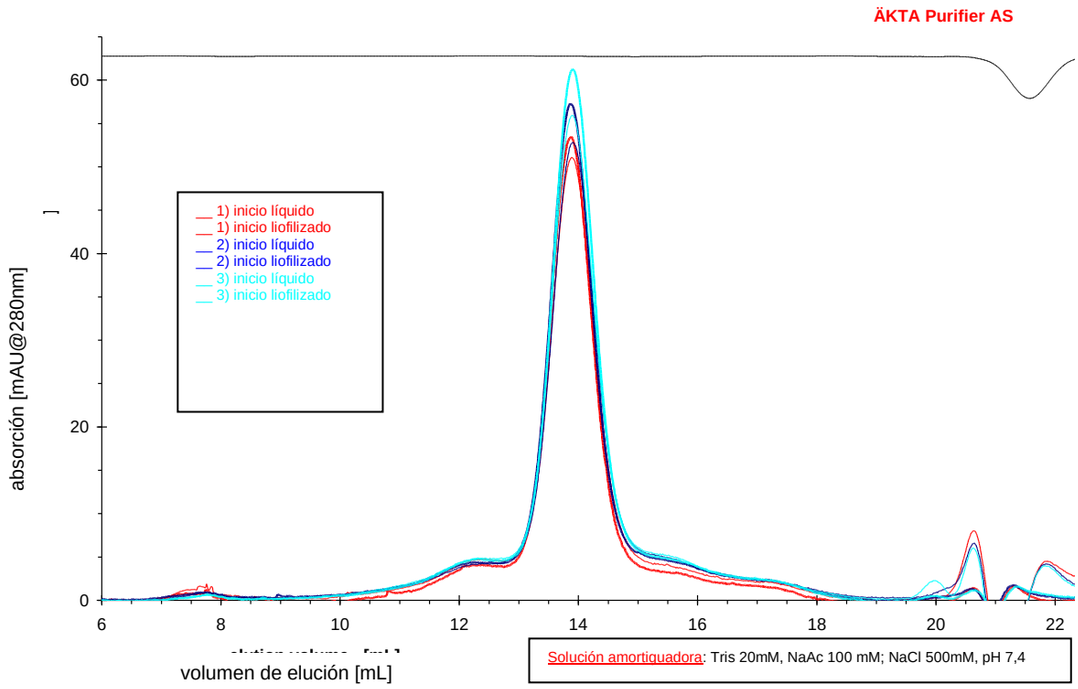
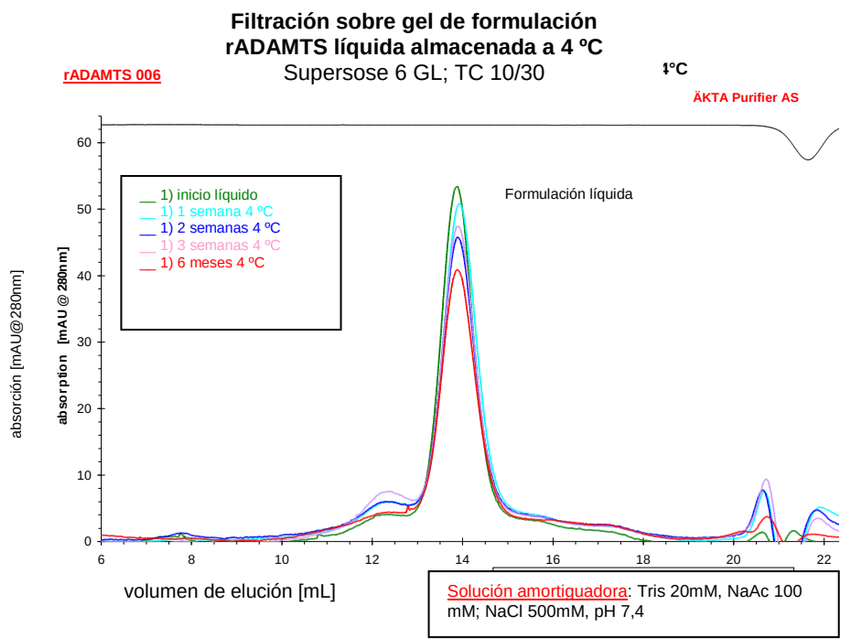


Figura 4

A


Filtración sobre gel de formulación
rADAMTS líquida almacenada a 4 ºC
Supersose 6 GL; TC 10/30
rADAMTS 006
ÄKTA Purifier AS
absorción [mAU@280nm]
absorption [mAU @ 280nm]
1) inicio líquido
1) 1 semana 4 ºC
1) 2 semanas 4 ºC
1) 3 semanas 4 ºC
1) 6 meses 4 ºC
Formulación líquida
volumen de elución [mL]
Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

B

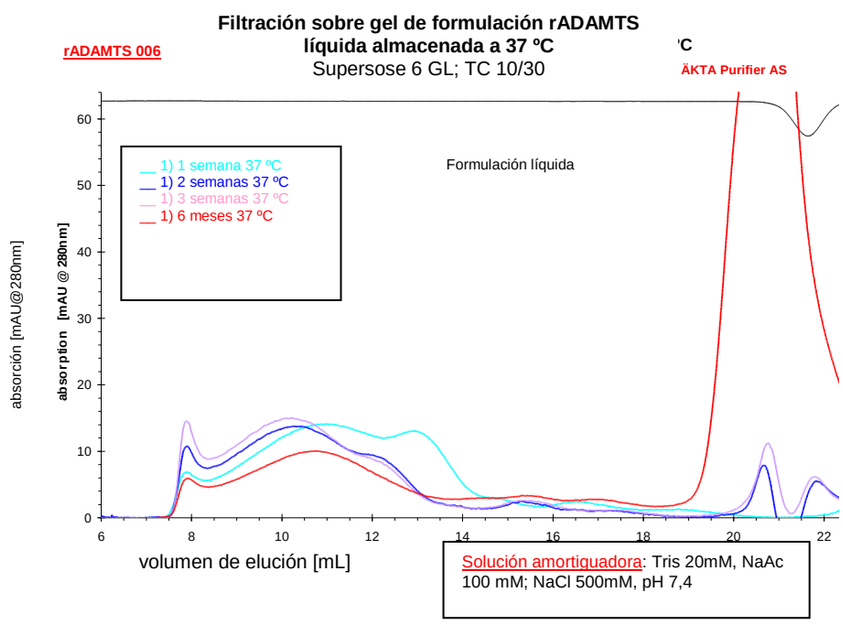
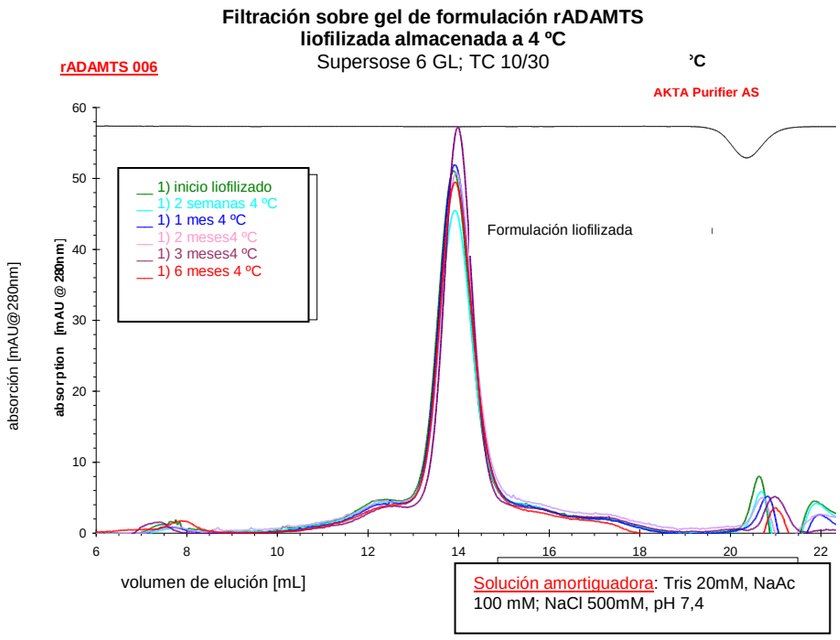

Filtración sobre gel de formulación rADAMTS
líquida almacenada a 37 ºC
Supersose 6 GL; TC 10/30
rADAMTS 006
ÄKTA Purifier AS
absorción [mAU@280nm]
absorption [mAU @ 280nm]
1) 1 semana 37 ºC
1) 2 semanas 37 ºC
1) 3 semanas 37 ºC
1) 6 meses 37 ºC
Formulación líquida
volumen de elución [mL]
Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

Figura 5

A


Filtración sobre gel de formulación rADAMTS
liofilizada almacenada a 4 ºC
Supersose 6 GL; TC 10/30
rADAMTS 006
AKTA Purifier AS
1) inicio liofilizado
1) 2 semanas 4 ºC
1) 1 mes 4 ºC
1) 2 meses4 ºC
1) 3 meses4 ºC
1) 6 meses 4 ºC
Formulación liofilizada
absorción [mAU@280nm]
absorption [mAU @ 280nm]
volumen de elución [mL]
Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc
100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

B

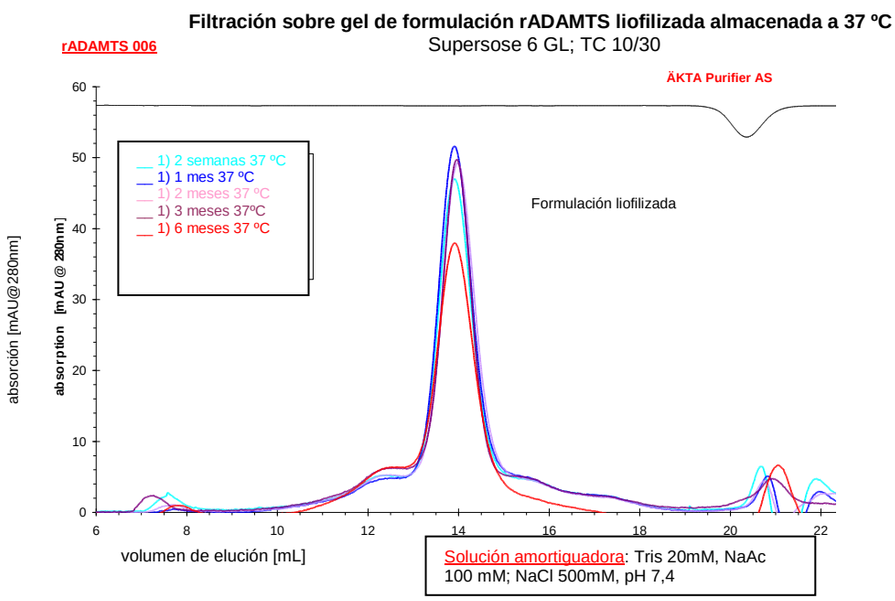
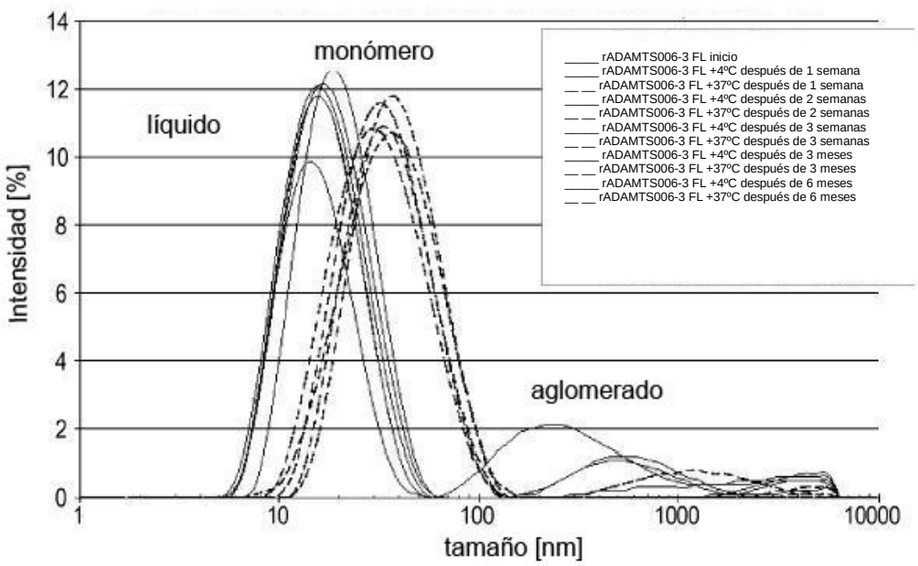

Filtración sobre gel de formulación rADAMTS liofilizada almacenada a 37 ºC
Supersose 6 GL; TC 10/30
rADAMTS 006
ÄKTA Purifier AS
1) 2 semanas 37 ºC
1) 1 mes 37 ºC
1) 2 meses 37 ºC
1) 3 meses 37ºC
1) 6 meses 37 ºC
Formulación liofilizada
absorción [mAU@280nm]
absorption [mAU @ 280nm]
volumen de elución [mL]
Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc
100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

Figura 6

A

rADAMTS006-1 FL tamaño por intensidad
Histidina 20mM, NaCl 150mM, sacarosa al 2%, Tween 80 al 0,05%; pH=7,0



B

rADAMTS006-1 liofilizada, tamaño por intensidad
Histidina 20mM, NaCl 150mM, sacarosa al 2%, Tween 80 al 0,05%; pH=7,0

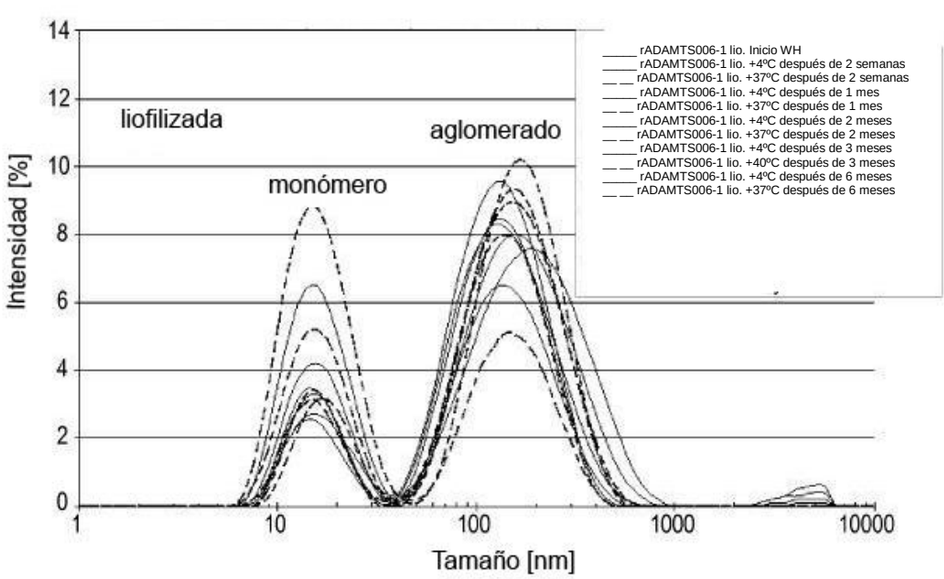
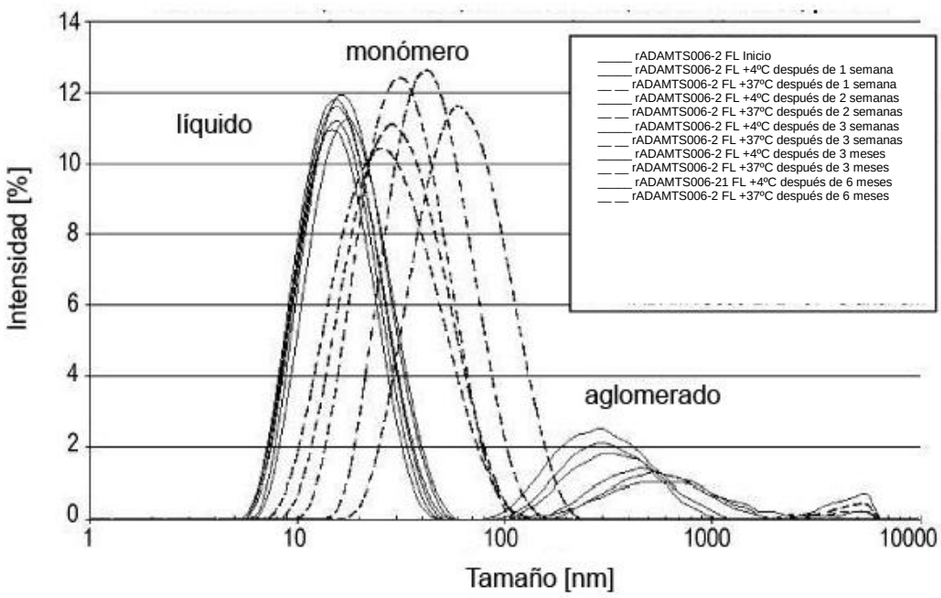


Figura 7

A

rADAMTS006-2 FL tamaño por intensidad
NaH2PO4 20mM, NaCl 150mM, sacarosa al 2%, Tween 80 al 0,05%; pH=7,0



B

rADAMTS006-2 liofilizada, tamaño por intensidad
NaH2PO4 20mM, NaCl 150mM, sacarosa al 2%, Tween 80 al 0,05%; pH=7,0

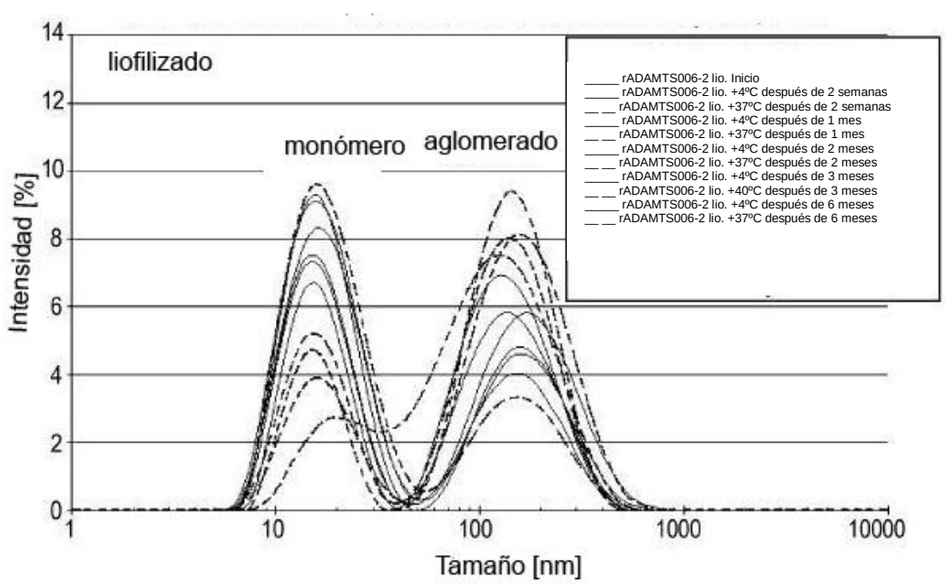
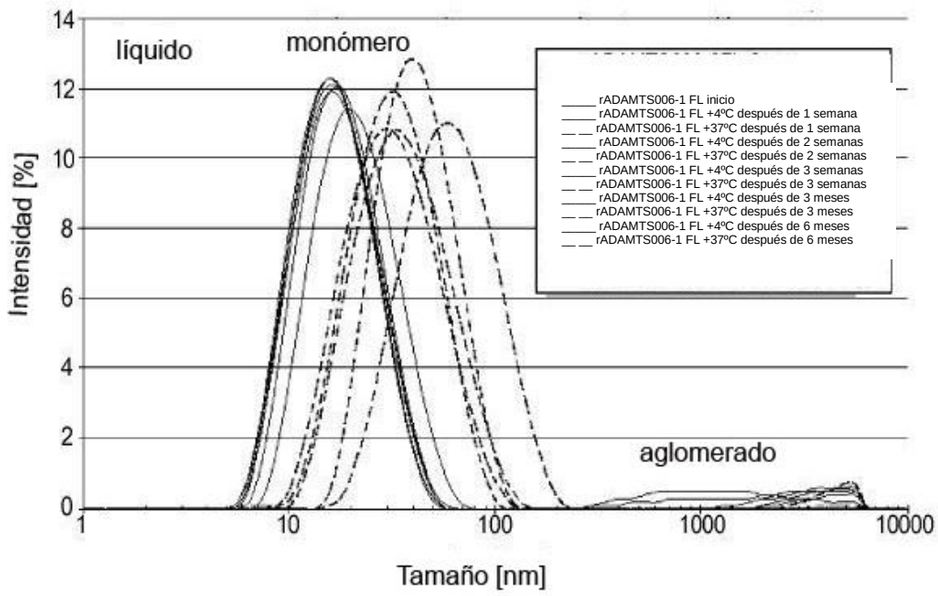


Figura 8

A

rADAMTS006-3 FL tamaño por intensidad
Citrato de sodio 20mM, NaCl 150mM, sacarosa al 2%, Tween 80 al 0,05%; pH=7,0



B

rADAMTS006-3 liofilizada, tamaño por intensidad
Citrato de sodio 20mM, NaCl 150mM, sacarosa al 2%, Tween 80 al 0,05%; pH=7,0

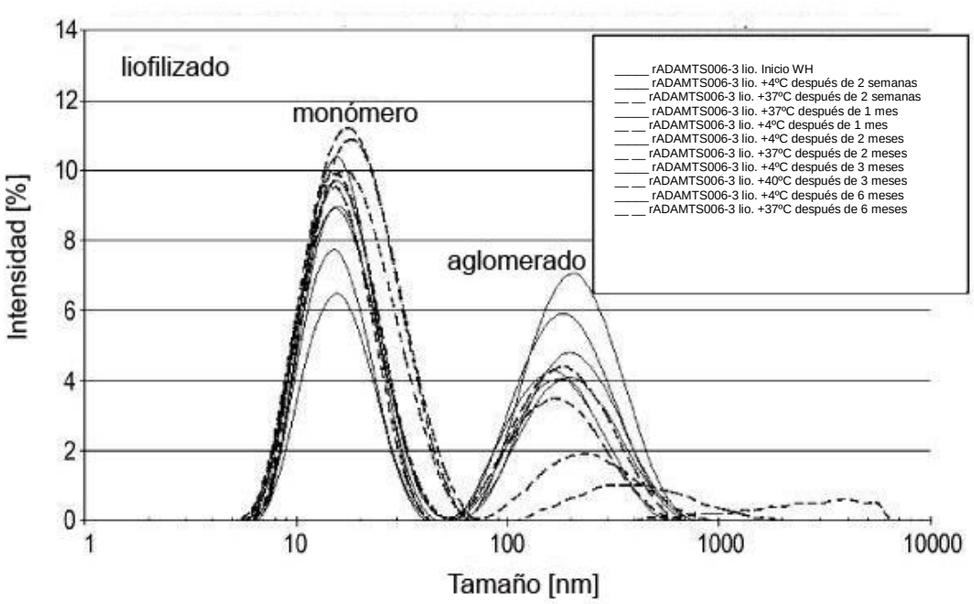


Figura 9

FTIR038-08
BioATRII
Solución amortiguadora corr.
Compensación corr.
Normalización de vector

rADAMTS006 Inicio liofilización

rADAMTS006 liofilización 3-Monat +4ºC

rADAMTS006 liofilización 3-Monat +37ºC

Solución amortiguadora: Histidina 20mM
NaCl 150mM
Sacarosa al 2%
Tween 80 al 0,05%
pH7,0

FTIR de rADAMTS006 liofilizada

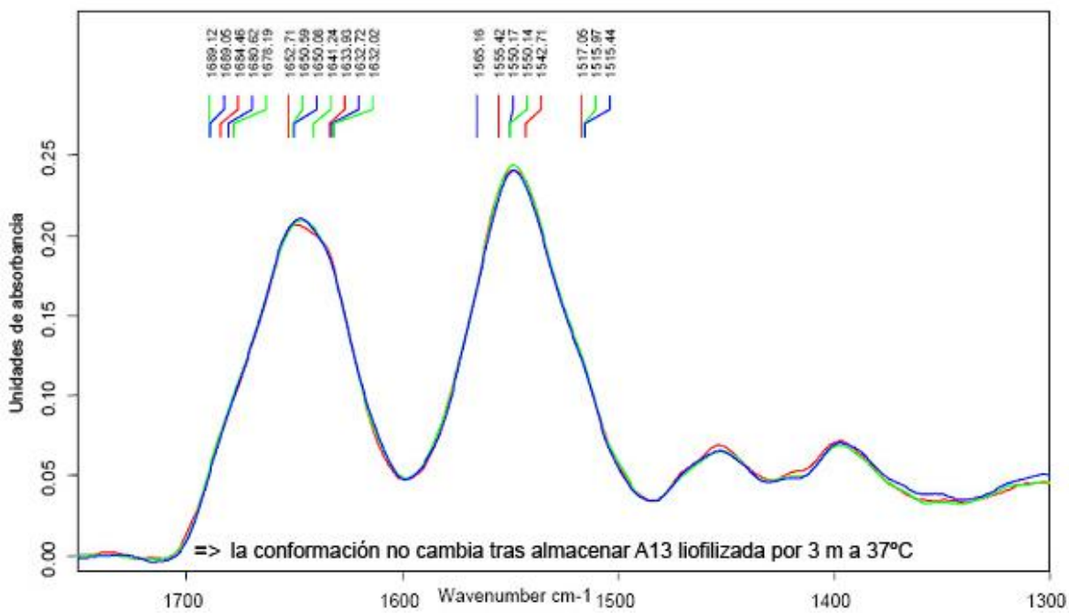


Figura 10

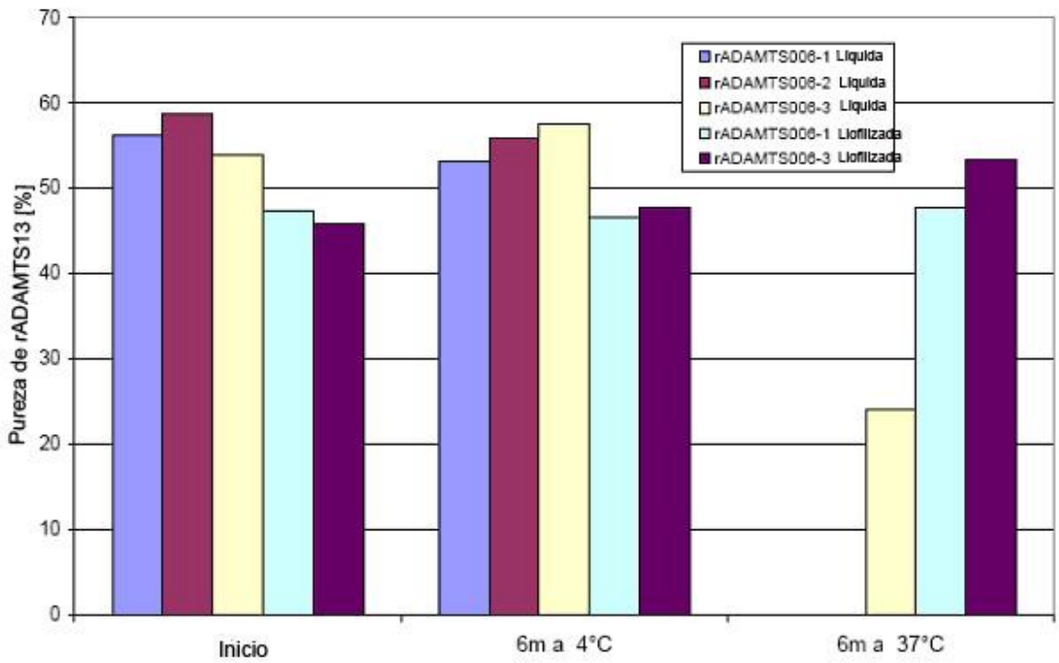

70
60
50
40
30
20
10
0
Pureza de rADAMTS13 [%]
rADAMTS006-1 Liquida
rADAMTS006-2 Liquida
rADAMTS006-3 Liquida
rADAMTS006-1 Liofilizada
rADAMTS006-3 Liofilizada
Inicio
6m a 4°C
6m a 37°C

Figura 11

(-1: solución amortiguadora de His; -2: solución amortiguadora de fosfato; -3: solución amortiguadora de citrato)

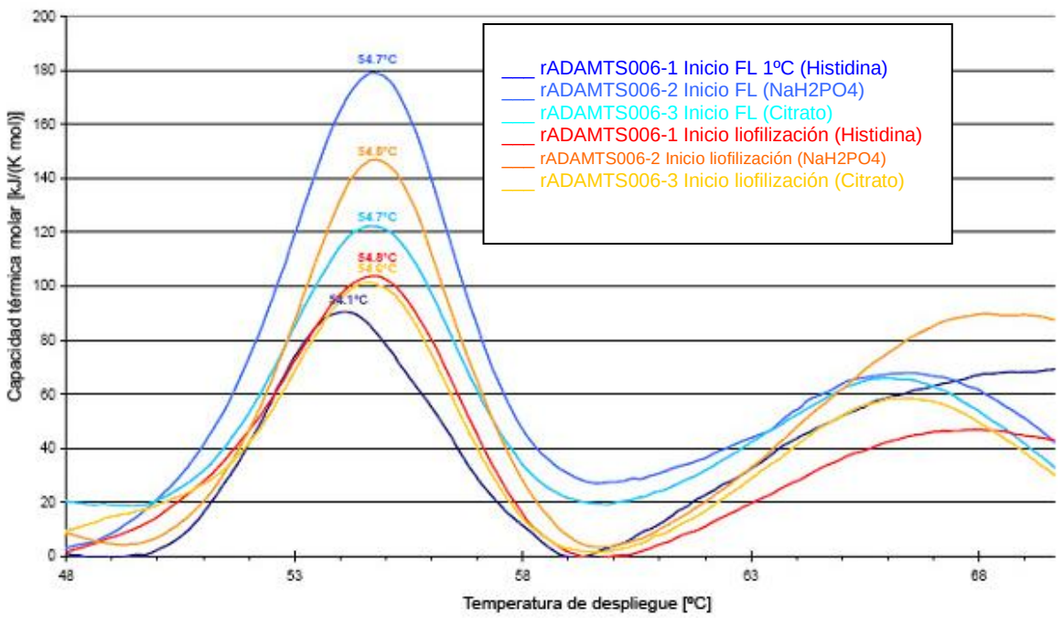
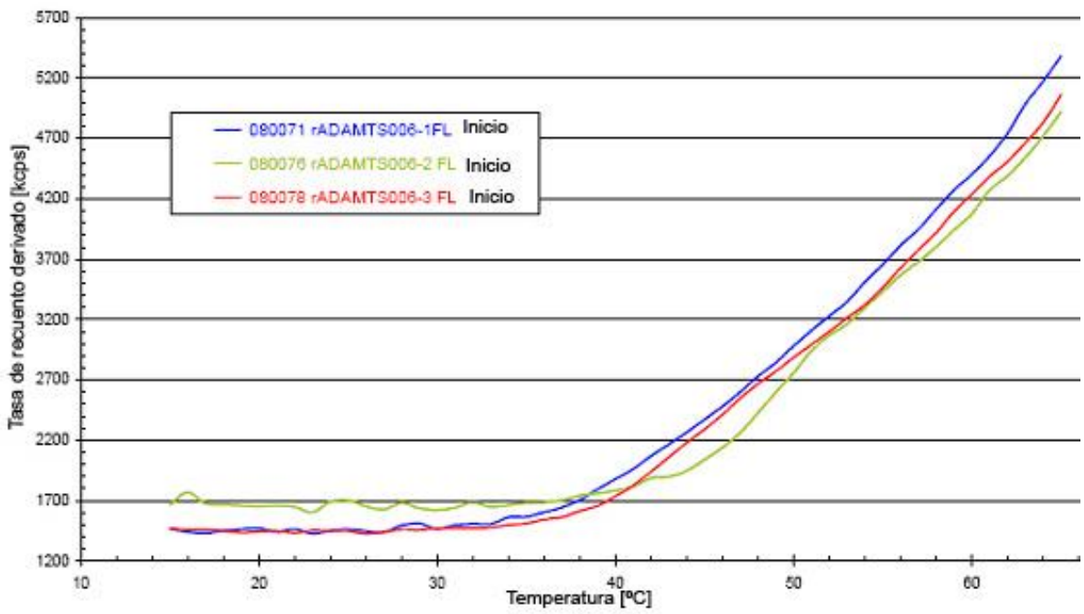


Figura 12

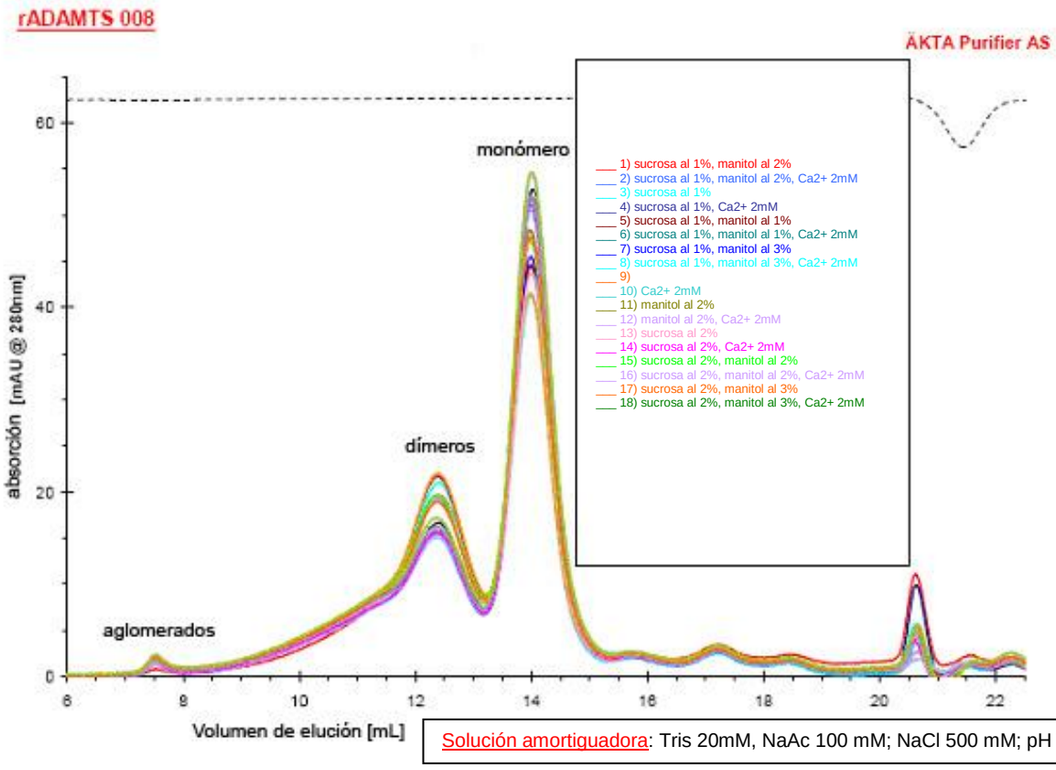
Tasa de recuento derivado de formulaciones de rADAMTS006
(-1: solución amortiguadora de His; -2: solución amortiguadora de fosfato; -3: solución amortiguadora de citrato)



A

Figura 13

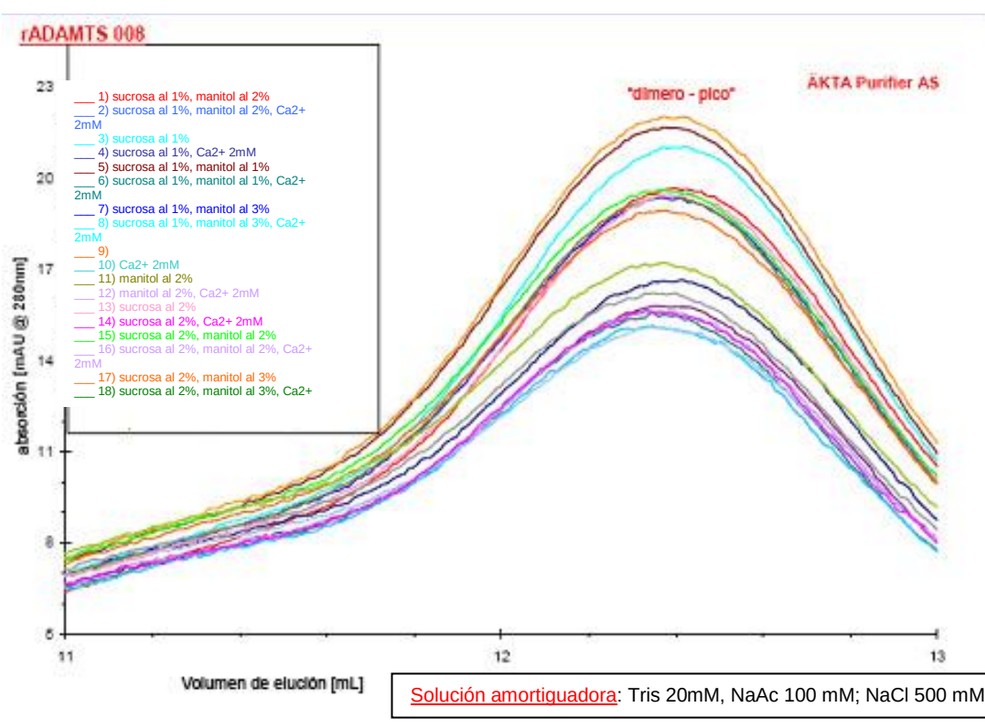
Filtración sobre gel de formulación de rADAMTS (His 20mM, NaCl 150mM, pH 7,0)
Superose 6 GL, TC10/30)



Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,4

B

Filtración sobre gel de formulaciones de rADAMTS (His 20mM, NaCl 150mM, pH 7,0)
Superose 6 GL, TC10/30)



Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500 mM; pH 7,4

Figura 14

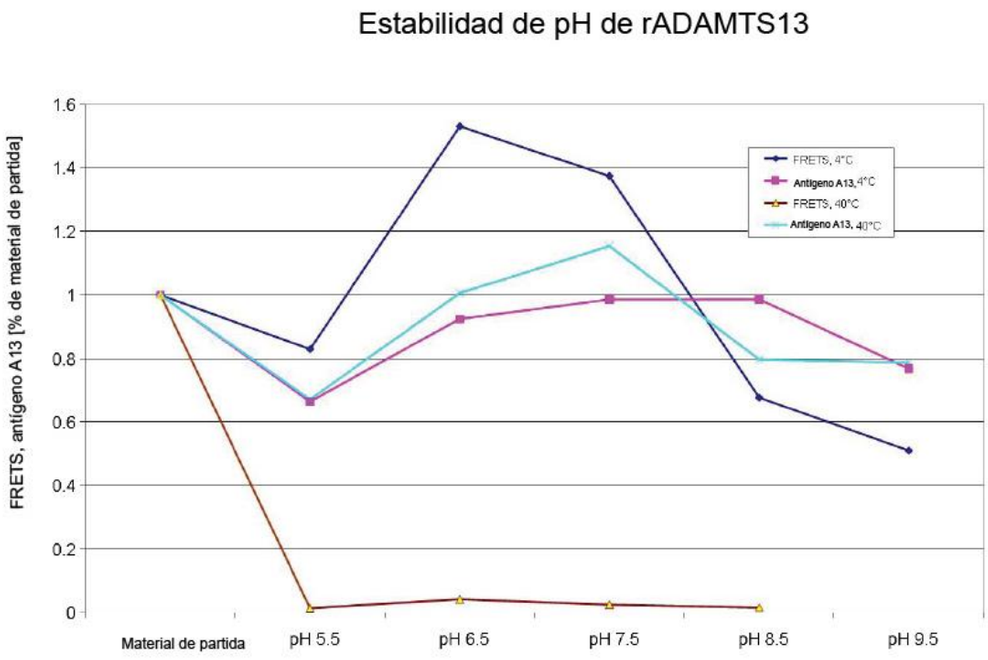

Estabilidad de pH de rADAMTS13
FRETS, antígeno A13 [% de material de partida]
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
FRETS, 4°C
Antígeno A13, 4°C
FRETS, 40°C
Antígeno A13, 40°C
Material de partida
pH 5.5
pH 6.5
pH 7.5
pH 8.5
pH 9.5

Figura 15

Actividad FRETS de formulaciones líquidas de rADAMTS13
(His 20mM, NaCl 150 mM, sacarosa al 2%, Tween al 0,05%, pH 7,0)
Variante A+C sin $CaCl_2$ 2mM; variante B+D con $CaCl_2$

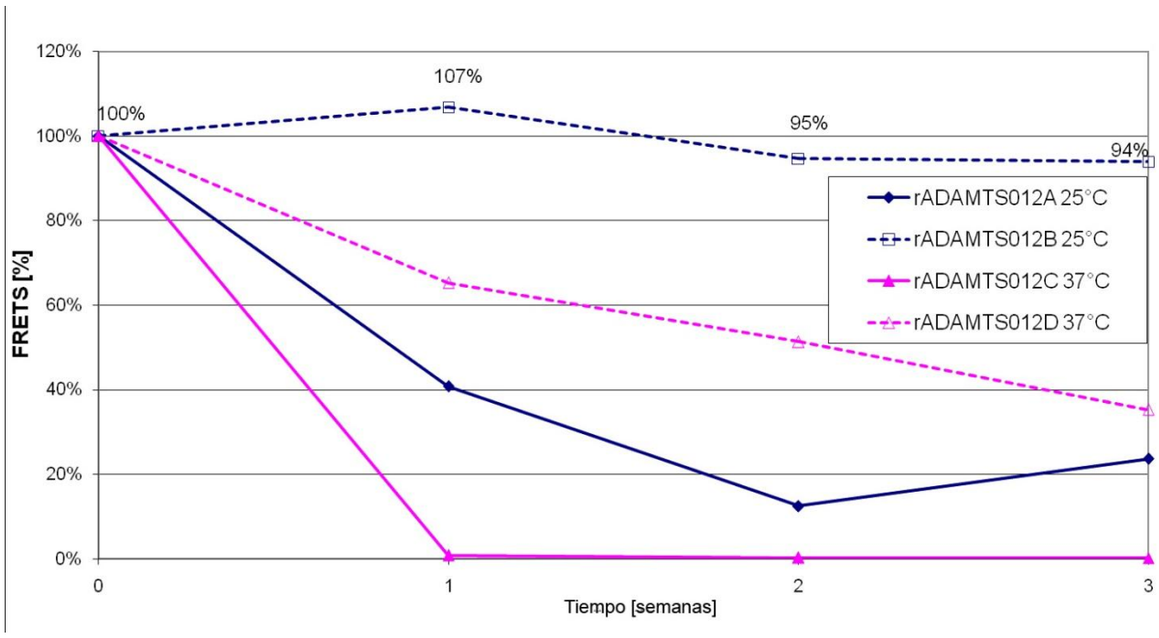
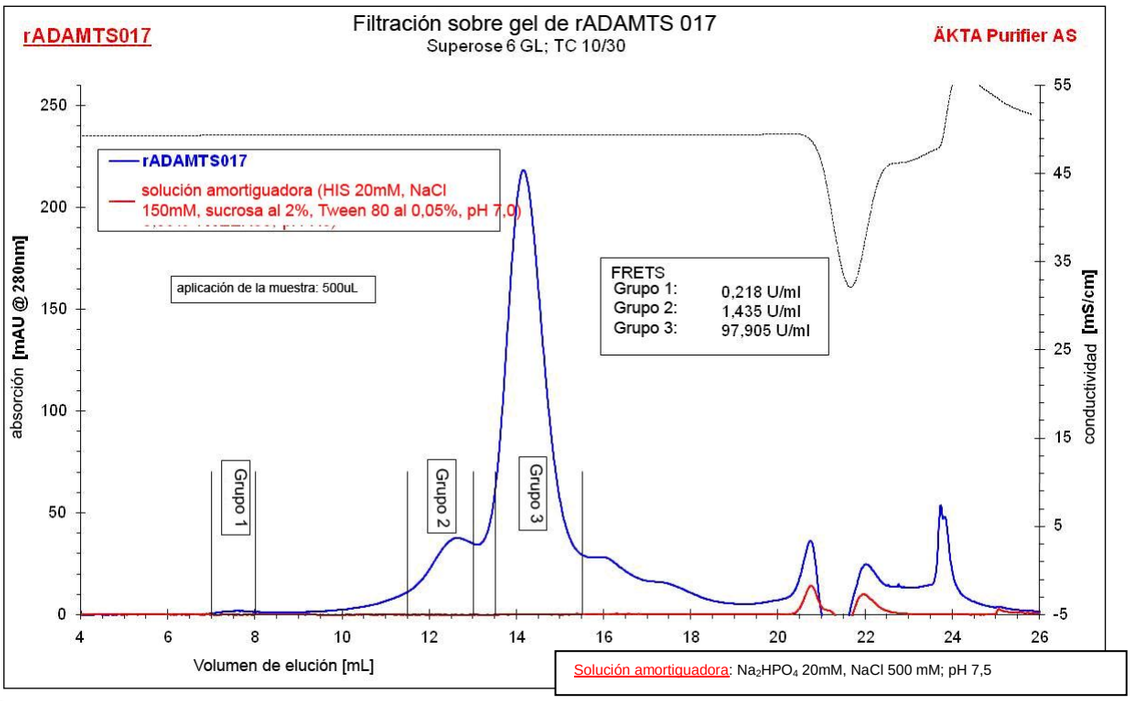


Figura 16

A


rADAMTS017
Filtración sobre gel de rADAMTS 017
Superose 6 GL; TC 10/30
ÄKTA Purifier AS
rADAMTS017
solución amortiguadora (HIS 20mM, NaCl 150mM, sucrosa al 2%, Tween 80 al 0,05%, pH 7,0)
aplicación de la muestra: 500uL
FRETS
Grupo 1: 0,218 U/ml
Grupo 2: 1,435 U/ml
Grupo 3: 97,905 U/ml
Grupo 1
Grupo 2
Grupo 3
absorción [mAU @ 280nm]
conductividad [mS/cm]
Volumen de elución [mL]
Solución amortiguadora: Na2HPO4 20mM, NaCl 500 mM; pH 7,5

B

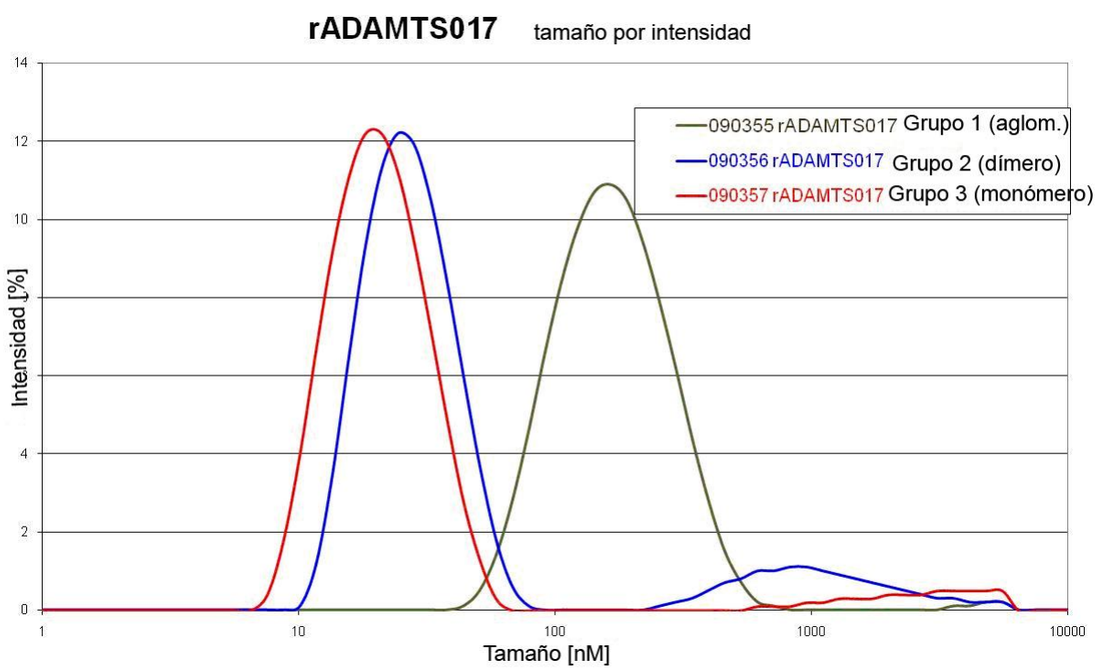
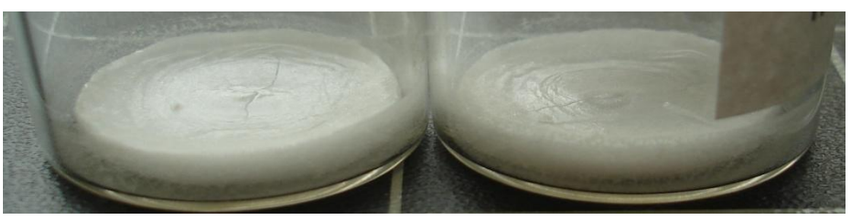

rADAMTS017 tamaño por intensidad
090355 rADAMTS017 Grupo 1 (aglom.)
090356 rADAMTS017 Grupo 2 (dímero)
090357 rADAMTS017 Grupo 3 (monómero)
Intensidad [%]
Tamaño [nM]

Figura 17

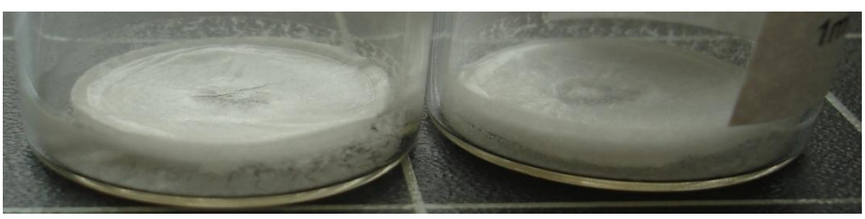
A

B

C



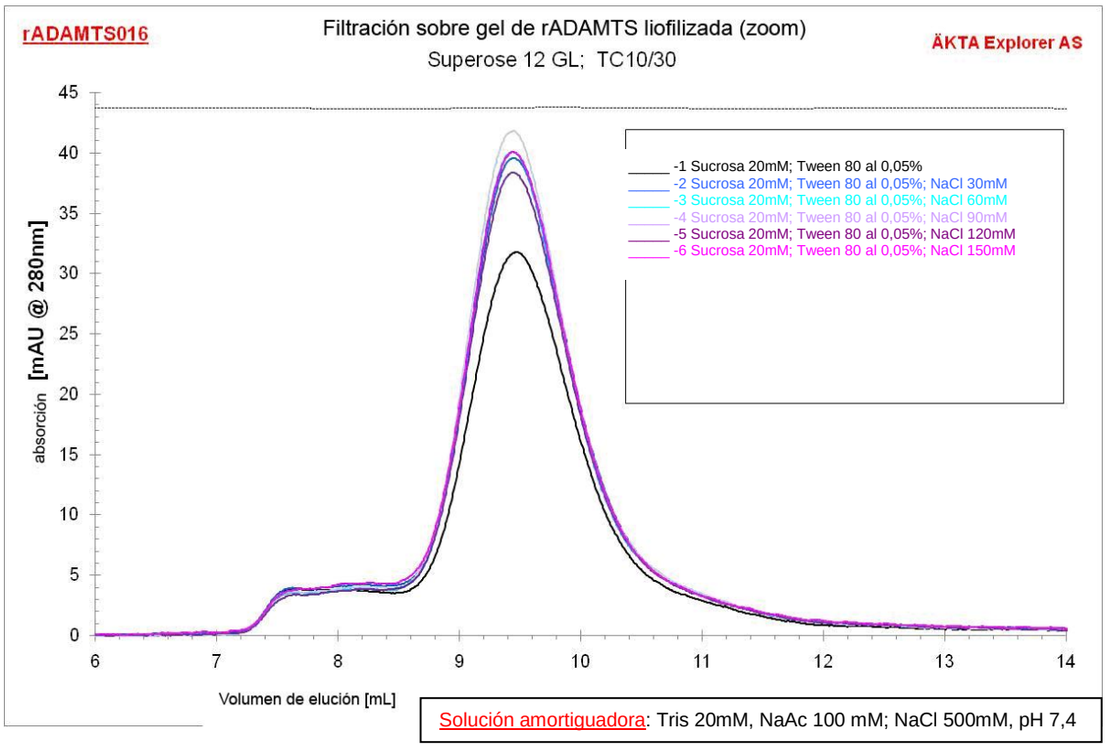
D



E

F

Figura 18



Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

Figura 19

Actividad FRETS de rADAMTS16 con diferentes composiciones amortiguadoras
(material de partida: A13 del clon F6 - A13_ANX_022_Eluato)

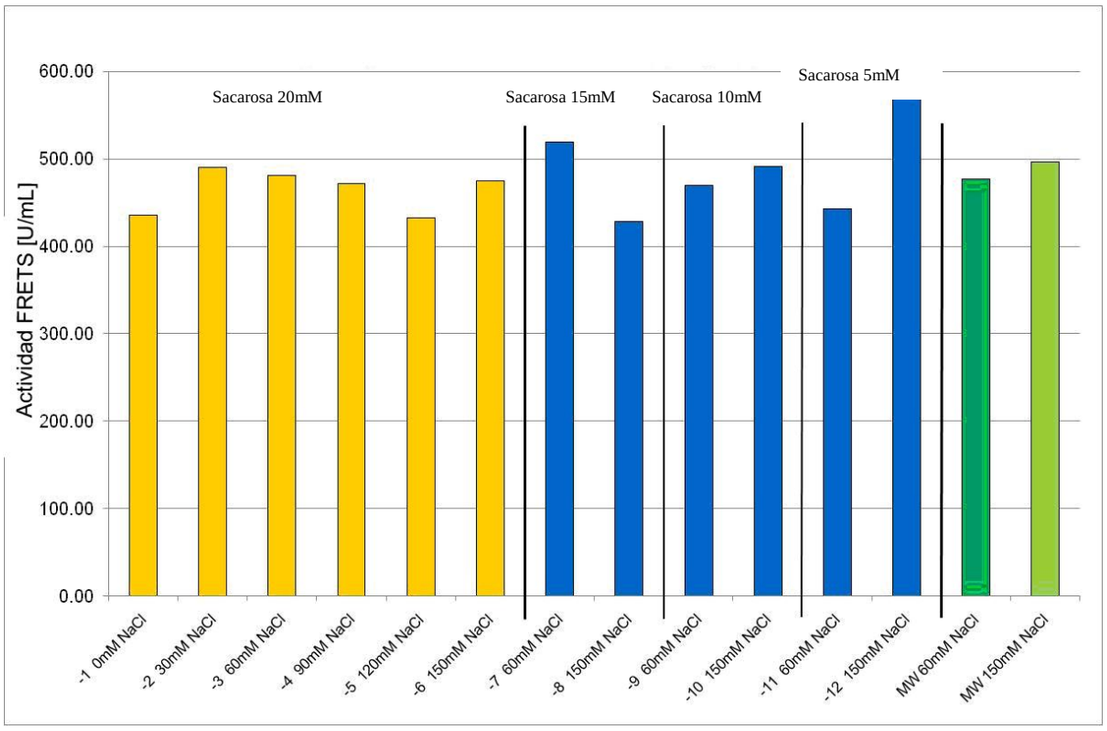
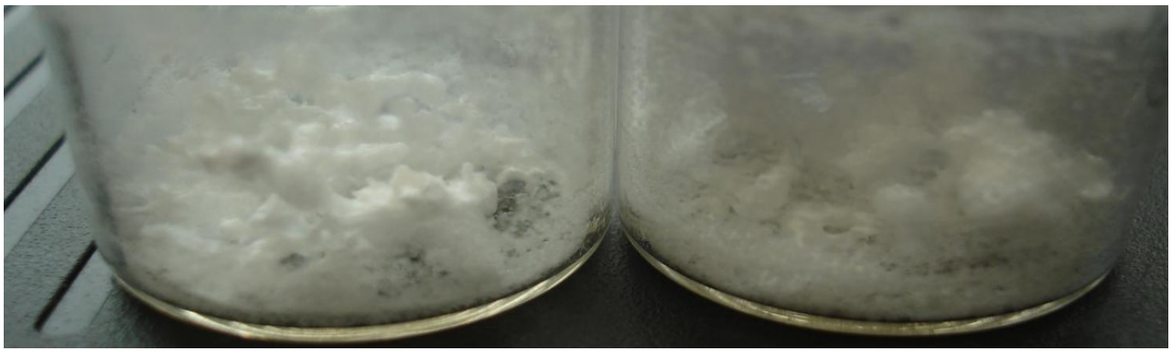


Figura 20

A



B

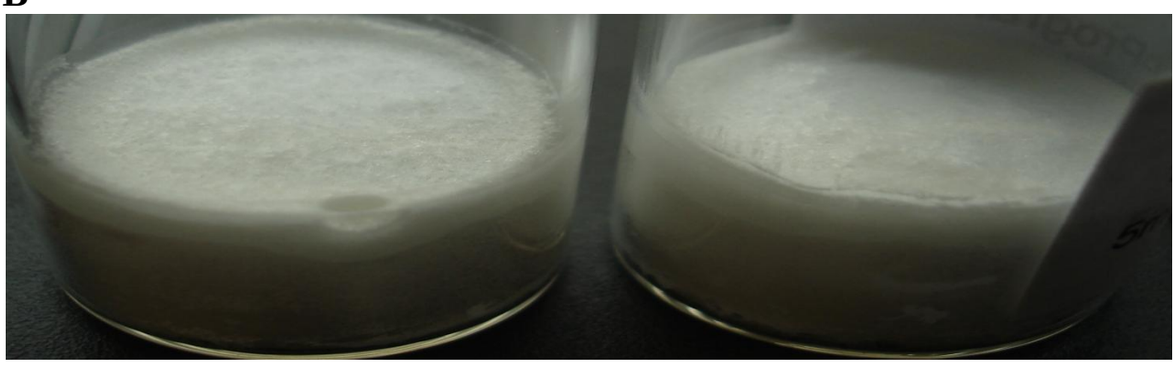
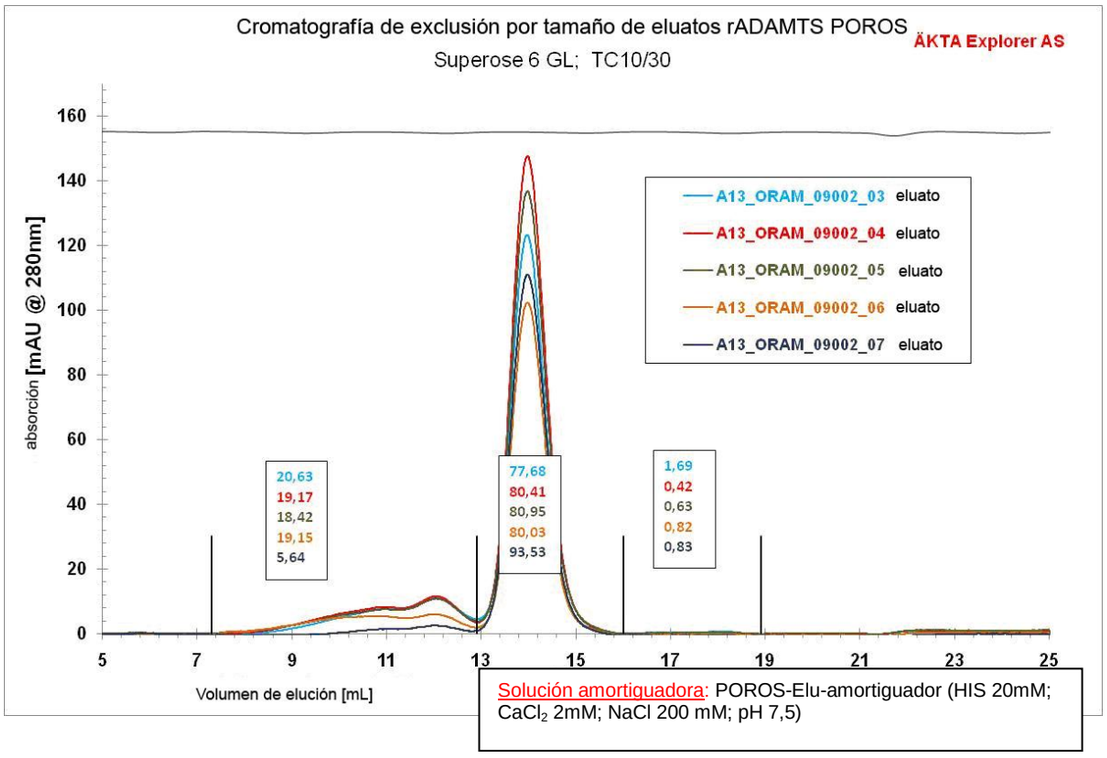


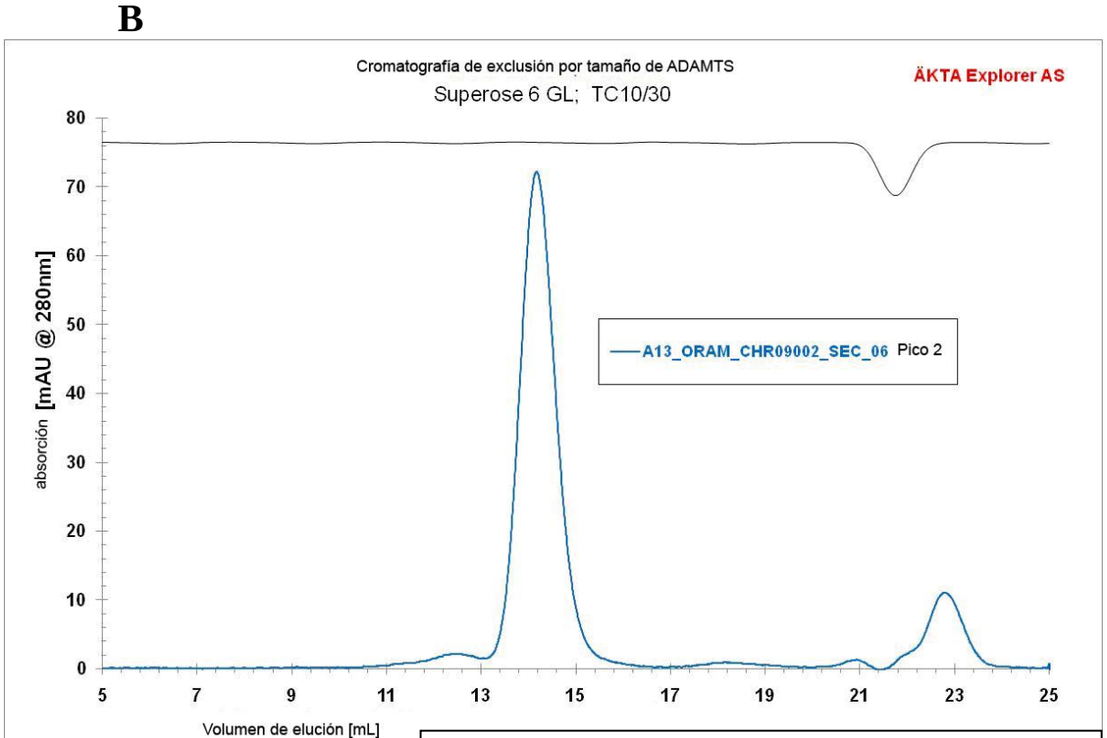
Figura 21

A



Solución amortiguadora: POROS-Elu-amortiguador (HIS 20mM; $CaCl_2$ 2mM; NaCl 200 mM; pH 7,5)

B



Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

Figura 22A

A

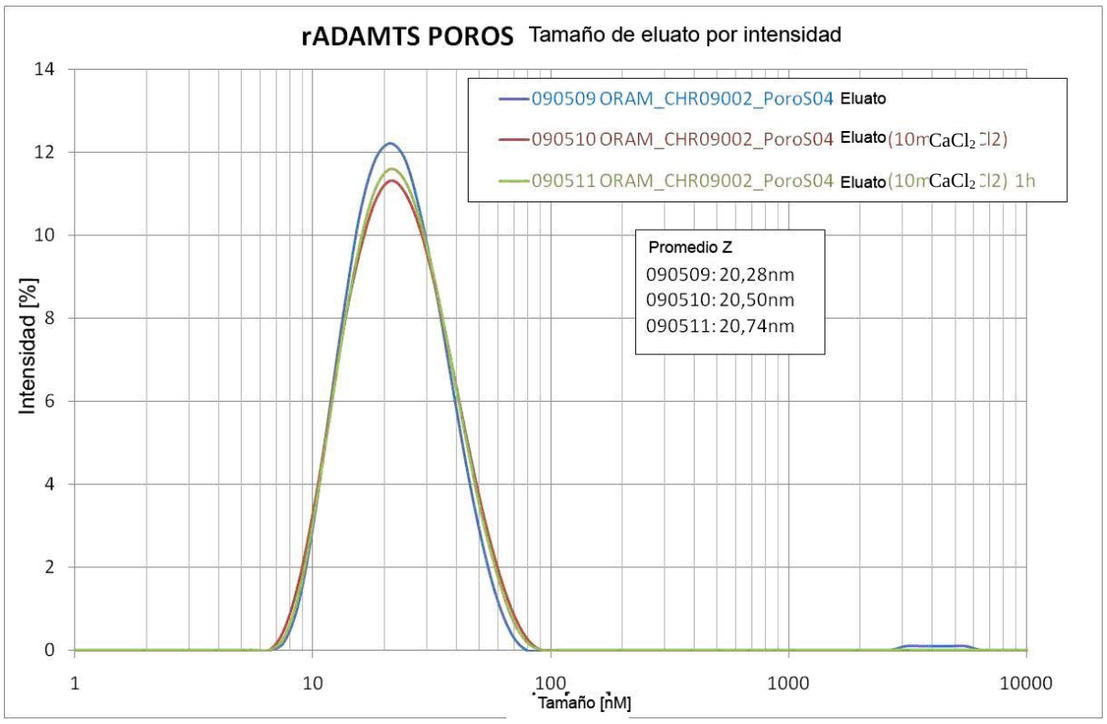

rADAMTS POROS Tamaño de eluato por intensidad
090509 ORAM_CHR09002_PoroS04 Eluato
090510 ORAM_CHR09002_PoroS04 Eluato (10mM CaCl2)
090511 ORAM_CHR09002_PoroS04 Eluato (10mM CaCl2) 1h
Promedio Z
090509: 20,28nm
090510: 20,50nm
090511: 20,74nm
Intensidad [%]
Tamaño [nM]
0
2
4
6
8
10
12
14
1
10
100
1000
10000

Figura 22B

B

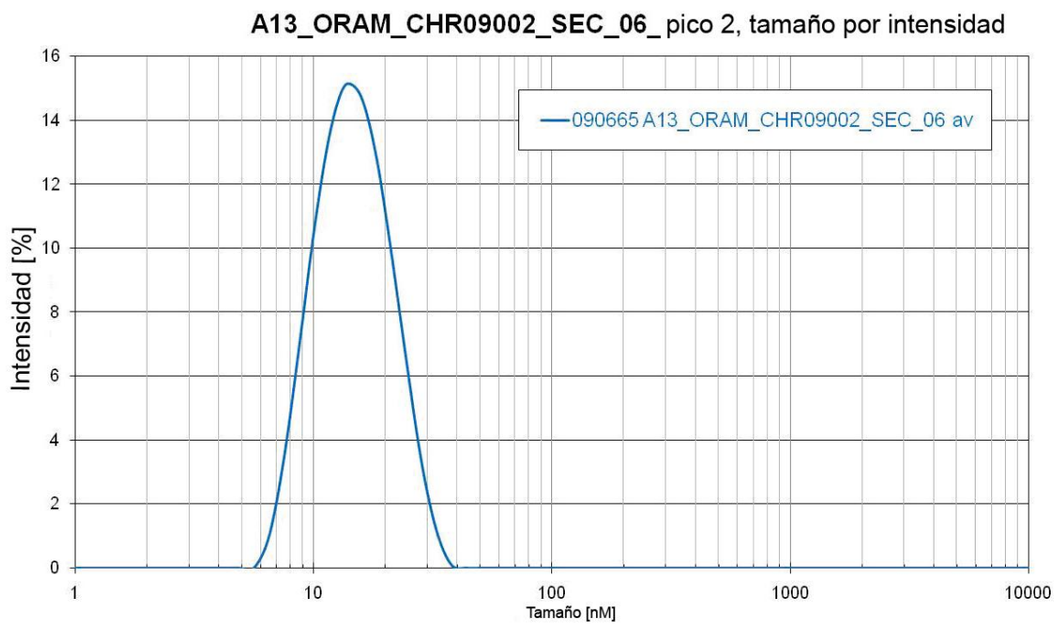
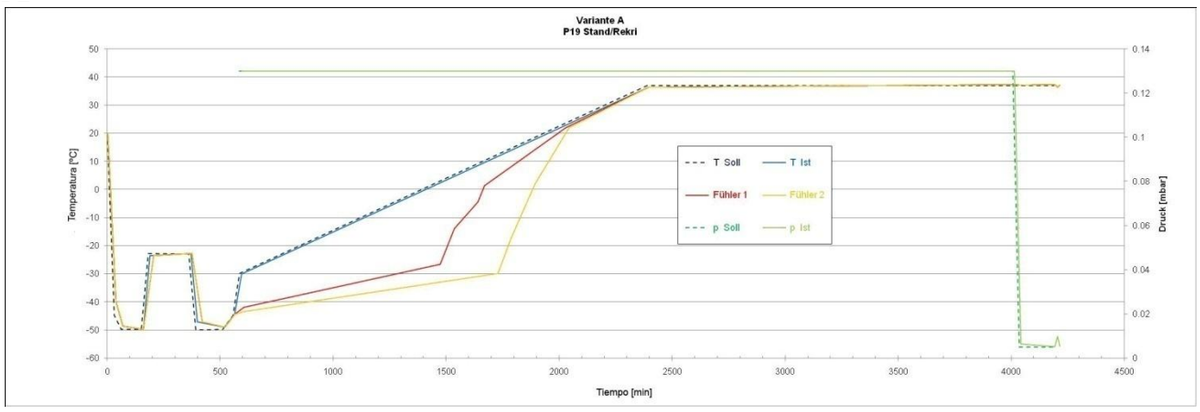

A13_ORAM_CHR09002_SEC_06_ pico 2, tamaño por intensidad
090665 A13_ORAM_CHR09002_SEC_06 av
Intensidad [%]
16
14
12
10
8
6
4
2
0
1
10
100
1000
10000
Tamaño [nM]

Figura 23

A


Variante A
P19 Stand/Rekri
Temperatura [°C]
Druck [mbar]
Tiempo [min]
T Soll
T Ist
Fühler 1
Fühler 2
p Soll
p Ist

B

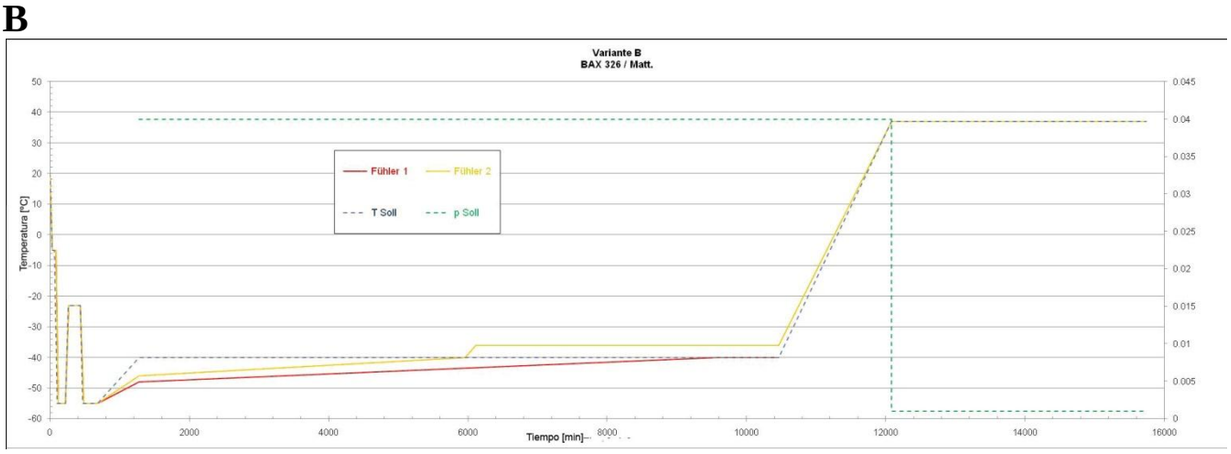

Variante B
BAX 326 / Matt.
Temperatura [°C]
Tiempo [min]
Fühler 1
Fühler 2
T Soll
p Soll

Figura 24A

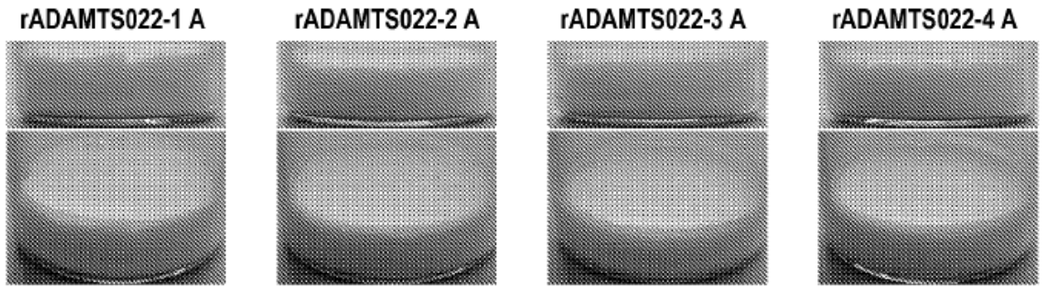


Figura 24B

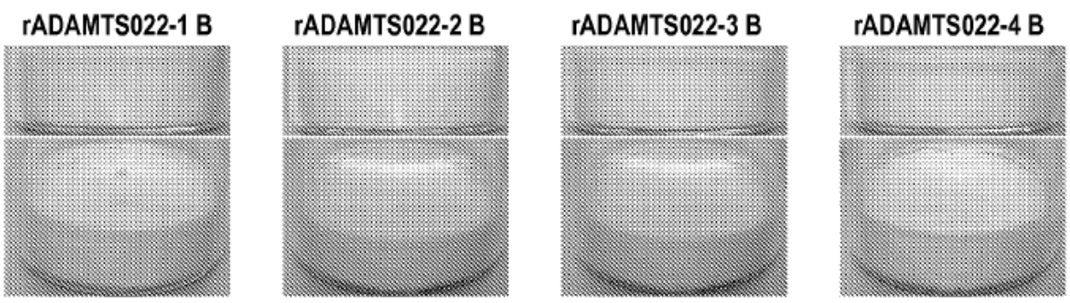


Figura 24C

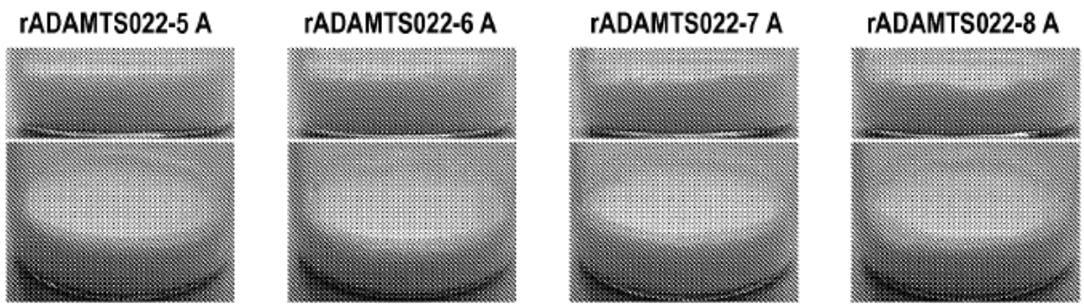


Figura 24D

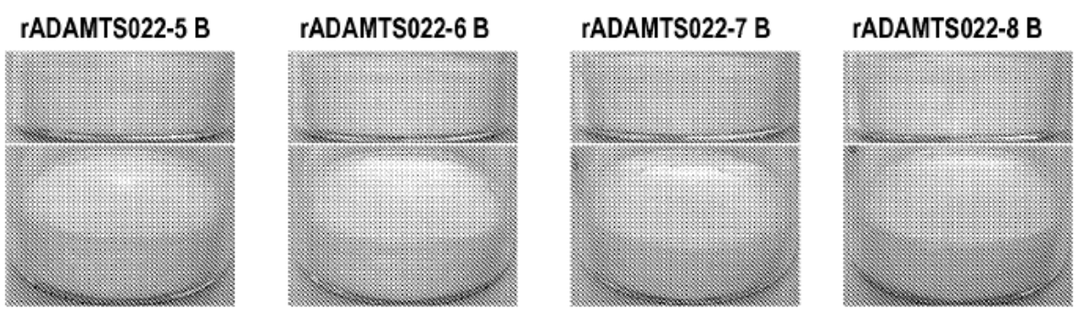
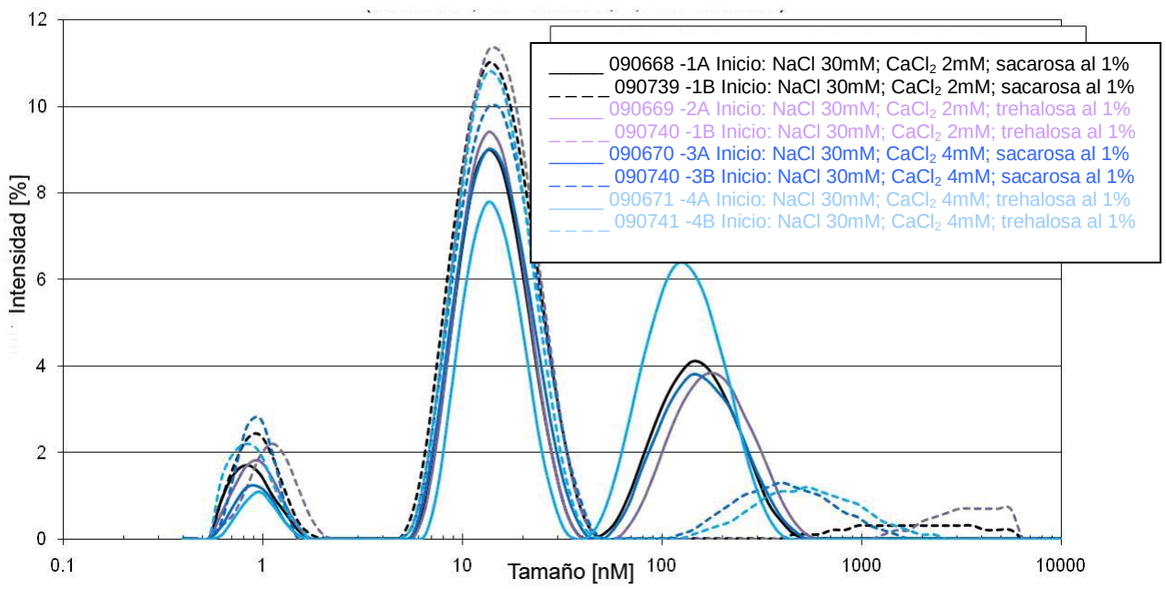


Figura 25

A

Inicio de liofilización rADAMTS22 A e inicio de liofilización rADAMTS22 B: tamaño por intensidad
(HIS 20mM; manitol al 3%; Tween 80 al 0,05%)



B

Inicio de liofilización rADAMTS022 A e inicio de liofilización rADAMTS022 B: tamaño por intensidad
(HIS 20mM; manitol al 3%; Tween 80 al 0,05%)

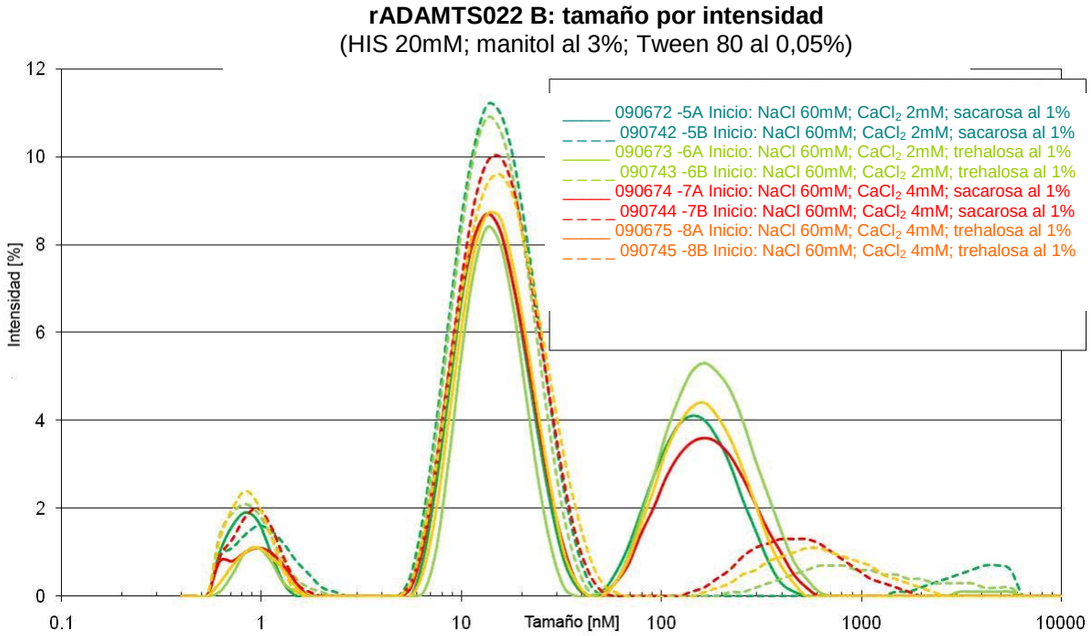


Figura 26

TSP1
S
P
Dominio catalítico
Desin-tegrina
1
Rico en cisteína
RGD
espaciador
2
3
4
5
6
7
8
CUB
CUB
precursor 1427aa
Furina

Figura 27

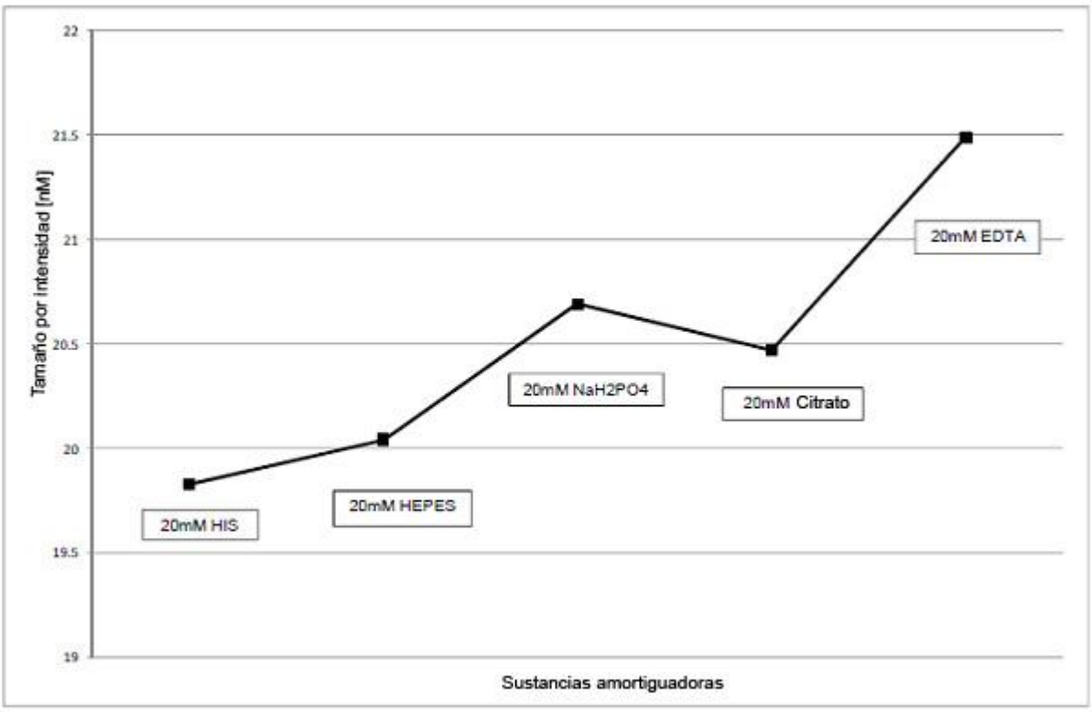

22
21.5
21
20.5
20
19.5
19
Tamaño por Intensidad [nM]
20mM HIS
20mM HEPES
20mM NaH2PO4
20mM Citrato
20mM EDTA
Sustancias amortiguadoras

Figura 28

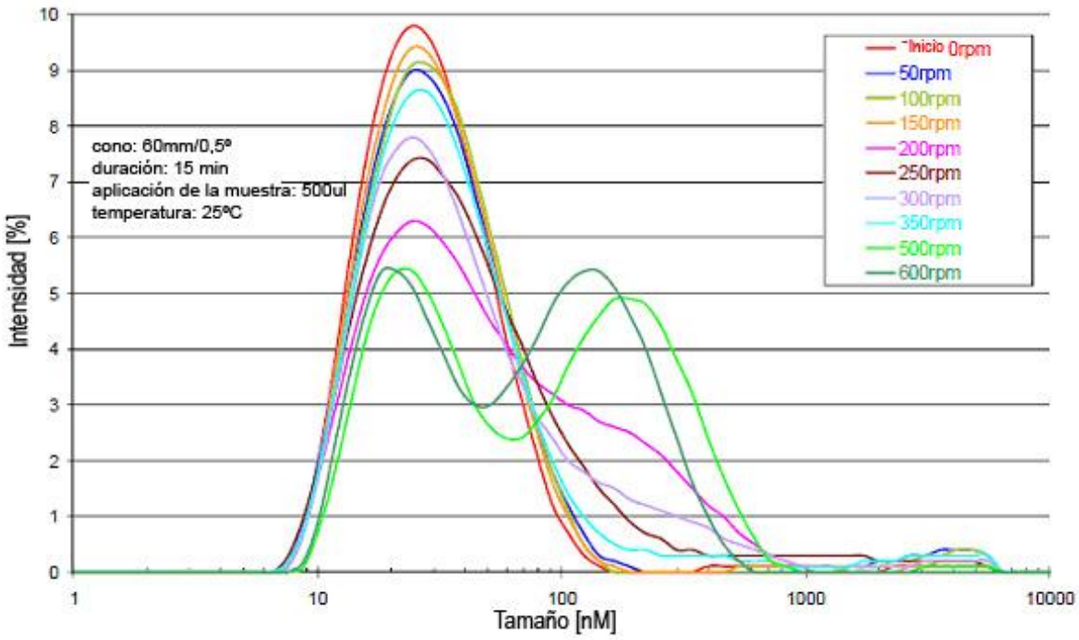

cono: 60mm/0,5º
duración: 15 min
aplicación de la muestra: 500ul
temperatura: 25ºC
Inicio 0rpm
50rpm
100rpm
150rpm
200rpm
250rpm
300rpm
350rpm
500rpm
600rpm
Intensidad [%]
Tamaño [nM]
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
1
10
100
1000
10000

Figura 29

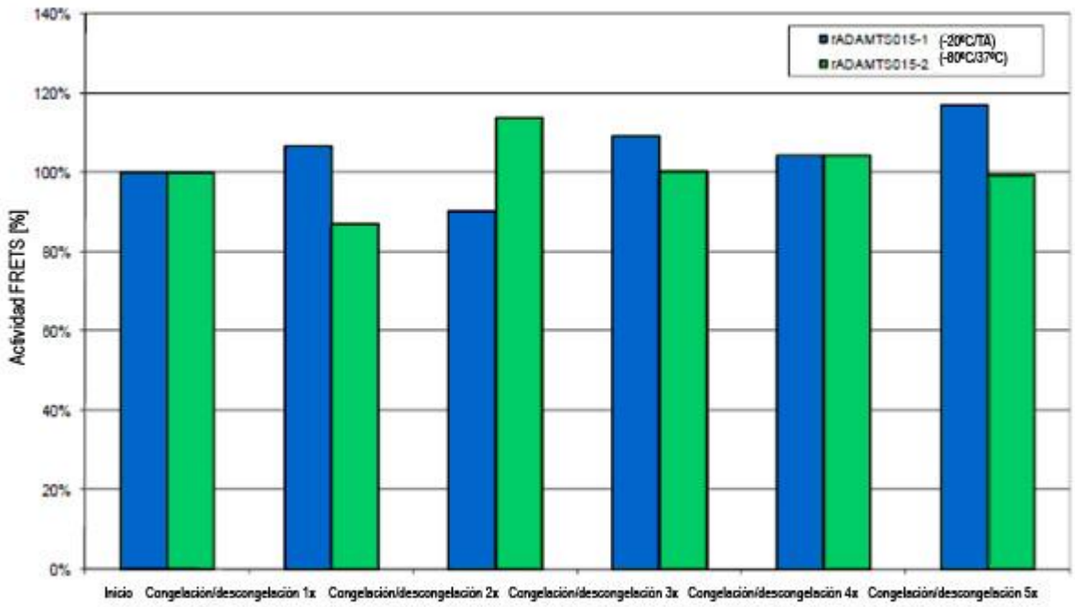

140%
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
Actividad FRETS [%]
rADAMTS015-1 (-20ºC/TA)
rADAMTS015-2 (-80ºC/37ºC)
Inicio
Congelación/descongelación 1x
Congelación/descongelación 2x
Congelación/descongelación 3x
Congelación/descongelación 4x
Congelación/descongelación 5x

Figura 30

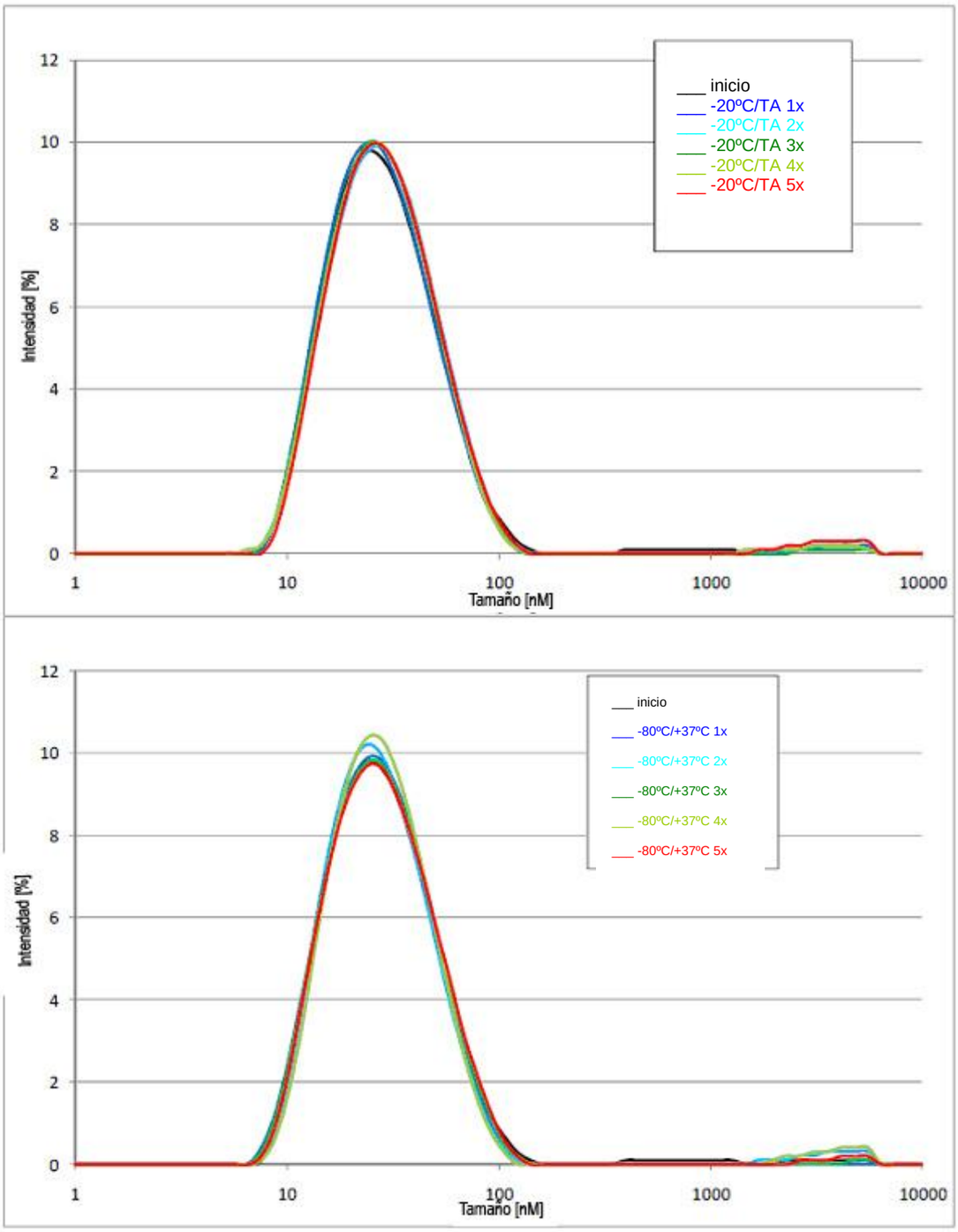

inicio
-20ºC/TA 1x
-20ºC/TA 2x
-20ºC/TA 3x
-20ºC/TA 4x
-20ºC/TA 5x
Intensidad [%]
Tamaño [nM]
inicio
-80ºC/+37ºC 1x
-80ºC/+37ºC 2x
-80ºC/+37ºC 3x
-80ºC/+37ºC 4x
-80ºC/+37ºC 5x
Intensidad [%]
Tamaño [nM]

Figura 31

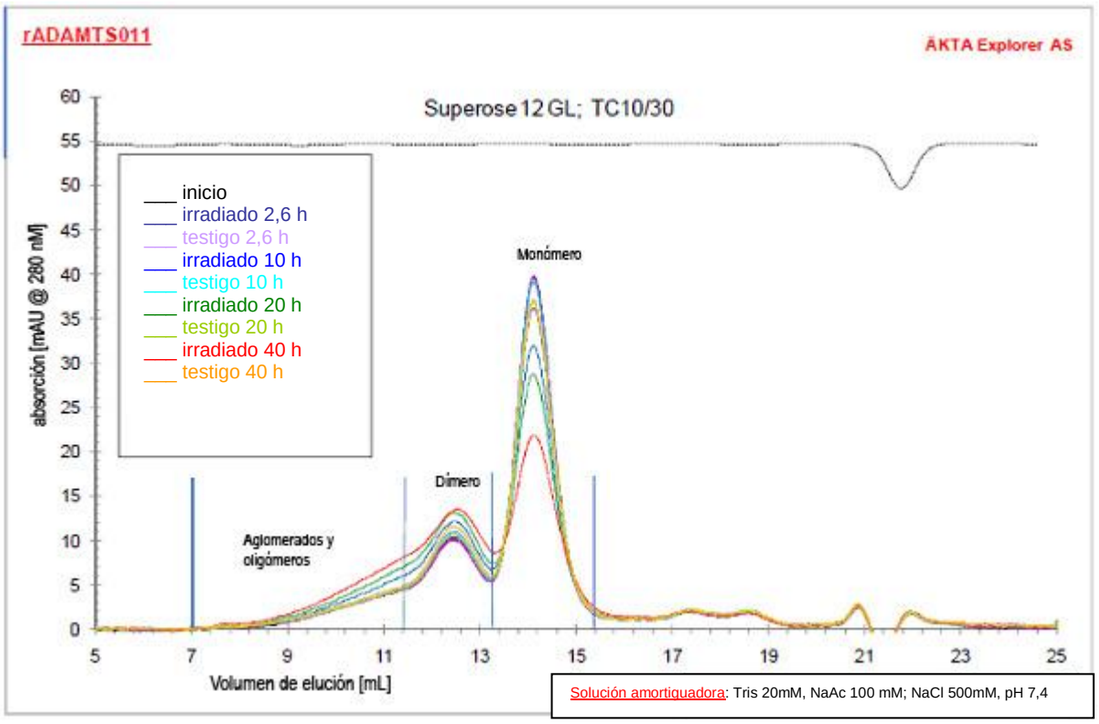
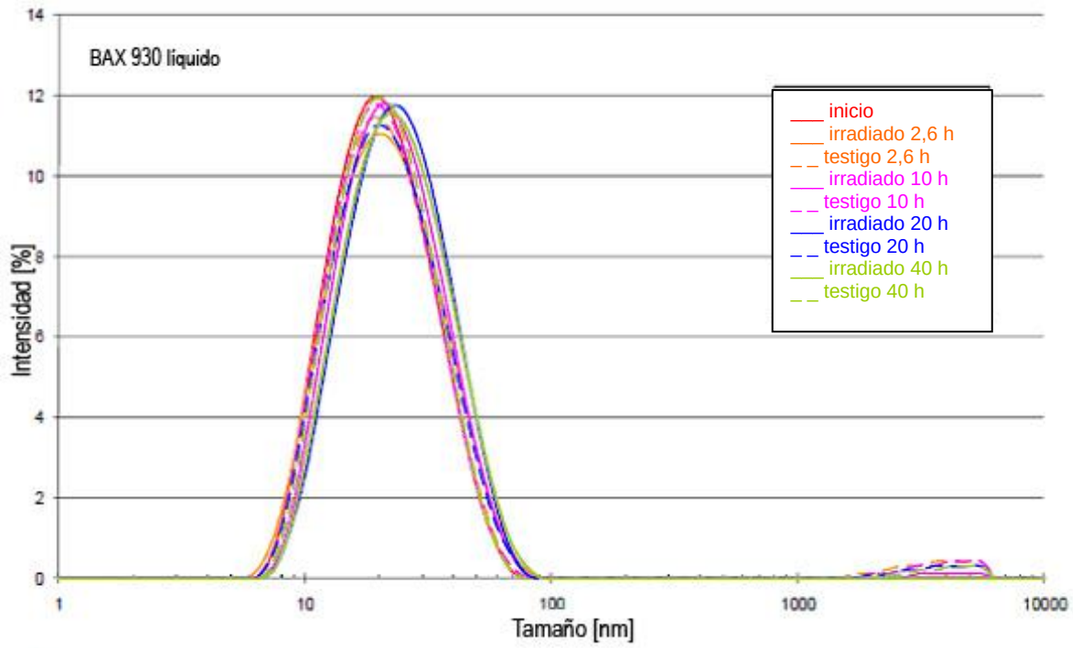

rADAMTS011
ÁKTA Explorer AS
Superose 12 GL; TC10/30
inicio
irradiado 2,6 h
testigo 2,6 h
irradiado 10 h
testigo 10 h
irradiado 20 h
testigo 20 h
irradiado 40 h
testigo 40 h
Monómero
Dímero
Aglomerados y oligómeros
absorción [mAU @ 280 nM]
Volumen de elución [mL]
Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

Figura 32


BAX 930 líquido
___ inicio
___ irradiado 2,6 h
_ _ testigo 2,6 h
___ irradiado 10 h
_ _ testigo 10 h
___ irradiado 20 h
_ _ testigo 20 h
___ irradiado 40 h
_ _ testigo 40 h
Intensidad [%]
Tamaño [nm]
0
2
4
6
8
10
12
14
1
10
100
1000
10000

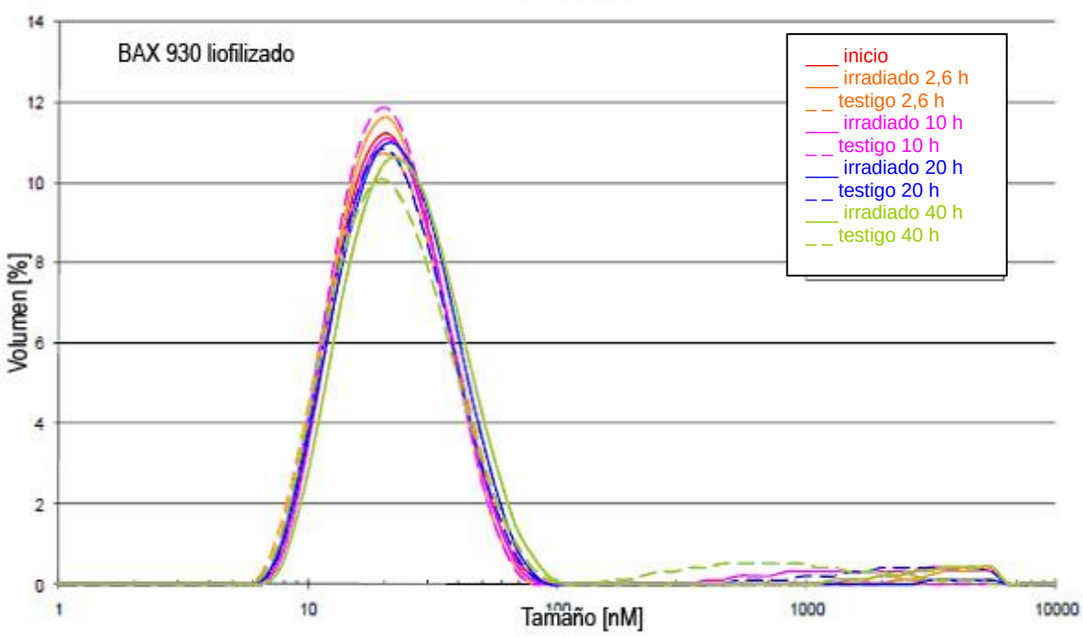

BAX 930 liofilizado
___ inicio
___ irradiado 2,6 h
_ _ testigo 2,6 h
___ irradiado 10 h
_ _ testigo 10 h
___ irradiado 20 h
_ _ testigo 20 h
___ irradiado 40 h
_ _ testigo 40 h
Volumen [%]
Tamaño [nM]
0
2
4
6
8
10
12
14
1
10
100
1000
10000

Figura 33

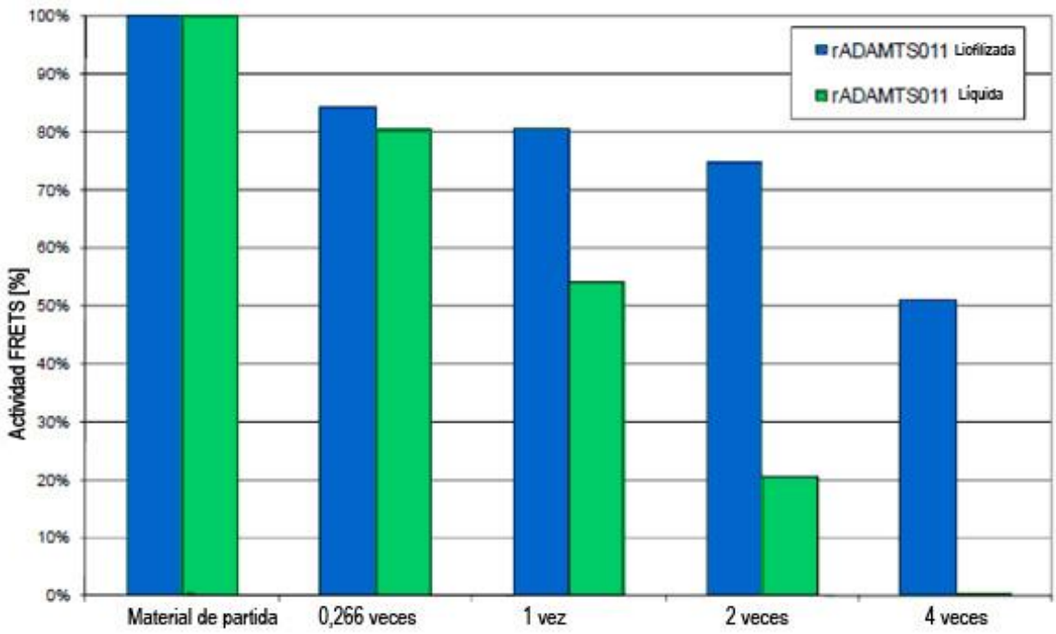

100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
Actividad FRETS [%]
rADAMTS011 Liofilizada
rADAMTS011 Líquida
Material de partida
0,266 veces
1 vez
2 veces
4 veces

Figura 34

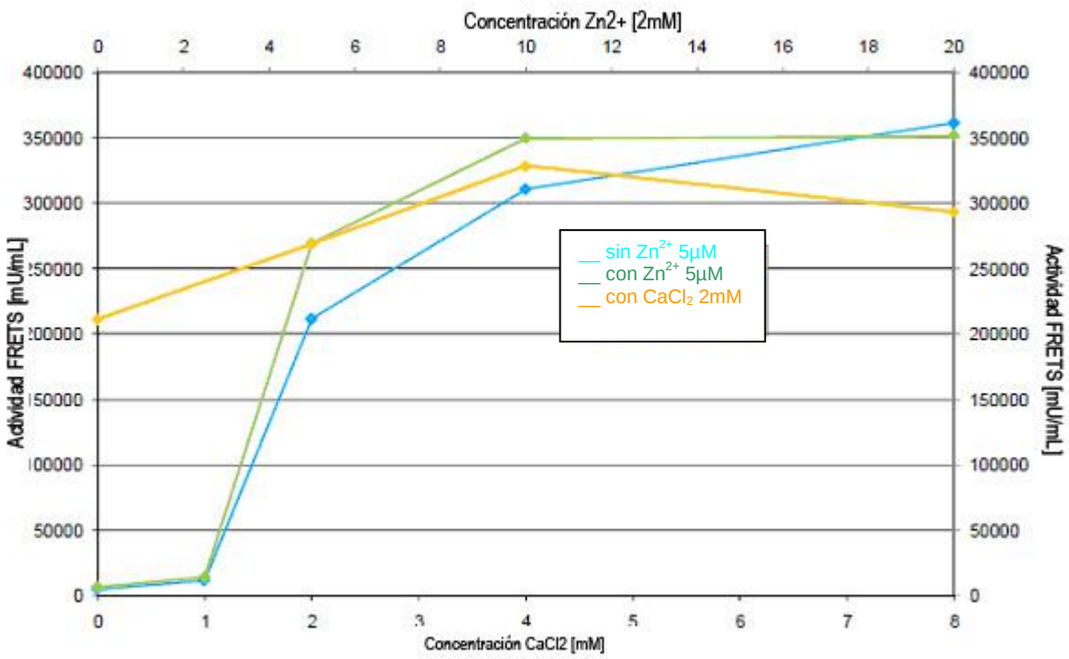

Concentración Zn2+ [2mM]
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
400000
350000
300000
250000
200000
150000
100000
50000
0
Actividad FRETS [mU/mL]
sin Zn2+ 5µM
con Zn2+ 5µM
con CaCl2 2mM
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Concentración CaCl2 [mM]

Figura 35

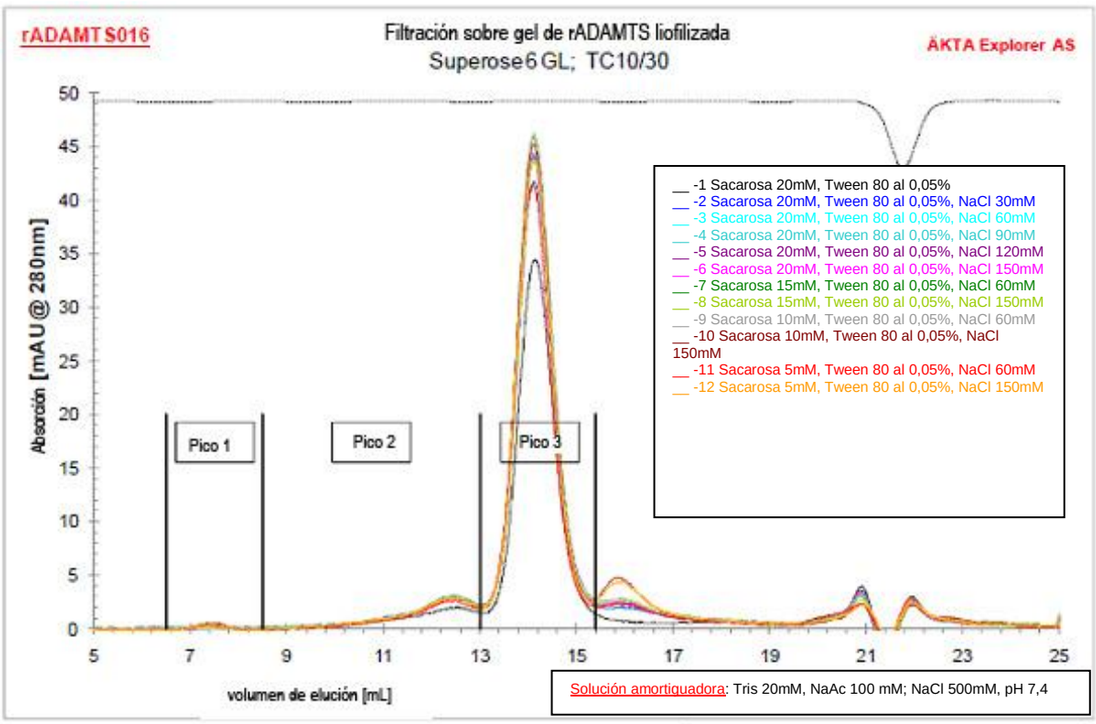

rADAMTS016
Filtración sobre gel de rADAMTS liofilizada
Superose6 GL; TC10/30
ÄKTA Explorer AS
Absorción [mAU@ 280nm]
volumen de elución [mL]
Pico 1
Pico 2
Pico 3
-1 Sacarosa 20mM, Tween 80 al 0,05%
-2 Sacarosa 20mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 30mM
-3 Sacarosa 20mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 60mM
-4 Sacarosa 20mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 90mM
-5 Sacarosa 20mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 120mM
-6 Sacarosa 20mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 150mM
-7 Sacarosa 15mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 60mM
-8 Sacarosa 15mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 150mM
-9 Sacarosa 10mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 60mM
-10 Sacarosa 10mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 150mM
-11 Sacarosa 5mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 60mM
-12 Sacarosa 5mM, Tween 80 al 0,05%, NaCl 150mM
Solución amortiguadora: Tris 20mM, NaAc 100 mM; NaCl 500mM, pH 7,4

Figura 36

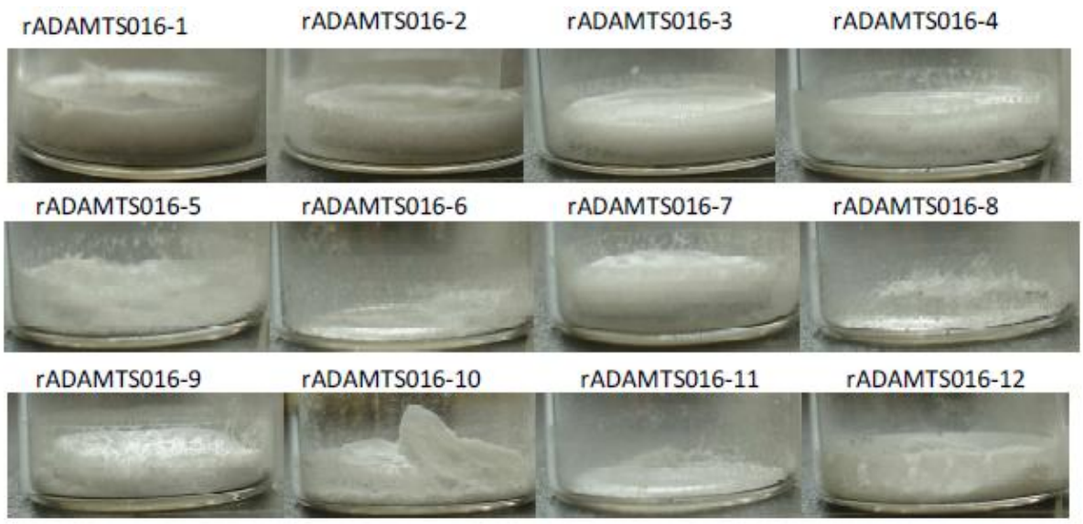

rADAMTS016-1
rADAMTS016-2
rADAMTS016-3
rADAMTS016-4
rADAMTS016-5
rADAMTS016-6
rADAMTS016-7
rADAMTS016-8
rADAMTS016-9
rADAMTS016-10
rADAMTS016-11
rADAMTS016-12

Figura 37

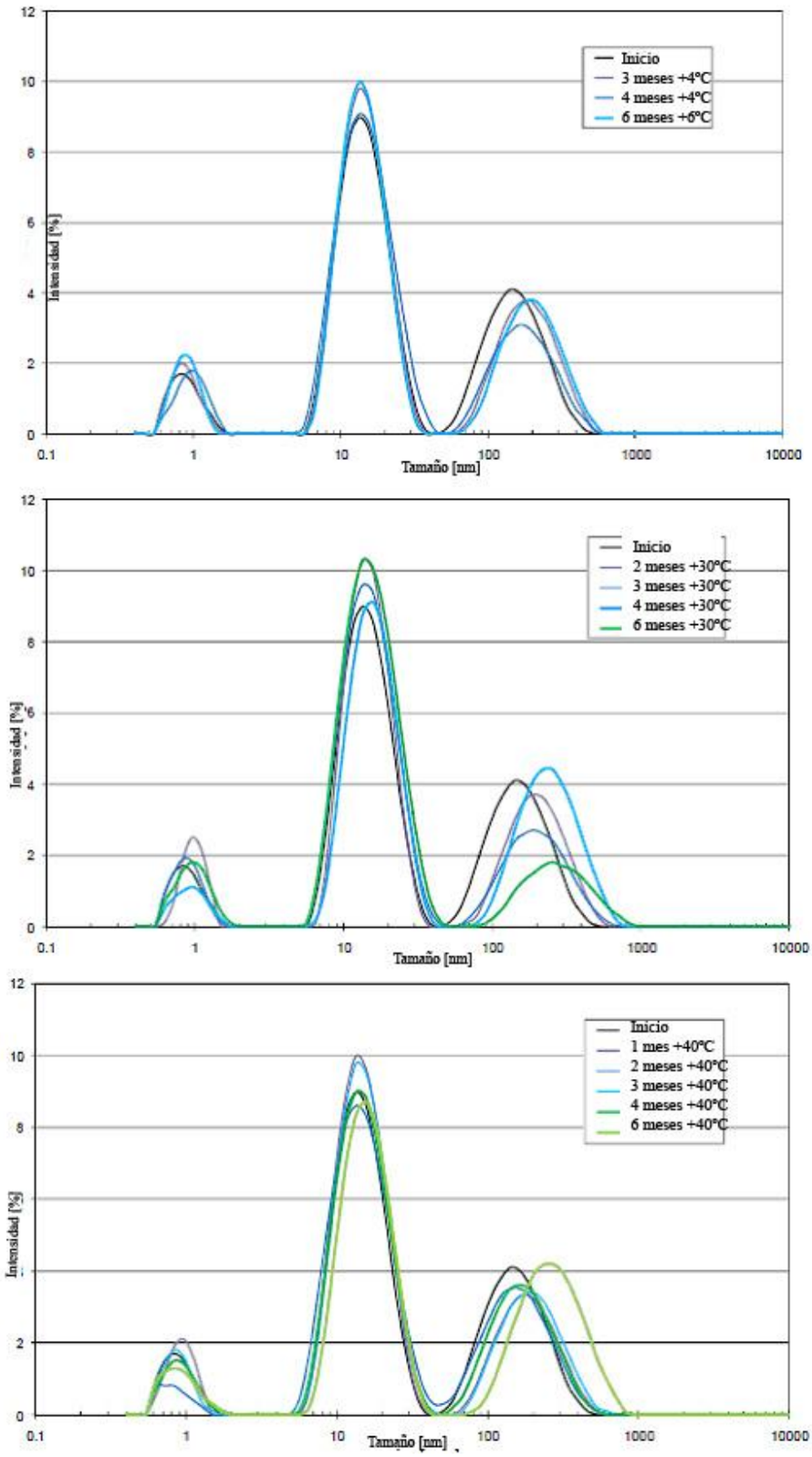

Inicio
3 meses +4ºC
4 meses +4ºC
6 meses +6ºC
Intensidad [%]
Tamaño [nm]
Inicio
2 meses +30ºC
3 meses +30ºC
4 meses +30ºC
6 meses +30ºC
Intensidad [%]
Tamaño [nm]
Inicio
1 mes +40ºC
2 meses +40ºC
3 meses +40ºC
4 meses +40ºC
6 meses +40ºC
Intensidad [%]
Tamaño [nm]

Figura 38

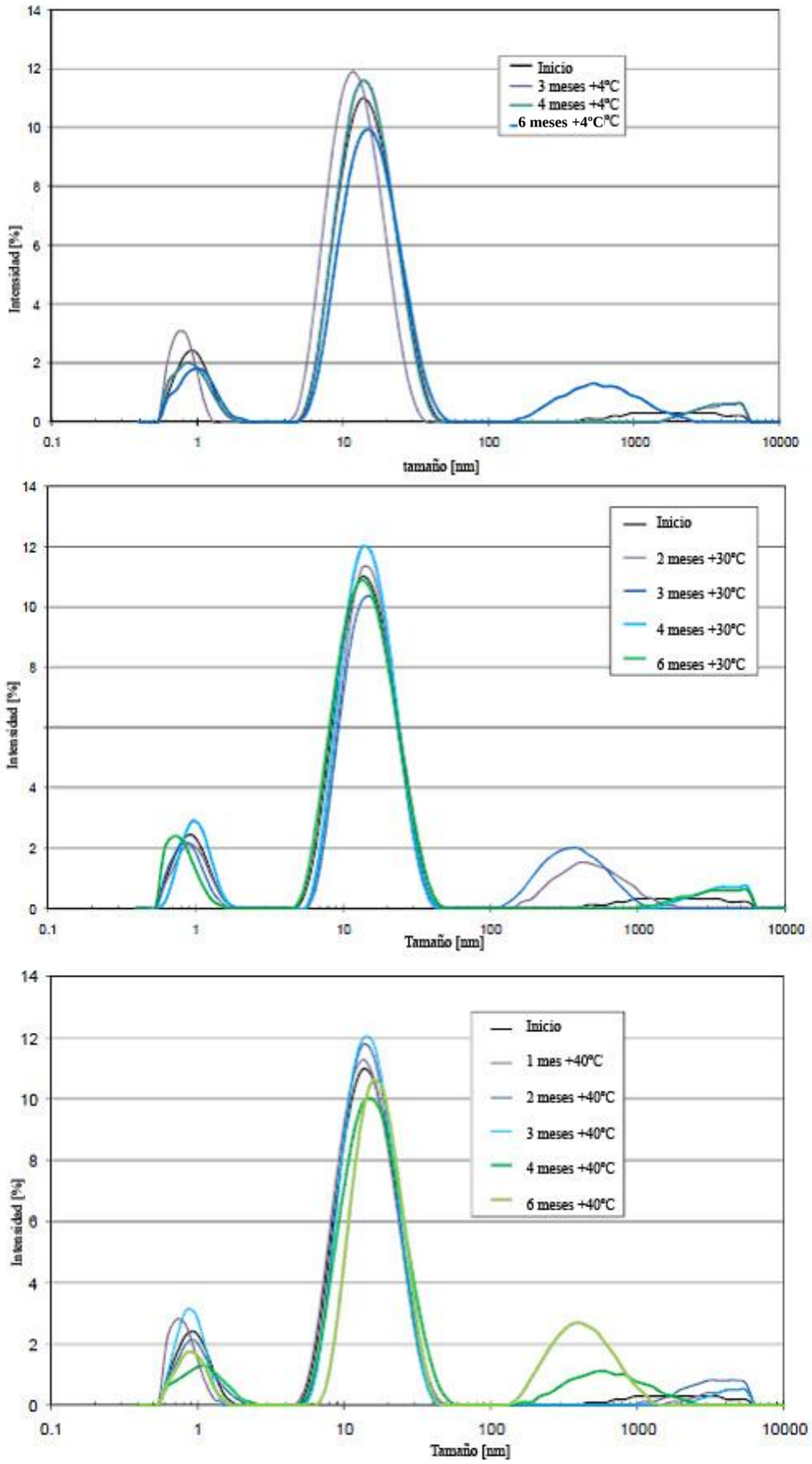
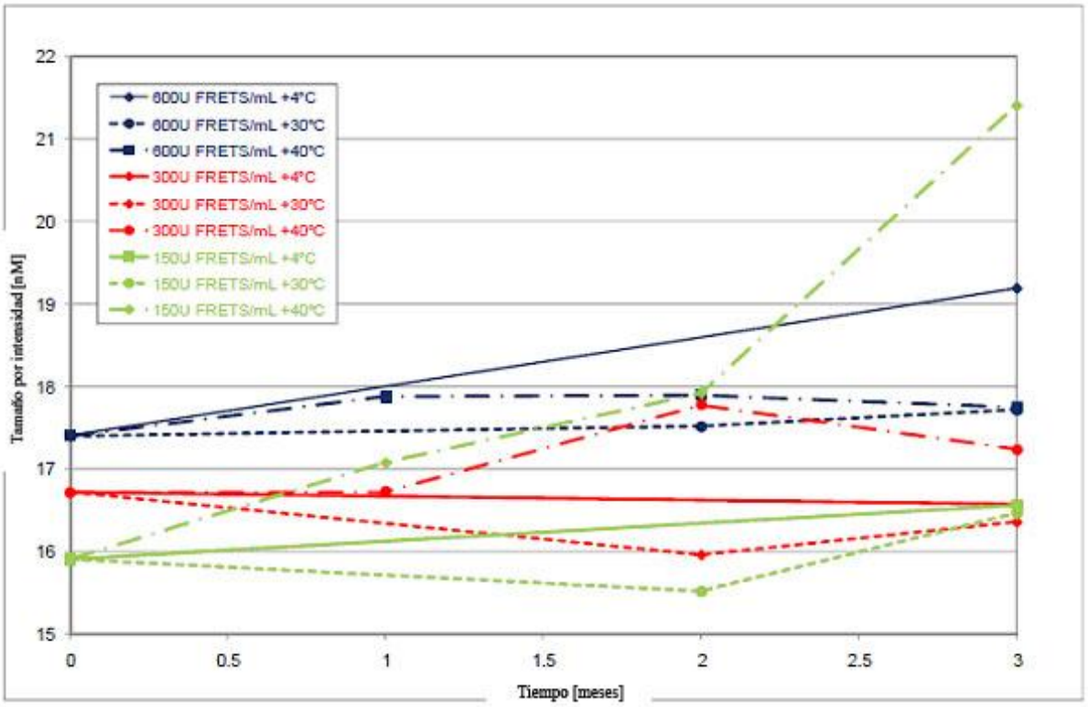

Inicio
3 meses +4ºC
4 meses +4ºC
6 meses +4ºC/ºC
Intensidad [%]
tamaño [nm]
Inicio
2 meses +30ºC
3 meses +30ºC
4 meses +30ºC
6 meses +30ºC
Intensidad [%]
Tamaño [nm]
Inicio
1 mes +40ºC
2 meses +40ºC
3 meses +40ºC
4 meses +40ºC
6 meses +40ºC
Intensidad [%]
Tamaño [nm]

Figura 39


600U FRETS/mL +4°C
600U FRETS/mL +30°C
600U FRETS/mL +40°C
300U FRETS/mL +4°C
300U FRETS/mL +30°C
300U FRETS/mL +40°C
150U FRETS/mL +4°C
150U FRETS/mL +30°C
150U FRETS/mL +40°C
Tamaño por intensidad [nM]
Tiempo [meses]
22
21
20
19
18
17
16
15
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0058778

Bogotá D.C., Junio 04 de 2014 - 09:25:04

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 83.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	58593	04/06/2014		31.561.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	464.000.00	464.000.00
				$464.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SESENTA Y CUATRO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE*

Responsable: _____
-*****-
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 111235

Bogotá D.C., Octubre 21 de 2014 - 09:55:23

RECIBIDO DE : CLARKE MODET NI 830.008.643 RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	58704	04/06/2014		31.000.00
RECIBO DE CA	999999999	94072	03/09/2014		212.000.00
RECIBO DE CA	999999999	94073	03/09/2014		212.000.00
RECIBO DE CA	999999999	105664	03/10/2014		212.000.00
RECIBO DE CA	999999999	105711	03/10/2014		515.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
38	50005-01-01 SOLICITUDES	1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA ADICIONAL A LAS 10 INIC	31.000.00	1.178.000.00
				$1.178.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N CIENTO SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
-***-

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____