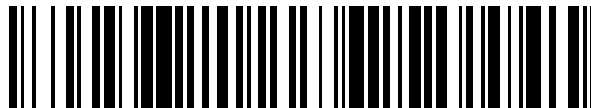


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 831 414**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.02.2011 E 18177157 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.09.2020 EP 3409289**

54 Título: **Composiciones estables que contienen anticuerpos**

30 Prioridad:

**26.02.2010 EP 10154771**  
**04.03.2010 US 31048010 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**08.06.2021**

73 Titular/es:

**NOVO NORDISK A/S (100.0%)**  
**Novo Allé**  
**2880 Bagsværd, DK**

72 Inventor/es:

**PARSHAD, HENRIK**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**ES 2 831 414 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones estables que contienen anticuerpos

## 5 Campo de la invención

La invención se refiere a composiciones líquidas estables y de baja viscosidad que contienen proteínas, en particular, pero no exclusivamente anticuerpos estables, y al uso de dichas composiciones en la terapia, en particular para el suministro subcutáneo de dicha proteína estable.

10

## Antecedentes de la invención

Las inmunoglobulinas, los anticuerpos monoclonales (mAb) y los anticuerpos humanizados se han desarrollado como productos farmacéuticos durante varios años. Existe un claro incentivo para desarrollar formulaciones líquidas de alta concentración de mAb debido al potencial de la administración subcutánea que resulta en una mayor comodidad para el paciente. Sin embargo, existe un consenso general de que el desarrollo de formulaciones de mAb de alta concentración plantea serios desafíos con respecto a la estabilidad física y química del mAb, tal como una mayor formación de agregados solubles e insolubles que potencian la probabilidad de una respuesta inmunogénica así como también dar lugar a una baja bioactividad.

20

La formación de agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar adversamente la actividad biológica de ese polipéptido, lo que resulta en la pérdida de la eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados puede provocar otros problemas tales como el bloqueo de tubos, membranas, o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptidos se administra mediante el uso de un sistema de infusión.

25

Además, se ha informado que las formulaciones de mAb de alta concentración dan como resultado un aumento de la viscosidad, lo que crea serios desafíos para la capacidad de fabricación y la inyectabilidad.

30 Controlar la agregación y la viscosidad de las formulaciones líquidas de mAb de alta concentración no es un asunto trivial. El hecho de que solo existan pocos productos de mAb en el mercado como una formulación líquida de alta concentración ( $\geq 100$  mg/ml) muestra la complejidad. Se han publicado artículos que muestran que el NaCl puede disminuir la viscosidad y también hasta cierto punto controlar la agregación (documento EP 1981824). También se ha demostrado que la sacarosa estabiliza el mAb frente a la formación de agregados mediante un mecanismo de exclusión preferencial. Sin embargo, la identificación de estabilizadores adecuados es todavía una ciencia empírica en este campo.

35

Es bien sabido que se usan cantidades relativamente altas de electrolitos, tales como sal y tampón, para disminuir la viscosidad de las formulaciones de mAb de alta concentración (documento EP 1981824). El documento WO 40 01/24814 (Chiron Corporation) describe una composición farmacéutica líquida que contiene polipéptidos que comprende una base de aminoácidos como estabilizador. El documento EP 1336410 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) describe una formulación farmacéutica inyectable que contiene una proteína fisiológicamente activa y al menos un azúcar como un agente suavizante. El documento EP 1314437 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) describe una preparación que contiene un anticuerpo que comprende un tampón de glicina y/o histidina. El documento WO 45 02/30463 (Genentech, Inc) describe una formulación de proteína concentrada que tiene una viscosidad reducida y una sal y/o tampón en una cantidad de al menos aproximadamente 50 mM. El documento EP 1475100 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) describe una solución que contiene un anticuerpo que comprende un ácido orgánico y un tensioactivo como estabilizadores. El documento EP 1475101 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) describe una solución que contiene un anticuerpo que comprende un azúcar como estabilizador. El documento WO 50 2004/001007 (IDEC Pharmaceuticals Corporation) describe una composición de anticuerpo concentrada que consiste esencialmente en tampón de histidina o acetato en el intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 48 mM. El documento WO 2004/016286 (Abbot Laboratories (Bermuda) Ltd.) describe una formulación de anticuerpos humanos que tiene un pH de entre aproximadamente 4 y 8. El documento WO 55 2005/123131 (Medimmune Vaccines, Inc) describe una formulación para secar por pulverización un anticuerpo o vacuna. El documento WO 2007/003936 (Insense Limited) describe un sistema acuoso estable que comprende una proteína y uno o más agentes estabilizadores que tienen grupos ionizables. El documento WO 2007/092772 (Medimmune, Inc.) describe una formulación líquida de proteína que comprende una proteína variante Fc y un agente tampón entre 1 mM y 100 mM. El documento US 2004/0022792 (Immunex Corporation) describe un método para estabilizar una proteína a un pH de entre aproximadamente 2,8 y aproximadamente 4,0. El documento US 60 2003/0180287 (Immunex Corporation) describe una composición farmacéutica acuosa adecuada para el almacenamiento a largo plazo de polipéptidos. El documento WO 2008/071394 (F. Hoffmann-La Roche AG) describe una formulación parenteral farmacéutica estable que contiene un anticuerpo. Los documentos WO 2009/120684 y WO 2008/121615 (MedImmune Inc) ambos describen formulaciones líquidas de alta concentración de anticuerpos o fragmentos de estos que se unen específicamente a un polipéptido de interferón alfa humano. El documento WO 65 2009/070642 (MedImmune Inc) describe formulaciones liofilizadas estables de anticuerpos biespecíficos o fragmentos de estos. El documento EP 1 977 763 (Chugai Seiyaku Kabushiki Kaisha) describe

composiciones estabilizadoras que contienen anticuerpos que comprenden uno o más aminoácidos. El documento US 2004/0197324 (Genentech, Inc) describe formulaciones de proteínas y anticuerpos altamente concentrados con viscosidad reducida. El documento WO 2008/132439 (Universidad de Strathclyde) describe composiciones estabilizadoras de la precipitación que se reivindican para prevenir o reducir la agregación. El documento US 2007/0020255 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) describe un método para estabilizar un anticuerpo en solución que comprende la adición de glicina y ácido cítrico a la solución. El documento US 2007/0184050 (Kirin Beer Kabushiki Kaisha) describe una formulación líquida estable que contiene un anticuerpo en un tampón de glutamato y/o un tampón de citrato. El documento US2009/0280129 (Genentech describe formulaciones de proteínas y anticuerpos de alta concentración. El documento WO 2010/017196 describe anticuerpos monoclonales contra un inhibidor de la vía del factor tisular. Ragni y otros, (2000) Circulation, 102: 113-117 sugiere que el TFPI endógeno está involucrado en el proceso de formación de trombos *in vivo*, desempeñando un papel activo en la modulación de la trombosis arterial.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de una composición farmacéutica de anticuerpo de alta concentración estable que tenga una viscosidad baja y factible que sea adecuada para la administración subcutánea, tal como en un dispositivo listo para usar. Además, desde el punto de vista del paciente, sería muy conveniente tener productos estables a temperatura ambiente. En este momento, no hay formulaciones de mAb comercializadas donde el almacenamiento a temperatura ambiente sea una posibilidad durante la vida útil del producto farmacéutico. Típicamente, se produce un aumento de la degradación de las proteínas formando un alto nivel inaceptable de agregados e impurezas relacionadas con las proteínas, que pueden dar lugar a reacciones inmunogénicas.

Muchos de los productos de mAb comercializados contienen tensioactivos en su formulación. Típicamente, los tensioactivos se añaden para reducir el estrés interfacial que puede inducir la agregación de proteínas y la formación de partículas que conducen a una calidad inaceptable del producto. Los ejemplos de estrés interfacial podrían ser el contacto de la proteína con i) aire ii) material de cierre del contenedor, tal como émbolo de goma, pistón, vidrio, jeringas prellenadas iii) materiales relacionados con la producción, tales como tanques de acero, tubos y bombas iv) hielo, durante la congelación/descongelación, etc. Sin embargo, los tensioactivos como los polisorbatos contienen típicamente un residuo de peróxidos que pueden oxidar la molécula de proteína y comprometer la calidad del producto. Además, desde el punto de vista de la fabricación, la adición de polisorbatos requiere una etapa adicional en la producción, ya que la ultra/diafiltración es difícil de realizar cuando la formulación contiene dichos polisorbatos. La formación de productos oxidados es un tema desafiante, por lo tanto, se requiere un manejo cuidadoso de los polisorbatos para controlar la formación de productos oxidados. Por tanto, sería conveniente diseñar formulaciones sin tensioactivos, tanto desde el punto de vista de la estabilidad como de la fabricación.

## Resumen de la invención

La presente invención se refiere a una composición líquida estable que comprende una proteína que es un anticuerpo, una sal y un tampón; en donde la concentración total de dicha sal y tampón está entre 5 y 100 mM, en donde la concentración de la sal es 50 mM o menor y en donde la concentración del tampón es 50 mM o menor; y que tiene un pH de entre 5,0 y 7,0, tal como 6,0 o 6,5; en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal anti-TFPI HzTFPI4F36 descrito en el documento WO2010/072691, las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de HzTFPI4F36 se proporcionan en las SEQ ID NO: 21 y 24 del documento WO2010/072691, respectivamente. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende tal una composición para su uso en el tratamiento de una coagulopatía, tal como la hemofilia A, con o sin inhibidores, o hemofilia B, con o sin inhibidores.

## Descripción detallada de la invención

En la presente descripción se describe una composición líquida estable que comprende una proteína, una sal y/o un tampón, caracterizada porque la concentración total de dicha sal y tampón es inferior a 100 mM.

Sorprendentemente, se ha encontrado que las composiciones estables de proteína con bajas cantidades de sal y tampón tienen una viscosidad baja y factible, tal como una viscosidad de < 50 cP a 25 °C.

La baja viscosidad de las formulaciones farmacéuticas es especialmente conveniente para la inyección subcutánea, pero también es conveniente para otras formulaciones líquidas, en las que, por ejemplo, mejora la manipulación de la formulación.

El término "composición estable" se refiere a una composición con estabilidad física satisfactoria, estabilidad química satisfactoria o estabilidad física y química satisfactoria.

El término "estabilidad física" de la composición de proteína como se usa en la presente descripción se refiere a la tendencia de la proteína a formar agregados inactivos biológicamente y/o insolubles de la proteína como resultado de la exposición de la proteína a estrés termomecánico y/o interacción con las interfaces y las superficies que son desestabilizantes, tales como las superficies e interfaces hidrófobas. La estabilidad física de las composiciones acuosas de proteínas se evalúa por medio de inspección visual y/o mediciones de la turbidez después de exponer la

composición vertida en contenedores adecuados (por ejemplo, cartuchos o viales). Es una cualidad inherente de las formulaciones altamente concentradas de mab exhibir opalescencia debido a la dispersión de Raleigh. Por tanto, una composición no se puede clasificar como físicamente inestable con respecto a la agregación de proteínas, cuando muestra turbidez visual a la luz del día. Sin embargo, cuando hay precipitados o separación de fases visible a la luz del día, la formulación se clasifica como físicamente inestable.

El término "estabilidad química" de la composición de proteína como se usa en la presente descripción se refiere a cambios químicos covalentes en la estructura de la proteína que conducen a la formación de productos de degradación química con una posible menor potencia biológica y/o un aumento potencial de las propiedades inmunogénicas en comparación con la estructura de la proteína natural. Pueden formarse diversos productos de degradación química en dependencia del tipo y la naturaleza de la proteína natural y del entorno al que se expone la proteína. La eliminación de la degradación química muy probablemente puede no evitarse completamente y a menudo se observan cantidades aumentadas de productos de degradación química durante el almacenamiento y el uso de la composición de proteínas es bien conocido por el experto en la técnica. La mayoría de las proteínas son propensas a la desamidación, un proceso en el que se hidroliza el grupo amida de la cadena lateral en residuos glutaminilo o asparaginilo para formar un ácido carboxílico libre. Otras rutas de degradación implican la formación de productos de transformación de alto peso molecular donde dos o más moléculas de proteína se unen covalentemente entre sí mediante transamidación y/o interacciones disulfuro que conducen a la formación de productos de degradación de dímeros, oligómeros y polímeros unidos covalentemente (*Stability of Protein Pharmaceuticals*, Ahern. T.J. & Manning M.C., Plenum Press, Nueva York, 1992). La oxidación (de, por ejemplo, residuos de metionina) puede mencionarse como otra variante de la degradación química. La estabilidad química de la composición de proteína puede evaluarse mediante la medición de la cantidad de productos de degradación química en varios puntos de tiempo después de la exposición a diferentes condiciones ambientales (a menudo la formación de productos de degradación puede acelerarse, por ejemplo, mediante el aumento de la temperatura). La cantidad de cada producto de degradación individual a menudo se determina por separación de los productos de degradación en dependencia del tamaño de la molécula y/o la carga mediante el uso de diversas técnicas de cromatografía (por ejemplo, SEC-HPLC y/o RP-HPLC).

SEC-HPLC se usa en particular para la cuantificación de agregados de proteínas. Las muestras se pueden analizar, por ejemplo, mediante el uso de una columna TSK G3000 SWXL, elución isocrática y detección UV subsecuente a 214 nm. Este método se usa para determinar el contenido de IgG monomérico y el % de HMWP que consiste en especies dimericas o más grandes que se separan de acuerdo con el tamaño por la resina de gel. El contenido de monómero y el % de HMWP se determinan en relación con el contenido de proteína total detectado por el método.

Por tanto, como se ha señalado anteriormente, una composición estable se refiere a una composición con estabilidad física satisfactoria, estabilidad química satisfactoria o estabilidad física y química satisfactoria. Una estabilidad satisfactoria de una formulación puede ser aquella en donde menos del 10 % y preferentemente menos del 5 % de la proteína es un agregado (HMWP) en la formulación. En general, una composición debe ser estable durante el uso y el almacenamiento (de acuerdo con el uso recomendado y las condiciones de almacenamiento) hasta que se alcance la fecha de vencimiento.

Viscosidad como se usa en la presente descripción se usa como viscosidad absoluta, también denominada viscosidad dinámica. Las mediciones se realizan mediante la técnica de cono y placa con un elemento Peltier fijado a 25 °C, y donde se aplica un gradiente de esfuerzo cortante bien definido a una muestra y se mide la velocidad de corte resultante. La viscosidad es la relación entre el esfuerzo cortante y la velocidad de corte. La viscosidad absoluta se expresa en unidades de centipoise (cP) a 25 °C.

El término "temperatura ambiente", como se usa en la presente descripción, significa una temperatura de la habitación y donde no se requiere algún tipo de efecto de enfriamiento. La temperatura ambiente está entre 15 y 30° C, tal como entre 20 y 30 °C, tal como 20 °C, 25 °C o 30 °C.

El término "proteína", "polipéptido" y "péptido", como se usan en la presente descripción, significan un compuesto formado por al menos cinco aminoácidos constituyentes conectados por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos codificados por el código genético y pueden ser aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético, así como también aminoácidos sintéticos. Los aminoácidos naturales que no se codifican por el código genético son, por ejemplo, hidroxiprolina, y-carboxiglutamato, ornitina, fosfoserina, D-alanina y D-glutamina. Los aminoácidos sintéticos comprenden los aminoácidos fabricados mediante síntesis química, es decir, los D-isómeros de los aminoácidos codificados por el código genético tales como D-alanina y D-leucina, Aib (ácido  $\alpha$ -aminoisobutírico), Abu (ácido  $\alpha$ -aminobutírico), Tle (terc-butilglicina),  $\beta$ -alanina, ácido 3-aminometil benzoico y ácido antranílico.

En una modalidad, la concentración total de sal y tampón es 95 mM o menos, tal como cualquiera de 90, 85, 80, 75, 70, 65 o 60 mM o menos. En una modalidad, la concentración total de sal y tampón es inferior a 60 mM, tal como 50 mM o menos, tal como 45, 40, 35, 33, 30, 25, 20 mM o menos.

En algunas modalidades, la sal puede tener una capacidad tamponadora al pH relevante y, en algunas modalidades, el tampón puede ser una sal. La característica crítica es que la concentración total de sal y tampón no excede los valores establecidos.

5 En una modalidad, la sal es una sal inorgánica o una sal orgánica o una combinación de una o más de estas. En una modalidad, la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de magnesio, tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, clorhidrato de arginina, cloruro de zinc, acetato de sodio, aminoácidos o una combinación de estos.

10 En una modalidad, la sal es cloruro de sodio o cloruro de magnesio, opcionalmente en combinación con otras sales. En una modalidad, la sal es clorhidrato de arginina. En una modalidad, la sal es una combinación de una sal inorgánica e clorhidrato de arginina.

15 En una modalidad, la sal es un aminoácido. En una modalidad, se usa el estereoisómero L del aminoácido. En una modalidad, la sal se selecciona de arginina, glicina, lisina, ácido aspártico o ácido glutámico, o una combinación de estos. En una modalidad, el aminoácido es arginina o glicina. En una modalidad adicional, el aminoácido es arginina, tal como L-arginina. El aminoácido puede añadirse a la composición en su forma de sal o en su forma libre, según convenga.

20 En una modalidad, la sal (o combinación de sales) está presente en una concentración de entre 0 y 100 mM. En una modalidad, la concentración total de sal es 100 mM o menos, tal como 50 mM, 40 mM, 35 mM, 33 mM, 30 mM, 25 mM o menos.

25 Se ha descubierto sorprendentemente que el aminoácido L-arginina actúa como un estabilizador y que la presencia de L-arginina tiene un efecto estabilizador estadísticamente significativo frente a la formación de agregados de HMWP en formulaciones líquidas de proteínas de alta concentración, tal como anticuerpos. En la presente descripción se describe una composición líquida estable que comprende un anticuerpo y arginina a una concentración de entre 5 mM y 100 mM, tal como o menos, tal como 50 mM, 40 mM, 35 mM, 33 mM, 30 mM, 25 mM o menos.

30 En una modalidad, el tampón es un tampón farmacéuticamente aceptable adecuado, que comprende tanto una base farmacéuticamente aceptable como un ácido farmacéuticamente aceptable. En una modalidad, el tampón tiene un pKa de entre 4 y 8.

35 Los ejemplos de ácidos y bases farmacéuticamente aceptables pueden incluir ácidos/bases inorgánicos así como también orgánicos no tóxicos tal como es bien conocido en la técnica. Los ejemplos son acetato de disodio, carbonato de sodio, citrato, glicilglicina, histidina, glicina, lisina, arginina, maleato, succinato, dihidrogenofosfato de sodio, hidrogenofosfato de disodio, fosfato de sodio y tris(hidroximetil)-amino metano, o mezclas de estos. Cada uno de estos tampones específicos constituye una modalidad alternativa. En una modalidad, el tampón

40 farmacéuticamente aceptable comprende histidina, maleato, succinato, fosfato o tris(hidroximetil)-amino metano.

En una modalidad, el tampón tiene un valor de pKa  $\pm$  1 unidad de pH del pH objetivo de la composición.

45 En una modalidad, la composición se tampona a un pH de entre 5 y 7, tal como un pH de 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9 o 7,0 o a un pH definido por cualquier intervalo entre ellos. En una modalidad, la composición se tampona a un pH de 5,0, 5,5, 6,0, 6,5 o 7,0. En una modalidad, la composición se tampona a un pH de entre 6,0 y 6,5. En una modalidad, la composición se tampona a un pH de 6,0 o 6,5.

50 En una modalidad, la composición comprende adicionalmente un tensioactivo. En una modalidad, el tensioactivo se selecciona de un detergente, aceite de ricino etoxilado, glicéridos poliglicolizados, monoglicéridos acetilados, ésteres de sorbitán y ácido graso, polímeros de bloques de polioxipropileno-polioxietileno (por ejemplo, poloxámeros como Pluronic® F68, poloxámero 188 y 407, Triton X-100), ésteres de polioxietileno sorbitán y ácido graso, derivados de polioxietileno y polietileno como derivados alquilados y alcoxlados (polisorbatos, por ejemplo polisorbato 20,

55 polisorbato 40, polisorbato 80 y Brij-35), monoglicéridos o sus derivados etoxilados, diglicéridos o sus derivados de polioxietileno, alcoholes, glicerol, lectinas y fosfolípidos (por ejemplo, fosfatidil serina, fosfatidil colina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil inositol, difosfatidil glicerol y esfingomielina), derivados de fosfolípidos (por ejemplo, ácido dipalmitoil fosfátidico) y lisofosfolípidos (por ejemplo, palmitoil lisofosfatidil-L-serina y 1-acil-sn-glicero-3-fosfato ésteres de etanolamina, colina, serina o treonina) y alquil, alcoxil (alquil éster), alcoxi (alquil éter)- derivados de

60 lisofosfatidil y fosfatidilcolinas, por ejemplo lauroil y miristoil derivados de lisofosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilcolina, y modificaciones del grupo de la cabeza polar, es decir colinas, etanolaminas, ácido fosfátidico, serinas, treoninas, glicerol, inositol, y DODAC, DOTMA, DCP, BISHOP cargados positivamente, lisofosfatidilserina y lisofosfatidiltreonina, y glicerofosfolípidos (por ejemplo, cefalinas), gliceroglicolípidos (por ejemplo, galactopiranosido), esfingoglicolípidos (por ejemplo, ceramidas, gangliósidos), dodecilsulfocolina, lisolecitina del

65 huevo de gallina, derivados del ácido fusídico - (por ejemplo tauro-dihidrofusidato de sodio, etcétera), ácidos grasos de cadena larga y sus sales C6-C12 (por ejemplo, ácido oleico y ácido caprílico), acilcarnitinas y derivados,

derivados de lisina, arginina o histidina N<sup>α</sup>-acilados, o derivados de lisina o arginina acilados en la cadena lateral, derivados N<sup>α</sup>-acilados de dipéptidos que comprenden cualquier combinación de lisina, arginina o histidina y un aminoácido neutro o ácido, derivado N<sup>α</sup>-acilado de un tripéptido que comprende cualquier combinación de un aminoácido neutro y dos aminoácidos cargados, DSS (docusato de sodio, registro CAS núm. [577-11-7]), docusato de calcio, registro CAS núm. [128-49-4]), docusato de potasio, registro CAS núm. [7491-09-0]), SDS (dodecil sulfato de sodio o laurilsulfato de sodio), caprilato de sodio, ácido cólico o derivados de estos, ácidos biliares y sus sales y conjugados de glicina o taurina, ácido ursodesoxicólico, colato de sodio, desoxicolato de sodio, taurocolato de sodio, glicocolato de sodio, N-hexadecil-N,N-dimetil-3-amonio-1-propanosulfonato, tensioactivos monovalentes (alquil-aril-sulfonatos) aniónicos, tensioactivos zwitteriónicos (por ejemplo N-alquil-N,N-dimetilamonio-1-propanosulfonatos, 3-colamido-1-propildimetilamonio-1-propanosulfonato, tensioactivos catiónicos (bases cuaternarias de amonio) (por ejemplo bromuro de cetil-trimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio), tensioactivos no iónicos (por ejemplo, dodecil β-D-glucopiranosido), poloxaminas (por ejemplo, de Tetric), que son copolímeros de bloque tetrafuncionales derivados de la adición secuencial de óxido de propileno y óxido de etileno a etilendiamina, o el tensioactivo puede seleccionarse del grupo de derivados de imidazolina o sus mezclas. Cada uno de estos tensioactivos específicos constituye una modalidad alternativa. En una modalidad, el tensioactivo es polisorbato 80 (es decir, Tween<sup>TM</sup>80).

El uso de un tensioactivo en composiciones farmacéuticas es bien conocido por los expertos. Por conveniencia se hace referencia a Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20<sup>ma</sup> edición, 2000.

En una modalidad, el tensioactivo está presente dentro de la composición en una cantidad inferior al 0,01 %. En una modalidad, el tensioactivo está presente dentro de la composición en una cantidad inferior a 0,0075 %, es decir, entre 0,001 % y 0,005 %, tal como 0,001 %.

En una modalidad, no hay presente tensioactivo. Sorprendentemente, se ha descubierto que las composiciones de proteína pueden ser estables tanto con cantidades bajas de sal, con una cantidad baja de tampón como con una cantidad baja de sal y tampón y sin ninguna adición de tensioactivo.

En una modalidad, la composición comprende además un agente modificador de la tonicidad. Los ejemplos de agentes modificadores de la tonicidad adecuados incluyen sales (por ejemplo, cloruro de sodio), alcoholes polihídricos (por ejemplo, propilenglicol, glicerol, xilitol, manitol o D-sorbitol), monosacáridos (glucosa o maltosa), disacáridos (por ejemplo, sacarosa), aminoácidos (L-glicina, L-histidina, arginina, lisina, isoleucina, ácido aspártico, triptófano, treonina), polietilenglicoles (por ejemplo, PEG 400) o mezclas de estos. En una modalidad, el agente modificador de la tonicidad es sacarosa, manitol o propilenglicol. En una modalidad adicional, el agente modificador de la tonicidad es sacarosa. En algunas modalidades, el tampón y/o sal de la composición (como se describió anteriormente) también actúa como modificador de la tonicidad o el modificador de la tonicidad actuará como un tampón y/o sal (y la concentración del modificador de tonicidad será por lo tanto en tales casos calculado como tal).

En una modalidad, el agente modificador de la tonicidad está presente dentro de la composición en una cantidad entre 50 y 250 mM, tal como entre 100 y 200 mM, por ejemplo cualquiera de 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 o cualquier intervalo entre ellos. En una modalidad, el agente modificador de la tonicidad está presente dentro de la composición en una cantidad de 150 mM.

En una modalidad, la composición es isotónica.

La proteína es el anticuerpo monoclonal anti-TFPI HzTFPI4F36 descrito en el documento WO2010/072691.

Se apreciará que las composiciones descritas encuentran una utilidad particular cuando la proteína está presente dentro de la composición en altas concentraciones. Por tanto, en una modalidad, la proteína está presente en una concentración de 50 mg/ml o más, tal como 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250, 300 mg/ml o más. En una modalidad, la proteína está presente dentro de la composición en una cantidad entre 50 mg/ml y 300 mg/ml, por ejemplo, entre 50 mg/ml y 250 mg/ml, tal como entre 50 mg/ml y 200 mg/ml, por ejemplo entre 50 mg/ml y 150 mg/ml. En una modalidad, la proteína está presente en una concentración de entre 75 mg/ml y 300 mg/ml, por ejemplo entre 75 mg/ml y 250 mg/ml, tal como entre 75 mg/ml y 200 mg/ml, para ejemplo entre 75 mg/ml y 150 mg/ml. En una modalidad, la proteína está presente en una concentración de entre 100 mg/ml y 300 mg/ml, por ejemplo, entre 100 mg/ml y 250 mg/ml, tal como entre 100 mg/ml y 200 mg/ml, para ejemplo entre 100 mg/ml y 150 mg/ml.

En una modalidad, las composiciones estables descritas en la presente descripción tienen una viscosidad de 50 cP o menos cuando se miden a 25 °C, tal como cualquiera de menos de 45, 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 o 1 cP. En particular, las composiciones estables descritas en la presente descripción tienen una viscosidad de 5 cP o menos cuando se miden a 25 °C.

El empleo de una formulación de alta concentración que contiene, por ejemplo, 100 mg/ml de proteína y menos de 100 mM de la suma de la concentración de sal y tampón produce una formulación relativamente baja de viscosidad (5 cP a 25 °C para un anticuerpo anti-IL20) que es estable a una temperatura de almacenamiento de 2-8 °C. En una modalidad, la formulación también es estable a temperaturas más altas, tal como la temperatura ambiente. La

formulación es adecuada para su uso en dispositivos listos para usar con un tamaño de aguja pequeño que confiere una mayor comodidad al paciente en comparación con un producto comercializado listo para usar (por ejemplo, Humira® que emplea una aguja 27G y 50 mg/ml de concentración de anticuerpo).

5 En una modalidad, una composición de proteínas comprende:

(a)  $\geq 50$  mg/ml de anticuerpo;

(b) 30 mM o menos de una sal inorgánica, tal como cloruro de sodio o cloruro de magnesio;

10

(d) 0-25 mM de un aminoácido, tal como arginina o glicina;

(e) 50 mM o menos de un tampón tal como tampón de histidina;

15

(e) 0,001-0,005 % de un tensioactivo no iónico;

(f) 100-200 mM de un agente modificador de la tonicidad, tal como sacarosa, propilenglicol, glicerol, manitol o D-sorbitol;

20

tamponada a un pH de entre 5 y 7.

En una modalidad, una composición de proteínas comprende:

(a) 100 mg/ml de anticuerpo;

25

(b) cloruro de sodio 25 mM;

(c) tampón de histidina 33 mM;

30

(d) arginina 25 mM;

(e) polisorbato 80 al 0,001 %;

35

(f) sacarosa 150 mM;

tamponada a un pH de entre 5 y 7.

En una modalidad, la composición estable de proteínas comprende:

40

(a) 100 mg/ml de anticuerpo;

(b) cloruro de sodio 25 mM;

(c) tampón de histidina 33 mM;

45

(d) arginina 25 mM;

(e) polisorbato 80 al 0,001 %;

50

(f) manitol 150 mM;

tamponada a un pH de entre 5 y 7.

En una modalidad, la composición estable de proteínas comprende:

55

(a) 100 mg/ml de anticuerpo;

(b) cloruro de sodio 25 mM;

60

(c) tampón de histidina 33 mM;

(d) arginina 25 mM;

(e) polisorbato 80 al 0,001 %;

65

(f) sacarosa 150 mM;

tamponada a un pH de 6,0 a 6,5.

En una modalidad, la composición estable de proteínas comprende:

- 5 (a) 100 mg/ml de anticuerpo;
- (b) cloruro de sodio 25 mM;
- (c) tampón de histidina 33 mM;
- 10 (d) arginina 25 mM;
- (e) sacarosa 150 mM;

15 tamponada a un pH entre 5 y 7.

Las composiciones descritas en la presente descripción han demostrado sorprendentemente estabilidad frente a la formación de HMWP a temperatura ambiente (aquí medida a 25 °C) durante 12 meses y a 5 °C durante hasta 24 meses donde no hay un aumento detectable del % de HMWP. Además, varias composiciones descritas en la presente descripción muestran típicamente que solo se forma 2-7 % de HMWP durante 3 meses a 40 °C, lo que sugiere una formulación termoestable interesante a pesar de tener una concentración total baja de sal y tampón.

20 Será evidente para los expertos en la técnica de las composiciones farmacéuticas que las composiciones de proteínas estables descritas anteriormente se pueden preparar de acuerdo con procedimientos estándar (Luo R y otros, High-concentration UF/DF of a monoclonal antibody. Strategy for optimization and scale-up, Bioprocess Int. 4, 44-48 (2006)). Por ejemplo, las composiciones de proteína estables pueden prepararse típicamente diafiltrando primero la proteína a una concentración de 50 mg/ml o más mediante el uso de Filtración de Flujo Tangencial (TFF). Subsecuentemente, el producto formulado, excepto por la adición de un tensioactivo (cuando corresponda), se ultrafiltra a 100 mg/ml o concentraciones superiores, después de lo cual se puede añadir el tensioactivo.

25 Es posible que puedan presentarse otros ingredientes en la composición farmacéutica de la presente invención. Estos ingredientes adicionales pueden incluir cosolventes, agentes humectantes, emulsionantes, antioxidantes, agentes de masa, agentes quelantes, iones metálicos, vehículos oleaginosos, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica humana, gelatina o proteínas) y un zwitterión. Tales ingredientes adicionales, por supuesto, no deben afectar adversamente la estabilidad general de la formulación farmacéutica de la presente invención.

30 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención son estables durante más de 6 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

40 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención son estables durante más de 4 semanas de uso y durante más de 3 años de almacenamiento.

45 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención son estables durante más de 4 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención son estables durante más de 2 semanas de uso y durante más de dos años de almacenamiento.

50 En una modalidad, las composiciones farmacéuticas de la invención son estables durante más de 1 semana de uso y durante más de seis meses de almacenamiento.

De acuerdo con un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición de proteína estable como se define en la presente descripción para su uso en terapia.

55 El término "tratamiento" y "tratar" como se usa en la presente descripción se refiere al manejo y la atención de un paciente con el propósito de combatir una afección, tal como una enfermedad o un trastorno. El término pretende incluir el espectro completo de tratamientos para una afección determinada de la que padece el paciente, tal como la administración del compuesto activo para aliviar los síntomas o complicaciones, para retrasar la progresión de la enfermedad, trastorno o afección, para aliviar o calmar los síntomas y complicaciones, y/o para curar o eliminar la enfermedad, trastorno o afección así como para prevenir la afección, en donde prevención debe entenderse como el manejo y cuidado de un paciente con el propósito de combatir la enfermedad, afección o trastorno e incluye la administración de los compuestos activos para prevenir el inicio de los síntomas o complicaciones. El paciente que va a tratarse es preferentemente un mamífero; en particular un ser humano, pero puede incluir, además, animales, como perros, gatos, vacas, ovejas y cerdos.

65

Por ejemplo, las composiciones de anticuerpos anti-TFPI de la presente invención puede usarse en el tratamiento de una coagulopatía (trastorno hemorrágico), tal como hemofilia A, con o sin inhibidores, y hemofilia B, con o sin inhibidores o de otro modo como se describe en el documento WO2010/072691.

5 Por tanto, de acuerdo con un aspecto adicional, la invención proporciona un método para tratar una coagulopatía que comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente efectiva de una composición de un anticuerpo anti-TFPI de la presente invención.

10 La invención también proporciona una composición de un anticuerpo anti-TFPI de la presente invención para su uso en el tratamiento de una coagulopatía.

La invención también proporciona el uso de una composición de un anticuerpo anti-TFPI de la presente invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una coagulopatía.

15 Debe entenderse que los regímenes terapéuticos y profilácticos (preventivos) representan aspectos separados de la presente invención.

20 Las formulaciones farmacéuticas de la invención son generalmente adecuadas para la administración parenteral. La administración parenteral puede realizarse por inyección subcutánea, intramuscular, intraperitoneal o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a una lapicera. Alternativamente, la administración parenteral puede realizarse por medio de una bomba de infusión.

La invención se describe adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

25 (Breve descripción de los dibujos)<sup>1</sup>

La figura 1 muestra un análisis estadístico del efecto de los factores principales y las interacciones de 2 factores sobre la formación de % de HMWP después de que las formulaciones se hayan almacenado a 40 °C durante 3 meses.

30 La figura 2 muestra el análisis estadístico del efecto de histidina y arginina en la formulación de % de HMWP después de que las formulaciones se hayan almacenado a 40 °C durante 3 meses.

35 La figura 3 muestra el análisis estadístico del efecto de histidina, cloruro de sodio (NaCl) y arginina sobre la viscosidad de la formulación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

40 Se prepararon 18 formulaciones (véase la Tabla 1 a continuación). Las formulaciones se prepararon a partir de una solución madre que contenía aprox. 150 mg/ml del mAb 1 y tampón de histidina 10 mM, pH 6,5. Esta solución madre se preparó mediante UF/DF/UF convencional. Se preparó una solución madre de los excipientes y se mezcló en la proporción correcta mediante el uso de un Biomek<sup>®</sup> 2000, sistema robot Beckman Coulter. Las formulaciones finales se llenaron en cartuchos de 3 ml de Penfill<sup>®</sup>, vidrio tipo 1. El pistón del cartucho se ajustó para acomodar 0,6 ml, que también era el volumen de llenado. Las formulaciones se almacenaron a 40 °C durante tres meses y luego se analizaron química, quimicofarmacéutica y biofísicamente. El aumento en la formación de agregados de proteínas (% HMWP) se puede modelar mediante el uso del software SAS JMP 8.0. Los datos muestran que existe un efecto positivo de arginina sobre la estabilidad que disminuyó significativamente la formación de agregados de proteínas. De manera similar, el efecto combinado de histidina y NaCl también disminuye la formación de agregados de proteínas. La sacarosa y el polisorbato 80 (PS 80) aumentan débilmente la formación de agregados de proteínas.

Tabla 1 Composición de formulaciones

mAb 1 (mg/ml)	Histidina (mM)	NaCl (mM)	PS 80 (mg/ml)	Sacarosa (mM)	Arginina (mM)	pH	%ΔHMWP
100	33	25	0,01	0	25	6,5	1,4
100	66	25	0,01	0	0	6,5	2,1
100	33	100	0,01	0	0	6,5	2,0
100	66	100	0,01	0	25	6,5	1,7
100	33	25	0,05	0	0	6,5	2,3

5	100	66	25	0,05	0	25	6,5	1,8
	100	33	100	0,05	0	25	6,5	1,8
	100	66	100	0,05	0	0	6,5	1,8
10	100	33	25	0,01	30	0	6,5	2,6
	100	66	25	0,01	30	25	6,5	1,7
	100	33	100	0,01	30	25	6,5	1,6
15	100	66	100	0,01	30	0	6,5	1,6
	100	33	25	0,05	30	25	6,5	1,5
	100	66	25	0,05	30	0	6,5	3,6
20	100	33	100	0,05	30	0	6,5	3,6
	100	66	100	0,05	30	25	6,5	1,9
25	100	49,5	62,5	0,03	15	12,5	6,5	1,8
	100	49,5	62,5	0,03	15	12,5	6,5	1,8
PS = polisorbato								

30 El efecto estadístico de los factores principales y las interacciones de 2 factores sobre la formación de % de HMWP, después de que la formulación se haya almacenado a 40 °C durante tres meses se muestra en la Figura 1.

### Ejemplo 2

35 Una solución de mAb se prepara por UF/DF/UF hasta una concentración > 100 mg/ml que incluye histidina 10 mM o NaCl 10 mM. Se prepara una solución que contiene los excipientes a investigar y se mezcla con la solución de mAb hasta la concentración deseada. El pH se ajusta al pH deseado. Las formulaciones se llenaron en cartuchos de 3 ml de Penfill®, vidrio tipo 1. El pistón del cartucho se ajustó para acomodar 1,5 ml, que también era el volumen de llenado. Los cartuchos se almacenaron a 5°C y/o 25°C y/o 40°C. La Tabla 2 muestra las diversas formulaciones preparadas y la viscosidad resultante y el aumento de agregados (% de HMWP). De manera similar al Ejemplo 1, se observa que la arginina tiene un efecto estabilizador ya que contrarresta la formación de % de HMWP. También se observa que la histidina contiene un efecto estabilizador similar.

45 Además, también se observó que la histidina, el cloruro de sodio y la arginina tienen cada uno un efecto reductor de la viscosidad estadísticamente significativo sobre la formulación, teniendo la histidina el efecto más profundo.

Interesantemente, después de 12 meses a los 25°C el aumento en % de HMWP es virtualmente inexistente, lo que indica fuertemente que existe un potencial para una formulación estable a temperatura ambiente (Tabla 2).

50 mAb1 es el anticuerpo anti-IL20 15D2 como se describe en el documento WO2010/000721. mAb2 es el anticuerpo monoclonal anti-TFPI HzTFPI4F36 como se describe en el documento WO2010/072691. mAb3 es el anticuerpo monoclonal anti-C5aR hAb-Q como se describe en el documento WO2009/103113. mAb4 es el anticuerpo monoclonal anti-NKG2D MS como se describe en el documento 2009/077483. mAb5 es el anticuerpo monoclonal anti-NKG2A humZ270 como se describe en el documento WO2008/009545

Tabla 2 Ejemplos de formulaciones y su correspondiente viscosidad y estabilidad química

mAb	Conc. de mAb (mg/ml)	Composición	Temp. de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)	ΔHMWP (%)	Viscosidad (cP)
mAb1	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Arginina 25 mM pH 6,5	5	12	0,0	5,4
			5	24	0,0	
			25	3	0,2	
			40	3	1,4	

ES 2 831 414 T3

5	mAb1	50	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Arginina 25 mM pH 6,5	5 40	18 3	0,3 3,1	3,7
10	mAb1	100	Histidina 66 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % pH 6,5	5 5 25 40	12 24 3 3	0,1 0,0 0,3 2,1	5,9
15	mAb1	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % pH 6,5	5 5 25 40	12 24 3 3	0,3 0,0 0,5 2,3	5,5
20	mAb1	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Sacarosa 30 mM pH 6,5	5 5 25 40	12 24 3 3	0,0 0,0 0,4 2,6	5,4
25	mAb1	50	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % Sacarosa 30 mM Arginina 25 mM pH 6,5	5 40	18 3	0,2 3,4	2,3
30	mAb1	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM Arginina 25 mM PS 80 al 0,001 % Sacarosa 150 mM pH 6,5	5 15 25 30 40	12 12 12 12 12	0,0 0,1 0,2 0,5 13,8	5,9
35	mAb1	100	Histidina 10 mM PS 80 al 0,001 % Arginina 70 mM pH 6,5	40	3	2,8	6,7
40	mAb1	100	Histidina 10 mM NaCl 70 mM PS 80 al 0,001 % pH 6,5	40	3	3,6	7,1
45	mAb1	100	Histidina 10 mM pH 6,5	5 40	18 3	0,0 6,1	9,3
50	mAb1	150	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Arginina 25 mM pH 6,5	5 25 40	12 3 3	0,0 0,0 4,0	6,0
55	mAb1	100	Fosfato de Na 10 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % Arginina 25 mM pH 6,5	40	3	3,7	4,2
60	mAb1	100	Succinato 10 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % Arginina 25 mM pH 6,5	40	3	2,8	5,6
65	mAb1	100	Citrato de Na 10 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % Arginina 25 mM pH 6,5	40	3	2,4	8,7
	mAb1	100	Maleato 10 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % Arginina 25 mM pH 6,51.7	40	3	2,9	4,8

ES 2 831 414 T3

5	mAb1	100	Tris (hidroxi-metil-amino- metano) 10 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % Arginina 25 mM pH 6,5	40	3	2,5	3,9
10	mAb2	150	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Arginina 25 mM pH 6,0	40 40 5	1 3 12	1,1 3,7 0,1	10,0
15	mAb2	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Arginina 25 mM pH 6,0	40 40 5	1 3 12	0,7 2,9 0,0	6,6
20	mAb2	150	Histidina 10 mM pH 6,0	40 40 5	1 3 12	1,4 4,5 0,1	8,6
25	mAb2	100	Histidina 10 mM pH 6,0	40 40 5	1 3 12	0,9 3,3 0,0	9,5
30	mAb3	100	Histidina 50 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,005 % pH 6,5	5 5 40	6 18 3	0,3 0,1 3,7	5,6
35	mAb3	100	Histidina 25 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % pH 6,5	5 5 40	6 18 3	0,8 1,3 5,3	6,5
40	mAb3	100	Histidina 10 mM NaCl 25 mM pH 6,5	5 5 40	6 18 2	0,6 1,3 2,8	7,1
45	mAb4	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Sacarosa 150 mM Arginina 25 mM pH 6,0	40 40 5	2 3 12	0,9 1,6 0,3	4,3
50	mAb4	100	Histidina 10 mM pH 6,0	40 40 5	2 3 12	3,4 4,8 0,5	4,3
55	mAb5	100	Histidina 33 mM NaCl 25 mM PS 80 al 0,001 % Sacarosa 150 mM Arginina 25 mM pH 6,0	5 40	9 3	0,0 3,1	6,5
	mAb5	100	Histidina 10 mM pH 6,0	5 40	9 3	0,2 7,4	7,3
Concentración de mAb: la concentración del anticuerpo indicado expresada en mg/ml. ΔHMWP (%): Determinado por SE-HPLC. Viscosidad: (cP) a 25 °C en el tiempo cero PD: polisorbato							

60 Los efectos estadísticos de histidina o arginina sobre la formación de % de HMWP después de que la formulación se haya almacenado a 40°C durante 3 meses, se muestra en la Figura 2.

Los efectos estadísticos de la histidina, el cloruro de sodio (NaCl) y la arginina sobre la viscosidad de la formulación se muestran en la Figura 3.

65

**Ejemplo 3**

## ES 2 831 414 T3

Se han preparado formulaciones de mAb como se menciona en el Ejemplo 2 con variación únicamente en la cantidad de tensioactivo. La robustez de las formulaciones se ha evaluado mediante estabilidad en almacenamiento a temperatura acelerada y de almacenamiento (Tabla 3), y además por agitación mecánica y congelación/descongelación (Tabla 4). Todas las formulaciones contienen:

mAb 100 mg/ml, histidina 33 mM, arginina 25 mM, NaCl 25 mM, sacarosa 150 mM,

0-0,1 mg/ml de polisorbato 80. pH de la formulación: 6,5 (mAb 1) y 6,0 (mAb 4)

Tabla 3. Estabilidad de almacenamiento en condiciones aceleradas y de temperatura de almacenamiento. Las formulaciones contienen cantidades variables de tensioactivo.

mAb	Concentración de tensioactivo (mg/ml)	Temp. de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)	$\Delta$ HMWP* (%)	$\Delta$ Unidades de turbidez* a 340 nm	Viscosidad (cP)
mAb 1	Ninguna	5	9	0,0	0,02	6,0
		40	3	1,6	0,26	
mAb 1	0,01	5	9	0,0	0,00	6,5
		40	3	1,6	0,19	
mAb 1	0,02	5	9	0,0	0,00	6,4
		40	3	1,6	0,25	
mAb 1	0,05	5	9	0,0	0,00	6,1
		40	3	1,5	0,17	
mAb 1	0,1	5	9	0,0	0,00	6,0
		40	3	1,7	0,34	
mAb 4	Ninguna	5	9	0,2	0,01	4,3
		40	3	3,0	0,29	
mAb 4	0,01	5	9	0,1	0,03	4,9
		40	3	3,0	0,32	
mAb 4	0,02	5	9	0,1	0,01	4,6
		40	3	3,1	0,32	
mAb 4	0,05	5	9	0,2	0,01	5,0
		40	3	3,3	0,36	
mAb 4	0,1	5	9	0,3	0,09	5,4
		40	3	3,3	0,43	

\*Los valores se calculan como: punto de tiempo X menos punto de tiempo cero. Viscosidad medida a 25°C en tiempo cero.

También se ha realizado un análisis de apariencia visual en gabinetes de luz y lámparas de arquitecto para todas las formulaciones para evaluar la posibilidad de formación de partículas. En el tiempo cero, se encontró que todas las muestras eran claras a ligeramente opalescentes sin partículas visibles mediante el uso de ambos métodos analíticos. No se ha observado ninguna diferencia durante el período de estabilidad en almacenamiento de la aparición de todas las formulaciones.

Tabla 4. Formulaciones de mAb expuestas a i) estrés por congelación-descongelación (10 ciclos de -20°C a temperatura ambiente) ii) agitación mecánica a temperatura ambiente, y iii) rotación combinada y térmico (37°C)

mAb	Conc. de tensioactivo (mg/ml)	Ciclos de congelación-descongelación	Agitación mecánica	Rotación y estrés térmico
		$\Delta$ Unidades de turbidez* a 340 nm	$\Delta$ Unidades de turbidez* a 340 nm	$\Delta$ Unidades de turbidez* a 340 nm
mAb 1	Ninguna	0,05	0,00	0,11
mAb 1	0,01	0,00	0,00	0,00

mAb 1	0,02	0,00	0,00	0,00
mAb 1	0,05	0,00	0,00	0,00
mAb 1	0,1	0,06	0,00	0,06
mAb 4	Ninguna	0,06	0,00	0,07
mAb 4	0,01	0,05	0,01	0,07
mAb 4	0,02	0,18	0,00	0,05
mAb 4	0,05	0,15	0,08	0,07
mAb 4	0,1	NA	0,15	0,14

\*Los valores se calculan como: punto de tiempo X menos punto de tiempo cero. Viscosidad medida a 25°C en tiempo cero.

También se ha realizado un análisis de apariencia visual en gabinetes de luz y lámparas de arquitecto para todas las formulaciones para evaluar la posibilidad de formación de partículas. En el tiempo cero, se encontró que todas las muestras eran claras a ligeramente opalescentes sin partículas visibles mediante el uso de ambos métodos analíticos. No se ha observado ninguna diferencia durante las condiciones de estrés anteriores. Además, no se pudo detectar ningún aumento en el % de HMWP durante estas condiciones de estrés.

#### Ejemplo 4

Se han producido dos lotes (aprox. 3 l) en las instalaciones de la planta piloto de acuerdo con las condiciones regulares de acabado de llenado. La formulación se llenó en cartuchos de 3 ml de Penfill®, vidrio tipo 1. El pistón del cartucho se ajustó para acomodar 1 ml, que también era el volumen de llenado. La diferencia entre la composición de los lotes es que uno contiene Polisorbato 80 mientras que el otro no. Los dos productos farmacéuticos están expuestos a condiciones de temperatura acelerada y agitación mecánica (Tabla 5).

Tabla 5. Estabilidad de almacenamiento de dos lotes de producción piloto de mAb 1.

Composición (+/- PS 80)	Temperatura de almacenamiento (°C)	Tiempo de almacenamiento (meses)	ΔHMWP* (%)	ΔUnidades de turbidez* a 340 nm	Viscosidad (cP)
Histidina 33 mM	5	3	0,3	0,00	3,5
NaCl 25 mM	25	3	0,6	0,00	
Sacarosa 150 mM	30	3	0,4	0,00	
Arginina 25 mM	40	3	2,1	0,46	
pH 6,5	Temperatura ambiente**	0,5	0,3	0,00	
Histidina 33 mM	5	3	0,3	0,00	3,4
NaCl 25 mM	25	3	0,6	0,00	
Sacarosa 150 mM	30	3	0,4	0,00	
Arginina 25 mM	40	3	2,5	N.A	
PS 80 al 0,001 %	Temperatura ambiente**	0,5	0,3	0,00	

\*Los valores se calculan como: punto de tiempo X menos punto de tiempo cero. NA: no aplica. Viscosidad medida a 25°C en tiempo cero. \*\* La agitación mecánica del producto farmacéutico se lleva a cabo a temperatura ambiente durante 2 semanas.

#### Ejemplo 5

Se preparó un lote a escala de laboratorio como en el Ejemplo 2 y se llenó en cartuchos de 3,0 ml de Penfill®, vidrio tipo 1. El pistón del cartucho se ajustó para acomodar 1,5 ml, que también era el volumen de llenado. El efecto del estrés interfacial aire/agua sobre el producto farmacéutico se evaluó al aplicar un volumen variable de aire a la formulación y exponerla a condiciones severas de temperatura y estrés mecánico (Tabla 6)

Tabla 6. Influencia sobre la estabilidad de las proteínas del volumen de aire añadido al producto farmacéutico llenado en cartuchos de 3,0 ml de Penfill®\*. La estabilidad de las proteínas se evaluó después de estrés rotacional y térmico a 37°C durante 14 días.

Volumen de aire añadido al producto farmacéutico (μl)	% ΔHMWP**	ΔUnidades de turbidez** a 340 nm
0	0,0	0,11
25	0,0	0,12

50	0,0	0,12
100	0,1	0,13
*El producto farmacéutico contiene: 100 mg/ml de mAb 1, histidina 33 mM, arginina 25 mM, NaCl 25 mM, sacarosa 150 mM, polisorbato 80 al 0,001 %. **Los valores se calculan como: punto de tiempo X menos punto de tiempo cero		

5

10 El uso de los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención cubren tanto el singular como el plural, a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o el contexto lo contradiga claramente. Por ejemplo, la frase "el compuesto" debe entenderse que se refiere a varios "compuestos" de la invención o aspecto descrito particular, a menos que se indique lo contrario.

15 A menos que se indique lo contrario, todos los valores exactos proporcionados en la presente descripción son representativos de los valores aproximados correspondientes. Cuando se da un intervalo, el intervalo incluye ambos valores finales, a menos que se indique lo contrario.

20 La descripción en la presente de cualquier aspecto o aspecto de la invención mediante el uso de términos tales como "que comprende", "que tiene", "que incluye" o "que contiene" con referencia a un elemento o elementos pretende proporcionar soporte para un aspecto o aspecto similar de la invención que "consiste en", "consiste esencialmente en", o "comprende sustancialmente" ese elemento o elementos particulares, a menos que se indique de cualquier otra manera o que el contexto lo contradiga claramente (por ejemplo, una composición descrita en la presente como que comprende un elemento particular debe entenderse como que también describe una composición que consiste en ese elemento, a menos que se indique de cualquier otra manera o el contexto lo contradiga claramente).

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición líquida estable que comprende una proteína que es un anticuerpo, una sal y un tampón; en donde la concentración total de dicha sal y tampón está entre 5 y 100 mM, en donde la concentración de la sal es 50 mM o menor y en donde la concentración del tampón es 50 mM o menor; y que tiene un pH de entre 5,0 y 7,0, tal como 6,0 o 6,5; en donde el anticuerpo es el anticuerpo monoclonal anti-TFPI HzTFPI4F36 descrito en el documento WO2010/072691, las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligera y pesada de HzTFPI4F3 se proporcionan en las SEQ ID NO: 21 y 24 del documento WO2010/072691, respectivamente.
- 10 2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración total de sal y tampón está entre 5 y 85 mM.
- 15 3. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde la concentración de la sal es 45 mM o menos, tal como 40 mM o menos, tal como 35 mM o menos, tal como 25 mM o menos.
- 20 4. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde la sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio, cloruro de magnesio, tiocianato de sodio, tiocianato de amonio, sulfato de amonio, cloruro de amonio, cloruro de calcio, clorhidrato de arginina, cloruro de zinc y acetato de sodio o cualquier combinación de estas.
- 25 5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la concentración del tampón es 45 mM o menos, tal como 40 mM o menos, tal como 35 mM o menos, tal como 33 mM o menos.
- 30 6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el tampón es histidina.
- 35 7. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende además un tensioactivo, tal como polisorbato 80.
- 40 8. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende además un agente modificador de la tonicidad.
- 45 9. La composición de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el agente modificador de la tonicidad es sacarosa o manitol.
10. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 8-9, en donde el agente modificador de la tonicidad está presente dentro de la composición en una cantidad de entre 100 y 200 mM, tal como 150 mM.
11. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la proteína está presente dentro de la composición en una concentración de entre 50 mg/ml y 300 mg/ml, tal como una concentración de 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 150, 200, 250 o 300 mg/ml.
12. Una composición farmacéutica que comprende la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-11 para su uso en el tratamiento de una coagulopatía, tal como hemofilia A, con o sin inhibidores, o hemofilia B, con o sin inhibidores.

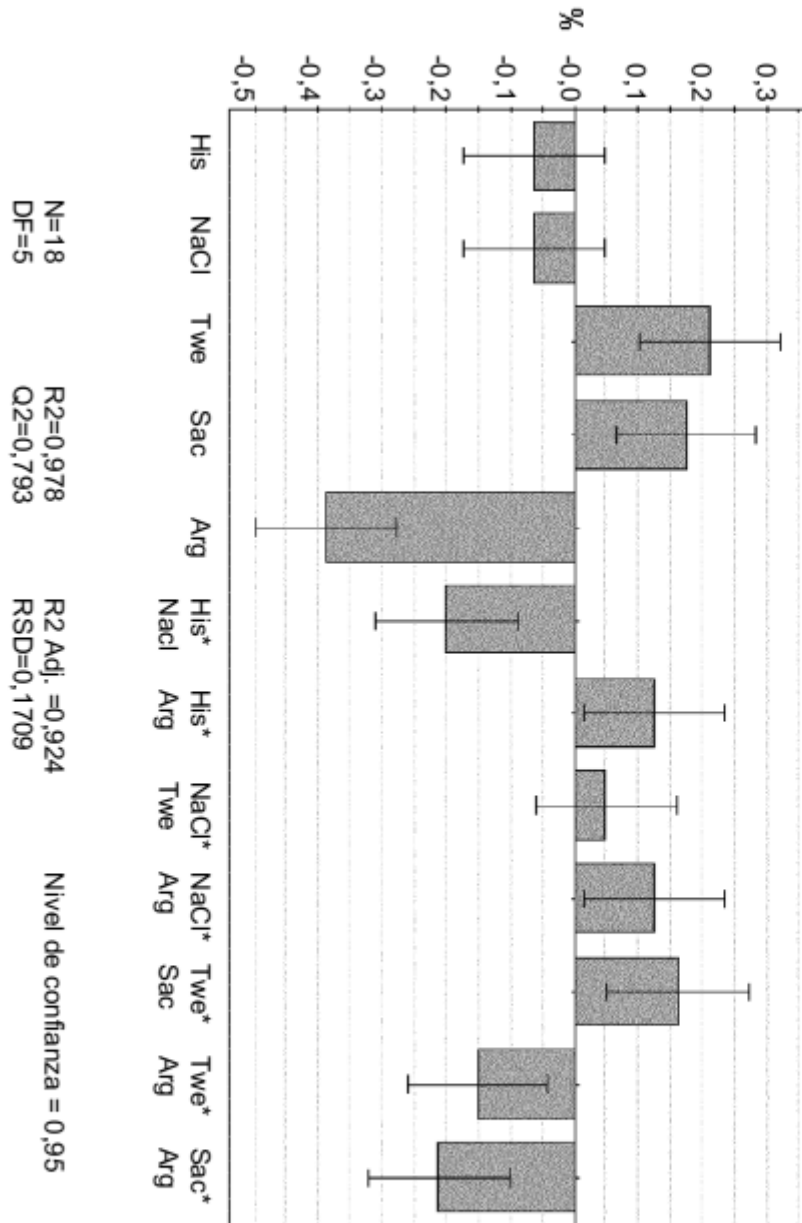


Figura 1/3

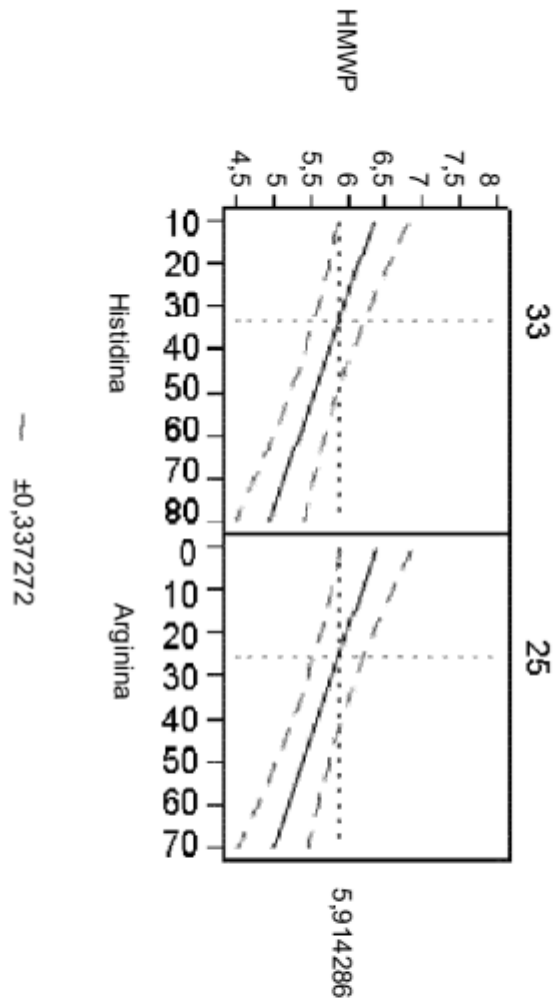


Figura 2/3

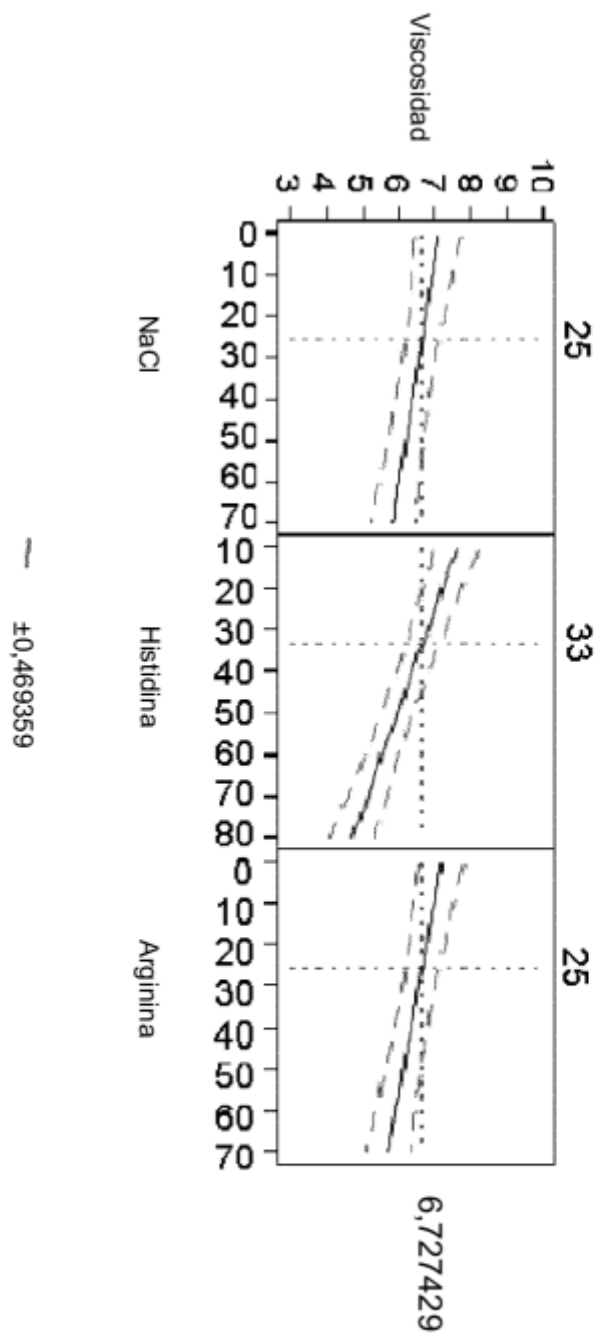


Figura 3/3