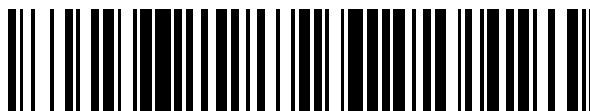


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 741 575**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/38 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.08.2013** **E 16180643 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.05.2019** **EP 3117837**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos**

30 Prioridad:

31.08.2012 US 201213601598

15.03.2013 US 201313843780

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

11.02.2020

73 Titular/es:

BAYER HEALTHCARE LLC (100.0%)

100 Bayer Boulevard

Whippany, NJ 07981-0915, US

72 Inventor/es:

MA, XINGHANG y

XIANG, JUN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 741 575 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de anticuerpos

Antecedentes

La presente divulgación se refiere, en general, a formulaciones de anticuerpos y otras proteínas que son isosmóticas y de baja viscosidad, incluyendo formulaciones que son útiles para inyección y administración general.

Los pacientes con hemofilia presentan trastornos hemorrágicos que dan como resultado un retardo en la coagulación de la sangre después de una lesión o cirugía. La prolongación de la hemorragia es causada por una deficiencia genética en uno o más factores de coagulación de la sangre. Se conocen dos tipos comunes de hemofilia - la hemofilia A y la hemofilia B. La hemofilia A es causada por una deficiencia en el factor VIII, mientras que la hemofilia B es causada por una deficiencia en el factor IX. Aproximadamente el 75-80% del total de los pacientes con hemofilia tienen hemofilia A.

El inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) es un inhibidor humano de la vía extrínseca de la coagulación de la sangre y funciona en la anticoagulación. Se están desarrollando anticuerpos que se dirigen contra el TFPI, incluyendo anticuerpos monoclonales anti-TFPI (mAb aTFPI), en un esfuerzo para bloquear la función del TFPI. Uno de estos mAb aTFPI es un mAb anti-TFPI IgG₂ humano, que está siendo desarrollado para el tratamiento de pacientes con hemofilia A y B.

Dicho anticuerpo se desvela en el documento WO201109452.

Los anticuerpos y otras proteínas pueden ser administrados a los pacientes a través de inyección intravenosa, intramuscular y/o subcutánea. Para garantizar el cumplimiento del paciente, es deseable que las formas farmacéuticas para inyección intramuscular y subcutánea sean isotónicas e incluyan volúmenes de inyección pequeños (<2,0 ml por sitio de inyección). Para reducir el volumen de inyección, las proteínas suelen administrarse en el intervalo de 1 mg/ml a 150 mg/ml.

El documento WO03009817 desvela una composición de anticuerpos que comprende histidina, sacarosa y un tensioactivo y sin sal inorgánica añadida. Este anticuerpo no se dirige contra el TFPI.

Si bien las formas farmacéuticas líquidas y liofilizadas se usan para medicamentos a base de anticuerpos y otras proteínas comercializados actualmente, las formas liofilizadas se usan con más frecuencia para medicamentos de proteínas y anticuerpos que tienen altas concentraciones de proteína.

Una forma farmacéutica de proteína y anticuerpos puede presentar numerosos desafíos en el desarrollo de la formulación, en especial para una formulación líquida. En formulaciones en las que la concentración de proteína está cerca de su límite de solubilidad aparente, puede ocurrir la separación de fases a través de precipitación, gelificación y/o cristalización. A una concentración de proteína elevada, la estabilidad de un anticuerpo u otra proteína puede llegar a ser problemática debido a la formación de agregados solubles e insolubles de proteína-proteína. Las formulaciones de proteínas muy concentradas son con frecuencia muy viscosas, lo que presenta dificultades para el procesamiento, tales como la ultrafiltración y filtración estéril, y para la inyección de la solución de dosificación. Y a concentraciones de proteína, que son deseables para formulaciones destinadas a la administración intramuscular o subcutánea, se requieren concentraciones altas de estabilizantes, tales como sacarosa y cloruro de sodio, para lograr la estabilidad de la proteína a largo plazo. Las soluciones hipertónicas resultantes a menudo causan dolor por la inyección debido a daños en los tejidos. Por lo tanto, es fundamental equilibrar la cantidad de estabilizantes para la estabilidad y la osmolalidad de la formulación de proteína de alta concentración.

Por estas razones, hay una necesidad en la técnica de formulaciones terapéuticas a base de anticuerpos y otras proteínas en forma líquida que exhiban altas concentraciones de proteína sin el problema del aumento significativo de la agregación de la proteína, la osmolalidad o la viscosidad y/o la disminución de la estabilidad de la proteína. Es, por lo tanto, deseable que las formulaciones a base de anticuerpos y otras proteínas contengan cantidades limitadas de excipientes y pequeños volúmenes para facilitar la administración o el suministro terapéutico. Es deseable, además, que las formulaciones terapéuticas a base de anticuerpos y otras proteínas sean susceptibles de liofilización para mejorar la estabilidad de la proteína en condiciones de almacenamiento prolongado.

Sumario

Las realizaciones de la invención se definen por las reivindicaciones adjuntas. La presente divulgación proporciona formulaciones a base de anticuerpos y proteínas, líquidas y liofilizadas, que son sustancialmente isotónicas y de baja viscosidad y que no contienen sustancialmente sales inorgánicas. Las formulaciones de anticuerpos y otras proteínas presentadas en la presente memoria contiene desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM de histidina, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm de un agente tensioactivo no iónico como, por ejemplo, polisorbato (Tween®) 80 o polisorbato (Tween®) 20; desde aproximadamente 88 mM a aproximadamente 292 mM de un azúcar o alcohol de azúcar como, por ejemplo, manitol, dextrosa, glucosa, trehalosa y/o sacarosa; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de arginina; desde

- aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de lisina; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 133 mM de glicina o alanina; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM de metionina, y desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml de una proteína a un pH desde aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 6,0. Las formulaciones divulgadas en la presente memoria presentan una viscosidad que
- 5 varía desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 20 mPa-s a 22 °C, o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 15 mPa-s a 22 °C, o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 10 mPa-s a 22 °C o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 8 mPa-s a 22 °C o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 6 mPa-s a 22 °C y una osmolalidad que varía desde aproximadamente 240 a aproximadamente 380 mmol/kg.
- 10 Dentro de aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona procedimientos para su uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, que comprenden la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más formulaciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos para su uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, que comprenden la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de anticuerpos u otras proteínas como se describe en mayor
- 15 detalle en la presente memoria.

Estas y otras características de las presentes enseñanzas se exponen en la presente memoria.

Breve descripción de los dibujos

- El experto en la materia entenderá que los dibujos, que se describen a continuación, son para propósitos de ilustración solamente. Los dibujos no están destinados a limitar el ámbito de las presentes enseñanzas de ninguna
- 20 manera.

La FIG. 1 es un gráfico que muestra el efecto de la concentración de cloruro de sodio (NaCl) sobre la turbidez de formulaciones de mAb anti-TFPI de 20 mg/ml a pH 5,5.

La FIG. 2 es un gráfico que muestra el efecto del pH sobre la turbidez de un principio activo mAb anti-TFPI.

Descripción de diversas realizaciones

- 25 Como se describió anteriormente, la presente divulgación proporciona formulaciones de anticuerpos y otras proteínas que estabilizan el anticuerpo u otra proteína en forma líquida o en forma liofilizada en condiciones de almacenamiento previstas. Las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen uno o más excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, y están contenidas en medios tamponados a un pH adecuado y son sustancialmente isosmóticas con los líquidos fisiológicos. Para la administración sistémica, la inyección es una de las
- 30 vías de administración, incluyendo inyección intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea.

- Debido a su baja viscosidad, las formulaciones de proteínas descritas actualmente pueden ser procesadas convenientemente a través de, por ejemplo, ultrafiltración y filtración estéril y pueden administrarse a un paciente a través de inyección, incluyendo inyección intravenosa y subcutánea. Por otra parte, debido a que son sustancialmente isosmóticas, las formulaciones de anticuerpos y proteínas descritas actualmente reducen el daño
- 35 del tejido u otros efectos fisiológicos adversos y de esta manera logran la tolerancia favorable del paciente y el aumento del cumplimiento del paciente.

- Las formulaciones descritas en la presente memoria se caracterizan por la ausencia sustancial de sal añadida, lo que proporciona flexibilidad para aumentar las concentraciones de otros estabilizantes, tales como sacarosa, mientras se mantiene la osmolalidad de la formulación para mejorar la tolerabilidad *in vivo* y, en consecuencia, el
- 40 aumento del cumplimiento del paciente. Por otra parte, la baja viscosidad de las formulaciones descritas actualmente permite el procesamiento conveniente, incluyendo, pero sin limitación, la ultrafiltración y la filtración estéril, y la inyección de la solución del medicamento a través de la aguja.

- Tal como se usa en la presente memoria, el término “viscosidad” se refiere a la resistencia de una formulación líquida a fluir, tal como cuando se inyecta a través de una aguja de una jeringa durante la administración a un
- 45 paciente. Las mediciones de viscosidad pueden hacerse mediante una técnica de cono y placa con un elemento Peltier fijado a una temperatura definida, tal como 22 °C como se describe en la presente memoria. Comúnmente, se aplica un gradiente de tensión de cizalladura bien definido a la formulación líquida y se mide la tasa de cizalladura resultante. La viscosidad es la relación de la tensión de cizalladura a la tasa de cizalladura. Como se usa en la presente memoria, la viscosidad se expresa en unidades de mPa-s a 22 °C en las que 1 mPa-s = 1 cP. Las
- 50 formulaciones de baja viscosidad, sustancialmente isosmóticas divulgadas en la presente memoria se caracterizan generalmente por tener una viscosidad que varía desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 20 mPa-s a 22 °C, o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 15 mPa-s a 22 °C, o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 10 mPa-s a 22 °C o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 8 mPa-s a 22 °C o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 6 mPa-s a 22 °C.

- 55 Como se usa en la presente memoria, el término “osmolalidad” se refiere a una medida de la concentración de soluto, que se define como el número de milimoles de soluto por kg de solución. Un nivel deseado de osmolalidad puede lograrse mediante la adición de uno o más estabilizantes tales como un azúcar o alcohol de azúcar,

incluyendo, pero sin limitación, manitol, dextrosa, glucosa, trehalosa y/o sacarosa. Otros estabilizantes que son adecuados para proporcionar osmolalidad se describen en referencias tales como el Handbook of Pharmaceutical Excipients (Fourth Edition, Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, Science & Practice Publishers) o Remingtons: The Science and Practice of Pharmacy (Nineteenth Edition, Mack Publishing Company).

- 5 Como se usa en la presente memoria, el término “aproximadamente” se refiere a +/- 10% del valor unitario proporcionado. Como se usa en la presente memoria, el término “sustancialmente” se refiere a la condición cualitativa de exhibir un grado total o aproximado de una característica o propiedad de interés. Una persona de habilidad normal en las técnicas biológicas entenderá que los fenómenos biológicos y químicos raramente, si alguna vez, alcanzan o evitan un resultado absoluto. El término sustancialmente es por lo tanto usado en la presente
- 10 memoria para captar la falta potencial de exhaustividad inherente a muchos fenómenos biológicos y químicos. Como se usa en la presente memoria, los términos “isosmótico” e “isotónico” se usan de manera intercambiable con los términos “sustancialmente isosmótico” y “sustancialmente isotónico” y se refieren a formulaciones que se caracterizan por tener una presión osmótica que es la misma o al menos sustancialmente equivalente a la presión osmótica de otra solución, que se logra mediante formulaciones en las que la concentración total de solutos,
- 15 incluyendo los solutos permeables e impermeables, en la formulación es la misma que o al menos sustancialmente equivalente al número total de solutos en la otra solución. Por lo tanto, aunque los expertos en la técnica apreciarán que las formulaciones “isosmóticas” e “isotónicas” que se usan para la administración *in vivo* generalmente tienen una osmolalidad que varía desde aproximadamente 270 mmol/kg a aproximadamente 310 mmol/kg, en el contexto de las formulaciones de baja viscosidad de la presente divulgación, los términos “isosmótico”, “isotónico”,
- 20 “sustancialmente isosmótico” y “sustancialmente isotónico” se usan de manera intercambiable para referirse a formulaciones que tienen una osmolalidad que varía desde aproximadamente 240 mmol/kg a aproximadamente 380 mmol/kg, o desde aproximadamente 270 mmol/kg a aproximadamente 370 mmol/kg, o desde aproximadamente 300 mmol/kg a aproximadamente 330 mmol/kg.

- Las formulaciones de anticuerpos y otras proteínas de baja viscosidad, sustancialmente isosmóticas descritas en la
- 25 presente memoria, contienen desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM de histidina, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm de un agente tensioactivo no iónico tal como, por ejemplo, polisorbato (Tween®) 80 o polisorbato (Tween®) 20; desde aproximadamente 88 mM a aproximadamente 292 mM de un azúcar o alcohol de azúcar tal como, por ejemplo, manitol, dextrosa, glucosa, trehalosa y/o sacarosa; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de arginina; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente
- 30 50 mM de lisina; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 133 mM de glicina o alanina; desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM de metionina, y desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml de una proteína a un pH desde aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 6. Las formulaciones descritas en la presente memoria presentan una viscosidad que varía desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 20 mPa-s a 22 °C, o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 15 mPa-s a
- 35 22 °C, o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 10 mPa-s a 22 °C o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 8 mPa-s a 22 °C o desde aproximadamente 1 mPa-s a aproximadamente 6 mPa-s a 22 °C y una osmolalidad que varía desde aproximadamente 240 a aproximadamente 380 mmol/kg.

- En estas formulaciones, la histidina es un agente tampón, que puede ser usado para mantener el pH de la formulación desde aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 6,0, o aproximadamente pH 5 a
- 40 aproximadamente pH 6, tal como aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 5,5, o aproximadamente pH 6. Los azúcares o alcoholes de azúcar, tales como manitol, dextrosa, glucosa, trehalosa y/o sacarosa, se usan por separado o en combinación, como crio-protectores y estabilizantes del anticuerpo en formulaciones líquidas, así como durante y después de la liofilización. Los tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos, incluyendo
- 45 polisorbato 20 y polisorbato 80; polioxámeros, incluyendo poloxámero 184 y 188; polioles Pluronic®; y otros polímeros de bloque de etileno/polipropileno, estabilizan el anticuerpo durante el procesamiento y almacenamiento mediante la reducción de la interacción interfacial y previenen la adsorción de la proteína. La arginina es un solubilizante de proteína y también un estabilizante que reduce la agregación de anticuerpos y otras proteínas, tales como la agregación de mAb aTFPI y la glicación. La metionina es un antioxidante que previene la oxidación de anticuerpos durante el procesamiento y almacenamiento.

- 50 Los azúcares y sales inorgánicas se usan comúnmente como estabilizantes de proteína; sin embargo, los azúcares y las sales inorgánicas también son agentes de tonicidad eficaces. Si una formulación requiere una concentración elevada de uno o más azúcares para estabilizar una proteína, la concentración de sal inorgánica debe ser cero o mantenerse muy baja con el fin de mantener la osmolalidad de la formulación de tal manera de reducir el dolor de la inyección tras la administración. Bastante sorprendentemente, se encontró que el cloruro de sodio aumentaba la
- 55 turbidez de las formulaciones de anticuerpos. Por consiguiente, la adición de sales inorgánicas se excluye sustancialmente de las formulaciones descritas en la presente memoria. Estas formulaciones sin sal mantienen la osmolalidad de las formulaciones de anticuerpos y otras proteínas con aumento de la estabilidad y reducción del cambio de fase, tal como precipitación o agregación.

- Como se usa en la presente memoria, el término “sal” se refiere a sales inorgánicas, incluyendo, pero sin limitación,
- 60 cloruro de sodio (NaCl), sulfato de sodio (Na₂SO₄), tiocianato de sodio (NaSCN), cloruro de magnesio (MgCl), sulfato de magnesio (MgSO₄), tiocianato de amonio (NH₄SCN), sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄), cloruro de amonio (NH₄Cl), cloruro de calcio (CaCl₂), sulfato de calcio (CaSO₄), cloruro de cinc (ZnCl₂) y similares, o combinaciones de las

mismas. Las formulaciones de anticuerpos y otras proteínas descritas en la presente memoria se caracterizan por una ausencia sustancial de sal añadida y son, por lo tanto, denominadas en la presente memoria como formulaciones de anticuerpos y/o proteínas sin sal. Los expertos en la técnica entenderán que la presencia de sales inorgánicas dentro de las formulaciones descritas actualmente que se introducen por el ajuste del pH no se consideran que sean sales añadidas, y tales sales inorgánicas, si están presentes en una formulación de acuerdo con la presente divulgación, no deben exceder de una concentración de aproximadamente 2 mM.

Como se usa en la presente memoria, el término “tensioactivo” incluye tensioactivos no iónicos incluyendo, sin limitación, polisorbatos, tales como polisorbato 20 u 80, y los polioxámeros, tales como poloxámero 184 o 188, polioles Pluronic®, y otros polímeros de bloque de etileno/polipropileno. Las cantidades de agentes tensioactivos eficaces para proporcionar formulaciones de anticuerpos y otras proteínas están por lo general en el intervalo de 50 ppm a 200 ppm. El uso de tensioactivos no iónicos permite que las formulaciones sean expuestas a tensiones de cizalladura y superficie sin causar la desnaturalización del anticuerpo u otra proteína, y también reduce la adsorción sobre las superficies durante el procesamiento y almacenamiento. Las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen, sin limitación, formulaciones que tienen uno o más agentes tensioactivos no iónicos, incluyendo, por ejemplo, uno o más polisorbatos, tales como polisorbato 20 o 80; uno o más polioxámeros, tales como poloxámero 184 o 188; uno o más polioles Pluronic®; y/o uno o más polímeros de bloque de etileno/polipropileno. En la presente memoria se ejemplifican formulaciones que tienen un polisorbato, tal como polisorbato 20 (Tween® 20) o polisorbato 80 (Tween® 80).

Como se usa en la presente memoria, el término “proteína” se refiere a polímeros de aminoácidos que contienen al menos cinco aminoácidos constituyentes que están covalentemente unidos por enlaces peptídicos. Los aminoácidos constituyentes pueden ser del grupo de los aminoácidos que están codificados por el código genético, que incluyen: alanina, valina, leucina, isoleucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano, serina, treonina, asparagina, glutamina, cisteína, glicina, prolina, arginina, histidina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico. Como se usa en la presente memoria, el término “proteína” es sinónimo de los términos relacionados “péptido” y “polipéptido”.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una clase de proteínas que se conocen generalmente como inmunoglobulinas. Los anticuerpos incluyen anticuerpos monoclonales (mAb) de longitud completa, tales como anticuerpos monoclonales IgG₂, que incluyen regiones Fc de inmunoglobulina. El término anticuerpo también incluye anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, moléculas de cadena única y fragmentos de anticuerpos tales como Fab, F (ab')₂ y Fv.

Como se usa en la presente memoria, el término “anticuerpo anti-TFPI” se refiere a un anticuerpo que tiene especificidad de unión contra la proteína TFPI humana, así como fragmentos y variantes de la proteína TFPI humana. Los anticuerpos anti-TFPI presentados en la presente memoria pueden ser anticuerpos IgG₂ e incluyen anticuerpos monoclonales anti-TFPI IgG₂, tales como anticuerpos monoclonales anti-TFPI IgG₂ quiméricos, humanizados y totalmente humanos. Los anticuerpos anti-TFPI se ejemplifican en la presente divulgación por anticuerpos monoclonales anti-TFPI IgG₂ humanos que tienen una cadena ligera que comprende la secuencia presentada en la presente memoria como SEQ ID NO: 1 y/o una cadena pesada presentada en la presente memoria como SEQ ID NO: 2. Otros anticuerpos monoclonales anti-TFPI, incluyendo anticuerpos de longitud completa y fragmentos de unión a antígeno y variantes de los mismos, que también son adecuados para su uso en las formulaciones descritas en la presente memoria se presentan en la Publicación de Patente PCT Núm. WO 2011/109452 y WO 2010/017196.

Los “anticuerpos monoclonales” se caracterizan por tener especificidad para un único determinante antigénico. Los anticuerpos monoclonales pueden, por ejemplo, ser fabricados mediante el procedimiento de hibridoma descrito por Kohler y Milstein, *Nature* 256:495 (1975) o mediante procedimientos de ADN recombinante, tales como los descritos en la Patente de EE.UU. Núm. 4.816.567. Los anticuerpos monoclonales también pueden aislarse a partir de bibliotecas de presentación de fagos usando técnicas tales como las descritas en Clackson *et al.*, *Nature* 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991).

Los anticuerpos monoclonales incluyen “anticuerpos monoclonales quiméricos” en los que una porción de una cadena pesada y/o ligera incluye secuencias de anticuerpos derivados de una especie, mientras que el resto del anticuerpo, incluyendo la región Fc, incluye secuencias de anticuerpos derivados de una segunda especie, comúnmente la segunda especie es humana. Véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. Núm. 4.816.567 y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984).

Los anticuerpos monoclonales también incluyen “anticuerpos monoclonales humanizados” en los que una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) de una secuencia de cadena pesada y/o ligera de anticuerpos derivados de una especie reemplazan una o más CDR de una secuencia de cadena pesada y/o ligera de anticuerpos derivados de una segunda especie, comúnmente la segunda especie es humana. El procedimiento de “humanización” se aplica generalmente a anticuerpos monoclonales desarrollados para la administración a seres humanos. Véase, por ejemplo, Riechmann *et al.*, *Nature* 332(6162):323-27 (1988) y Queen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86(24):10029-33 (1989).

Los anticuerpos monoclonales también incluyen “anticuerpos monoclonales totalmente humanos”, en los que la

totalidad de las secuencias de cadena pesada y ligera derivan de secuencias de anticuerpos humanos. Los anticuerpos monoclonales totalmente humanos pueden ser generados por tecnologías de presentación de fagos y pueden aislarse a partir de ratones que han sido manipulados genéticamente para expresar el repertorio de anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, McCafferty *et al.*, *Nature* 348(6301):552-554 (1990), Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222(3):581-597 (1991), y Carmen y Jermutus, *Brief Funct. Genomic Proteomic* 1(2):189-203 (2002).

Como se usa en la presente memoria, la expresión "cantidad farmacéuticamente eficaz" de una formulación de anticuerpos u otras proteínas se refiere a una cantidad de la formulación que proporciona un efecto terapéutico en un régimen de administración. Las formulaciones de anticuerpos y proteínas descritas en la presente memoria incluyen generalmente un anticuerpo u otra proteína a una concentración que varía desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 20 mg/ml, o desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml, o desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 90 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o desde aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. Dentro de algunos aspectos la concentración de la proteína o el anticuerpo en estas formulaciones es de aproximadamente 150 mg/ml. Cuando tales formulaciones se administran por vía subcutánea generalmente se administran en un volumen de menos de aproximadamente 2,0 ml, o aproximadamente 1,5 ml, o aproximadamente 1 ml, o aproximadamente 0,5 ml por sitio de inyección.

Dentro de ciertos aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 30 mM de histidina, aproximadamente 100 ppm de Tween 80, aproximadamente 292 mM de sacarosa, aproximadamente 20 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 234 mM de sacarosa, aproximadamente 50 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 234 mM de sacarosa, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 88 mM de sacarosa, aproximadamente 133 mM de glicina, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 20, aproximadamente 88 mM de sacarosa, aproximadamente 133 mM de glicina, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 200 ppm de Tween 20, aproximadamente 88 mM de sacarosa, aproximadamente 133 mM de glicina, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 88 mM de sacarosa, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM de arginina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 88 mM de sacarosa, aproximadamente 133 mM de glicina, aproximadamente 10 mM de arginina, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM de metionina.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 88 mM de sacarosa, aproximadamente 133 mM de glicina, aproximadamente 30 mM de lisina, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0.

Dentro de otros aspectos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas contiene aproximadamente 10 mM de histidina, aproximadamente 75 ppm de Tween 80, aproximadamente 234 mM de sacarosa, aproximadamente 30 mM de arginina, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo u otra proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 5,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de aspectos relacionados, la formulación de anticuerpos u otras proteínas también contiene desde aproximadamente 0 mM a 10 mM de metionina.

En la presente memoria se ejemplifican formulaciones de anticuerpos en las que los anticuerpos incluyen anticuerpos IgG₂, tales como anticuerpos inhibidores de la vía del factor anti-tisular (Abs aTFPI), incluyendo el anticuerpo monoclonal IgG₂ humano que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2.

De este modo, la presente divulgación proporciona formulaciones de mAb anti-TFPI, incluyendo formulaciones de mAb anti-TFPI IgG₂, en las que el mAb anti-TFPI es soluble a concentraciones elevadas de proteínas. Generalmente, el mAb anti-TFPI en las formulaciones descritas en la presente memoria permanece soluble a concentraciones de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml y se mantiene estable en condiciones de almacenamiento isosmóticas y exhibe viscosidad reducida en comparación con formulaciones de anticuerpos disponibles en la actualidad.

El anticuerpo anti-TFPI que tiene una cadena ligera que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2 es un anticuerpo IgG₂ que bloquea el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI). Como TFPI infra-regula la coagulación extrínseca, los anticuerpos anti-TFPI pueden promover la coagulación impulsada por la vía extrínseca mediante el bloqueo de TFPI, evitando así deficiencias de FVIII o FIX en la vía intrínseca para el tratamiento de la hemofilia. Las formulaciones de anticuerpos anti-TFPI sin sal, presentadas en la presente memoria pueden administrarse a los pacientes a través de inyección intravenosa o inyección subcutánea u otras vías de inyección.

Como parte de la presente divulgación, se encontró que la solubilidad y la estabilidad de los anticuerpos anti-TFPI se vio afectada por excipientes. La solubilidad del anticuerpo anti-TFPI aumenta con la disminución de las concentraciones de NaCl. En ausencia de NaCl, la solubilidad del anticuerpo anti-TFPI es mayor que las formulaciones que incluyen NaCl. Además, se encontró que los aminoácidos con carga positiva, tales como arginina y lisina, podrían mejorar la estabilidad del anticuerpo anti-TFPI y que el pH afectaba en gran medida la solubilidad del anticuerpo anti-TFPI. La turbidez de la solución de anticuerpo se incrementó con el aumento en el pH; sin embargo, la precipitación fue reversible cuando se disminuyó el pH. El pH óptimo para la estabilización de los anticuerpos anti-TFPI presentados en la presente memoria varía desde aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 6 o desde aproximadamente pH 5 a aproximadamente pH 6, tal como aproximadamente pH 5, aproximadamente pH 5,5 o aproximadamente pH 6.

En la presente memoria se ejemplifican formulaciones, como se ha indicado anteriormente, en las que el anticuerpo es un anticuerpo anti-TFPI (Ab aTFPI). En al menos un aspecto, el anticuerpo anti-TFPI es un anticuerpo monoclonal IgG₂ humano. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-TFPI IgG₂ humano incluye el anticuerpo que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2.

Secuencias de cadena pesada y ligera de un anticuerpo monoclonal anti-TFPI IgG₂ humano ejemplar

Identificador de secuencia	Secuencia de aminoácidos (NH ₃ -COOH)
----------------------------	--

(continuación)

Identificador de secuencia	Secuencia de aminoácidos (NH ₃ -COOH)
SEQ ID NO: 1	SYELTQPPSV SVSPGQTARI TCSGDNLPKY YAHWYQQKPG QAPVVVIFYD VNRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISGTQAM DEADYYCQAW WSSTPVFGGG TKLTVLGQPK AAPSVTLFPP SSEELQANKA TLVCLISDFY PGAVTVAWKA DSSPVKAGVE TTPSKQSNK KYAASSYLSL TPEQWKSHRS YSCQVTHEGS TVEKTVAPTE CS
SEQ ID NO: 2	EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMDWVRQA PGKGLEWVSS IRGSRGSTYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARLY RYWFYWGQG TLVTVSSAST KGPSVFPLAP CSRSTSESTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF PAVLQSSGLY SLSSVTVPS SNFGTQTYTC NVDHKPSNTK VDKTVRKCC VECPPCPAPP VAGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVQ FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QFNSTFRVVS VLTVVHQDWL NGKEYKCKVS NKGLPAPIEK TISKTKGQPR EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GPENNYKTT PPMLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL PG

La presente divulgación también proporciona procedimientos para su uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, que comprenden la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más formulaciones descritas en la presente memoria. Por ejemplo, se proporcionan procedimientos para su uso en el tratamiento de un trastorno en un paciente, que comprenden la administración al paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación de anticuerpos u otras proteínas que contiene desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM de histidina y, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm de polisorbato (Tween®) 80 o polisorbato (Tween®) 20, desde aproximadamente 88 mM a aproximadamente 292 mM de sacarosa, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de arginina, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de lisina, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 133 mM de glicina o alanina, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM de metionina, y desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml de una proteína a un pH que varía desde aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de al menos uno de los aspectos de estos procedimientos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas puede administrarse por vía intravenosa. Dentro de otros aspectos de estos procedimientos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas puede administrarse por vía subcutánea. Dentro de otros aspectos de estos procedimientos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas puede administrarse por vía intramuscular.

Dentro de aspectos relacionados, la presente divulgación proporciona procedimientos para su uso en el tratamiento de la hemofilia A o la hemofilia B en un paciente, que comprenden la administración al paciente de una cantidad

terapéuticamente eficaz de una formulación de anticuerpo anti-TFPI que contiene desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 30 mM de histidina y, desde aproximadamente 50 ppm a aproximadamente 200 ppm de polisorbato (Tween®) 80 o polisorbato (Tween®) 20, desde aproximadamente 88 mM a aproximadamente 292 mM de sacarosa, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de arginina, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM de lisina, desde aproximadamente 0% (0 mM) a aproximadamente 1% (133 mM) de glicina, desde aproximadamente 0 mM a aproximadamente 10 mM de metionina, y desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml de una proteína en un pH que varía desde aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 6,0. Dentro de al menos un aspecto de estos procedimientos, la formulación de anticuerpo anti-TFPI puede ser administrada por vía intravenosa. En otros aspectos de estos procedimientos, la formulación de anticuerpo anti-TFPI puede ser administrada por vía subcutánea. Dentro de otros aspectos de estos procedimientos, la formulación de anticuerpos u otras proteínas puede administrarse por vía intramuscular.

De acuerdo con ciertos aspectos de estos procedimientos para su uso en el tratamiento de la hemofilia A o la hemofilia B en un paciente, el anticuerpo anti-TFPI es un anticuerpo monoclonal anti-TFPI IgG₂ humano tal como, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal anti-TFPI IgG₂ humano que contiene una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2.

A los efectos de la interpretación de esta memoria, se aplicarán las siguientes definiciones y, cuando sea apropiado, los términos usados en singular también incluirán el plural y viceversa. En el caso de que cualquier definición establecida a continuación entre en conflicto con el uso de esa palabra en cualquier otro documento, la definición establecida a continuación siempre controlará a los efectos de interpretar esta memoria y sus reivindicaciones asociadas a menos que se prevea claramente un significado contrario (por ejemplo, en el documento en el que se usó originalmente el término). El uso de “o” significa “y/o” a menos que se indique lo contrario. El uso de “un” significa en la presente memoria “uno o más” a menos que se especifique lo contrario o cuando el uso de “uno o más” sea claramente inadecuado. El uso de “comprenden”, “comprende”, “que comprende”, “incluyen”, “incluye” y “que incluye” es intercambiable y no pretende ser limitante. Por otra parte, cuando en la descripción de una o más realizaciones se usa la expresión “que comprende”, los expertos en la técnica entenderán que, en algunos casos específicos, la realización o realizaciones pueden describirse alternativamente usando la expresión “que consiste esencialmente de” y/o “que consiste de”.

Los aspectos de la presente divulgación pueden ser entendidos más en profundidad a la luz de los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse de ninguna manera como limitantes del ámbito de las presentes enseñanzas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Efecto de la concentración de NaCl y el pH sobre la turbidez de soluciones de anticuerpos

Este Ejemplo divulga el efecto de la concentración de sal (NaCl) y el pH sobre la turbidez de soluciones que contienen un anticuerpo monoclonal anti-TFPI humano que tiene una cadena ligera con la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada con la secuencia de aminoácidos presentada en SEQ ID NO: 2.

La turbidez de las soluciones se midió por Nefelometría para evaluar rápidamente los efectos de las concentraciones de sal y el pH sobre soluciones de Ab aTFPI. La formulación de anticuerpo anti-TFPI usada en este Ejemplo contenía 10 mM de tampón acetato, 88 mM de sacarosa y 200 ppm de Tween 80. Las concentraciones de NaCl se variaron de 0 mM a 300 mM. Los resultados de las mediciones de turbidez dependiente de NaCl para formulaciones de mAb anti-TFPI a pH 5,5 se presentan en la FIG. 1. Estos datos demostraron que la turbidez de las formulaciones de mAb anti-TFPI aumentó significativamente con el aumento de la concentración de NaCl. El aumento de la concentración de sal de 0 a 300 mM dio lugar a un aumento de 72 FNU en el valor de la turbidez por Nefelometría, lo que podría atribuirse a la precipitación, agregación o insolubilización del Ab aTFPI en solución. Como resultado de este hallazgo, se recomendaron soluciones sin cloruro de sodio para las formulaciones de anticuerpos anti-TFPI descritas en la presente memoria.

Sin estar ligados por la teoría, se cree que el aumento de la turbidez de las formulaciones de mAb anti-TFPI con el aumento de la concentración de NaCl es el resultado de la neutralización de cargas positivas en las cadenas laterales de arginina del mAb anti-TFPI. El comportamiento de fase del mAb aTFPI a diferentes pH con el impacto de la sal monovalente (NaCl) explica por qué podrían lograrse formulaciones de mAb aTFPI estables, solubles, sin sal y con isosmolalidad sustancial.

La molécula de mAb aTFPI descrita en la presente memoria tiene 116 aminoácidos (42 argininas y 74 lisinas) que tienen una cadena lateral que porta cargas positivas en el pH por debajo del PI. Este anticuerpo anti-TFPI tiene un PI a ~ 7,9. A un pH por debajo del PI, tal como pH 4-6, este anticuerpo anti-TFPI tiene cargas netas positivas. La repulsión de las cargas positivas en esta superficie del anticuerpo anti-TFPI probablemente impide la asociación proteína-proteína entre las moléculas individuales y, de este modo, aumenta de manera significativa la solubilidad. Se planteó la hipótesis de que el anión (Cl⁻) de la sal se une al grupo guanidinio de las cadenas laterales de arginina

sobre la superficie del anticuerpo anti-TFPI para neutralizar las cargas positivas, lo que mejora las interacciones proteína-proteína y, por lo tanto, causa menor solubilidad y turbidez de la solución. Al cambiar el pH a 4-6, se desarrollaron las formulaciones sin sal que se describen en la presente memoria para lograr un aumento de la solubilidad y la estabilidad del anticuerpo (ver Figura 1). En ausencia de sal, la concentración de otros estabilizantes, tales como sacarosa, puede aumentarse a >150 mM y <300 mM sin comprometer la osmolalidad.

También se estudió el efecto del pH sobre la turbidez de los anticuerpos anti-TFPI. Como se mostró en la Figura 2, el pH también puede afectar en gran medida la turbidez de la solución de Ab aTFPI. Cuando el pH se incrementó de 4 a 6,5, la turbidez de la solución de Ab aTFPI aumentó en 81 FNU. Además, aumentando el pH a 7, la turbidez de la solución estaba fuera del intervalo para una medición exacta. Sin embargo, los precipitados formados en la solución eran reversibles cuando se disminuyó el pH. Este resultado podría atribuirse a la neutralización de la carga superficial cuando se aumentó el pH al valor cercano al pI del Ab aTFPI, ya que el valor de pI del Ab aTFPI es aproximadamente 7,9. De acuerdo con este estudio, se prefiere un pH más bajo para las formulaciones de Ab aTFPI. Sin embargo, un pH bajo puede causar irritación de los tejidos durante la inyección. Por lo tanto, se prefiere un pH neutro desde el punto de vista del cumplimiento del paciente. Equilibrando estos dos factores, el pH óptimo de las formulaciones de Ab aTFPI es entre pH 5 y pH 6.

Ejemplo 2

Formulaciones de anticuerpos anti-TFPI

En base a los hallazgos inesperados presentados en el Ejemplo 1, se prepararon formulaciones de Ab anti-TFPI sustancialmente isosmóticas, sin NaCl. Estas formulaciones emplearon generalmente altas concentraciones de sacarosa para ayudar a estabilizar el Ab anti-TFPI.

El anticuerpo anti-TFPI congelado se descongeló y se reformuló por diálisis de acuerdo con las formulaciones presentadas en la Tabla 1. Las formulaciones se prepararon y se filtraron con un filtro de 0,22 µm y se colocaron en viales de tubo de vidrio y se taparon con tapones de goma.

También se encontró que, en ausencia de NaCl, y en presencia de sacarosa 88 mM a 292 mM y polisorbato 80 o polisorbato 20 (50-200 ppm), los aminoácidos cargados positivamente, tales como arginina (10-50 mM), pueden inhibir eficazmente al Ab aTFPI de la glicación.

Tabla 1

Formulaciones de anticuerpos anti-TFPI

Designación de la formulación	Composición de la formulación
PH5.0	20 mg/ml de mAb aTFPI 30 mM de histidina 292 mM de sacarosa 100 ppm de de Tween 80 pH 5,0
PH5.5	20 mg/ml de mAb aTFPI 30 mM de histidina 292 mM de sacarosa 100 ppm de de Tween 80 pH 5,5
PH6.0	20 mg/ml de mAb aTFPI 30 mM de histidina 292 mM de sacarosa 100 ppm de de Tween 80 pH 6,0

(continuación)

Designación de la formulación	Composición de la formulación
6ARG	20 mg/ml de mAb aTFPI 30 mM de histidina 292 mM de sacarosa 100 ppm de de Tween 80 50 mM de arginina pH 6,0
PH5.5LC	50 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 234 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 pH 5,5
PH5.5LCARG	50 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 234 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 30 mM de arginina pH 5,5
PH5.5HCARG	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 234 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 30 mM de arginina pH 5,5
PH6LCARG	50 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 234 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 50 mM de arginina pH en 6

(continuación)

Designación de la formulación	Composición de la formulación
PH6LCARG_L	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 234 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 30 mM de arginina pH 6
3%STWN80	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 88 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 30 mM de arginina 133 mM de glicina pH 5,5
3%STWN20_L	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 88 mM de sacarosa 75 ppm Tween 20 30 mM de arginina 133 mM de glicina pH 5,5
3%STWN20_H	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 88 mM de sacarosa 200 ppm Tween 20 30 mM de arginina 133 mM de glicina pH en 5,5
5.5ARG10	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 88 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 10 mM de arginina 133 mM de glicina pH 5,5

(continuación)

Designación de la formulación	Composición de la formulación
5.5ARG10MET	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 88 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 10 mM de arginina 10 mM de metionina 133 mM de glicina pH 5,5
5.5LYS30	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 88 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 30 mM de lisina 133 mM de glicina pH 5,5
PH5.5HCARGMET	100 mg/ml de Ab aTFPI 10 mM de histidina 234 mM de sacarosa 75 ppm de Tween 80 30 mM de arginina 10 mM de metionina pH 5,5

Cada una de estas formulaciones de mAb anti-TFPI se analizó mediante HPLC-SEQ para determinar la agregación y la degradación de proteínas, LC-MS para determinar cambios estructurales en aTFPI (glicación y oxidación) y nefelometría para la evaluación de la turbidez, viscosímetro para la medición de la viscosidad, y aparato de

5

osmolalidad para la medición de la osmolalidad. Los resultados de estos análisis se presentan en la Tabla 2.

<i>Osmolalidad y viscosidad de formulaciones de anticuerpos anti-TFPI</i>		
Composición de la formulación	Viscosidad a 22 °C (mPa-s)	Osmolalidad (mmol/kg)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5	1,8	272

(continuación)

<i>Osmolalidad y viscosidad de formulaciones de anticuerpos anti-TFPI</i>		
Composición de la formulación	Viscosidad a 22 °C (mPa-s)	Osmolalidad (mmol/kg)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	1,6	339
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	2,9	335
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 50 mM	2,3-	373
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 30 mM	4,6	353*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	4,1	282*

(continuación)

<i>Osmolalidad y viscosidad de formulaciones de anticuerpos anti-TFPI</i>		
Composición de la formulación	Viscosidad a 22 °C (mPa-s)	Osmolalidad (mmol/kg)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	4,5	282
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 200 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	4,5	278
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 10 mM Glicina 133 mM	--	263*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 10 mM Metionina 10 mM Glicina 133 mM	--	268*

(continuación)

<i>Osmolalidad y viscosidad de formulaciones de anticuerpos anti-TFPI</i>		
Composición de la formulación	Viscosidad a 22 °C (mPa-s)	Osmolalidad (mmol/kg)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Lisina 30 mM Glicina 133 mM	--	288*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Metionina 10 mM	3,0	341
* Osmolaridad estimada basada en cálculos		

Ejemplo 3

El efecto de la arginina sobre la glicación de Ab anti-TFPI

5 El Ejemplo demuestra que las formulaciones de Ab anti-TFPI que contienen arginina muestran reducción de la glicación de anticuerpos en comparación con formulaciones de Ab anti-TFPI sin arginina añadida.

Las formulaciones de Ab anti-TFPI, con y sin arginina, a pH 6 se almacenaron a 40 °C durante 14 días y se analizaron por LC-MS. Los resultados presentados en la Tabla 3 demuestran que el aminoácido arginina cargado positivamente reduce la glicación de Ab anti-TFPI, posiblemente debido a la estructura única del Ab aTFPI, al nivel que se encuentra en un estándar de referencia.

10

Tabla 3

<i><u>La arginina reduce la glicación del mAb Anti-TFPI</u></i>		
Designación de la formulación	Composición de la formulación	Perfil de LC-MS
PH6.0	20 mg/ml de mAb aTFPI 30 mM de Histidina 292 mM de Sacarosa 100 ppm de Tween 80 pH 6,0	Glicación

(continuación)

<u>La arginina reduce la glicación del mAb Anti-TFPI</u>		
Designación de la formulación	Composición de la formulación	Perfil de LC-MS
6ARG	20 mg/ml de mAb aTFPI 30 mM de Histidina 292 mM de Sacarosa 100 ppm de Tween 80 50 mM de Arginina pH 6,0	Comparable al Estándar de Referencia

- 5 Puede concluirse sobre la base de los resultados de este estudio que la estabilidad del Ab aTFPI está muy afectada por el pH de la formulación y el pH óptimo para la estabilidad de la formulación es de entre pH 5 y pH 6 cuando se considera la inyección IV, IM y subcutánea. La arginina pareció ser capaz de prevenir la glicación del Ab aTFPI. Los estudios de desarrollo y estabilidad de la formulación que se presentan en el Ejemplo 4 y el Ejemplo 5 fueron diseñados sobre la base de estos hallazgos.

Ejemplo 4**Estabilidad de las formulaciones de Ab anti-TFPI**

- 10 Los resultados de HPLCSEQ y los resultados de LC-MS de las formulaciones de Ab anti-TFPI se resumen en las Tablas 4-7.

Tabla 4

<u>Estabilidad de formulaciones para liofilización de Ab anti-TFPI después de 3 meses a 5 °C</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5	0	Y
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0	Y

(continuación)

<u>Estabilidad de formulaciones para liofilización de Ab anti-TFPI después de 3 meses a 5 °C</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0	Y
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 50 mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 30 mM	0	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0	Y*

(continuación)

<i>Estabilidad de formulaciones para liofilización de Ab anti-TFPI después de 3 meses a 5 °C</i>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0 ¹	Y ¹
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 200 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0 ¹	Y ¹
¹ El cálculo se basó en el valor 2 meses. ² Si la tasa es negativa, se introduce cero. Y: Comparable al estándar de referencia Y*: Comparable al estándar de referencia, con mínimas modificaciones		

Tabla 5

<i>Estabilidad de formulaciones para liofilización de Ab Anti-TFPI después de 3 meses a 40 °C</i>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5	0,01	Glicación

(continuación)

<u>Estabilidad de formulaciones para liofilización de Ab Anti-TFPI después de 3 meses a 40 °C</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0,01	Y
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 50 mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 30 mM	0,01	Y*

(continuación)

<i>Estabilidad de formulaciones para liofilización de Ab Anti-TFPI después de 3 meses a 40 °C</i>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,01	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,04 ¹	Y ¹
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 200 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,04 ¹	Y ¹
¹ El cálculo se basa en el valor 2 meses. ² Si la tasa es negativa, se introduce cero. Y: Comparable al estándar de referencia Y*: Comparable al estándar de referencia, con pequeñas modificaciones		

Tabla 6

<i>Formulaciones líquidas a 5 °C durante 3 meses</i>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)

(continuación)

<u>Formulaciones líquidas a 5 °C durante 3 meses</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5	0	Y
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0	Y
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 50 mM	0	Y
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 30 mM	0,01	Y*

(continuación)

<u>Formulaciones líquidas a 5 °C durante 3 meses</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,01	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0 ¹	Y ¹
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 200 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0 ¹	Y ¹
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 10 mM	0	Y*

(continuación)

<u>Formulaciones líquidas a 5 °C durante 3 meses</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 10 mM Metionina 10 mM	0	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Lisina 30 mM	0,01	Y*
¹ El cálculo se basa en el valor de 2 meses. ² Si la tasa es negativa, se introduce cero. Y: Comparable al estándar de referencia Y*: Comparable al estándar de referencia, con pequeñas modificaciones		

Tabla 7

<u>Formulaciones líquidas a 40 °C durante 3 meses</u>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5	0,17	Glicación

(continuación)

<i>Formulaciones líquidas a 40 °C durante 3 meses</i>		
Composición de la formulación	HPLC-SEC Tasa promedio de formación de agregación (%/día) ²	LC-MS (3 meses)
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0,02	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM	0,04	Y*
aTFPI 50 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 50 mM	0,03	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 234 mM Tween 80 75 ppm pH 6,0 Arginina 30 mM	0,04	Y*

ES 2 741 575 T3

aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,04	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 75 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,04 ¹	Y* ¹
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 20 200 ppm pH 5,5 Arginina 30 mM Glicina 133 mM	0,040 ¹	Y* ¹
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 10 Mm	0,07	Y*
aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Arginina 10 mM Metionina 10 mM	0,06	Y*

aTFPI 100 mg/ml Histidina 10 mM Sacarosa 88 mM Tween 80 75 ppm pH 5,5 Lisina 30 mM	0,06	Y*
¹ El cálculo se basa en el valor 2 meses. Y: Comparable al estándar de referencia Y*: Comparable al estándar de referencia, con pequeñas modificaciones		

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Bayer HealthCare, LLC Ma, Xinghang Xiang, Jun

<120> FORMULACIONES DE ANTICUERPO Y PROTEÍNA

5 <130> 17207.0002USI1

<140> A asignar

<141> 15-03-2013

<150> US13/601598

<151> 31-08-2012

10 <160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 212

<212> PRT

15 <213> *Homo sapiens*

<400> 1

ES 2 741 575 T3

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Leu Pro Lys Tyr Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Val Val Ile Phe
35 40 45

Tyr Asp Val Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ala Trp Trp Ser Ser Thr Pro Val
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn
115 120 125

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val
130 135 140

Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu
145 150 155 160

Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser
165 170 175

Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser
180 185 190

Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro
195 200 205

Thr Glu Cys Ser
210

<210> 2
<211> 442
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 2

ES 2 741 575 T3

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Gly	Met	Asp	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Ser	Ile	Arg	Gly	Ser	Arg	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
65					70					75					80	
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Arg	Leu	Tyr	Arg	Tyr	Trp	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	
			100					105					110			
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	
		115					120					125				
Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	
	130					135					140					

ES 2 741 575 T3

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

ES 2 741 575 T3

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440

REIVINDICACIONES

1. Un anticuerpo anti-TFPI que comprende:

- a. 10 mM a 30 mM de histidina,
- b. 50 ppm a 200 ppm de un tensioactivo no iónico,
- 5 c. 88 mM a 292 mM de sacarosa,
- d. 0 mM a 50 mM de arginina,
- e. 0 mM a 50 mM de lisina,
- f. 0 mM a 133 mM de glicina o alanina,
- g. 0 mM a 10 mM de metionina y
- 10 h. 1 mg/ml a 150 mg/ml de anticuerpo anti-TFPI;

en la que dicha formulación de anticuerpo anti-TFPI tiene un pH de 4,0 a 6,0, y en el que la concentración de sales inorgánicas de dicha formulación de anticuerpo anti-TFPI no supera los 2 mM, y en el que dicho anticuerpo anti-TFPI comprende una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

15 2. La formulación de anticuerpo anti-TFPI de conformidad con la reivindicación 1, en la que dicha formulación tiene una viscosidad que varía de 1 a 8 mPa-s a 22 °C.

3. La formulación de anticuerpo anti-TFPI de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en la que dicha formulación tiene una osmolalidad que varía de 240 a 380 mmol/kg.

20 4. La formulación de anticuerpo anti-TFPI de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho tensioactivo no iónico es un polisorbato seleccionado entre polisorbato 20 y polisorbato 80.

5. La formulación de anticuerpo anti-TFPI de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende:

- a. 10 mM de histidina,
- b. 75 ppm de Tween 80,
- c. 234 mM de sacarosa,
- 25 d. 30 mM de arginina, y
- e. 10 mM de metionina, y
- f. 100 mg/ml de anticuerpo anti-TFPI;

en la que dicha formulación de anticuerpo anti-TFPI tiene un pH de 5,5.

30 6. La formulación de anticuerpo anti-TFPI de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en la que dicho anticuerpo anti-TFPI es un anticuerpo monoclonal IgG₂.

7. La formulación de anticuerpo anti-TFPI de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para su uso como un medicamento.

8. La formulación de anticuerpo anti-TFPI para el uso de la reivindicación 7, en la que dicho uso es el uso como un medicamento para tratar la hemofilia A o la hemofilia B.

35

FIG. 1

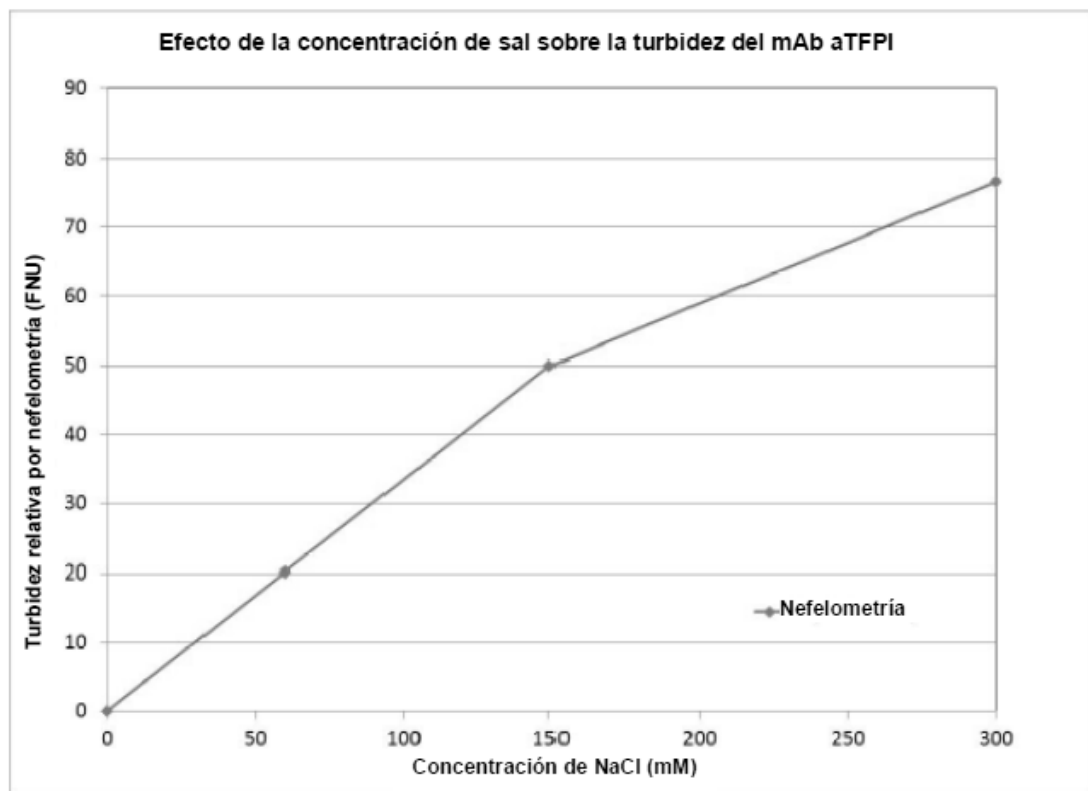


FIG. 2

