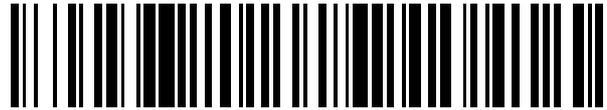


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 083**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010 E 10747896 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 2473528**

54 Título: **Formulaciones estables de polipéptidos y usos de las mismas**

30 Prioridad:

03.09.2009 US 275816 P
18.12.2009 US 284502 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
10.03.2015

73 Titular/es:

ABLYNX N.V. (100.0%)
Technologiepark 21
9052 Ghent-Zwijnaarde, BE

72 Inventor/es:

BRIGE, ANN;
LABEUR, CHRISTINE y
DE BRABANDERE, VERONIQUE

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 531 083 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 estables de polipéptidos y usos de las mismas

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones de dominios variables individuales. Más específicamente la presente invención proporciona formulaciones que contienen dominios variables individuales con una buena solubilidad y buena estabilidad en diferentes condiciones de almacenamiento y estrés. Las formulaciones de la invención son adecuadas para su administración a sujetos humanos.

La invención se refiere además a recipientes y unidades farmacéuticas que comprenden tales formulaciones y a usos profilácticos y terapéuticos de las formulaciones y unidades farmacéuticas de la invención.

15 Otros aspectos, realizaciones, ventajas y aplicaciones de la invención resultarán claras a partir de la descripción adicional en el presente documento.

Antecedentes de la técnica

20 Los nanocuerpos (tal como se describen adicionalmente en el presente documento) se caracterizan por la formación del sitio de unión a antígeno mediante un dominio variable individual, que no requiere interacción con un dominio adicional (por ejemplo en forma de interacción VH/VL) para el reconocimiento del antígeno. Se han descrito nanocuerpos contra una amplia gama de diferentes dianas (documentos WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/040153, WO 06/122825, WO 07/104529, WO 08/020079, WO 08/074839, WO 08/071447, WO 08/074840, WO 08/074867, WO 08/077945, WO 08/101985, WO 08/142164, WO 09/068625, WO 08/142165, WO 09/068627) que podrían ser candidatos ideales para el desarrollo de fármacos. Se describen nanocuerpos contra IL-6R que pueden inhibir la interacción IL-6/IL-6R en el documento WO 08/020079. Se han descrito nanocuerpos contra la subunidad p19 de IL-23 que bloquean la interacción de IL-23 con su receptor en el documento WO 09/068627. Se describen nanocuerpos contra RANKL que pueden inhibir la formación de osteoclastos en el documento WO 08/142164. Recientemente se ha descubierto el sistema OPG/RANKL/RANK como factores reguladores fundamentales en la patogénesis de enfermedades y trastornos óseos como por ejemplo osteoporosis.

A menudo proteínas tales como anticuerpos y nanocuerpos terapéuticos se transportan y/o se almacenan para un uso posterior. Por tanto, es importante que tales proteínas conserven la estabilidad y la actividad biológica de la proteína en diversas condiciones tales como diferentes regímenes de temperatura y estrés mecánico.

Determinadas preparaciones líquidas de anticuerpos anteriores han mostrado vidas útiles de almacenamiento cortas y pérdida de la actividad biológica de los anticuerpos que resultan de inestabilidades químicas y/o físicas durante el transporte y el almacenamiento. La inestabilidad química puede estar provocada por desamidación, racemización, hidrólisis, oxidación, beta-eliminación o intercambio de disulfuros, y la inestabilidad física puede estar provocada por desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción de anticuerpos. Entre éstas, se sabe que la agregación, desamidación y oxidación son las causas más comunes de la degradación de anticuerpos (Cleland *et al.*, 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377). Se sabe poco sobre componentes de formulación farmacéutica que proporcionen formulaciones líquidas estables de nanocuerpos.

Existe una necesidad de formulaciones líquidas estables de nanocuerpos que muestren una buena solubilidad del nanocuerpo y que presenten estabilidad aumentada, niveles de agregación de bajos a indetectables, niveles de degradación de nanocuerpos de bajos a indetectables y muy poca o ninguna pérdida de actividad biológica del nanocuerpo, incluso en diferentes condiciones de transporte y almacenamiento.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona formulaciones mejoradas (también denominadas "formulación/formulaciones de la invención") de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales que muestran buena solubilidad de los dominios variables individuales y conservan una estabilidad aumentada de los dominios variables individuales en una variedad de diferentes condiciones de transporte, almacenamiento y en uso. La presente invención se basa en el hallazgo de que la presencia en la formulación de determinados tampones puede aumentar la solubilidad, la temperatura de fusión y/o la estabilidad de los dominios variables individuales presentes en la formulación.

La presente invención proporciona datos de solubilidad para formulaciones con polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales (también denominados "polipéptido(s) de la invención") hasta 150 mg/ml y mayor. La invención muestra además que tales formulaciones pueden transportarse, manipularse a través de diversos dispositivos de administración y conservar la actividad, pureza y potencia en diferentes condiciones de estrés: condiciones de estrés mecánico; almacenamiento de la formulación a diversas condiciones de estrés tales como diferentes ciclos de congelación/descongelación, a 2-8°C, a 25±5°C y a temperatura elevada.

La formulación de la presente invención comprende un portador acuoso con un pH de 5,5 a 8,0 y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, estando formulada dicha formulación para su administración a un sujeto humano y comprendiendo además dicha formulación:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM seleccionado de histidina pH 6,0-6,5

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor y en la que el polipéptido se selecciona de uno de SEQ ID NO: 1 a 6.

Los presentes inventores observaron que formulaciones que tienen 150 mM o menos de sal inorgánica muestran una estabilidad mucho mejor de los dominios variables individuales contenidos en la formulación. Sales inorgánicas usadas frecuentemente en formulación farmacéutica son NaCl y KCl. Los dominios variables individuales presentes en formulaciones que contienen 150 mM o menos de sal inorgánica han mostrado un aumento de la estabilidad (por ejemplo menos tendencia a formar agregados, dímeros y/o piroglutamato, o a perder potencia) a diferentes condiciones de almacenamiento con estrés (tal como por ejemplo durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)), una mejora de la temperatura de fusión y/o un aumento de la solubilidad. Preferiblemente, la formulación contiene 100 mM o menos de sal inorgánica, más preferiblemente incluso 50 mM o menos de sal inorgánica. Lo más preferiblemente la formulación no contiene ninguna sal inorgánica.

El polipéptido (también denominado "*polipéptido de la invención*") que comprende uno o más dominios variables individuales para su uso en la formulación de la invención puede ser terapéutico o profiláctico, y puede ser útil en la prevención, el tratamiento y/o la gestión de una o más enfermedades y/o trastornos. En un aspecto específico, el polipéptido tiene al menos dos dominios variables individuales. En otro aspecto específico, el polipéptido tiene al menos tres dominios variables individuales. Los polipéptidos de la invención pueden seleccionarse de SEQ ID NO: 1 a 6.

El polipéptido de la invención está presente en la formulación de la presente invención a una concentración de 1 a 200 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 5 a 100 mg/ml o más, más preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 mg/ml o más, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 mg/ml o más, tal como alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 30 mg/ml, alrededor de 40 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 60 mg/ml, alrededor de 70 mg/ml, alrededor de 80 mg/ml, alrededor de 90 mg/ml, alrededor de 100 mg/ml, alrededor de 150 mg/ml o incluso más.

En un aspecto de la invención, la formulación es homogénea. En otro aspecto, la formulación de la invención es estéril. Además del polipéptido de la invención, la formulación de la presente invención comprende al menos un portador acuoso (por ejemplo agua destilada, agua MilliQ o WFI) y un tampón.

El pH de la formulación de la invención debe estar en el intervalo de 5,5 a 8,0, preferiblemente el pH es de alrededor de 6,0 a 7,5, más preferiblemente de alrededor de 6,2 a 7,5 o de alrededor de 6,2 a 7,0. Lo más preferiblemente el pH está en el intervalo de 6,5 a 7,0, tal como por ejemplo pH 6,5. Estos intervalos de pH han mostrado que proporcionan un aumento de la temperatura de fusión a los polipéptidos presentes en la formulación de la invención.

Tampones para su uso en la formulación de la invención son histidina pH 6,0-6,5. Formulaciones que comprenden uno de estos tampones han mostrado una muy buena solubilidad (tal como se define en el presente documento) de los polipéptidos de la invención, una mejora de la temperatura de fusión de los polipéptidos presentes en la formulación y un aumento de la estabilidad (por ejemplo menos tendencia a formar agregados, dímeros y/o piroglutamato, o a perder potencia) a diferentes condiciones de almacenamiento con estrés (tal como por ejemplo durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)). El tampón está preferiblemente a una concentración de aproximadamente 10 a 20 mM, tal como 10 mM o 15 mM. En un aspecto específico, la formulación de la invención comprende un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 15 mM o un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM.

Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales, comprendiendo dichas formulaciones un portador acuoso, el polipéptido a una concentración de desde aproximadamente 1 hasta 200 mg/ml o más, preferiblemente de aproximadamente 5 a 100 mg/ml o más, más preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 mg/ml o más, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 mg/ml o más, tal como alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 30 mg/ml, alrededor de 40 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 60 mg/ml, alrededor de 70 mg/ml, alrededor de 80 mg/ml, alrededor de 90 mg/ml, alrededor de 100 mg/ml, alrededor de 150 mg/ml o incluso más, y un tampón tal como un tampón histidina con un pH que oscila entre 6,0 y 7,0 a una concentración de

aproximadamente 10 a 20 mM.

Preferiblemente la formulación de la invención es isotónica o ligeramente hipotónica y/o tiene una osmolalidad de aproximadamente 290 ± 60 mOsm/kg, tal como aproximadamente 240 o mayor, 250 o mayor o 260 o mayor. La isotonicidad de la formulación puede ajustarse además mediante la adición de uno o más excipientes y/o agentes de tonicidad.

Excipientes/agentes de tonicidad preferidos para su uso en la formulación de la presente invención son sacáridos y/o polioles. Por consiguiente, en otro aspecto, la formulación de la invención comprende un sacárido y/o poliol. Las formulaciones que comprenden uno o más sacáridos y/o polioles han mostrado un aumento de la estabilidad (por ejemplo menos tendencia a formar agregados, dímeros y/o piroglutamato, o a perder potencia) a diferentes condiciones de almacenamiento con estrés (tal como por ejemplo durante almacenamiento a una temperatura de $37 \pm 5^\circ\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) y durante condiciones de estrés mecánico) y/o una mejora de la temperatura de fusión de los polipéptidos presentes en la formulación. En un aspecto específico de la invención, el excipiente presente en la formulación de la invención es un azúcar no reductor. En otro aspecto específico, el excipiente presente en la formulación de la invención es un disacárido. En otro aspecto específico, el excipiente presente en la formulación de la invención se selecciona de sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol. El sacárido y/o poliol está presente preferiblemente en la formulación de la invención a una concentración de aproximadamente el 1% al 20%, preferiblemente de aproximadamente el 2,5% al 15%, más preferiblemente de aproximadamente el 5% al 10%, tal como alrededor del 5%, alrededor del 7,5%, alrededor del 8% o alrededor del 10%.

Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales, comprendiendo dichas formulaciones un portador acuoso, el polipéptido a una concentración de desde aproximadamente 1 hasta 200 mg/ml o más, preferiblemente de aproximadamente 5 a 100 mg/ml o más, más preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 mg/ml o más, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 mg/ml o más, tal como alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 30 mg/ml, alrededor de 40 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 60 mg/ml, alrededor de 70 mg/ml, alrededor de 80 mg/ml, alrededor de 90 mg/ml, alrededor de 100 mg/ml, alrededor de 150 mg/ml o incluso más, y un sacárido y/o poliol a una concentración de aproximadamente el 1% al 20%, preferiblemente de aproximadamente el 2,5% al 15%, más preferiblemente de aproximadamente el 5% al 10%, tal como alrededor del 5%, alrededor del 7,5%, alrededor del 8% o alrededor del 10%.

En otro aspecto específico, la formulación de la invención puede comprender uno o más tensioactivos (por ejemplo, Tween 20, Tween 80 o un poloxámero). Las formulaciones que comprenden un tensioactivo han mostrado una muy buena solubilidad (tal como se define en el presente documento) de los polipéptidos de la invención y/o un aumento de la estabilidad con estrés mecánico. El tensioactivo puede estar presente a una concentración en el intervalo de aproximadamente el 0,001% al 1% (preferiblemente entre aproximadamente el 0,001% y el 0,1%, o aproximadamente el 0,01% y el 0,1% tal como alrededor del 0,001%, alrededor del 0,005%, alrededor del 0,01%, alrededor del 0,02%, alrededor del 0,05%, alrededor del 0,08%, alrededor del 0,1%, alrededor del 0,5% o alrededor del 1% de la formulación, preferiblemente de alrededor del 0,01%).

Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales, comprendiendo dichas formulaciones un portador acuoso, el polipéptido a una concentración de desde aproximadamente 1 hasta 200 mg/ml o más, preferiblemente de aproximadamente 5 a 100 mg/ml o más, más preferiblemente de aproximadamente 5 a 50 mg/ml o más, lo más preferiblemente de aproximadamente 5 a 30 mg/ml o más, tal como alrededor de 5 mg/ml, alrededor de 10 mg/ml, alrededor de 20 mg/ml, alrededor de 30 mg/ml, alrededor de 40 mg/ml, alrededor de 50 mg/ml, alrededor de 60 mg/ml, alrededor de 70 mg/ml, alrededor de 80 mg/ml, alrededor de 90 mg/ml, alrededor de 100 mg/ml, alrededor de 150 mg/ml o incluso más, y un tensioactivo (por ejemplo, Tween 20, Tween 80 o un poloxámero) a una concentración en el intervalo de aproximadamente el 0,001% al 1% (preferiblemente entre aproximadamente el 0,001% y el 0,1%, o aproximadamente el 0,01% y el 0,1% tal como alrededor del 0,001%, alrededor del 0,005%, alrededor del 0,01%, alrededor del 0,02%, alrededor del 0,05%, alrededor del 0,08%, alrededor del 0,1%, alrededor del 0,5% o alrededor del 1% de la formulación, preferiblemente de alrededor del 0,01%).

Una formulación preferida de la invención puede comprender:

a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM, tal como de 10 mM a 20 mM;

b) sacarosa a una concentración del 1% al 10%; y

c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1%.

Otra formulación preferida de la invención puede comprender:

a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 15 mM;

b) sacarosa a una concentración del 8%; y

5 c) Tween 80 a una concentración del 0,01%.

Otra formulación preferida de la invención puede comprender:

10 a) un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM, tal como de 10 mM a 20 mM;

b) sacarosa a una concentración del 1% al 10%; y

c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1%.

15 Otra formulación preferida de la invención puede comprender:

a) un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM;

20 b) sacarosa a una concentración del 10%; y

c) Tween 80 a una concentración del 0,005%.

25 La presente invención proporciona formulaciones de un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales que presentan alta solubilidad del polipéptido, poca o ninguna agregación del polipéptido y alta estabilidad durante largos periodos de almacenamiento.

30 En un aspecto, los componentes presentes en las formulaciones de la invención se han seleccionado de manera que los polipéptidos de la invención tienen una solubilidad de al menos 20 mg/ml, al menos 50 mg/ml, preferiblemente al menos 90 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 150 mg/ml o incluso 200 mg/ml o más.

35 En otro aspecto, los componentes presentes en las formulaciones de la invención se han seleccionado de manera que el polipéptido presente en la formulación de la invención tiene una temperatura de fusión de al menos 59°C o más (tal como 59,5°C o más), preferiblemente al menos 60°C o más (tal como 60,5°C o más), más preferiblemente al menos 61°C o más (tal como 61,5°C o más) o al menos 62°C o más (tal como 62,5°C o más), lo más preferiblemente al menos 63°C o más (tal como 63,5°C o más) tal como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico (TSA) y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC).

40 Aún en otro aspecto, la formulación de la presente invención presenta estabilidad en diversas condiciones de estrés tales como:

- múltiples (hasta 10) ciclos de congelación/descongelación;

45 - almacenamiento a una temperatura de 2-8°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

50 - almacenamiento a una temperatura de 25±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

- almacenamiento a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más); y/o

55 - estrés mecánico.

60 Estrés mecánico tal como se usa en la presente invención puede ser cualquier forma de fuerza externa aplicada sobre la formulación que puede afectar a la estabilidad del polipéptido presente en la formulación. Sin limitarse, el estrés mecánico aplicado a la disolución puede ser estrés por cizalladura, estrés por agitación, estrés por remoción, estrés por rotación, etc. Preferiblemente la formulación de la invención es estable en una o más de las siguientes formas de estrés mecánico:

- remover la formulación durante de 10 s a 1 min;

65 - empujar la formulación a través de una aguja (25G, preferiblemente 26G, más preferiblemente 27G, incluso más preferiblemente 28G, lo más preferiblemente 29G o más) con una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier

jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml hasta 50 ml);

- rotar durante dos días a 10 rpm; y/o

- agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4-48 horas (tal como 4-8 horas, 12 horas, 24 horas o incluso 48 horas) a 4°C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

Preferiblemente, las formulaciones de la presente invención son estables en más de una (tal como dos, tres, cuatro, cinco, seis o siete) de las condiciones de estrés anteriores, lo más preferiblemente en todas las condiciones de estrés anteriores.

Por consiguiente, el polipéptido de la invención presente en la formulación de la invención:

- es estable tras múltiples (hasta 10) ciclos de congelación/descongelación, dicha estabilidad tal como se determina mediante medición de DO320/DO280, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, ensayo de potencia (tal como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

- es estable durante almacenamiento a una temperatura de 2-8°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), dicha estabilidad tal como se determina mediante medición de DO320/DO280, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, ensayo de potencia (tal como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

- es estable durante almacenamiento a una temperatura de 25±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), dicha estabilidad tal como se determina mediante medición de DO320/DO280, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, ensayo de potencia (tal como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

- es estable durante almacenamiento a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), dicha estabilidad tal como se determina mediante medición de DO320/DO280, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, ensayo de potencia (tal como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

- es estable cuando se remueve la formulación durante de 10 s a 1 min;

- es estable cuando se empuja la formulación a través de una aguja (25G, preferiblemente 26G, más preferiblemente 27G, incluso más preferiblemente 28G, lo más preferiblemente 29G o más) con una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml);

- es estable cuando se hace rotar durante dos días a 10 rpm; y/o

- es estable cuando se agita durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4-48 horas (tal como 4-8 horas, 12 horas, 24 horas o incluso 48 horas) a 4°C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

La estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse por el hecho de que menos del 10% de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) y/o menos del 10% de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. Preferiblemente menos del 10% de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) y menos del 10% de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

En un aspecto específico, menos del 10% de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) durante almacenamiento a una temperatura de 37±5°C durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más). En otro aspecto específico, menos del 10% de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento a una temperatura de 37±5°C durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más). Aún en otro aspecto específico, menos del 10% de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-

5 HPLC) durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) y menos del 10% de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más).

10 Aparte de esto y/o además, la estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse mediante el hecho de que muestra niveles sólo de bajos a indetectables de agregación y/o formación de material particulado (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, medición de la razón DO320/DO280 y/o dispersión elástica de la luz) incluso durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. En un aspecto específico, las formulaciones de la presente invención muestran niveles sólo de bajos a indetectables de agregación y/o formación de material particulado (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz y/o medición de DO320/DO280) a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ y/o $5\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más).

20 Aparte de esto y/o además, la estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse mediante el hecho de que muestra niveles sólo de bajos a indetectables de fragmentación y/o degradación de los polipéptidos (por ejemplo tal como se evalúa mediante SDS-PAGE, SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC) incluso durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. En un aspecto específico, las formulaciones de la presente invención muestran niveles sólo de bajos a indetectables de fragmentación y/o degradación de los polipéptidos (por ejemplo tal como se evalúa mediante SDS-PAGE, SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC) a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más).

30 Aparte de esto y/o además, la estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse mediante el hecho de que muestra de muy poca a ninguna pérdida de las actividades biológicas del polipéptido de la invención (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) incluso durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. En un aspecto específico, las formulaciones de la presente invención muestran de muy poca a ninguna pérdida de las actividades biológicas del polipéptido de la invención (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más).

40 Más específicamente, en las formulaciones de la presente invención al menos el 80% (preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% o incluso al menos el 99%) de los polipéptidos conservan su actividad de unión a al menos una (preferiblemente a todas) de sus dianas (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

45 En un aspecto específico, al menos el 80% (preferiblemente al menos el 90%, más preferiblemente al menos el 95% o incluso al menos el 99%) de los polipéptidos conservan su actividad de unión (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una (preferiblemente a todas) de sus dianas tras almacenamiento a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 2 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

50 Por consiguiente la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales, en las que:

55 - menos del 10% de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

60 - menos del 10% de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

65

- al menos el 80% de los polipéptidos conservan su actividad de unión (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una (preferiblemente a todas) de sus dianas tras almacenamiento a $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 2 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento;

5

y/o

- el polipéptido es estable bajo estrés mecánico.

En un aspecto preferido, la formulación de la invención es una formulación farmacéutica.

10

La presente invención proporciona además métodos para preparar las formulaciones estables de la invención. Los métodos de la invención pueden comprender las etapas de concentrar un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales e intercambiarlo con el tampón y/o excipiente preferido.

15 También se proporcionan recipientes, kits y dosificaciones farmacéuticas unitarias que comprenden las formulaciones de la invención para su uso, por ejemplo, por un profesional sanitario. En realizaciones específicas, los kits o las dosificaciones farmacéuticas unitarias que comprenden las formulaciones estables de la invención se formulan para la administración parenteral (por ejemplo, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa y/o por vía subcutánea) del polipéptido de la invención a un sujeto humano. Las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o los kits pueden usarse en profilaxis y/o

20 terapia. En un aspecto específico, las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones farmacéuticas unitarias y/o los kits se usan para la prevención y/o el tratamiento de una o más enfermedades y/o trastornos tales como enfermedades y/o trastornos óseos (tales como por ejemplo osteoporosis, enfermedades óseas relacionadas con cáncer, y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección viral) o enfermedades autoinmunitarias (tales como por ejemplo artritis reumatoide).

25

Leyendas de las figuras

Figura 1. Los cromatogramas de SE-HPLC a 280 nm de RANKL008a formulado en tampones fosfato (A) o histidina (B) con o bien NaCl 50 mM, NaCl 100 mM o bien manitol al 10%, antes y después de 10 ciclos de congelación/descongelación. Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

30

Figura 2. Los cromatogramas de RP-HPLC a 280 nm de RANKL008a formulado en tampones fosfato con o bien NaCl 50 mM, NaCl 100 mM o bien manitol al 10%, antes y después de 10 ciclos de congelación/descongelación. Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

35

Figura 3. Los cromatogramas de SE-HPLC a 280 nm de RANKL008a formulado en tampón fosfato con o bien NaCl 50 mM, NaCl 100 mM o bien manitol al 10%, tras incubación durante 2 semanas a 37°C . Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

40

Figura 4. Figura que demuestra la disminución (A) y el aumento (B) dependientes del tiempo del área de superficie de, respectivamente, el pico principal (A) y el % de dímeros (B) observados en el análisis de SE-HPLC de RANKL008a formulado en diferentes tampones y almacenado hasta 10 semanas a 37°C .

45

Figura 5. Los cromatogramas de RP-HPLC a 280 nm de RANKL008a formulado en tampón fosfato con o bien NaCl 50 mM, NaCl 100 mM o bien manitol al 10%, tras incubación durante 2 semanas a 37°C . Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

50

Figura 6. Superposición de los cromatogramas de IEX-HPLC a 280 nm de RANKL008a formulado en tampón fosfato con o bien NaCl 50 mM, NaCl 100 mM o bien manitol al 10%, tras incubación durante 2 semanas a 37°C . Se muestra una ampliación sobre el pico principal y picos posteriores como recuadro.

Figura 7. Cantidades relativas (%) del pico principal y los dos picos posteriores observados en los cromatogramas de IEX-HPLC de las muestras de estabilidad tras almacenamiento durante 10 semanas a 37°C .

55

Figura 8. Fotografía y observación visual de los viales tras remover. La muestra de RANKL008a, diluida (hasta 5 mg/ml) y sin diluir con o sin Tween 80 al 0,01% se removió con fuerza (10 s – 1 min).

60

Figura 9. Resumen de las diluciones y etapas realizadas en estudio de jeringabilidad tal como se describe en el ejemplo 1.6.

Figura 10. Razones de DO320/278 y DO350/278 (n=3) tras el paso/almacenamiento de RANKL008a en jeringuillas con diferentes diluyentes tal como se describe en el ejemplo 1.6.

65

Figura 11. Potencia frente a HSA y RANKL relativas de RANKL008a tras dilución en diferentes diluyentes y paso/almacenamiento en jeringuillas tal como se describe en el ejemplo 1.6.

- Figura 12. Resumen de estudio de tamaño de aguja/calibre con RANKL008a diluido tal como se describe en el ejemplo 1.7.
- 5 Figura 13. Resumen de estudio de tamaño de aguja/calibre adicional con RANKL008a diluido y sin diluir tal como se describe en el ejemplo 1.7.
- Figura 14. Resumen de los resultados obtenidos para pruebas de estabilidad térmica de IL6R304 (A, C, E) e IL6R305 (B, D, F) y en función de la concentración de NaCl (A, B), el manitol añadido (C, D) y tampón/excipiente (E, F).
- 10
- Figura 15. Resumen de los resultados obtenidos en pruebas de estabilidad térmica de IL6R304 en tampón Tris pH 7,2 o histidina pH 6,5, con sacarosa, glicina o manitol añadido como excipiente.
- Figura 16. Termogramas (obtenidos tras restar los valores iniciales) de IL6R304 en los tampones tal como se indica en el gráfico.
- 15
- Figura 17. Análisis de PAMAS de IL6R304 formulado en PBS en comparación con IL6R304 formulado en PBS + Tween 80 al 0,01% o al 0,02%. Recuentos de partículas: >10 μm , >25 μm , >50 μm , >100 μm y >200 μm .
- 20
- Figura 18. SE-HPLC para la molécula de IL6R304 en presencia de diferentes concentraciones de Tween 80.
- Figura 19. (A)-(C): Valores logarítmicos de la concentración de nanocuerpo frente a IL-6R soluble (eje Y) frente a la concentración de PEG6000 (%) (eje X), junto con los valores de solubilidad calculados. (D) representa un ejemplo de cómo se realiza el análisis de regresión lineal sobre los puntos de datos obtenidos para determinar la ordenada en el origen con el eje X (a partir de la que puede deducirse la solubilidad teórica a un % de PEG6000 de cero).
- 25
- Figura 20. Superposición de los cromatogramas de SE-HPLC de IL6R304 formulado a 10 mg/ml almacenado durante 3 semanas a 37°C. Recuadro, ampliación sobre el pico principal para demostrar las diferencias dependientes de tampón en el % de agregados.
- 30
- Figura 21. Figura que demuestra las diferencias dependientes de tampón en el % de agregados (área de superficie de pico en SE-HPLC) que se observaron en las muestras de estabilidad de IL6R304 e IL6R305 almacenadas durante 1 semana a 37°C.
- 35
- Figura 22. Figura que demuestra las diferencias dependientes de tampón en el % de agregados (área de superficie de pico en SE-HPLC) que se observaron en las muestras de estabilidad de IL6R304 e IL6R305 almacenadas durante 3 semanas a 37°C.
- Figura 23. Superposiciones de los cromatogramas de RP-HPLC de IL6R304 incubado durante 3 semanas a 37°C en diferentes tampones de formulación. Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro. Obsérvese el aumento de dos picos previos y un pico posterior menores en las muestras de IL6R304 almacenadas durante 3 semanas.
- 40
- Figura 24. Datos de osmolalidad de IL6R304 (10 mg/ml) en los 12 tampones diferentes indicados en el gráfico. La barra horizontal define la región isotónica.
- 45
- Figura 25. Figura que demuestra el aumento dependiente del tiempo del % de oligómeros/agregados (eje Y) observado en el análisis de SE-HPLC de IL6R304 almacenado durante hasta 5 semanas a 37°C (A) y 5°C (B) en los tampones indicados en el gráfico. El % de oligómeros/agregados se expresa como la suma del % de las áreas de superficie de pico del pico previo 1a, pico previo 1b y pico previo 2 en relación con el área de superficie de pico total.
- 50
- Figura 26. (A): el % de oligómeros (% de área de superficie de pico) observado en los tampones histidina tras almacenamiento durante 3 semanas a 37°C en comparación con la muestra equivalente en tampón PBS. (B): aumento dependiente del tiempo y dependiente de tampón en el % de oligómeros observado en las muestras de estabilidad de IL-6R almacenadas durante hasta 5 semanas a 37°C, a una concentración de 10 mg/ml en los tampones indicados en el gráfico.
- 55
- Figura 27. Perfil de SE-HPLC de IL6R304 en los diferentes tampones tal como se representa en la tabla 21. IL6R304 era menos propenso a oligomerización en tampón L-histidina en comparación con tampón fosfato. (A) Estaban presentes menos oligómeros, que se observaron como picos previos durante el análisis de SE-HPLC, en muestras de IL6R304 almacenadas durante 8 semanas a 37°C en tampón L-histidina (tampones 1-5) en comparación con tampón fosfato (tampones 6-10). La cantidad de oligómeros era la más baja en el tampón 3. (B) El efecto de los diferentes excipientes sobre la oligomerización o bien en L-histidina frente a fosfato. Obsérvese que el área de superficie del pico posterior era mayor en fosfato en comparación con L-histidina.
- 60
- 65

- Figura 28. Cinética de la formación de oligómero tras almacenamiento de IL6R304 en los diferentes tampones. La oligomerización era significativamente más lenta en L-histidina (tampones 1-5) en comparación con tampón fosfato (tampones 6-10).
- 5 Figura 29. Superposición de los cromatogramas de RP-HPLC de IL6R304 tras almacenamiento durante hasta 8 semanas a +37°C en 10 tampones de formulación diferentes. Se muestra una ampliación sobre el pico principal y picos laterales como recuadro.
- Figura 30. Cinética de la formación para la variante de piroglutamato de IL6R304 tras almacenamiento en condiciones de estrés en los diferentes tampones. Se forma menos piroglutamato en L-histidina en comparación con tampón fosfato.
- 10 Figura 31. Índice de agregación antes y después de la agitación de IL6R304.
- Figura 32. Presentación gráfica de valores de Tm para 23IL0064 como función de la concentración de NaCl (A) y de la concentración de manitol (B). Se obtuvieron las Tm en el ensayo de desplazamiento térmico a 0,1 mg/ml.
- 15 Figura 33. Representación gráfica de las temperaturas de fusión medidas para 23IL0075 como función del pH, en tampón acetato 10 mM, en histidina 10 mM y en fosfato 10 mM. La concentración de proteína era de 0,2 mg/ml. Se realizó el barrido a 1°C/min, comenzando a 30°C.
- 20 Figura 34. Cromatogramas de SE-HPLC (DO280) de 23IL0064 en histidina 40 mM (pH 6,0)/NaCl 50 mM. Se comparó la muestra de partida con muestras tras la concentración. No se observó formación de agregado debido a la concentración de la muestra en el tampón histidina. Se ejecutó la SE-HPLC con una columna BioSep SEC S-2000 de Phenomenex, con D-PBS como fase móvil a 0,2 ml/min.
- 25 Figura 35. Valores logarítmicos de la concentración de proteína soluble (eje Y) frente a la concentración de PEG6000 (%; eje X). El panel superior derecho representa un ejemplo de cómo se realiza el análisis de regresión lineal sobre los puntos de datos obtenidos para determinar la ordenada en el origen con el eje X (a partir de la que puede deducirse la solubilidad teórica a un % de PEG6000 de cero). En el tampón histidina, se realizó el experimento a dos concentraciones que se presentan en los dos gráficos inferiores. Para estos dos gráficos no fue posible la regresión.
- 30 Figura 36. Valores logarítmicos de la concentración de proteína soluble (eje Y) de p23IL0064 y 23IL0075 en tampón fosfato 10 mM pH 7 con NaCl 50 mM frente a la concentración de PEG6000 (eje X). Mediante análisis de regresión y extrapolación a una concentración de PEG6000 de cero, se calcularon las concentraciones de proteína máximas teóricas (valores de solubilidad aparente) y para ambas proteínas eran de aproximadamente 50 mg/ml. Este número debe usarse sólo tras la confirmación con otras técnicas.
- 35 Figura 37. Valores logarítmicos de la concentración de proteína soluble (eje Y) de p23IL0064 y p23IL0075 en tampón histidina 40 mM pH 6,0 con NaCl 50 mM frente a la concentración de PEG6000 (eje X). En este gráfico la regresión no era posible puesto que no se produjo precipitación en la ventana de % de PEG explorada.
- 40 Figura 38. Cromatogramas de SE-HPLC (280 nm) de muestras de 25 µg de 23IL0064 no sometidas a estrés y sometidas a estrés a 37°C (3 semanas y 4 semanas) en D-PBS. Se ejecutó SE-HPLC en TSK-GEL G2000SWXL con D-PBS.
- 45 Figura 39. Cromatogramas de RP-HPLC (280 nm) de muestra de 25 µg de 23IL0064 no sometida a estrés y sometida a estrés a 37°C (4 semanas) en D-PBS. Se ejecutó RP-HPLC en una columna Zorbax C-3 con un gradiente de agua/acetonitrilo con el 0,1% de TFA.
- 50 Figura 40. Representación gráfica del % de área de pico de los diferentes picos de RP-HPLC de 23IL0064 y sustancias relacionadas con producto tras 6 semanas de estrés a 37°C en diferentes tampones de formulación. La primera barra representa la muestra de referencia, almacenada a -80°C hasta el análisis. El pico previo 2 estaba presente en la muestra de partida y no aumentó durante almacenamiento a 37°C.
- 55 Figura 41. Superposición de cromatogramas de RP-HPLC (280 nm) de 23IL0064 en histidina 20 mM pH 6,5 (conc. 22,4 mg/ml). Comparación de 6 semanas a 37°C, 6 semanas a 25°C, 6 semanas a 4°C y referencia a -80°C. Se ejecutó RP-HPLC en una columna Zorbax 300SB-C3 con un gradiente de agua/acetonitrilo con el 0,1% de TFA (el 0,3%/min) a 75°C.
- 60 Figura 42. SDS-PAGE de muestras de estabilidad de 23IL0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC sometidas a estrés durante 6 semanas a 4°C, 25°C, 37°C y su referencia a -80°C.
- 65 Figura 43. Dispersión elástica de la luz tal como se mide a 500 nm como función de la temperatura para muestras de 23IL0075 con concentraciones diferentes (tal como se indica en la leyenda).

Figura 44. Dispersión elástica de la luz tal como se mide a 500 nm como función de la temperatura para 231L0075 250 µg/ml en fosfato 10 mM pH 6,0. La temperatura del comienzo de la formación de agregado se determina por medio de ajuste lineal.

5 Figura 45. Dispersión elástica de la luz tal como se mide a 500 nm como función de la temperatura para 231L0075 250 µg/ml en acetato 10 mM pH 6,0. La temperatura del comienzo de la formación de agregado se determina por medio de ajuste lineal.

10 Figura 46. Dispersión elástica de la luz tal como se mide a 500 nm como función de la temperatura para 231L0075 250 µg/ml en histidina 10 mM pH 6,0. La temperatura del comienzo de la formación de agregado se determina por medio de ajuste lineal.

15 Figura 47. Representación gráfica de la opalescencia (medida mediante DO500) (A) y el % de oligómeros (% de pico previo) detectados en SE-HPLC (B) tras estrés por congelación/descongelación. El porcentaje de oligómeros en la muestra de referencia era de aproximadamente el 0,4%. En este estudio, se compararon un tampón acetato, histidina y fosfato, en combinación con manitol o una mezcla de manitol y glicina como excipientes, y Tween 80 o poloxámero en dos concentraciones diferentes como tensioactivos.

20 Figura 48. Representación gráfica de la opalescencia (medida mediante DO500) (A) y el % de oligómeros detectados en SE-HPLC (B) tras estrés por cizalladura. El porcentaje de oligómeros en la muestra de referencia era de aproximadamente el 0,4%. En este estudio, se compararon un tampón acetato, histidina y fosfato, en combinación con manitol o una mezcla de manitol y glicina como excipientes, y Tween 80 o poloxámero en dos concentraciones diferentes como tensioactivos.

25 Figura 49. Representación gráfica de la opalescencia (medida mediante DO500) (A) y el % de oligómeros detectados en SE-HPLC (B) en diferentes tampones histidina tras estrés por congelación/descongelación. El porcentaje de oligómeros en la muestra de referencia era de aproximadamente el 0,4%. *Para una muestra se incluyó la condición sin detergente.

30 Figura 50. Representación gráfica de la opalescencia (medida mediante DO500) (A), el % de oligómeros detectados en SE-HPLC (B) y el % de actividad (unión a albúmina) del nanocuerpo medido en Biacore (C) tras estrés por cizalladura. El porcentaje de oligómeros en la muestra de referencia era de aproximadamente el 0,4%. En este estudio no se incluyeron detergentes, para imitar la situación durante la etapa de concentración final del procedimiento de DSP.

35 Figura 51. Cromatogramas de SE-HPLC (280 nm) de 231L0075 a 25 mg/ml en histidina 10 mM pH 6,0, sacarosa al 10%, Tween 80 al 0,005%: la muestra de referencia en comparación con almacenamiento de 6 semanas a 25°C y 37°C.

40 Descripción detallada

A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que estarán claros para el experto. Por ejemplo, se hace referencia a los manuales convencionales, tales como Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2ª ed.), vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel *et al.*, eds., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, Nueva York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, Nueva York, N.Y., (1985); Old *et al.*, "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt *et al.*, "Immunology" (6ª ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt *et al.*, "Roitt's Essential Immunology, 10ª ed. Blackwell Publishing, RU (2001); y Janeway *et al.*, "Immunobiology" (6ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como los antecedentes de la técnica anterior citados en el presente documento.

55 Tal como se usa en el presente documento, el término "aislado" en el contexto de un polipéptido se refiere a un polipéptido que está sustancialmente libre de material celular o proteínas contaminantes de la fuente de células o tejido del que se deriva, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de un polipéptido en las que el polipéptido se separa de componentes celulares de las células a partir de las que se aísla o se produce de manera recombinante. Por tanto, un polipéptido que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de un polipéptido que tiene menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10% o el 5% (en peso seco) de proteína, polipéptido, péptido o anticuerpo heterólogos (también denominado "proteína contaminante"). Cuando el polipéptido se produce de manera recombinante, también puede estar sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20%, el 10% o el 5% del volumen de la preparación de polipéptido. Cuando el polipéptido se produce mediante síntesis química, está de manera preferible sustancialmente libre de precursores químicos u otros compuestos químicos, es decir, está separado de los precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del

polipéptido. Por consiguiente, tales preparaciones de un polipéptido tienen menos de aproximadamente el 30%, el 20%, el 10%, el 5% (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés. En una realización específica, un polipéptido "aislado" se purifica mediante un procedimiento de purificación de múltiples etapas que comprende dos etapas de cromatografía (por ejemplo intercambio catiónico e intercambio aniónico), una etapa de ultrafiltración de 100K, seguida por una etapa de intercambio de tampón y concentración en modo de ultrafiltración/diafiltración.

Tal como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "paciente" se usan de manera intercambiable. Tal como se usan en el presente documento, los términos "sujeto" y "sujetos" se refieren a un animal, preferiblemente un mamífero incluyendo un no primate (por ejemplo, una vaca, un cerdo, un caballo, un gato, un perro, una rata y un ratón) y un primate (por ejemplo, un mono, tal como un mono cynomolgus, un chimpancé, un babuino y un ser humano), y más preferiblemente un ser humano. En una realización determinada, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano, con una o más enfermedades o trastornos. En otra realización, el sujeto es un mamífero, preferiblemente un ser humano, que corre el riesgo de desarrollar una o más enfermedades y/o trastornos.

Los términos "estabilidad" y "estable" tal como se usan en el presente documento en el contexto de una formulación que comprende un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales se refieren a la resistencia del polipéptido en la formulación frente a agregación, a la formación de productos de degradación y/o a la formación de productos de fragmentación en condiciones de transporte y/o almacenamiento dadas. Aparte de esto y/o además, las formulaciones "estables" de la invención conservan la actividad biológica en condiciones de transporte y/o almacenamiento dadas. La estabilidad de dicho polipéptido puede evaluarse mediante grados de agregación, degradación y/o fragmentación (tal como se miden por ejemplo mediante SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, medición de la razón DO320/DO280, dispersión elástica de la luz, etc.), y/o mediante el % de actividad biológica (tal como se mide por ejemplo mediante ELISA, Biacore, etc.) en comparación con una formulación de referencia. Por ejemplo, una formulación de referencia puede ser un patrón de referencia congelado a -20°C o por debajo de -65°C (tal como por ejemplo -80°C) que consiste en el mismo polipéptido a la misma concentración en D-PBS o que consiste en el mismo polipéptido a la misma concentración y en el mismo tampón que las muestras sometidas a estrés pero sin aplicar las condiciones de estrés, formulación de referencia que da de manera regular un pico individual mediante SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC y/o mantiene su actividad biológica en Biacore y/o ELISA.

La "solubilidad" se describe a menudo como la concentración de proteína máxima que puede lograrse mediante lo cual toda la proteína permanece en disolución. A esta concentración la proteína todavía debe ser monomérica y estar libre de agregados. Para determinar la solubilidad de la proteína sólo están disponibles actualmente un número limitado de técnicas (la mayoría empíricas). Una primera técnica popular consiste en concentrar la muestra usando ultrafiltración centrífuga hasta el punto en el que se forma una disolución opalescente. Posteriormente, la fracción insoluble se retira y se mide el contenido en proteína del sobrenadante. Pueden usarse dispositivos de concentración centrífuga tales como por ejemplo concentradores Vivaspín con un punto de corte de peso molecular de 5 kDa pero requieren cantidades razonables de proteína. También puede monitorizarse la solubilidad usando una macromolécula inerte tal como polietilenglicol (PEG; Mr > 6.000), que precipita proteínas principalmente a través de un efecto de volumen excluido, un procedimiento que puede entenderse de manera general en cuanto a una separación de fase coloidal simple. Puede obtenerse una relación lineal logarítmica entre solubilidad de la proteína y el porcentaje en peso de polietilenglicol, y a partir de esta representación gráfica la ordenada en el origen proporciona el valor de solubilidad. El término "buena solubilidad" del polipéptido de la invención, tal como se usa en el presente documento, significa que no se observa o se observa poca precipitación del polipéptido de la invención durante el procesamiento posterior (DSP) y/o durante almacenamiento durante un tiempo corto o más largo a 5° o -20°C a concentraciones que oscilan entre 20-200 mg/ml o más. La formación de precipitados (oligómeros u otros materiales particulados) puede medirse por ejemplo mediante SE-HPLC, medición de la razón DO320/DO280 y/o dispersión elástica de la luz. Preferiblemente, los polipéptidos presentes en las formulaciones de la presente invención tienen una solubilidad de al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 60 mg/ml, al menos 65 mg/ml, al menos 70 mg/ml, al menos 80 mg/ml, al menos 90 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 110 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 130 mg/ml, al menos 140 mg/ml, al menos 150 mg/ml, al menos 200 mg/ml o incluso más. Preferiblemente, la razón DO320/DO280 de las formulaciones de la presente invención es de 0,05 o menor, tal como de 0,01 o menor o de 0,005 o menor. La dispersión en la formulación de la presente invención debe estar dentro de los límites de detección y preferiblemente ser inferior a 1000 abs, tal como 750 abs o inferior o 500 abs o inferior.

La expresión "niveles de agregación de bajos a indetectables" tal como se usa en el presente documento se refiere a muestras que contienen no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1% o no más del 0,5% de agregación en peso de proteína. A menos que se refiera explícitamente a algo diferente, agregación tal como se usa en la presente invención significa el desarrollo de agregados de alto peso molecular, es decir agregados con un peso molecular aparente de más de/superior al peso molecular aparente observado en análisis de SE-HPLC para dímeros del polipéptido de la invención (tal como por ejemplo 44 kDa tal como se observa para SEQ ID NO: 4; 36-38 kDa tal como se observa para SEQ ID NO 1-3; y 36 kDa tal como se observa para SEQ ID NO: 5 en SE-HPLC) en comparación con marcadores de peso molecular. La agregación puede evaluarse mediante diversos

métodos conocidos en la técnica. Sin limitarse, los ejemplos incluyen técnicas de cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (SE-HPLC), recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica (UCA), dispersión dinámica de la luz (DLS), dispersión estática de la luz (SLS), dispersión elástica de la luz, medición de DO320/DO280, espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), difracción circular (CD), técnicas de desplegamiento de proteínas inducido por urea, fluorescencia intrínseca de triptófano y/o calorimetría diferencial de barrido.

El término “niveles de fragmentación y/o degradación de bajos a indetectables” tal como se usa en el presente documento se refiere a muestras que contienen igual a o más del 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% o el 99% de la proteína total, por ejemplo, en un pico individual tal como se determina mediante SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC, que representa el polipéptido no degradado, y que no contiene otros picos individuales que tengan más del 5%, más del 4%, más del 3%, más del 2%, más del 1%, o más del 0,5% de la proteína total en cada uno.

El término “de muy poca a ninguna pérdida de las actividades biológicas” tal como se usa en el presente documento se refiere a actividades de dominio variable individual, incluyendo pero sin limitarse a, capacidades de unión específica del dominio variable individual a la diana de interés tal como se miden mediante diversos ensayos inmunológicos, incluyendo, pero sin limitarse a ELISA y/o mediante resonancia de plasmones superficiales (Biacore). En una realización, los dominios variables individuales de las formulaciones de la invención conservan al menos el 50%, preferiblemente al menos el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 80%, el 85%, el 90%, el 95%, el 98% o incluso el 99% o más de la capacidad para unirse específicamente a un antígeno en comparación con una formulación de referencia, tal como se mide mediante un ensayo inmunológico conocido por un experto en la técnica o descrito en el presente documento. Por ejemplo, puede usarse un ensayo basado en ELISA (por ejemplo tal como se describe en la sección de ejemplos) para comparar la capacidad del dominio variable individual para unirse específicamente a su diana. Una “formulación de referencia” tal como se usa en el presente documento se refiere a una formulación que está congelada a una temperatura de $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ o a por debajo de -64°C (tal como por ejemplo a -80°C) que consiste en el mismo dominio variable individual a la misma concentración en D-PBS o que consiste en los mismos dominios variables individuales a la misma concentración en el mismo tampón/excipientes que las muestras sometidas a estrés pero sin aplicar las condiciones de estrés, formulación de referencia que da regularmente un pico individual mediante SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC y/o mantiene su actividad biológica en Biacore y/o ELISA.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” tal como se usa en el presente documento significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal, o enumerado en la Farmacopea de los Estados Unidos, la Farmacopea europea u otra farmacopea reconocida de manera general para su uso en animales, y más particularmente en seres humanos. En este sentido, debe ser compatible con los otros componentes de la formulación y no producir un efecto perjudicial inaceptable en el sujeto.

Según la Farmacopea europea, una disolución se considera isotónica si tiene una osmolalidad de 290 ± 30 mOsm/kg. Por tanto se realizaron mediciones de osmolalidad en las diferentes formulaciones usadas en los estudios de estabilidad. La isotonicidad puede medirse, por ejemplo, mediante un osmómetro de tipo de presión de vapor o de descenso crioscópico.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad eficaz” se refiere a la cantidad de un agente (por ejemplo un agente profiláctico o terapéutico) que es suficiente para reducir y/o mejorar la gravedad y/o duración de una o más enfermedades y/o trastornos.

El término “poliol” tal como se usa en el presente documento se refiere a azúcares que contienen muchos grupos hidroxilo (-OH) en comparación con un sacárido normal. Los polioles incluyen alcoholes e hidratos de carbono tales como manitol, sorbitol, maltitol, xilitol, isomaltosa, eritritol, lactitol, sacarosa, glucosa, galactosa, fructosa, fucosa, ribosa, lactosa, maltosa y celubiosa.

Tal como se usa en el presente documento, los términos “agente terapéutico” y “agentes terapéuticos” se refieren a cualquier agente que puede usarse en la prevención, el tratamiento y/o la gestión de una o más enfermedades y/o trastornos. En el contexto de la presente invención, el término “agente terapéutico” se refiere a un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales. En otras determinadas realizaciones, el término “agente terapéutico” se refiere a un agente distinto del polipéptido de la invención que puede usarse en la formulación.

Tal como se usa en el presente documento, el término “cantidad terapéuticamente eficaz” se refiere a la cantidad de un agente terapéutico (por ejemplo un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales), que es suficiente para reducir la gravedad de una o más enfermedades y/o trastornos.

El término “excipiente” tal como se usa en el presente documento se refiere a un sustancia inerte que se usa comúnmente como diluyente, vehículo, conservante, aglutinante o agente de estabilización para fármacos que confiere una propiedad física beneficiosa a una formulación, tal como aumento de la estabilidad de la proteína, aumento de la solubilidad de la proteína y/o disminución de la viscosidad. Los ejemplos de excipientes incluyen, pero no se limitan a, proteínas (por ejemplo, albúmina sérica), aminoácidos (por ejemplo, ácido aspártico, ácido

glutámico, lisina, arginina, glicina), tensioactivos (por ejemplo, SDS, Tween 20, Tween 80, poloxámeros, polisorbato y tensioactivos no iónicos), sacáridos (por ejemplo, glucosa, sacarosa, maltosa y trehalosa), polioles (por ejemplo, manitol y sorbitol), ácidos grasos y fosfolípidos (por ejemplo, alquilsulfonatos y caprilato). Para información adicional sobre excipientes, véase Remington's Pharmaceutical Sciences (de Joseph P. Remington, 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, PA), que se incorpora en el presente documento en su totalidad.

El término "dominio variable" o "dominio variable de inmunoglobulina" se refiere a la parte o el dominio de una molécula de inmunoglobulina o anticuerpo que es parcial o completamente responsable de la unión a antígeno. El término "dominio variable individual" o "dominio variable individual de inmunoglobulina" (ambos términos se usan de manera intercambiable), define moléculas en las que el sitio de unión a antígeno está presente en, y formado por, un dominio de inmunoglobulina individual. Esto distingue a los dominios variables individuales de inmunoglobulinas "convencionales" o sus fragmentos, en los que dos dominios de inmunoglobulina, en particular dos "dominios variables" interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. Normalmente, en inmunoglobulinas convencionales, un dominio variable de cadena pesada (VH) y un dominio variable de cadena ligera (VL) interaccionan para formar un sitio de unión a antígeno. En este caso, las regiones determinantes de complementariedad (CDR) tanto de VH como de VL contribuirán al sitio de unión a antígeno, es decir un total de 6 CDR estarán implicadas en la formación de sitio de unión a antígeno.

Por el contrario, el sitio de unión de un dominio variable individual está formado por un dominio VH o VL individual. Por tanto, el sitio de unión a antígeno de un dominio variable individual está formado por no más de tres CDR. El término "dominio variable individual" comprende fragmentos de inmunoglobulinas convencionales en las que el sitio de unión a antígeno está formado por un dominio variable individual.

Generalmente, dominios variables individuales serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones de entramado (FR1 a FR4 respectivamente) y 3 regiones determinantes de complementariedad (CDR1 a CDR3 respectivamente); o cualquier fragmento adecuado de una secuencia de aminoácidos de este tipo (que entonces contendrá habitualmente al menos algunos de los residuos de aminoácido que forman al menos una de las CDR). Tales dominios variables individuales y fragmentos son lo más preferiblemente tales que comprenden un plegamiento de inmunoglobulina o pueden formar, en condiciones adecuadas, un plegamiento de inmunoglobulina. Por tanto, el dominio variable individual puede comprender, por ejemplo, una secuencia de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia VL) o un fragmento adecuado de la misma; o una secuencia de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia VH o secuencia VHH) o un fragmento adecuado de la misma; siempre que pueda formar una unidad de unión a antígeno individual (es decir una unidad de unión a antígeno funcional que consiste esencialmente en el dominio variable individual, de manera que el dominio de unión a antígeno individual no necesita interaccionar con otro dominio variable para formar una unidad de unión a antígeno funcional, tal como es por ejemplo el caso para los dominios variables que están presentes en por ejemplo anticuerpos convencionales y fragmentos scFv que necesitan interaccionar con otro dominio variable, por ejemplo a través de una interacción VH/VL, para formar un dominio de unión a antígeno funcional).

En un aspecto de la invención, los dominios variables individuales son secuencias de dominio variable de cadena ligera (por ejemplo una secuencia VL), o secuencias de dominio variable de cadena pesada (por ejemplo una secuencia VH); más específicamente, los dominios variables individuales pueden ser secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cuatro cadenas convencional o secuencias de dominio variable de cadena pesada que se derivan de un anticuerpo de cadena pesada.

El dominio variable individual puede ser un anticuerpo de dominio (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio), un anticuerpo de dominio individual (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como anticuerpo de dominio individual), un "dAb" (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o un Nanobody® (tal como se define en el presente documento, e incluyendo pero sin limitarse a una secuencia VHH) [Nota: Nanobody® y Nanobodies® son marcas comerciales registradas de Ablynx N.V.]; otros dominios variables individuales, o cualquier fragmento adecuado de uno cualquiera de los mismos. Para una descripción general de anticuerpos de dominio (individual), también se hace referencia a la técnica anterior citada en el presente documento, así como al documento EP 0 368 684. Para el término "dAb", se hace referencia por ejemplo a Ward *et al.* 1989 (Nature 341 (6242): 544-546), a Holt *et al.* 2003 (Trends Biotechnol. 21(11): 484-490); así como por ejemplo a los documentos WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 y otras solicitudes de patente publicadas de Domantis Ltd. También debe observarse que, aunque menos preferidos en el contexto de la presente invención debido a que no son de origen mamífero, los dominios variables individuales pueden derivarse de determinadas especies de tiburón (por ejemplo, los denominados "dominios IgNAR", véase por ejemplo el documento WO 05/18629).

En particular, los polipéptidos de la invención pueden comprender uno o más nanocuerpos o un fragmento adecuado de los mismos. Para una descripción adicional de VHH y nanocuerpos, se hace referencia al artículo de revisión de Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302); así como a las siguientes solicitudes de patente, que se mencionan como antecedentes de la técnica generales: los documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Universidad libre de Bruselas; los documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134 231 y WO 02/48193 de Unilever; los

documentos WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 y WO 03/055527 del Instituto Vlaams de biotecnología (VIB); los documentos WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; el documento WO 01/90190 del Consejo nacional de investigación de Canadá; el documento WO 03/025020 (= EP 1 433 793) del Institute of Antibodies; así como los documentos WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 y WO 06/122825, de Ablynx N.V. y las solicitudes de patente publicadas adicionalmente de Ablynx N.V. También se hace referencia a la técnica anterior adicional mencionada en estas solicitudes, y en particular a la lista de referencias mencionada en las páginas 41-43 de la solicitud internacional WO 06/040153, cuya lista y referencias se incorporan en el presente documento como referencia. Tal como se describe en estas referencias, los nanocuerpos (en particular secuencias V_{HH} y nanocuerpos parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más "residuos distintivos" en una o más de las secuencias de entramado. Una descripción adicional de los nanocuerpos, incluyendo humanización y/o camelización de nanocuerpos, así como otras modificaciones, partes o fragmentos, derivados o "fusiones de nanocuerpos", constructos multivalentes (incluyendo algunos ejemplos no limitativos de secuencias ligadoras) y diferentes modificaciones para aumentar la semivida de los nanocuerpos y sus preparaciones puede encontrarse por ejemplo en los documentos WO 08/101985 y WO 08/142164.

El número total de residuos de aminoácido en un nanocuerpo puede estar en la región de 110-120, es preferiblemente de 112-115 y es lo más preferiblemente de 113. Sin embargo, debe observarse que partes, fragmentos, análogos o derivados (tal como se describe adicionalmente en el presente documento) de un nanocuerpo no están particularmente limitados en cuanto a su longitud y/o tamaño, siempre que tales partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales que se explican resumidamente en el presente documento y también sean preferiblemente adecuados para los fines descritos en el presente documento.

Por tanto, en el significado de la presente invención, el término "dominio variable individual" comprende polipéptidos que se derivan de una fuente no humana, preferiblemente un camélido, preferiblemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden estar humanizados, tal como se describió anteriormente. Además, el término comprende polipéptidos derivados de fuentes distintas de camélidos, por ejemplo ratón o ser humano, que se han "camelizado", tal como se describió anteriormente.

El término "dominio variable individual" también abarca dominios variables de diferente origen, que comprende dominios variables de ratón, de rata, de conejo, de asno, de ser humano y de camélido; así como dominios variables completamente humanos, humanizados o quiméricos. Por ejemplo, la invención comprende dominios variables de camélido y dominios variables de camélido humanizados o dominios variables camelizados, por ejemplo dAb camelizado tal como se describe en Ward *et al* (véanse por ejemplo el documento WO 94/04678 y Davies y Riechmann (1994, FEBS Lett. 339(3): 285-290) y (1996, Protein Eng. 9(6): 531-537)). Además, la invención comprende dominios variables fusionados, por ejemplo constructos multivalentes y/o multispecíficos (para polipéptidos multivalentes y multispecíficos que contienen uno o más dominios V_{HH} y su preparación, también se hace referencia a Conrath *et al*. 2001 (J. Biol. Chem. 276: 7346-7350) así como a por ejemplo los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221).

A menos que se indique lo contrario, el término "secuencia de inmunoglobulina", ya se use en el presente documento para referirse a un anticuerpo de cadena pesada o a un anticuerpo de 4 cadenas convencional, se usa como término general para incluir tanto el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluyendo pero sin limitarse a dominios de unión a antígeno o fragmentos tales como dominios V_{HH} o dominios V_H/V_L , respectivamente). Los términos moléculas de unión a antígeno o proteína de unión a antígeno se usan de manera intercambiable con secuencia de inmunoglobulina, e incluyen nanocuerpos.

Los dominios variables individuales proporcionados por la invención están preferiblemente en forma esencialmente aislada (tal como se define en el presente documento), o forman parte de un polipéptido de la invención (tal como se define en el presente documento), que puede comprender o consistir esencialmente en uno o más dominios variables individuales y que puede comprender además opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales (todas unidas opcionalmente mediante uno o más ligadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, el uno o más dominios variables individuales pueden usarse como unidad de unión en un polipéptido de este tipo, que puede contener opcionalmente una o más secuencias de aminoácidos adicionales que pueden servir como unidad de unión (es decir contra una o más dianas distintas), para proporcionar un polipéptido monovalente, multivalente o multispecífico de la invención, respectivamente por ejemplo tal como se describe en los documentos WO 08/101985, WO 08/142164, WO 09/068625, WO 09/068627 y WO 08/020079. Una proteína o un polipéptido de este tipo también pueden estar esencialmente en forma aislada (tal como se define en el presente documento) y los métodos de la presente invención para la expresión y/o producción de dominios variables individuales se aplican igualmente a polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales.

Según la invención, el término "dominio variable individual" puede comprender constructos que comprenden dos o más unidades de unión a antígeno en forma de dominio variable individual, tal como se explicó de manera resumida anteriormente. Por ejemplo, dos (o más) dominios variables con la misma o diferente especificidad de antígeno pueden unirse para formar por ejemplo un constructo bivalente, trivalente o multivalente. Combinando dominios

variables de dos o más especificidades, biespecíficos, triespecíficos etc. pueden formarse constructos. Por ejemplo, un dominio variable según la invención puede comprender dos dominios variables dirigidos contra la diana A, y un dominio variable contra la diana B. Tales constructos y modificaciones de los mismos, que el experto puede prever fácilmente, están todos abarcados por el término dominio variable tal como se usa en el presente documento y también se denominan “*polipéptido de la invención*” o “*polipéptidos de la invención*”.

Tal como se describe adicionalmente en el párrafo m) en la página 53 del documento WO 08/020079, una secuencia de aminoácidos (tal como un nanocuerpo, un anticuerpo, un polipéptido de la invención, o generalmente una proteína o un polipéptido de unión a antígeno o un fragmento de los mismos) que puede unirse (específicamente) a, que tiene afinidad por y/o que tiene especificidad por un determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína (o por al menos una parte, fragmento o epítipo de la misma) específicos se dice que es “*contra*” o “*se dirige contra*” dicho determinante antigénico, epítipo, antígeno o proteína.

El polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales para su uso en la formulación de la invención puede ser terapéutico o profiláctico, y puede ser útil en el tratamiento y/o la gestión de una o más enfermedades. En un aspecto específico, el polipéptido tiene al menos dos dominios variables individuales. En otro aspecto específico, el polipéptido tiene al menos tres dominios variables individuales. Preferiblemente, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual dirigido contra HSA. En otro aspecto específico, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra RANKL. En otro aspecto específico, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra IL-6R. En otro aspecto específico, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra IL-23. Más preferiblemente, el polipéptido se dirige contra y/o se une específicamente a RANKL y HSA, IL-6R y HSA y/o IL-23 y HSA. Aún en otro aspecto, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra RANKL y al menos un dominio variable individual contra HSA. Aún en otro aspecto, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra IL-6R y al menos un dominio variable individual contra HSA. Aún en otro aspecto, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra IL-23 y al menos un dominio variable individual contra HSA. Aún en otro aspecto, el polipéptido comprende al menos dos dominios variables individuales contra RANKL y al menos un dominio variable individual contra HSA. Aún en otro aspecto, el polipéptido comprende al menos dos dominios variables individuales contra IL-6R y al menos un dominio variable individual contra HSA. Aún en otro aspecto, el polipéptido comprende al menos dos dominios variables individuales contra IL-23 y al menos un dominio variable individual contra HSA. Los polipéptidos de la invención se seleccionan de SEQ ID NO: 1 a 6.

La concentración de polipéptido de la invención presente en la formulación es de desde 1 hasta 200 mg/ml tal como de aproximadamente 1 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 5 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 15 mg/ml o aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 65 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml o aproximadamente 100 mg/ml o más. En determinadas realizaciones, la concentración de polipéptido de la invención puede ser de 110 mg/ml o más, 120 mg/ml o más, 130 mg/ml o más, 140 mg/ml o más, 150 mg/ml o más o incluso de 200 mg/ml o más. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende aproximadamente 10 mg/ml de polipéptido de la invención.

La formulación de la invención comprende un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0 y un polipéptido tal como se definió anteriormente (“*polipéptido de la invención*”) que comprende uno o más dominios variables individuales a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM seleccionado de histidina pH 6,0-6,5; y

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor.

Las formulaciones estables de la presente invención comprenden polipéptidos de la invención que tienen una buena solubilidad y una alta estabilidad incluso durante el transporte y/o largos periodos de almacenamiento y que presentan poca o ninguna agregación. Además del polipéptido de la invención, las formulaciones de la presente invención comprenden al menos un portador acuoso y un tampón. El portador usado en la formulación de la invención debe ser un portador líquido. Preferiblemente el portador es un portador acuoso tal como por ejemplo agua destilada, agua MilliQ o agua para inyección (WFI).

La formulación no debe contener sal inorgánica a una concentración de más de 150 mM. Sin limitarse, sales inorgánicas para su uso en la formulación de la invención pueden seleccionarse de NaCl y KCl. Por consiguiente la formulación de la invención tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor, preferiblemente de 120 mM o menor, o de 100 mM o menor, más preferiblemente de 90 mM o menor, de 80 mM o menor, de 75 mM o menor, tal como de 50 mM o menor o incluso de 40 mM o menor, de 25 mM o menor, de 10 mM o menor o de 5 mM o menor. Lo más preferiblemente, la formulación no contiene ninguna sal inorgánica.

El pH de la formulación de la invención generalmente no debe ser igual al punto isoeléctrico del polipéptido particular

de la invención presente en la formulación y puede oscilar entre 5,5 y aproximadamente 8,0, o entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5, preferiblemente entre aproximadamente 6,2 y 7,5, entre aproximadamente 6,5 y 7,5, lo más preferiblemente entre aproximadamente 6,5 y 7,0. En un aspecto específico, la formulación de la invención tiene un pH de aproximadamente 6,5. En otro aspecto específico, la formulación de la invención tiene un pH de aproximadamente 7,0. Aún en otro aspecto específico, la formulación de la invención tiene un pH de aproximadamente 6,0.

La formulación se tampona mediante un tampón seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5.

La concentración del tampón presente en la formulación de la invención puede oscilar entre 10 mM y 100 mM, 10 mM y 50 mM, 10 mM y 25 mM, 10 mM y 20 mM. En un aspecto específico, la concentración de tampón en las formulaciones de la invención es de 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM o 100 mM. Preferiblemente, la concentración es de entre 10 y 20 mM, tal como 10 mM o 15 mM.

Puede usarse cualquier forma de histidina adecuada para la formulación y administración parenteral en la formulación de la invención. La pureza de histidina debe ser de al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón histidina 15 mM pH 6,5. En otro aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón histidina 10 mM pH 6,0.

Además de histidina, pueden usarse tampones HEPES pH 7,0 en las formulaciones de la presente invención. Puede usarse cualquier forma de HEPES adecuada para la formulación y administración parenteral en la formulación de la invención. La pureza de HEPES debe ser de al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón HEPES 15 mM pH 7,0.

Un experto en la técnica entenderá que la formulación de la invención puede ser isotónica o ligeramente hipotónica con la sangre humana, es decir la formulación de la invención tiene esencialmente la misma presión osmótica o ligeramente menor que la sangre humana. Tal formulación isotónica o ligeramente hipotónica tiene generalmente una presión osmótica de desde aproximadamente 240 mOSm/kg hasta aproximadamente 320 mOSm/kg, tal como aproximadamente 240 mOSm/kg o mayor, 250 mOSm/kg o mayor o 260 mOSm/kg o mayor.

La tonicidad de una formulación se ajusta mediante el uso de modificadores de la tonicidad. Los "modificadores de la tonicidad" son las sustancias inertes farmacéuticamente aceptables que pueden añadirse a la formulación para proporcionar una isotonicidad de la formulación. Un modificador de la tonicidad preferido en la formulación de la invención son excipientes. Los excipientes preferidos para su uso en la formulación de la invención pueden seleccionarse de azúcares, polioles y tensioactivos.

Por consiguiente, en otro aspecto, la formulación de la invención comprende un excipiente. Los excipientes preferidos incluyen polioles y/o azúcares. El poliol y/o el azúcar puede ser un monosacárido tal como glucosa o manosa, o un polisacárido incluyendo disacáridos tales como (sin limitarse a) sacarosa y lactosa, así como derivados de azúcar incluyendo alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles y alcoholes de azúcar incluyen (sin limitarse a) manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol. Un ejemplo no limitativo de un ácido de azúcar es L-gluconato. Otros azúcares a modo de ejemplo incluyen (sin limitarse a) trehalosa, glicina, maltosa, rafinosa, etc. La concentración del excipiente puede oscilar entre aproximadamente el 1% y el 10% (p:v), preferiblemente entre aproximadamente el 2,5% y el 10% (p:v), más preferiblemente entre aproximadamente el 5% y el 10% (p:v), tal como por ejemplo el 5% (p:v), el 7,5% (p:v), el 8% o el 10% (p:v). A lo largo de toda la presente invención la concentración del excipiente se facilitará como % (p:v). En un aspecto preferido, la formulación comprende sacarosa, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 5% al 10% (p:v), tal como aproximadamente el 8% (p:v).

En otro aspecto, la formulación de la invención comprende un tensioactivo. Un tensioactivo se refiere a un agente activo de superficie que comprende una parte hidrófoba y una parte hidrófila. En un aspecto preferido, el tensioactivo es no iónico. Determinados tensioactivos no iónicos a modo de ejemplo incluyen (sin limitarse a) PEG8000 y polisorbato, incluyendo sin limitarse a, polisorbato 80 (Tween 80) y polisorbato 20 (Tween 20), Triton X-100, ésteres de polioxipropileno-polioxi-etileno (Pluronic[®]) y NP-40. En un aspecto específico, el tensioactivo se selecciona de Tween 20, Tween 80 o un poloxámero. La concentración del tensioactivo puede oscilar entre aproximadamente el 0,001% y el 1% (v:v) (preferiblemente entre aproximadamente el 0,001% y el 0,1% (v:v), o el 0,01% y el 0,1% (v:v) tal como el 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v), el 0,1% (v:v), 0,5% (v:v) o el 1% (v:v) de la formulación, preferiblemente el 0,01% (v:v)). A lo largo de toda la presente invención la concentración del tensioactivo se facilitará como % (v:v). En una realización específica, el tensioactivo es Tween 20 o Tween 80, que está a una concentración del 0,001% (v:v), el 0,005% (v:v), el 0,01% (v:v), el 0,02% (v:v), el 0,05% (v:v), el 0,08% (v:v), el 0,1% (v:v), el 0,5% (v:v) o el 1% (v:v) de la formulación, preferiblemente el 0,01% (v:v).

En un aspecto preferido, la formulación de la presente invención comprende un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0 y un polipéptido tal como se definió anteriormente ("*polipéptido de la invención*") que comprende uno o más dominios variables individuales a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano y dicha formulación comprende además al menos dos componentes

seleccionados de:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5, HEPES pH 7,0-8,0, MES pH 6,0, succinato pH 6,0-6,5 y acetato pH 5,5-6,0;

b) un excipiente a una concentración del 1% al 20%;

c) un tensioactivo a una concentración del 0,001% al 1% seleccionado de Tween 80, Tween 20 o poloxámeros;

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor.

En un aspecto, además del polipéptido de la invención, la formulación de la presente invención comprende al menos un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0, un tampón seleccionado de histidina pH 6,0-6,5 y un excipiente. Lo más preferiblemente el tampón es histidina pH 6,5 o histidina pH 6,0. El tampón tiene preferiblemente una concentración que oscila entre 10 mM y 50 mM, 10 mM y 25 mM, 10 mM y 20 mM. En un aspecto específico, la concentración de tampón en las formulaciones de la invención es de 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM o 100 mM. En un aspecto preferido, la concentración es de entre 10 y 20 mM, tal como 10 mM o 15 mM. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón histidina 15 mM pH 6,5. En otro aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón histidina 10 mM pH 6,0. Excipientes preferidos son polioles tales como manitol, sorbitol, etc., sacáridos tales como por ejemplo sacarosa, manosa, trehalosa, etc. La concentración del excipiente puede oscilar entre aproximadamente el 1% y el 20%, preferiblemente entre aproximadamente el 2,5% y el 15%, más preferiblemente entre aproximadamente el 5% y el 10%, tal como por ejemplo el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%. En un aspecto preferido, la formulación comprende sacarosa, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 5% al 10%, tal como de aproximadamente el 8% o aproximadamente el 10%. Por consiguiente, una formulación preferida de la invención puede comprender histidina 15 mM pH 6,5 y sacarosa al 8%. Otra formulación preferida de la invención puede comprender histidina 10 mM pH 6,0 y sacarosa al 10%.

En otro aspecto, además del polipéptido de la invención, la formulación de la presente invención puede comprender al menos un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0, un tampón seleccionado de histidina pH 6,0-6,5 y un tensioactivo. Lo más preferiblemente el tampón es histidina pH 6,5 o histidina pH 6,0. El tampón tiene preferiblemente una concentración que oscila entre 10 mM y 50 mM, 10 mM y 25 mM, 10 mM y 20 mM. En un aspecto específico, la concentración de tampón en la formulación de la invención es de 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM o 100 mM. En un aspecto preferido, la concentración es de entre 10 y 20 mM, tal como 10 mM o 15 mM. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón histidina 15 mM pH 6,5. En otro aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón histidina 10 mM pH 6,0. El tensioactivo puede seleccionarse de Tween 20, Tween 80 o poloxámeros. La concentración del tensioactivo puede oscilar entre aproximadamente el 0,001% y el 1% (preferiblemente entre aproximadamente el 0,001% y el 0,1%, o el 0,01% y el 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01%). En una realización específica, el tensioactivo es Tween 20 o Tween 80, que está a una concentración del 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, tal como por ejemplo Tween 80 al 0,01% o Tween 80 al 0,005%. Por consiguiente, una formulación preferida de la invención puede comprender histidina 15 mM pH 6,5 y Tween 80 al 0,01%. Otra formulación preferida de la invención puede comprender histidina 10 mM pH 6,0 y Tween 80 al 0,005%.

Aún en otro aspecto, además del polipéptido de la invención, la formulación de la presente invención puede comprender al menos un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0, un excipiente y un tensioactivo. Excipientes preferidos son polioles tales como manitol, sorbitol, etc., sacáridos tales como por ejemplo sacarosa, manosa, trehalosa, etc. La concentración del excipiente puede oscilar entre aproximadamente el 1% y el 20%, preferiblemente entre aproximadamente el 2,5% y el 15%, más preferiblemente entre aproximadamente el 5% y el 10%, tal como por ejemplo el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%. En un aspecto preferido, la formulación comprende sacarosa, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 5% al 10%, tal como de aproximadamente el 8% o el 10%. El tensioactivo puede seleccionarse de Tween 20, Tween 80 o un poloxámero. La concentración del tensioactivo puede oscilar entre aproximadamente el 0,001% y el 1% (preferiblemente entre aproximadamente el 0,001% y el 0,1%, o el 0,01% y el 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01%). En una realización específica, el tensioactivo es Tween 20 o Tween 80, que está a una concentración del 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, tal como por ejemplo Tween 80 al 0,01% o Tween 80 al 0,005%. Por consiguiente, una formulación preferida de la invención puede comprender sacarosa al 8% y Tween 80 al 0,01%. Otra formulación preferida de la invención puede comprender sacarosa al 10% y Tween 80 al 0,005%.

Por consiguiente, una formulación de la invención, además del polipéptido de la invención, puede comprender por ejemplo:

a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5, tampón histidina pH 6,0 y tampón HEPES pH 7,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y

ES 2 531 083 T3

- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%.
- 5
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5, tampón histidina pH 6,0 y tampón HEPES pH 7,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y
- 10 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
-
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y
- 15 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
-
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5 y tampón HEPES pH 7,0 a una concentración de 15 mM; y
- 20 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%.
-
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5 y tampón HEPES pH 7,0 a una concentración de 15 mM; y
- 25 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
-
- 30 a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5 y tampón HEPES pH 7,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y
- 35 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 8%.
-
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 8%; y
- 40 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
-
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5 y tampón HEPES pH 7,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y
- 45 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,01%.
-
- 50 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y
- c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,01%.
- 55
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM; y
- 60 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%.
-
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM; y
- 65 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.

ES 2 531 083 T3

O

a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y

5 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 10%.

O

b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 10%; y

10 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.

O

15 a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y

c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,005%.

O

20 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y

c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,005%.

25 O

a) tampón histidina pH 6,5 o pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y

30 b) sacarosa a una concentración del 1% al 20%.

O

a) tampón histidina pH 6,5 o pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM; y

35 c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1%.

O

b) sacarosa a una concentración del 1% al 20%; y

40 c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1%.

O

45 a) tampón histidina 15 mM pH 6,5; y

b) sacarosa al 8%.

O

50 a) tampón histidina 15 mM pH 6,5; y

c) Tween 80 al 0,01%.

55 O

b) sacarosa al 8%; y

c) Tween 80 al 0,01%.

60 O

a) tampón histidina 10 mM pH 6,0; y

65 b) sacarosa al 10%.

O

a) tampón histidina 10 mM pH 6,0; y

5 c) Tween 80 al 0,005%.

O

b) sacarosa al 10%; y

10 c) Tween 80 al 0,005%.

La formulación de la invención comprende un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6. Por consiguiente la formulación de la invención puede comprender:

15 a) tampón histidina 15 mM pH 6,5;

b) sacarosa al 8%; y

20 d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

O

a) tampón histidina 15 mM pH 6,5;

25 c) Tween 80 al 0,01%; y

d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

30 O

b) sacarosa al 8%;

35 c) Tween 80 al 0,01%; y

d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

O

40 a) tampón histidina 10 mM pH 6,0;

b) sacarosa al 10%; y

45 c) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

O

a) tampón histidina 10 mM pH 6,0;

50 c) Tween 80 al 0,005%; y

d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

O

55 b) sacarosa al 10%;

c) Tween 80 al 0,005%; y

60 d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

La formulación de la presente invención comprende un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0 y un polipéptido tal como se definió anteriormente (*"polipéptido de la invención"*) que comprende uno o más dominios variables individuales a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, formulándose dicha formulación para la administración a un sujeto humano y comprende los componentes seleccionados de:

65

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM seleccionado de histidina pH 6,0-6,5
 en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor.

5 Por consiguiente además del polipéptido de la invención, las formulaciones de la presente invención pueden comprender al menos un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0, un tampón seleccionado del grupo que
 consiste en histidina pH 6,0-6,5, un excipiente y un tensioactivo. Lo más preferiblemente el tampón es histidina pH
 6,5 o histidina pH 6,0. El tampón tiene preferiblemente una concentración que oscila entre 10 mM y 50 mM, 10 mM y
 25 mM, 10 mM y 20 mM. En un aspecto específico, la concentración de tampón en las formulaciones de la invención
 10 es de 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM o 100 mM. En un aspecto preferido, la concentración es de
 entre 10 y 20 mM, tal como 10 mM o 15 mM. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende
 tampón histidina 15 mM pH 6,5. En otro aspecto específico, una formulación de la invención comprende tampón
 histidina 10 mM pH 6,0. Excipientes preferidos son polioles tales como manitol, sorbitol, etc., sacáridos tales como
 15 por ejemplo sacarosa, manosa, trehalosa, etc. La concentración del excipiente puede oscilar entre aproximadamente
 el 1% y el 20%, preferiblemente entre aproximadamente el 2,5% y el 15%, más preferiblemente entre
 aproximadamente el 5% y el 10%, tal como por ejemplo el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%. En un aspecto preferido, la
 formulación comprende sacarosa, preferiblemente a una concentración de aproximadamente el 5% al 10%, tal como
 de aproximadamente el 8% o el 10%. El tensioactivo puede seleccionarse de Tween 20, Tween 80 o un poloxámero.
 20 La concentración del tensioactivo puede oscilar entre aproximadamente el 0,001% y el 1% (preferiblemente entre
 aproximadamente el 0,001% y el 0,1%, o el 0,01% y el 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el
 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%). En una
 realización específica, el tensioactivo es Tween 20 o Tween 80, que está a una concentración del 0,001%, el
 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, tal como por ejemplo
 Tween 80 al 0,01% o Tween 80 al 0,005%. Por consiguiente, una formulación preferida de la invención puede
 25 comprender histidina 15 mM pH 6,5, sacarosa al 8% y Tween 80 al 0,01%. Otra formulación preferida de la
 invención puede comprender histidina 10 mM pH 6,0, sacarosa al 10% y Tween 80 al 0,005%.

Por consiguiente, una formulación de la invención, además del polipéptido de la invención, puede comprender por
 ejemplo:

30 a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,5, un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de
 10 mM a 100 mM;

35 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y

c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.

O

40 a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 15 mM;

b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y

45 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.

O

a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM;

50 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 8%; y

c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.

O

55 a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM;

b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y

60 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,01%.

O

65 a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 15 mM;

b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 8%; y

ES 2 531 083 T3

- c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
- 5 O
- a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM;
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 8%; y
- 10 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,01%.
- O
- a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 15 mM;
- 15 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y
- c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,01%.
- 20 O
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM;
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y
- 25 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
- O
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM;
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 10%; y
- 30 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o a poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
- 35 O
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM;
- 40 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y
- c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,005%.
- O
- 45 a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM;
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 10%; y
- 50 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,001% al 1%.
- O
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM;
- 55 b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 10%; y
- c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,005%.
- 60 O
- a) un tampón seleccionado de un tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 15 mM;
- b) un excipiente seleccionado de sacarosa, sorbitol, trehalosa y manitol a una concentración del 1% al 20%; y
- 65 c) un tensioactivo seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero a una concentración del 0,005%.

O

5 a) tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM;

b) sacarosa a una concentración del 1% al 20%; y

c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1%.

10 O

a) tampón histidina 15 mM pH 6,5;

15 b) sacarosa al 8%; y

c) Tween 80 al 0,01%.

O

20 a) tampón histidina pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM;

b) sacarosa a una concentración del 1% al 20%; y

c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1%.

25

O

a) tampón histidina 10 mM pH 6,0;

30 b) sacarosa al 10%; y

c) Tween 80 al 0,005%.

35 La formulación de la invención comprende un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6. Por consiguiente la formulación de la invención puede comprender:

a) tampón histidina 15 mM pH 6,5;

40 b) sacarosa al 8%;

40

c) Tween 80 al 0,01%; y

d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

45 O

a) tampón histidina 10 mM pH 6,0;

50 b) sacarosa al 10%;

50

c) Tween 80 al 0,005%; y

d) un polipéptido seleccionado de SEQ ID NO: 1 a 6 (por ejemplo a una concentración de 10 mg/ml).

55 Los componentes presentes en las formulaciones de la invención se han seleccionado de manera que los polipéptidos de la invención tienen una buena solubilidad (tal como se define en el presente documento). Preferiblemente, los polipéptidos presentes en las formulaciones de la presente invención tienen una solubilidad de al menos 0,7 mM, al menos 0,8 mM, al menos 0,9 mM, al menos 1,0 mM, al menos 1,1 mM, al menos 1,2 mM, al menos 1,3 mM, al menos 1,4 mM, al menos 1,5 mM, al menos 1,6 mM, al menos 1,7 mM, al menos 1,8 mM, al menos 1,9 mM, al menos 2,0 mM, al menos 2,1 mM, al menos 2,2 mM, al menos 2,3 mM, al menos 2,4 mM, al menos 2,5 mM, al menos 2,6 mM, al menos 2,7 mM, al menos 2,8 mM, al menos 2,9 mM, al menos 3,0 mM, al menos 3,2 mM, al menos 3,4 mM, al menos 3,6 mM o más y/o al menos 20 mg/ml, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, al menos 60 mg/ml, al menos 65 mg/ml, al menos 70 mg/ml, al menos 80 mg/ml, al menos 90 mg/ml, al menos 100 mg/ml, al menos 110 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 130 mg/ml, al menos 140 mg/ml, al menos 150 mg/ml o incluso 200 mg/ml o más tal como se determina mediante el método de exclusión de PEG o mediante ultrafiltración centrífuga. Una muy buena solubilidad de los polipéptidos de la invención se ha

60

65

obtenido con una formulación que comprende un tampón histidina pH 6,5 o con una formulación que comprende Tween 80. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una formulación tal como se reivindica que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para la administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además al menos uno de:

a) un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM);

c) Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1% (preferiblemente desde aproximadamente el 0,001% hasta el 0,1%, o del 0,01% al 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01%);

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

en la que la solubilidad del polipéptido es de al menos 20 mg/ml, al menos 50 mg/ml, preferiblemente al menos 90 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 150 mg/ml o incluso 200 mg/ml o más tal como se determina mediante el método de exclusión de PEG o mediante ultrafiltración centrífuga. En un aspecto preferido, la formulación comprende un tampón histidina pH 6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM) y Tween 80 a una concentración del 0,001% al 1% (preferiblemente desde aproximadamente el 0,001% hasta el 0,1%, o del 0,01% al 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01%).

Aparte de esto y/o además, los polipéptidos de la invención presentes en la formulación de la invención deben tener preferiblemente una temperatura de fusión de al menos 59°C o más (tal como 59,5°C o más), preferiblemente al menos 60°C o más (tal como 60,5°C o más), más preferiblemente al menos 61°C o más (tal como 61,5°C o más) o al menos 62°C o más (tal como 62,5°C o más), lo más preferiblemente al menos 63°C o más (tal como 63,5°C o más) tal como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico (TSA) y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Sin limitarse, la determinación del punto de fusión puede realizarse mediante el ensayo de desplazamiento térmico basado en fluorescencia que se basa en el hecho de que tras el desplegamiento térmico las regiones hidrófobas de las proteínas, habitualmente ocultas en el centro del plegamiento de la proteína, se vuelven accesibles para unirse a un colorante fluorescente hidrófobo. La emisión de fluorescencia de este colorante se extingue en disolución acuosa, mientras que tras unirse a los parches hidrófobos de una proteína desplegada se observa un aumento repentino en el rendimiento de fluorescencia de la sonda. El desplegamiento inducido por temperatura normalmente es un proceso de dos estados con una transición repentina entre el estado plegado y desplegado, en el que la temperatura de fusión (T_m) se define como la temperatura a la que la mitad de la proteína está en el estado desplegado, es decir se representa gráficamente la primera derivada de la señal de fluorescencia tras el calentamiento gradual de la muestra y el pico observado (o picos cuando están presentes múltiples dominios y/o variantes del mismo dominio) representa la temperatura de fusión. El ensayo de desplazamiento térmico puede realizarse en un instrumento de PCR en tiempo real típico en el que pueden registrarse las curvas de fusión con precisión en el modo de alto rendimiento requiriendo sólo cantidades pequeñas de proteína.

Durante un experimento de calorimetría diferencial de barrido la muestra se calienta a una velocidad constante en un entorno adiabático ($\Delta T = 0$). La energía requerida para mantener la diferencia de temperatura entre una referencia y la célula de muestra a cero se mide y proporciona la capacidad calorífica como función de la temperatura ($C_p(T)$). La temperatura correspondiente a la capacidad calorífica máxima representa la temperatura de fusión (T_m). Si el proceso de desplegamiento dependiente de temperatura es reversible, pueden determinarse otros parámetros termodinámicos tales como la entalpía de desplegamiento ($\Delta H_{\text{desplegamiento}}$).

Se ha observado un aumento de las temperaturas de fusión para los polipéptidos de la invención cuando están presentes en una formulación con un pH de aproximadamente 6,0 a 8,0, preferiblemente de 6,2 a 7,5, más preferiblemente de 6,5 a 7,5, lo más preferiblemente 6,5-7,0. También se ha obtenido un aumento de la temperatura de fusión para los polipéptidos de la invención cuando están presentes en una formulación que comprende HEPES pH 7,0, histidina pH 6,0-6,5, MES pH 6,0 o acetato pH 6,0, o una formulación que comprende un excipiente, preferiblemente sacáridos y/o poliol tal como manitol, trehalosa, sorbitol o sacarosa. Por consiguiente, en el presente documento también se da a conocer una formulación que comprende un portador acuoso a un pH de 6,0 a 8,0 y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además al menos uno de:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM o 10 mM) seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5, HEPES pH 7,0-8,0, MES pH 6,0, succinato pH 6,0-6,5 y acetato pH 5,5-6,0;

b) un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol, sorbitol, trehalosa o sacarosa a una

concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%)

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

en la que la temperatura de fusión del polipéptido de la invención es de al menos 59°C o más (tal como 59,5°C o más), preferiblemente al menos 60°C o más (tal como 60,5°C o más), más preferiblemente al menos 61°C o más (tal como 61,5°C o más) o al menos 62°C o más (tal como 62,5°C o más), lo más preferiblemente al menos 63°C o más (tal como 63,5°C o más) tal como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico (TSA) y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC).

En un aspecto preferido, la formulación comprende un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM) seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5, HEPES pH 7,0-8,0, MES pH 6,0, succinato pH 6,0-6,5 y acetato pH 5,5-6,0 y un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol, sorbitol, trehalosa o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%).

Aparte de esto y/o además, la formulación de la presente invención presenta estabilidad en al menos una o más de las siguientes condiciones de estrés:

- múltiples (hasta 10) ciclos de congelación/descongelación;

- almacenamiento a una temperatura de 2-8°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

- almacenamiento a una temperatura de 25±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

- almacenamiento a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

- estrés mecánico.

Preferiblemente la formulación de la invención es estable en una o más de las siguientes formas de estrés mecánico:

- remover la formulación durante de 10 s a 1 min;

- empujar la formulación a través de una aguja (25G, preferiblemente 26G, más preferiblemente 27G, incluso más preferiblemente 28G, lo más preferiblemente 29G o más) con una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml);

- rotar durante dos días a 10 rpm; y/o

- agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4-48 horas a 4°C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

Preferiblemente, la formulación de la presente invención es estable en más de una de las condiciones de estrés anteriores, tales como al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete o lo más preferiblemente en todas las condiciones de estrés anteriores.

En un aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en una o más formas de estrés mecánico y/o por cizalladura. El estrés mecánico tal como se usa en la presente invención puede ser cualquier forma de fuerza externa aplicada sobre la formulación que puede afectar a la estabilidad del polipéptido presente en la formulación. Sin limitarse, el estrés mecánico aplicado a la disolución incluye estrés por cizalladura, estrés por agitación, estrés por remoción, estrés por rotación, etc. La formulación de la invención puede removerse por ejemplo durante al menos 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s hasta 1 minuto o más. La formulación de la invención puede empujarse a través de una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml) con aguja una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces hasta 10 veces o más. Preferiblemente la aguja tiene un tamaño de 25G (tal como 26G, 27G, 28G, 29G, 30G) o más. Más preferiblemente el tamaño de las agujas es de 27G o más.

Además o alternativamente, la formulación de la invención puede hacerse rotar durante 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día hasta dos días o más a 10 rpm. La formulación de la invención puede agitarse durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas o incluso 48 horas o más a 2-8°C. La velocidad de rotación es preferiblemente superior a 10 rpm, tal como por ejemplo 50 rpm, 100 rpm o más.

5 La estabilidad de la formulación bajo estrés mecánico puede evaluarse por ejemplo mediante inspección visual de la formulación o mediante medición de la razón DO320/DO280. Preferiblemente la razón DO320/DO280 es de 0,05 o menor, tal como 0,01 ó 0,005.

10 Una buena estabilidad de los polipéptidos de la invención bajo estrés mecánico se ha obtenido con una formulación que comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa o que comprende Tween 80. Por consiguiente, en el presente documento también se da a conocer una formulación que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además al menos uno de:

b) un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 10%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%);

20 c) un tensioactivo a una concentración del 0,001% al 1% (preferiblemente desde aproximadamente el 0,001% hasta el 0,1%, o del 0,01% al 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01%) seleccionado de Tween 20, Tween 80 o un poloxámero,

25 en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

en la que el polipéptido es estable bajo estrés mecánico tal como se determina mediante medición de la razón DO320/DO280. En un aspecto preferido, la formulación comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%) y un tensioactivo a una concentración del 0,001% al 1% (preferiblemente de aproximadamente el 0,001% al 0,1%, o del 0,01% al 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%) seleccionado de Tween 20 y Tween 80. Una formulación preferida comprende sacarosa al 8% y Tween 80 al 0,01%. Otra formulación preferida comprende sacarosa al 10% y Tween 80 al 0,005%.

35 En un aspecto específico, la formulación de la invención comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%) y/o Tween 20, Tween 80 o un poloxámero (a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0,001% y el 0,1%, o el 0,01% y el 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01%) y se caracteriza porque los polipéptidos presentes en la formulación son estables bajo estrés mecánico.

45 En un aspecto preferido, la formulación de la invención comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%) y/o Tween 80 (a una concentración del 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%) y se caracteriza porque los polipéptidos presentes en la formulación de la invención son estables cuando se remueve la formulación durante al menos 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s hasta 1 minuto o más. En otro aspecto preferido, la formulación de la invención comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%) y/o Tween 80 (a una concentración del 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%) y se caracteriza porque los polipéptidos presentes en la formulación de la invención son estables cuando se empuja la formulación a través de una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml) con un tamaño de aguja de 25G o más (tal como 26G, 27G, 28G, 29G, 30G o más, preferiblemente 27G o más) una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces hasta 10 veces o más. En otro aspecto preferido, la formulación de la invención comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%) y/o Tween 80 (a una concentración del 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%) y se caracteriza porque los polipéptidos presentes en la formulación de la invención son estables cuando se hace rotar la formulación durante 1 hora, 2 horas, 6 horas, 12 horas, 1 día hasta dos días o más a 10 rpm. En otro aspecto preferido, la formulación de la invención comprende un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20%

(preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%) y/o Tween 80 (a una concentración del 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%) y se caracteriza porque los polipéptidos presentes en la formulación de la invención son estables cuando se agita la formulación durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4 horas, 8 horas, 12 horas, 24 horas o incluso 48 horas o más a 2-8°C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

Un "ciclo de congelación/descongelación" o "ciclo de C/D" se define como la congelación de una muestra en un congelador (-20±5°C) o ultracongelador (por debajo de -64°C (tal como por ejemplo a -80°C)) hasta que se vuelve sólida, seguido por descongelación a temperatura ambiente hasta que todos los cristales de hielo han desaparecido visualmente. En un aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en múltiples (hasta 10) ciclos de congelación/descongelación. La formulación de la invención puede presentar estabilidad en al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 5 hasta al menos 10 ciclos de congelación/descongelación, tal como por ejemplo 10 ciclos a -20°C, 2 ciclos a -80°C + 1 ciclo a -20°C o 2 ciclos a -80°C + 6 ciclos a -20°C.

Aún en otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad cuando se almacena a una temperatura de 5±5°C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad cuando se almacena a una temperatura de 5±5°C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 8 semanas, 10 semanas, hasta 3 meses, 6 meses, 11 meses, 1 año, 1,5 años o incluso 2 años y más.

Aún en otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad cuando se almacena a una temperatura de 25±5°C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad cuando se almacena a una temperatura de 25±5°C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más.

Aún en otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad cuando se almacena a una temperatura de 37±5°C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad cuando se almacena a una temperatura de 37±5°C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más.

Tal como conoce un experto en la técnica, las temperaturas indicadas en este texto pueden someterse a variaciones normales.

Preferiblemente, en las formulaciones que son estables en una o más de las condiciones de estrés anteriores:

- menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más preferiblemente menos del 1%) del polipéptido de la invención forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) durante almacenamiento en (una de las anteriores) condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

- menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más preferiblemente menos del 1%) del polipéptido de la invención forma dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento en (una de las anteriores) condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

- al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%) de los polipéptidos de la invención conservan su actividad de unión (por ejemplo tal como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una de sus (preferiblemente a todas de sus) dianas tras almacenamiento en (una de las anteriores) condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) en comparación con la actividad de unión antes de la condición de estrés.

La estabilidad de las formulaciones puede evaluarse mediante diversos métodos analíticos y/o inmunológicos conocidos en la técnica. El contenido en proteína de los polipéptidos de la invención, por ejemplo, puede detectarse mediante métodos espectrofotométricos.

SDS-PAGE permite la visualización de los polipéptidos en una muestra dada mediante tinción directa. Se usa SDS-PAGE para separar las proteínas según su tamaño. Pueden realizarse análisis de SDS-PAGE tanto reductores como no reductores.

La distribución de tamaño molecular y las cantidades relativas de polipéptido de la invención e impurezas de proteína puede determinarse mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC). La cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como el % de área, puede calcularse dividiendo el área de pico que corresponde a la impureza entre el área integrada total. El experto conoce métodos de SE-HPLC y también se describen en la sección de ejemplos.

La cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) separa moléculas con respecto a diferencias en hidrofobicidad y se basa en la interacción reversible entre la molécula y la fase estacionaria hidrófoba. En este ensayo puede usarse una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.). La cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como el % de área, puede calcularse dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza entre el área integrada total. El experto conoce métodos de RP-HPLC y también se describen en la sección de ejemplos.

Pueden separarse polipéptidos de la invención y sus variantes de carga mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio iónico (IEX-HPLC). También pueden detectarse posibles impurezas con este método. La cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como el % de área, puede calcularse dividiendo el área de pico que corresponde a la impureza entre el área integrada total. El experto conoce métodos de IEX-HPLC y también se describen en la sección de ejemplos.

Los polipéptidos presentes en la formulación de la invención preferiblemente no forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal. La formación de piroglutamato en la muestra puede medirse por ejemplo mediante RP-HPLC. Por ejemplo, el análisis mediante RP-HPLC de una formulación que contiene SEQ ID NO: 4 tras almacenamiento durante 10 semanas a una temperatura de 37°C mostró la formación de piroglutamato como un pico separado a 18-19 minutos. Preferiblemente en la formulación de la invención, menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más preferiblemente menos del 1%) de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

Se ha observado de poca a ninguna formación de piroglutamato de los polipéptidos de la invención en formulaciones con un pH de 7,0 o menor, preferiblemente 6,5 o menor, tal como 6,5, 6,0 ó 5,5, en por ejemplo tampones histidina y tampones acetato. Por consiguiente, en el presente documento también se da a conocer una formulación que comprende un portador acuoso a un pH de 7,0 o menor y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para la administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM o 10 mM) seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5 y acetato pH 5,5-6,0,

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

en la que menos del 10% (preferiblemente menos del 8%, más preferiblemente menos del 7%, lo más preferiblemente menos del 5%) de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal durante una o más de las condiciones de estrés anteriores (tal como durante almacenamiento a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)), midiéndose el % de piroglutamato mediante RP-HPLC. En un aspecto preferido, la formulación comprende un tampón histidina pH 6,5 a 15 mM. En otro aspecto preferido, la formulación comprende un tampón histidina pH 6,0 a 10 mM.

Los polipéptidos presentes en la formulación de la invención preferiblemente tampoco forman dímeros. La formación de dímeros en la muestra puede medirse por ejemplo mediante SE-HPLC. Por ejemplo, el análisis en SE-HPLC de una formulación que contiene SEQ ID NO: 4 tras almacenamiento durante 10 semanas a una temperatura de 37°C, mostró la formación de un pico separado que eluye a un peso molecular aparente de 44 kDa en comparación con marcadores del peso molecular, mientras que el polipéptido monomérico eluyó entre los marcadores de peso molecular de 44 y 17 kDa. Este pico separado a 44 kDa representaba una forma dimérica de SEQ ID NO: 4. Preferiblemente en la formulación de la invención, menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más preferiblemente menos del 1%) de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

Se ha observado de poca a ninguna formación de dímeros de los polipéptidos de la invención en formulaciones con un tampón histidina o un tampón acetato y en formulaciones que comprenden un excipiente, preferiblemente un sacárido y/o poliol tal como manitol, trehalosa, sorbitol o sacarosa. Por consiguiente, en el presente documento también se da a conocer una formulación que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano, en

la que dicha formulación comprende además al menos uno de:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM o 10 mM) seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5 y acetato pH 5,5-6,0;

b) un excipiente, preferiblemente un sacárido, un azúcar no reductor y/o poliol tal como manitol, trehalosa, sorbitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%),

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

en la que menos del 10% (preferiblemente menos del 8%, más preferiblemente menos del 7%, lo más preferiblemente menos del 5%) de los polipéptidos forman dímeros durante una o más de las condiciones de estrés anteriores (tal como durante almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^\circ\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)), midiéndose el % de dímeros mediante SE-HPLC. En un aspecto preferido, la formulación comprende un tampón histidina pH 6,5 a 15 mM. En otro aspecto preferido, la formulación comprende un tampón histidina pH 6,0 a 10 mM. En un aspecto preferido, la formulación comprende un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM o 10 mM) seleccionado del grupo que consiste en histidina pH 6,0-6,5 y acetato pH 5,5-6,0 y un excipiente, preferiblemente un sacárido, azúcar no reductor y/o poliol tal como manitol, trehalosa, sorbitol o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%), tal como por ejemplo histidina 15 mM pH 6,5 y sacarosa al 8%; o histidina 10 mM pH 6,0 y sacarosa al 10%.

Preferiblemente en la formulación de la invención, menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más preferiblemente menos del 1%) de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) y menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más preferiblemente menos del 1%) de los polipéptidos forman dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

Aparte de esto y/o además, la formulación de la presente invención debe mostrar niveles sólo de bajos a indetectables de agregación incluso durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. Por ejemplo, en la formulación de la invención, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, y lo más preferiblemente no más del 0,5% de los polipéptidos forman un agregado tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

Agregación tal como se usa en la presente invención significa el desarrollo de agregados de alto peso molecular, es decir agregados con un peso molecular aparente en análisis de SE-HPLC de más de/mayor que el peso molecular observado para dímeros. Tal como se describió anteriormente, 44 kDa es el peso molecular aparente observado en análisis de SE-HPLC para dímeros de SEQ ID NO: 4, 36-38 kDa es el peso molecular aparente observado en análisis de SE-HPLC para dímeros de SEQ ID NO: 1-3 y 36 kDa es el peso molecular aparente observado en análisis de SE-HPLC para dímeros de SEQ ID NO: 5. La agregación puede evaluarse mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Sin limitarse, los ejemplos incluyen SE-HPLC, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, recuento de partículas subvisibles y medición de DO320/DO280.

En una ultracentrifuga analítica, puede monitorizarse una muestra que está centrifugándose en tiempo real a través de un sistema de detección óptica, usando absorción de luz ultravioleta y/o un sistema sensible de índice de refracción óptica de interferencia. Esto permite al operario observar la evolución de la concentración de la muestra frente al perfil del eje de rotación como resultado del campo centrífugo aplicado. Con instrumentación moderna, estas observaciones se digitalizan electrónicamente y se almacenan para su análisis matemático adicional. Se realizan comúnmente dos tipos de experimentos en estos instrumentos: experimentos de velocidad de sedimentación y experimentos de equilibrio de sedimentación.

Los experimentos de velocidad de sedimentación están dirigidos a interpretar todo el transcurso de tiempo de la sedimentación, y notificar la forma y la masa molar de las macromoléculas disueltas, así como su distribución de tamaño (Perez-Ramirez y Steckert (2005) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. C.M. Smales y D.C. James, Eds. vol. 308: 301-318. Humana Press Inc, Totowa, NJ, EE.UU.). La resolución de tamaño de este método aumenta de escala aproximadamente con el cuadrado de los radios de partícula, y ajustando la velocidad del rotor del experimento pueden cubrirse intervalos de tamaño de desde 100 Da hasta 10 GDa. Los experimentos de velocidad de sedimentación también pueden usarse para estudiar equilibrios químicos reversibles entre especies macromoleculares, o bien monitorizando el número y la masa molar de complejos macromoleculares, reuniendo información sobre la composición de complejo a partir de análisis de múltiples señales aprovechando diferencias en cada señal espectroscópica de componentes, o bien siguiendo la dependencia de la composición de las tasas de

sedimentación del sistema macromolecular, tal como se describe en la teoría de Gilbert-Jenkins.

5 Los experimentos de equilibrio de sedimentación se centran sólo en el estado estacionario final del experimento, en el que la sedimentación está equilibrada mediante difusión opuesta a los gradientes de concentración, dando como resultado un perfil de concentración independiente del tiempo. Las distribuciones de equilibrio de sedimentación en el campo centrífugo se caracterizan por distribuciones de Boltzmann. Este experimento no detecta la forma de la macromolécula, y directamente notifica la masa molar de las macromoléculas y, para mezclas que reaccionan químicamente, las constantes de equilibrio químico.

10 Los tipos de información que pueden obtenerse a partir de una ultracentrífuga analítica incluyen la forma macroscópica de macromoléculas, los cambios conformacionales en macromoléculas y las distribuciones de tamaño de muestras macromoleculares. Para macromoléculas, tales como proteínas, que existen en equilibrio químico con diferentes complejos no covalentes, puede estudiarse el número y la estequiometría de subunidades de los complejos y la constante de equilibrio. (Véase también Scott D.J., Harding S.E. y Rowe A.J. Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods, RSC Publishing)

15 La dispersión dinámica de la luz (también conocida como espectroscopía de correlación de fotones o dispersión cuasi-elástica de la luz) es una técnica en física, que puede usarse para determinar el perfil de distribución de tamaño de partículas pequeñas en disolución. Cuando un haz de luz pasa a través de una dispersión coloidal, las partículas o gotitas dispersan parte de la luz en todas las direcciones. Cuando las partículas son muy pequeñas en comparación con la longitud de onda de la luz, la intensidad de la luz dispersada es uniforme en todas las direcciones (dispersión de Rayleigh); para partículas más grandes (por encima de aproximadamente 250 nm de diámetro), la intensidad depende del ángulo (dispersión de Mie). Si la luz es coherente y monocromática, como de un láser por ejemplo, es posible observar fluctuaciones dependientes del tiempo en la intensidad dispersada usando un detector adecuado tal como un fotomultiplicador que puede funcionar en modo de recuento de fotones.

20 Estas fluctuaciones surgen del hecho de que las partículas son lo suficientemente pequeñas como para experimentar movimiento térmico aleatorio (browniano) y la distancia entre ellas, por tanto, está variando constantemente. La interferencia constructiva y destructiva de la luz dispersada por partículas vecinas dentro de la zona iluminada da lugar a la fluctuación de intensidad en el plano del detector que, puesto que surge a partir del movimiento de las partículas, contiene información sobre este movimiento. Por tanto, el análisis de la dependencia del tiempo de la fluctuación de intensidad puede proporcionar el coeficiente de difusión de las partículas a partir del que, mediante la ecuación de Stokes-Einstein, conociendo la viscosidad del medio, puede calcularse el radio hidrodinámico o el diámetro de las partículas. (Véase también Berne B. J. y Pecora R. Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics, Dover Publications)

30 La agregación también puede medirse mediante el instrumento SVSS-C (sistema de jeringuilla de volumen pequeño-C) de PAMAS (PArtikelMess und AnalyseSysteme GMBH), que es un analizador de la distribución del tamaño de partícula para fluidos poco viscosos. Usa el principio de oscurecimiento de la luz para detectar partículas subvisibles en el intervalo de tamaño de 1 μm - 200 μm . Los criterios de validación / límites especificados de la Farmacopea europea (EP<2.9.19 Contaminación de material particulado: partículas subvisibles) para formulaciones parenterales de volumen pequeño y grande se definen por los recuentos totales por recipiente:

- 45 - Para partículas > 10 μm , no más de 6000 recuentos por recipiente
- Para partículas > 25 μm , no más de 600 recuentos por recipiente

50 La razón DO320/DO280 también es una medida de la turbidez o la presencia de materiales particulados en la muestra. En un aspecto preferido, la razón DO320/DO280 de la formulación de la invención debe ser de 0,05 o menor, preferiblemente de 0,01 o menor, tal como de 0,005 o menor.

55 La tendencia para la formación de agregado de un polipéptido en una formulación determinada también puede medirse mediante dispersión elástica de la luz. La dispersión elástica de la luz puede medirse en un espectrofluorómetro (por ejemplo longitud de onda de excitación y emisión de 500 nm) mediante desnaturalización inducida por temperatura tal como se mide por ejemplo a un ángulo de 90°. Preferiblemente la dispersión máxima permanecerá dentro del límite de detección de la absorción. La dispersión debe ser de 1000 abs o menor, preferiblemente de 750 abs o menor, tal como de 500 abs o menor.

60 No se ha observado formación de material particulado en formulaciones que comprenden un tampón histidina pH 6,0-6,5 en diferentes condiciones de estrés (tal como por ejemplo almacenamiento a una temperatura de $5\pm 5^\circ\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) o almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^\circ\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)). Por consiguiente, la presente invención se refiere a una formulación que

65

comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además:

- 5 a) un tampón histidina pH 6,0-6,5 a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM),

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

- 10 en la que no hay partículas presentes en una o más de las condiciones de estrés anteriores (por ejemplo cuando se almacena a una temperatura de $5\pm 5^\circ\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) o cuando se almacena a una temperatura de $37\pm 5^\circ\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)) tal como se mide mediante medición de la razón DO320/DO280 y/o dispersión elástica de la luz. En un aspecto preferido la formulación comprende un tampón histidina pH 6,5 a 15 mM. En otro aspecto preferido la formulación comprende un tampón histidina pH 6,0 a 10 mM.

- 20 Aparte de esto y/o además, la formulación de la presente invención muestra niveles sólo de bajos a indetectables de fragmentación y/o degradación incluso durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. La fragmentación y degradación pueden medirse por ejemplo mediante SE-HPLC y/o RP-HPLC. Por ejemplo, el análisis en SE-HPLC de una formulación que contiene SEQ ID NO: 4 tras almacenamiento durante 10 semanas a una temperatura de 37°C mostró la formación de algunos picos posteriores menores, representando productos de degradación de SEQ ID NO: 4. Por ejemplo, el análisis mediante RP-HPLC de una formulación que contiene SEQ ID NO: 4 tras almacenamiento durante 10 semanas a una temperatura de 37°C mostró la formación de algunos picos menores a 8-9 minutos, representando productos de degradación. Preferiblemente en la formulación de la invención, no más del 5%, no más del 4%, no más del 3%, no más del 2%, no más del 1%, no más del 0,5%, no más del 0,1%, no más del 0,05%, y lo más preferiblemente no más del 0,01% de los polipéptidos muestra degradación y/o fragmentación tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

- 35 Las técnicas de dispersión estática de la luz (SLS), filtración de flujo tangencial (TFF), espectroscopía de infrarrojos con transformada de Fourier (FTIR), dicroísmo circular (CD), técnicas de desplegamiento de proteínas inducido por urea, fluorescencia intrínseca de triptófano y/o unión de proteína a ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico (ANS) también pueden usarse para evaluar las propiedades físicas y la estabilidad de polipéptidos.

- Aparte de esto y/o además, la formulación de la presente invención muestra de muy poca a ninguna pérdida de potencia y/o actividad biológica de sus polipéptidos, incluso durante almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

- 40 La potencia y/o actividad biológica de un producto biológico describe la aptitud o capacidad específica de dicho producto biológico para lograr un efecto biológico definido. La potencia y actividades biológicas de los polipéptidos de la invención pueden evaluarse mediante diversos ensayos incluyendo cualquier ensayo *in vitro* adecuado, ensayo basado en células, ensayo *in vivo* y/o modelo animal conocido *per se*, o cualquier combinación de los mismos, dependiendo de la enfermedad o el trastorno específico implicado. Los ensayos *in vitro* adecuados resultarán evidentes para el experto, y por ejemplo incluyen ELISA; ensayo de unión FACS; Biacore; ensayo de unión de competición (AlphaScreen[®], Perkin Elmer, Massachusetts, EE.UU.; FMAT); ensayo TRAP (ensayo de diferenciación de osteoclastos; Rissanen *et al.* 2005, J. Bone Miner. Res. 20, supl. 1: S256); ensayo de gen indicador NF-kappaB (Mizukami *et al.* 2002, Mol. Cell. Biol. 22: 992-1000). Por ejemplo, SEQ ID NO: 4 interacciona con RANKL y bloquea la interacción de este ligando con RANK, impidiendo de ese modo la señalización a través de este receptor. SEQ ID NO: 1 a 3 interaccionan con IL-6R y bloquean la interacción de este receptor con IL-6. SEQ ID NO: 5 y 6 interaccionan con IL-23 y bloquean la interacción de este ligando con su receptor. La potencia de SEQ ID NO: 1 a 6 para bloquear la interacción ligando/receptor respectiva puede determinarse, por ejemplo mediante ELISA, Biacore, AlphaScreen[®].

- 55 Por ejemplo, en una realización, el análisis cinético de Biacore usa la tecnología de resonancia de plasmones superficiales (SPR) para monitorizar interacciones macromoleculares en tiempo real y se usa para determinar las velocidades de asociación y disociación de polipéptidos de la formulación de la invención a su diana. El análisis cinético de Biacore comprende analizar la unión y disociación de la diana a partir de chips con polipéptidos de la invención inmovilizados sobre su superficie. Un estudio cinético de Biacore típico implica la inyección de 250 μl de reactivo de polipéptido a concentración variable en tampón HBS que contiene Tween 20 al 0,005% sobre una superficie de chip sensor, sobre el que se ha inmovilizado el antígeno. En el sistema BIACore 3000, el ligando se inmoviliza sobre dextrano carboximetilado sobre una superficie de oro, mientras que el segundo par (analito) se captura a medida que fluye sobre la superficie de ligando inmovilizado. Los ligandos inmovilizados son notablemente resistentes y mantienen su actividad biológica. Los analitos unidos pueden separarse del ligando inmovilizado sin afectar a su actividad para permitir muchos ciclos de unión y regeneración sobre la misma superficie inmovilizada.

Se detecta la interacción en tiempo real mediante SPR y con alta sensibilidad. Debido a que la misma afinidad puede reflejar diferentes velocidades de asociación y velocidades de disociación, este instrumento destaca sobre la mayoría de los otros métodos de medición de la afinidad ya que mide velocidades de asociación (k_a) y velocidades de disociación (k_d). También son viables experimentos de determinación de la concentración.

La formulación de la presente invención apenas presenta pérdida en las actividades biológicas del polipéptido durante almacenamiento prolongado en las condiciones descritas anteriormente, tal como se evalúa mediante diversos ensayos inmunológicos incluyendo, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y resonancia de plasmones superficiales para medir la capacidad del polipéptido para unirse específicamente a un antígeno. Los polipéptidos presentes en la formulación de la presente invención conservan, incluso en las condiciones de estrés definidas anteriormente (tal como almacenamiento en determinado estrés de temperatura durante periodos definidos) más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95%, más del 98%, más del 99% o más del 99,5% de sus actividades biológicas iniciales (por ejemplo, la capacidad para unirse a RANKL, IL-6R, IL-23 y/o HSA) de los polipéptidos antes del almacenamiento. En algunas realizaciones, los polipéptidos en la formulación de la invención conservan en las condiciones de estrés definidas anteriormente al menos el 80%, al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5% de la actividad biológica (por ejemplo, la capacidad para unirse a RANKL, IL-6R, IL-23 y/o HSA) en comparación con los polipéptidos presentes en una formulación de referencia antes del almacenamiento.

En una realización, los polipéptidos de la invención se unen a HSA. En las formulaciones de la presente invención, al menos el 80% (preferiblemente al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%) de dichos polipéptidos conservan su actividad de unión a HSA en una o más de las condiciones de estrés anteriores (tal como almacenamiento en determinado estrés de temperatura durante periodos definidos) en comparación con la actividad de unión antes de la condición de estrés. Sin limitarse, la unión de los polipéptidos a HSA puede determinarse por ejemplo mediante ELISA y/o Biacore.

En otra realización, los polipéptidos de la invención se unen a RANKL. En la formulación de la presente invención al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%) de dichos polipéptidos conservan su actividad de unión a RANKL tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

En otra realización, los polipéptidos de la invención se unen a IL-6R. En la formulación de la presente invención al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%) de dichos polipéptidos conservan su actividad de unión a IL-6R tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

En otra realización, los polipéptidos de la invención se unen a IL-23. En la formulación de la presente invención al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%) de dichos polipéptidos conservan su actividad de unión a IL-23 tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

En un aspecto preferido, al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al menos el 99,5%) de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención conservan su actividad de unión a todas sus dianas (tal como por ejemplo RANKL y HSA, IL-6R y HSA o IL-23 y HSA) tras almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

Los modelos animales adecuados para determinar la potencia y/o actividad biológica de los polipéptidos presentes en las formulaciones de la invención resultarán evidentes para el experto y dependerán de la enfermedad y/o el trastorno previsto que va a prevenirse y/o tratarse mediante el polipéptido de la invención. Modelos animales adecuados para someter a prueba la potencia y/o actividad biológica de SEQ ID NO: 1 a 6 se describen por ejemplo en los documentos WO 08/020079, WO 09/068627 y WO 08/142164.

Se ha observado de poca a ninguna pérdida de potencia de los polipéptidos de la invención en formulaciones con un tampón histidina y en formulaciones que comprenden un excipiente, preferiblemente un sacárido, azúcar no reductor y/o poliol tal como manitol, sorbitol, trehalosa o sacarosa. Por consiguiente, la presente invención se refiere a una formulación tal como se reivindica que comprende un portador acuoso y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, formulándose dicha formulación para la administración a un sujeto humano, en la que dicha formulación comprende además al menos uno de:

a) un tampón histidina a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM o 10 mM);

b) un excipiente, preferiblemente un sacárido, azúcar no reductor y/o poliol tal como manitol, sorbitol, trehalosa o sacarosa a una concentración del 1% al 20% (preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%),

en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor; y

5 en la que al menos el 80% (preferiblemente al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%,
al menos el 99% o al menos el 99,5%) de los polipéptidos conservan su actividad de unión a al menos una
(preferiblemente a todas) de sus dianas en una o más de las condiciones de estrés anteriores (tal como durante
almacenamiento a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al
menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1
10 año, 1,5 años o incluso 2 años o más)) en comparación con la actividad de unión antes de las condiciones de estrés,
tal como se mide dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore. En un aspecto preferido, la formulación
comprende un tampón histidina a una concentración de 10 mM a 100 mM (preferiblemente de 10 mM a 50 mM, más
preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 15 mM o 10 mM) y un excipiente, preferiblemente un sacárido, azúcar no
reductor y/o poliol tal como manitol, sorbitol, trehalosa o sacarosa a una concentración del 1% al 20%
(preferiblemente del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como el 5%, el 7,5%, el 8% o el 10%), tal
15 como por ejemplo histidina 15 mM pH 6,5 y sacarosa al 8%; o histidina 10 mM pH 6,0 y sacarosa al 10%.

Por consiguiente, en las formulaciones estables de la presente invención preferiblemente:

20 - el polipéptido de la invención tiene una solubilidad de al menos 20 mg/ml, al menos 50 mg/ml, preferiblemente al
menos 90 mg/ml, al menos 120 mg/ml, al menos 150 mg/ml o incluso 200 mg/ml o más) (por ejemplo tal como se
evalúa mediante método de exclusión de PEG o mediante ultrafiltración centrífuga);

25 - el polipéptido de la invención tiene una temperatura de fusión de al menos 59°C o más (tal como $59,5^{\circ}\text{C}$ o más),
preferiblemente al menos 60°C o más (tal como $60,5^{\circ}\text{C}$ o más), más preferiblemente al menos 61°C o más (tal como
 $61,5^{\circ}\text{C}$ o más) o al menos 62°C o más (tal como $62,5^{\circ}\text{C}$ o más), lo más preferiblemente al menos 63°C o más (tal
como $63,5^{\circ}\text{C}$ o más) (por ejemplo tal como se evalúa mediante TSA o DSC);

30 - menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más
preferiblemente menos del 1%) del polipéptido de la invención forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal
(por ejemplo tal como se evalúa mediante RP-HPLC) durante almacenamiento en una o más (de las anteriores)
condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas
(preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos
3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

35 - menos del 10% (más preferiblemente menos del 5%, incluso más preferiblemente menos del 3%, lo más
preferiblemente menos del 1%) del polipéptido de la invención forma dímeros (por ejemplo tal como se evalúa
mediante SE-HPLC) durante almacenamiento en una o más (de las anteriores) condiciones de estrés, tales como
por ejemplo a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al
menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1
40 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);

45 - al menos el 80% (al menos el 85%, al menos el 90%, al menos el 95%, al menos el 98%, al menos el 99% o al
menos el 99,5%) de los polipéptidos de la invención conservan su actividad de unión (por ejemplo tal como se
evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una (preferiblemente a todas) de sus dianas tras almacenamiento
en una o más (de las anteriores) condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de $37\pm 5^{\circ}\text{C}$ hasta
al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10
semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) en comparación
con la actividad de unión antes de la condición de estrés; y/o

50 - el polipéptido de la invención es estable en una o más de las siguientes condiciones de estrés mecánico:

- o remover la formulación durante de 10 s a 1 min;
- 55 o empujar la formulación a través de una aguja (25G, preferiblemente 26G, más preferiblemente 27G, incluso
más preferiblemente 28G, lo más preferiblemente 29G o más) con una jeringuilla (la jeringuilla usada puede
ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml,
4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml);
- 60 o rotar durante dos días a 10 rpm; y/o
- o agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4-48 horas a 4°C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm,
100 rpm o más).

65 Un ejemplo de una formulación preferida de la invención con estas características comprende 10 mg/ml del
polipéptido de la invención, histidina 15 mM pH 6,5, sacarosa al 8% y Tween 80 al 0,01%. Otro ejemplo de una
formulación preferida de la invención con estas características comprende 10 mg/ml del polipéptido de la invención,

histidina 10 mM pH 6,0, sacarosa al 10% y Tween 80 al 0,005%.

El experto conoce métodos generales para producir los dominios variables individuales y/o polipéptidos presentes en la formulación de la invención y/o se han descrito en la técnica. Los dominios variables individuales y/o polipéptidos pueden producirse en cualquier huésped conocido por el experto. Por ejemplo pero sin limitarse, los dominios variables individuales y/o polipéptidos pueden producirse en huéspedes procariontes entre los que está *E. coli* o huéspedes eucariotas, por ejemplo huésped eucariota seleccionado de células de insecto, células de mamífero y huéspedes eucariotas inferiores que comprenden levaduras tales como *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulasporea*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*, *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospodium*, *Leucosporidium*, *Botryosphaeria*, *Sporidiobolus*, *Endomyces*, preferiblemente *Pichia pastoris*. La producción de nanocuerpos en huéspedes procariontes y eucariotas inferiores tales como *Pichia pastoris* se ha descrito por ejemplo en los documentos WO 94/04678, WO 94/25591 y WO 08/142164. Se hace referencia al contenido de estas solicitudes explícitamente en relación con técnicas de cultivo y métodos generales, incluyendo medios y condiciones adecuados. El experto también puede concebir constructos genéticos adecuados para la expresión de los polipéptidos de la invención en diferentes huéspedes basándose en la presente solicitud y conocimiento general común. La presente invención también se refiere a condiciones y constructos genéticos descritos en la técnica, por ejemplo los métodos de cultivo generales, plásmidos, promotores y secuencias líder descritos en los documentos WO 94/25591, WO 08/020079, Gasser *et al.* 2006 (Biotechnol. Bioeng. 94: 535); Gasser *et al.* 2007 (Appl. Environ. Microbiol. 73: 6499); o Damasceno *et al.* 2007 (Microbiol. Biotechnol. 74: 381).

Más particularmente, el método para la expresión y/o producción de un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales comprende al menos las etapas de:

a) cultivar un huésped o célula huésped (tal como se define en el presente documento) en condiciones que son tales que dicho huésped o célula huésped se multiplicará;

b) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones que son tales que dicho huésped o célula huésped expresa y/o produce el polipéptido;

c) aislar y/o purificar el polipéptido secretado a partir del medio.

Para producir/obtener la expresión del polipéptido, la célula huésped transformada o el organismo huésped transformado generalmente puede dejarse, mantenerse y/o cultivarse en condiciones tales que el polipéptido (deseado) se expresa/produce. Las condiciones adecuadas serán evidentes para el experto y habitualmente dependerán de la célula huésped/organismo huésped usado, así como de los elementos reguladores que controlan la expresión de la secuencia de nucleótidos (relevante). De nuevo, se hace referencia a los manuales y solicitudes de patente mencionados anteriormente.

Generalmente, las condiciones adecuadas pueden incluir el uso de un medio adecuado, la presencia de una fuente adecuada de alimento y/o nutrientes adecuados, el uso de una temperatura adecuada, y opcionalmente la presencia de un compuesto o factor de inducción adecuado (por ejemplo cuando las secuencias de nucleótidos de la invención están bajo el control de un promotor inducible); pudiéndose seleccionarse todos por el experto. De nuevo, en tales condiciones, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden expresarse de manera constitutiva, de manera transitoria o sólo cuando se inducen de manera adecuada.

Entonces puede aislarse el polipéptido de la invención de la célula huésped/organismo huésped y/o del medio en el que se cultivó dicha célula huésped u organismo huésped, usando técnicas de aislamiento y/o purificación de proteínas conocidas *per se*, tales como técnicas de cromatografía (preparativa) y/o electroforesis, técnicas de precipitación diferencial, técnicas de afinidad (por ejemplo usando una secuencia de aminoácidos escindible, específica fusionada con el polipéptido de la invención) y/o técnicas inmunológicas preparativas (es decir usando anticuerpos contra el polipéptido que va a aislarse).

En la presente invención, el huésped puede retirarse del medio de cultivo mediante medios de rutina. Por ejemplo, el huésped puede retirarse mediante centrifugación o filtración. La disolución obtenida mediante la retirada del huésped del medio de cultivo también se denomina sobrenadante de cultivo, o sobrenadante de cultivo clarificado. Los polipéptidos de la invención pueden purificarse del sobrenadante de cultivo mediante métodos convencionales. Los métodos convencionales incluyen, pero no se limitan a métodos cromatográficos, incluyendo cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Estos métodos pueden realizarse solos o en combinación con otros métodos de purificación, por ejemplo precipitación o electroforesis en gel. El experto puede concebir combinaciones adecuadas de métodos de purificación para los polipéptidos de la invención basándose en el conocimiento general común. Para ejemplos específicos se hace referencia a la técnica citada en el presente documento.

En una realización a modo de ejemplo, los polipéptidos de la invención pueden purificarse a partir de sobrenadante de cultivo mediante una combinación de cromatografía de afinidad sobre proteína A, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. La referencia a cualquier "etapa de purificación" incluye, pero no se

limita a, estos métodos particulares.

Más específicamente, los polipéptidos de la invención pueden purificarse a partir de sobrenadante de cultivo usando un procedimiento en el que el sobrenadante clarificado (obtenido por centrifugación) se captura en cualquier combinación de columnas seleccionadas de (sin limitarse a) resina de cromatografía de afinidad tal como resina de proteína A, cromatografía de intercambio catiónico (CIEC) o una cromatografía de intercambio aniónico (AIEC) usando por ejemplo Poros 50HS (POROS), SOURCE 30S o SOURCE 15S (GE Healthcare), SP Sepharose (GE Healthcare), Capto S (GE Healthcare), Capto MMC (GE Healthcare) o Poros 50HQ (POROS), SOURCE 30Q o SOURCE 15Q (GE Healthcare), Q Sepharose (GE Healthcare), Capto Q y DEAE Sepharose (GE Healthcare), cromatografía de exclusión molecular (SE-HPLC) usando por ejemplo Superdex 75 o Superdex 200 (GE Healthcare), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando por ejemplo octil, butil Sepharose o equivalentes, opcionalmente incluyendo también una etapa de filtración de flujo tangencial (TFF). Puede usarse cualquier combinación de columnas para la purificación de los polipéptidos de la invención, tal como por ejemplo resina de proteína A seguido por cromatografía de intercambio catiónico o dos etapas de cromatografía de intercambio catiónico.

La presente invención también proporciona métodos para preparar las formulaciones estables de la invención que comprenden los polipéptidos de la invención. Más particularmente, la presente invención proporciona métodos para preparar formulaciones estables de tales polipéptidos, comprendiendo dichos métodos concentrar una fracción que contiene el polipéptido purificado hasta la concentración de polipéptido final usando por ejemplo una membrana semipermeable con un punto de corte de peso molecular (Pm) apropiado (por ejemplo un punto de corte de 5 kD para dominios variables individuales; un punto de corte de 10 kD para polipéptidos bivalentes que comprenden dos dominios variables individuales; o un punto de corte de 15 kD para polipéptidos trivalentes que comprenden tres dominios variables individuales) y diafiltrar y/o ultrafiltrar para el intercambio de tampón y concentrar adicionalmente la fracción de polipéptido en el tampón de formulación usando la misma membrana. Tal como se describió de manera extensa anteriormente, el tampón de formulación de la presente invención puede comprender además al menos uno de:

a) un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM seleccionado del grupo que consiste en HEPES pH 7,0-8,0, histidina pH 6,0-6,5, MES pH 6,0 y acetato pH 5,5-6,0;

b) un excipiente a una concentración del 1% al 20%;

c) un tensioactivo a una concentración del 0,001% al 1% seleccionado de Tween 80, Tween 20 o un poloxámero.

El pH de la formulación puede oscilar entre aproximadamente 5,5 y aproximadamente 8,0, o puede oscilar entre aproximadamente 6,0 y aproximadamente 7,5, preferiblemente entre aproximadamente 6,2 y 7,5, entre aproximadamente 6,2 y 7,0, lo más preferiblemente entre aproximadamente 6,5 y 7,0.

Se añadirá tensioactivo (por ejemplo Tween 20, Tween 80 o poloxámero) tras la etapa de diafiltración/ultrafiltración final a una concentración en el intervalo de aproximadamente el 0% al 1%, preferiblemente del 0,001% al 0,1%, o del 0,01% al 0,1% tal como el 0,001%, el 0,005%, el 0,01%, el 0,02%, el 0,05%, el 0,08%, el 0,1%, el 0,5% o el 1% de la formulación, preferiblemente el 0,01% o el 0,005%.

La formulación de la presente invención puede esterilizarse mediante diversos métodos de esterilización, incluyendo filtración estéril, radiación, etc. En una realización específica, la formulación de polipéptido se esteriliza mediante filtro con un filtro de 0,2 micrómetros preesterilizado.

Preferiblemente, la formulación de la presente invención se suministra en un recipiente sellado herméticamente. Las formulaciones de líquido pueden comprender una cantidad de entre 1 ml y 20 ml, preferiblemente de aproximadamente 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml.

La formulación de la presente invención puede prepararse como formas farmacéuticas unitarias preparando un vial que contiene una alícuota de la formulación para un solo uso. Por ejemplo, una dosificación unitaria de formulación líquida por vial puede contener 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml o 20 ml de la formulación. Las formas de dosificación unitarias farmacéuticas pueden prepararse para que sean adecuadas para cualquier forma de administración del polipéptido de la invención incluyendo (sin limitarse a) administración parenteral, administración tópica, administración pulmonar, administración intranasal, administración vaginal, administración enteral, administración rectal, administración oral y/o administración sublingual. En un aspecto, la presente invención se refiere a una forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral (tal como por ejemplo intravenosa, intraarterial, intramuscular, intracerebral, intraósea, intradérmica, intratecal, intraperitoneal, subcutánea, etc.) a un sujeto, que comprende una formulación de la invención en un recipiente adecuado. En otro aspecto preferido, el sujeto es un ser humano. En una realización específica, las formulaciones de la presente invención se formulan en viales de una única dosis como líquido estéril que contiene 10 mg/ml de una de SEQ ID NO: 1 a 6, tampón histidina 15 mM a pH 6,5, sacarosa al 8% y Tween 80 al 0,01%. En otra realización específica, las formulaciones de la presente invención se formulan en viales de una única dosis

como líquido estéril que contiene 10 mg/ml de una de SEQ ID NO: 1 a 6, tampón histidina 10 mM pH 6,0, sacarosa al 10% y Tween 80 al 0,005%.

5 La cantidad de una formulación de la presente invención que será eficaz en la prevención, el tratamiento y/o la gestión de una enfermedad o trastorno determinado puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales bien conocidas en la técnica o descritas en el presente documento. La dosis precisa que va a emplearse en la formulación también dependerá de la vía de administración, y debe decidirse según el juicio del médico y de las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o en modelo animal. Para formulaciones del polipéptido, abarcadas por la invención, 10 la dosificación administrada a un paciente puede calcularse además usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis que va a administrarse en mg/kg.

15 El volumen requerido (en ml) que va a administrarse se determina entonces tomando la dosis en mg requerida dividida entre la concentración de la formulación de polipéptido. El volumen requerido calculado final se obtendrá combinando el contenido de cuantos viales sean necesarios en jeringuilla(s) para administrar la formulación de polipéptido de la invención.

20 La presente invención también abarca un producto farmacéutico envasado y etiquetado terminado. Este artículo de fabricación o kit incluye la forma farmacéutica unitaria apropiada en un envase o recipiente apropiado tal como un vial de vidrio u otro recipiente que está sellado herméticamente. En una realización, la forma farmacéutica unitaria es adecuada para la administración intravenosa, intramuscular, intranasal, oral, tópica o subcutánea. Por tanto, la invención abarca formulaciones, preferiblemente estériles, adecuadas para cada vía de administración. En el caso de formas farmacéuticas adecuadas para la administración parenteral (tal como por ejemplo administración subcutánea) el principio activo, por ejemplo, polipéptido de la invención, es estéril y adecuado para la administración 25 como disolución libre de material particulado.

30 Como con cualquier producto farmacéutico, el material de envasado y el recipiente se diseñan para proteger la estabilidad del producto durante su almacenamiento y transporte. Además, los productos de la invención incluyen instrucciones para su uso u otro material informativo que aconseje al médico, técnico o paciente sobre cómo prevenir o tratar de manera apropiada la enfermedad o el trastorno en cuestión. En otras palabras, el artículo de fabricación incluye medios de instrucción que indican o sugieren un régimen de dosificación incluyendo, pero sin limitarse a, dosis reales, procedimientos de monitorización y otra información de monitorización.

35 Específicamente, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, una botella, un tubo, un vial, un recipiente, un pulverizador, un insuflador, una bolsa para administración intravenosa (i.v.), un sobre y similares; y al menos una forma farmacéutica unitaria de un agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado, en el que dicho agente farmacéutico comprende la formulación que contiene el polipéptido. El material de envasado incluye medios de instrucción que indican que dicho polipéptido puede usarse para impedir, tratar y/o gestionar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno 40 administrando dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos tal como se describe en el presente documento.

45 La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, una botella, un tubo, un vial, un recipiente, un pulverizador, un insuflador, una bolsa para administración intravenosa (i.v.), un sobre y similares; y al menos una forma farmacéutica unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado, en el que un agente farmacéutico comprende una formulación que contiene el polipéptido de interés, y en el que dicho material de envasado incluye medios de instrucción que indican que dichos agentes pueden usarse para prevenir, tratar y/o gestionar la enfermedad o el trastorno administrando 50 dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos tal como se describe en el presente documento.

55 La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de envasado, tal como una caja, una botella, un tubo, un vial, un recipiente, un pulverizador, un insuflador, una bolsa para administración intravenosa (i.v.), un sobre y similares; y al menos una forma farmacéutica unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de envasado, en el que un agente farmacéutico comprende una formulación que contiene el polipéptido, y en el que dicho material de envasado incluye medios de instrucción que indican que dichos agentes pueden usarse para prevenir, tratar y/o gestionar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno administrando dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos tal como se describe en el presente documento.

60 Las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad y/o un trastorno específico. En un aspecto específico, las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la presente invención se administran a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar una enfermedad y/o un trastorno asociados con o caracterizados por la expresión y/o actividad aberrantes de una diana determinada o uno o más 65 síntomas de los mismos. En otro aspecto específico, las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la presente invención se administran a un sujeto para prevenir, tratar y/o gestionar

enfermedades y/o trastornos asociados con la expresión y/o actividad aberrante de RANKL, enfermedades y/o trastornos asociados con la sobreexpresión de IL-6, o enfermedades y trastornos asociados con citocinas heterodiméricas y sus receptores o uno o más síntomas de los mismos.

5 Enfermedades y los trastornos asociados con la expresión y/o actividad aberrante de RANKL son por ejemplo enfermedades y trastornos óseos, e incluyen (sin limitarse) las siguientes enfermedades y trastornos: Osteoporosis (McClung 2006, *Current Osteoporosis Reports* 4: 28-33), incluyendo, pero sin limitarse a, osteoporosis primaria, osteoporosis endocrina (incluyendo, pero sin limitarse a, hipertiroidismo, hiperparatiroidismo (Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232), síndrome de Cushing y acromegalia), formas hereditarias y
 10 congénitas de osteoporosis (incluyendo, pero sin limitarse a, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Menkes, síndrome de Riley-Day), osteoporosis debida a inmovilización de las extremidades, osteoporosis inducida por glucocorticoides (Locklin *et al.* 2001, *Bone* 28 (supl.): S80; McClung 2006, *Current Osteoporosis Reports* 4: 28-33; Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232) y osteoporosis posmenopáusica (McClung 2006, *Current Osteoporosis Reports* 4: 28-33); enfermedad de Paget (juvenil o familiar) (Cundy *et al.* 2002, *Hum. Mol. Genet.* 11: 2119-2127; Whyte *et al.* 2002, *J. Bone Miner. Res.* 17: 26-29; Whyte *et al.* 2002, *N. Engl. J. Med.* 347: 175-184; Johnson-Pais *et al.* 2003, *J. Bone Miner. Res.* 18: 376-380; Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232; Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232); osteomielitis, es decir, una lesión infecciosa del hueso, que conduce a pérdida ósea; hipercalcemia (Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232), incluyendo, pero sin limitarse a, hipercalcemia que resulta de tumores sólidos (incluyendo, pero sin limitarse a, de mama, de pulmón y de riñón) y tumores malignos hematológicos (incluyendo, pero sin limitarse a, mieloma múltiple (Sordillo y Pearse 2003, *Cancer* 97 (3 supl.): 802-812; Vanderkerken *et al.* 2003, *Cancer Res.* 63: 287-289), linfoma y leucemia), hipercalcemia idiopática e hipercalcemia asociada con hipertiroidismo y trastornos de la función renal; pérdida ósea, incluyendo pero sin limitarse a, osteopenia tras cirugía, osteopenia inducida por administración de esteroides, osteopenia asociada con trastornos del intestino delgado y grueso, y osteopenia asociada con enfermedades hepáticas y renales crónicas; osteonecrosis, es decir, muerte de células óseas, incluyendo, pero sin limitarse a, osteonecrosis asociada con lesión traumática, osteonecrosis asociada con enfermedad de Gaucher, osteonecrosis asociada con anemia falciforme, osteonecrosis asociada con lupus eritematoso sistémico, osteonecrosis asociada con artritis reumatoide, osteonecrosis asociada con enfermedad periodontal, osteonecrosis asociada con metástasis osteolítica y osteonecrosis asociada con otro estado; pérdida ósea asociada con trastornos artríticos tales como artritis psoriásica, artritis reumatoide, pérdida de cartílago y erosión de la articulación asociada con artritis reumatoide (Bezerra *et al.* 2005, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 161-170; Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232); artritis (Bezerra *et al.* 2005, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 161-170), incluyendo artritis inflamatoria (McClung 2006, *Current Osteoporosis Reports* 4: 28-33), artritis inducida por colágeno (Bezerra *et al.* 2005, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 38: 161-170); osteólisis periprotésica (McClung 2006, *Current Osteoporosis Reports* 4: 28-33; Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232); enfermedad ósea relacionada con cáncer (McClung 2006, *Current Osteoporosis Reports* 4: 28-33); pérdida ósea relacionada asociada con terapia con inhibidor de aromatasa (Lewiecki 2006, *Expert Opin. Biol. Ther.* 6: 1041-1050); pérdida ósea asociada con terapia de privación de andrógenos (Lewiecki 2006, *Expert Opin. Biol. Ther.* 6: 1041-1050); pérdida ósea asociada con metástasis ósea; pérdida ósea asociada con enfermedades que tienen implicación del sistema inmunitario, tales como leucemias en adultos y en la infancia, metástasis cancerosa, autoinmunidad y diversas infecciones virales (Holstead Jones *et al.* 2002, *Ann. Rheum. Dis.* 61 (supl. II): ii32-ii39); trastornos osteopénicos tales como leucemia en adultos y en la infancia (Oliveri *et al.* 1999, *Henry Ford Hosp. Med.* 39:45-48); infecciones crónicas tales como hepatitis C o VIH (Stellon *et al.* 1985, *Gastroenterology* 89: 1078-1083); trastornos autoinmunitarios tales como diabetes mellitus (Piepkorn *et al.* 1997, *Horm. Metab. Res.* 29: 584-91) y lupus eritematoso (Seitz *et al.* 1985, *Ann. Rheum. Dis.* 44: 438-445); enfermedades alérgicas tales como asma (Ebeling *et al.* 1998, *J. Bone Min. Res.* 13: 1283-1289); metástasis ósea lítica en múltiples cánceres tales como cáncer de mama (Coleman 1998, *Curr. Opin. Oncol.* 10 (supl. 1): 7-13); cáncer de próstata; enfermedad ósea de mieloma (Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232); infecciones periodontales (Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232); hiperfosfatasa esquelética expansiva (Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232); metástasis óseas (Lewiecki 2006, *Expert Opin. Biol. Ther.* 6: 1041-1050; Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232).

La presente invención también proporciona la prevención y/o el tratamiento con las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la invención de otras enfermedades y trastornos asociados con un desequilibrio en la ruta de RANKL/RANK/OPG. Tales enfermedades y trastornos incluyen pero no se limitan a osteoporosis, estados inflamatorios, estados autoinmunitarios, asma, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, mieloma múltiple (Sordillo y Pearse 2003, *Cancer* 97 (3 supl.): 802-812; Vanderkerken *et al.* 2003, *Cancer Res.* 63: 287-289); enfermedades vasculares (Anandarajah y Schwarz 2006, *J. Cell Biochem.* 97: 226-232) y enfermedad cardiovascular (Lewiecki 2006, *Expert Opin. Biol. Ther.* 6: 1041-1050).

La presente invención también proporciona la prevención y/o el tratamiento con las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la invención de enfermedades y trastornos asociados con osteopetrosis tales como osteopetrosis tardía, osteopetrosis congénita y enfermedad de los huesos de mármol.

Las enfermedades y los trastornos provocados por la expresión y o actividad aberrante, tal como producción o

señalización de IL-6 excesiva incluyen septicemia (Starnes *et al.*, 1999) y diversas formas de cáncer tal como enfermedad de mieloma múltiple (MM), carcinoma de células renales (RCC), leucemia de células plasmáticas (Klein *et al.*, 1991), linfoma, trastorno linfoproliferativo de células B (BLPD) y cáncer de próstata. Los ejemplos no limitativos de otras enfermedades provocadas por la expresión y/o actividad aberrante, tal como producción o
 5 señalización de IL-6 excesiva incluyen resorción ósea (osteoporosis) (Roodman *et al.*, 1992; Jilka *et al.*, 1992), caquexia (Strassman *et al.*, 1992), psoriasis, glomerulonefritis proliferativa mesangial, sarcoma de Kaposi, linfoma relacionado con SIDA (Emilie *et al.*, 1994), enfermedades y trastornos inflamatorios tales como artritis reumatoide, artritis idiopática juvenil de aparición sistémica, hipergammaglobulinemia (Grau *et al.*, 1990), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, enfermedad de Castleman, gammopatía de
 10 IgM, mixoma cardíaco, asma (en particular asma alérgica) y diabetes mellitus insulino dependiente autoinmunitaria (Campbell *et al.*, 1991).

Las enfermedades y los trastornos asociados con citocinas heterodiméricas y sus receptores incluyen inflamación y trastornos inflamatorios tales como enfermedades intestinales (colitis, enfermedad de Crohn, EII), enfermedades infecciosas, psoriasis, cáncer, enfermedades autoinmunitarias (tales como EM), carcoidis, rechazo de trasplante, fibrosis quística, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, artritis reumatoide, infección viral, inmunodeficiencia variable común.

Las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la presente invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con una o más de otras terapias (por ejemplo, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos), preferiblemente terapias útiles en la prevención, el tratamiento y/o la gestión de la enfermedad o el trastorno (iguales o diferentes). Cuando se usan una o más terapias distintas (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), pueden administrarse por separado, en cualquier forma apropiada y mediante cualquier vía adecuada. Los agentes terapéuticos o profilácticos incluyen, pero no se limitan a, moléculas pequeñas, fármacos sintéticos, péptidos, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos (por ejemplo, nucleótidos de ADN y ARN incluyendo, pero sin limitarse a, secuencias de nucleótidos antisentido, triples hélices, iARN y secuencias de nucleótidos que codifican para proteínas, polipéptidos o péptidos biológicamente activos), anticuerpos, otros dominios variables individuales, moléculas inorgánicas sintéticas o naturales, agentes miméticos y moléculas orgánicas sintéticas o naturales. Puede usarse cualquier terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) que se sabe que es útil, o que se ha usado o está usándose actualmente para la prevención, el tratamiento y/o la gestión de uno o más síntomas asociados con una enfermedad o un trastorno específico, en combinación con las formulaciones de la presente invención según la invención descrita en el presente documento.

Una formulación de la invención puede administrarse a un mamífero, preferiblemente un ser humano, simultáneamente con una o más terapias distintas (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos). El término "simultáneamente" no se limita a la administración de agentes/terapias profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien quiere decir que la formulación de la invención y el otro agente/la otra terapia se administran a un mamífero en una secuencia y dentro de un intervalo de tiempo de manera que el polipéptido contenido en la formulación puede actuar junto con el otro agente/la otra terapia para proporcionar un aumento del beneficio que si se administrara de otra manera. Por ejemplo, la formulación de la invención y el uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos pueden administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden a diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deberían administrarse lo suficientemente cerca en el tiempo como para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado.

Cuando se usa en combinación con otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos), las formulaciones de la invención y la otra terapia pueden actuar de manera aditiva o sinérgica. La invención contempla la administración de una formulación de la invención en combinación con otras terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) mediante la misma vía o vías diferentes de administración, por ejemplo, oral y parenteral.

Se conocen diversos sistemas de administración y pueden usarse para administrar la formulación de la presente invención. Los métodos de administración de formulaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y preferiblemente subcutánea), administración epidural, administración tópica y administración mucosa (por ejemplo, vías intranasal y oral). En una realización específica, las formulaciones líquidas de la presente invención se administran por vía parenteral.

La invención se describirá ahora adicionalmente por medio de los siguientes aspectos y ejemplos preferidos no limitativos:

Ejemplos

Ejemplo 1: Formulación y estudios de estabilidad con RANKL008a

Ejemplo 1.1: Materiales y métodos usados en el estudio

1.1.1 Dominios variables individuales

5 RANKL008a (SEQ ID NO: 4; EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGRFVS
 SITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGLTVTVSS
 GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWSSISGSGSDTLYADSVK
 GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGS
 LRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGRFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVY
 YCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGLTVTVSS) se ha descrito como SEQ ID NO: 759 en el documento WO
 10 2008/142164. RANKL008a es un nanocuerpo biespecifico trivalente que consiste en tres dominios variables
 humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada, de los que dos subunidades idénticas son específicas
 para la unión a RANKL mientras que la subunidad restante se une a HSA. Las subunidades se fusionan de cabeza a
 cola con un ligador G/S en el siguiente formato: RANKL13H5-9GS-Alb8-9GS-RANKL13H5.

15 Se expresó RANKL008a en *Pichia pastoris* y se purificó sobre SP Sepharose como etapa de captura y un filtro Q
 como etapa de pulido o sobre SP Sepharose como etapa de captura y Capto MMC como etapa de pulido o
 alternativamente usando una etapa de captura en ProtA seguida por una etapa de pulido en SP Sepharose. La
 concentración del nanocuerpo y el cambio de tampón a PBS, fosfato 10 mM + NaCl 100 mM, fosfato 10 mM +
 manitol al 5% o fosfato 10 mM + NaCl 115 mM u otros tampones se realizó por medio de UF/DF o mediante diálisis.
 20 Se realizó una filtración final sobre un filtro de 0,22 µm. Los diferentes lotes de RANKL008a oscilaban en
 concentración entre 143 y 62,8 mg/ml. La mayoría de los lotes se prepararon a concentraciones de
 aproximadamente 60-85 mg/ml.

1.1.2 Otros reactivos

25 Todos los reactivos usados en el estudio son reactivos químicos convencionales de la mayor pureza. La
 composición completa de D-PBS era NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato de sodio dibásico 10 mM, fosfato de potasio
 monobásico 2 mM.

30 1.1.3 Equipo y columnas para las pruebas

Se llevaron a cabo experimentos de HPLC en un instrumento de la serie Agilent 1200 de Agilent Technologies (Palo
 Alto, EE.UU.). Las columnas usadas fueron:

- 35 • RP-HPLC: Zorbax 300SB-C3 5 micrómetros;
- SE-HPLC: TSKgel G2000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Japón);
- 40 • IEX-HPLC: Columna Dionex ProPac_wCX-10;

Se determinó la concentración de los lotes de RANKL008a purificado mediante espectroscopía a 280 nm o bien
 usando un instrumento NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific), o un espectrofotómetro Uvikon 943 (Kontron
 Instruments) o bien un instrumento Biophotometer 613 de Eppendorf.

45 Se midió la distribución de tamaño de partícula en un contador de partículas SVSS-C de PAMAS (PARTikelMess- und
 AnalyseSysteme GMBH).

Para las mediciones de potencia se usó un instrumento Biacore 3000 (GE Healthcare). Se realizaron ensayos de
 potencia basados en ELISA usando equipo de laboratorio e instrumentación de lectura de placas convencionales.

50 Se realizó la medición de osmolalidad con un osmómetro modelo 3320 de Advanced Instruments.

1.1.4 ELISA de inhibición para la medición de la potencia de RANKL

55 RANKL008a interacciona con el ligando de receptor activador humano (soluble) de factor nuclear-kappa B (RANKL)
 y bloquea la interacción de este ligando con su receptor activador humano de factor nuclear-kappaB (RANK),
 impidiendo de ese modo la señalización a través de este receptor. Se midió la potencia de RANKL008a mediante un
 ensayo de inhibición basado en ELISA que permite la evaluación de la potencia relativa de los restos de unión a
 RANKL de un lote desconocido de RANKL008a en relación con la de un lote de referencia.

60 Para las muestras de referencia, control y de prueba, se prepararon diferentes diluciones de nanocuerpos. Se
 preincubaron estas diluciones con una cantidad constante de RANKL soluble 5 ng/ml y una cantidad constante de
 RANK-Fc 200 ng/ml. Posteriormente, se transfirió esta mezcla a una placa de microtitulación recubierta con un
 anticuerpo anti-Fc no bloqueante. Tras lavar, se detectó RANKL unido residual con un anticuerpo biotinilado
 65 policlonal anti-RANKL humano, seguido por detección con estreptavidina marcada con peroxidasa del rábano (HRP).

Se analizó la potencia relativa de las muestras de prueba en comparación con las muestras de referencia mediante el uso del software PLA 2.0 (Stegmann Systems).

5 1.1.5 ELISA para la unión a HSA

Se midió la potencia relativa del resto de unión a HSA en RANKL008a mediante un ELISA. En resumen, se recubrió HSA sobre una placa de ELISA Maxisorp de múltiples pocillos de plástico mediante adsorción. Tras bloquear los sitios de unión en exceso en las placas con Superblock T20, se aplicó sobre la placa una serie de dilución de muestras de referencia, control y de prueba. Posteriormente se detectó el nanocuerpo unido usando nanocuerpo anti-nanocuerpo bivalente, directamente conjugado con peroxidasa del rábano (HRP).

Se analizó la potencia relativa de las muestras de prueba en comparación con las muestras de referencia mediante el uso del software PLA 2.0 (Stegmann Systems).

15 1.1.6 Ensayo de pureza de RANKL008a mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC)

El ensayo de SE-HPLC consistía en una columna de gel de sílice TSKgel G2000SW_{XL} preempaquetada, una fase móvil que consistía en KCl, NaCl y tampón fosfato pH 7,2 (D-PBS) y detección UV a 280 nm. Se calculó la cantidad relativa de la proteína, variante o impurezas específicas expresada como el % del área dividiendo el área de pico correspondiente a la proteína específica o a cualquier impureza proteica entre el área total de todos los picos integrados.

25 1.1.7 Ensayo de pureza de RANKL008a mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

En el ensayo de RP-HPLC, se usó una columna Zorbax 300SB-C3 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.). Se determinó la cantidad relativa de una impureza proteica específica midiendo la absorbancia de luz de los componentes que se eluyen de la columna de RP-HPLC. Se calculó la cantidad relativa de la proteína, variante o impurezas específicas expresada como el % de área dividiendo el área de pico correspondiente a la proteína específica o a cualquier impureza proteica entre el área total de todos los picos integrados.

35 1.1.8 Ensayo de pureza de RANKL008a mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio iónico (IEX-HPLC)

El ensayo de IEX-HPLC combinaba el uso de una columna de intercambio catiónico débil Dionex ProPac WCX-10 preempaquetada, una fase móvil que consistía en tampón citrato pH 5,5 y detección UV a 280 nm. Tras cargar la(s) proteína(s) sobre la columna, se eluyeron los materiales unidos mediante un gradiente de cloruro de sodio. Se calculó la cantidad relativa de la proteína, variante o impurezas específicas expresadas como el % de área dividiendo el área de pico correspondiente a la proteína específica o a cualquier impureza proteica entre el área total de todos los picos integrados.

45 1.1.9 Determinación de la potencia relativa sobre Biacore

Se inmovilizó RANKL o HSA sobre el chip Biacore (acoplamiento de aminos usando el kit de acoplamiento de aminos Biacore). Tras una etapa de acondicionamiento previo de 5 inyecciones de RANKL008a, se diluyeron todas las muestras hasta 2,5 nM por triplicado y se analizaron sobre el chip. Se determinaron las pendientes usando el método de ajuste general y el modelo de ajuste lineal (software BIAevaluation). Para determinar la tasa de unión inicial (IBR), se seleccionó la pendiente entre 5 s y 30 s. Se transfirieron los valores de estas pendientes a Excel y se determinó el porcentaje de actividad/potencia en comparación con el material de referencia de RANKL008a. La potencia de Biacore se expresa por tanto como potencia relativa en comparación con los materiales de referencia.

Ejemplo 1.2: Estabilidad del nanocuerpo en diferentes tampones tras diferentes ciclos de congelación/descongelación

Se realizó un estudio de estabilidad a la congelación/descongelación para determinar el efecto de la congelación y descongelación repetitivas sobre la recuperación, estabilidad física y estabilidad química de RANKL008a. Se sometieron alícuotas del lote de RANKL008a formulado a ~60-85 mg/ml en los tampones 1-12 facilitados en la tabla 1 a 10 ciclos de congelación/descongelación (C/D) a -20°C. Se define un ciclo de C/D por congelación de la muestra durante 1 hora en un congelador a -20°C seguido por descongelación a temperatura ambiente durante 30 minutos. Se compararon las muestras sometidas a estrés con material de referencia (almacenado a 4°C) usando SE-HPLC (figura 1 (A); figura representativa de los experimentos realizados en tampón fosfato), RP-HPLC (figura 2; figura representativa de los experimentos realizados en tampón fosfato) y los ensayos de potencia de ELISA (tabla 2). Todos los demás datos de los experimentos de congelación-descongelación demuestran patrones similares tal como se facilita en las figuras 1 y 2 (excepto la figura 1 (B), véase a continuación).

Someter RANKL008a a 10 ciclos de C/D no tuvo ningún efecto significativo sobre su estabilidad: los perfiles de SE-HPLC y RP-HPLC eran comparables entre los lotes de referencia y el material sometido a múltiples ciclos de congelación/descongelación. No hubo ninguna disminución en el área de superficie total y no estaban formándose nuevos picos, excepto en L-histidina 20 mM, pH 5,5 + manitol al 10% y L-histidina 20 mM, pH 6 + manitol al 10%, en donde el pico principal tenía un hombro muy pequeño en los cromatogramas de SE-HPLC (figura 1(B) que muestra los datos a pH 5,5 y en donde el hombro menor en el pico principal se indica mediante una flecha). En la tabla 3 y la tabla 4 se incluyen datos para la integración de los diferentes picos (expresados como el % del área de superficie) en el análisis de SE-HPLC y RP-HPLC respectivamente. Estos datos demuestran que no se produce ningún cambio en los perfiles tras 10 ciclos de congelación-descongelación.

El análisis mediante los ensayos de potencia de ELISA indicó que no hay pérdida de actividad tras congelación y descongelación repetitivas en todas las formulaciones, excepto en histidina 20 mM, pH 5,5 + manitol al 10% en donde parecía haber una potencia de unión a RANKL y HSA inferior.

Ejemplo 1.3: Estabilidad del nanocuerpo en diferentes tampones cuando se almacena a 37°C hasta 10 semanas

Se formuló RANKL008a en diferentes tampones a ~60-85 mg/ml (tampones 1-12 facilitados en la tabla 1). Se evaluó la estabilidad de las diferentes muestras en condiciones de estrés acelerado a $37^{\circ}\pm 3^{\circ}\text{C}$. Se tomaron muestras tras 2, 3, 5 y 10 semanas de almacenamiento a esta temperatura y se analizaron usando SE-HPLC, RP-HPLC e IEX-HPLC. Se realizó Biacore sobre las muestras almacenadas durante 10 semanas para evaluar la pérdida de potencia.

1.3.1 Análisis de SE-HPLC

En la figura 3 se facilitan los resultados del análisis de una muestra mediante SE-HPLC en la que se muestra un ejemplo para la muestra almacenada durante dos semanas a 37°C en presencia de sal 50 ó 100 mM o tampón fosfato con manitol al 10%. El almacenamiento a 37°C dio como resultado la formación de un claro pico previo que eluía a aproximadamente 40 minutos y algunos picos posteriores menores próximos al pico principal; a los 60 minutos de tiempo de elución (véase el recuadro en la figura 3) podían observarse algunos fragmentos de degradación. En la tabla 3 se resumen los datos de integración para todas las muestras analizadas para los diferentes picos observados (excepto picos tras 60 minutos de tiempo de elución). El área de pico del pico previo aumentó a lo largo del tiempo pero se redujo mediante la adición de manitol al tampón (tabla 3). Los picos posteriores tras 60 minutos de tiempo de elución correspondían a los productos de degradación (debido a la actividad proteolítica restante en la muestra). El área relativa (%) de estos picos aumentó sólo ligeramente, lo que implica que la degradación se restringió a un mínimo.

El pico previo representaba la forma dimerica de RANKL008a. El área de superficie de pico del pico previo aumentó con el tiempo de almacenamiento (tabla 3) y estaba acompañado por una disminución concomitante en el área de superficie del pico principal (tabla 3). La propensión a formar dímeros era significativamente inferior en las formulaciones que contenían manitol al 10%, que parecía tener un efecto positivo en la supresión del proceso de dimerización. Obsérvense las cantidades inferiores significativas de dímeros observados en los tampones acetato e histidina (pH 5,5) que contenían manitol al 10% (tabla 1 y figura 4). La figura 4(A) resume el % de área de superficie para el pico principal en los diferentes tampones y a diferentes puntos de tiempo cuando se almacenan a 37°C. La figura 4(B) resume los datos para el % de pico previo (dímero).

1.3.2 Análisis de RP-HPLC

Se facilita una RP-HPLC representativa en la figura 5 en la que se representa el cromatograma de RP-HPLC de una muestra de RANKL008a almacenada en tampón fosfato con concentraciones diferentes de sal o manitol al 10%. Los perfiles de RP-HPLC de RANKL008a formulado en los 12 tampones diferentes eran comparables a esta figura. En la tabla 4 se resumen los datos de integración para los diferentes picos detectados. En la figura 5 el recuadro muestra una ampliación sobre el pico principal en la que pueden distinguirse dos picos previos, mientras que el pico posterior que está totalmente resuelto hasta la línea de base con respecto al pico principal es la variante de piro-glutamato del RANKL008a en la que el ácido glutámico N-terminal se ha convertido en la forma de piroglutamato.

Hay dos diferencias entre los perfiles de RP-HPLC del lote de referencia y las muestras de almacenamiento. En primer lugar, el pico de piroglutamato aumentó con el aumento del tiempo de incubación y era más evidente en tampón fosfato a pH 7 que a pH 5,5 o pH 6. En segundo lugar, estaba formándose un pico previo en función del tiempo de almacenamiento. El área de superficie de este pico era superior en el tampón fosfato.

No hubo ninguna diferencia en los perfiles de RP-HPLC de las muestras sin o con manitol.

1.3.3 Análisis de IEX-HPLC

En la figura 6 se representa un cromatograma de IEX-HPLC representativo del RANKL008a almacenado durante 2 semanas en tampón fosfato con diferentes concentraciones salinas o manitol al 10%. El recuadro muestra una ampliación en el pico principal en la que se observa un pico posterior menor 1 y un pico posterior más significativo 2.

En la tabla 5 y la figura 7 se facilitan los resultados del análisis de las diferentes muestras mediante IEX-HPLC.

El primer pico posterior constituía de manera máxima el 4,5% del área de superficie del pico total. El área de superficie de este pico era la mayor en tampón fosfato y la menor o incluso estaba ausente en los tampones que contienen manitol. El área de pico del segundo pico, por otro lado, era sustancial, aunque significativamente menor en los tampones que contienen manitol al 10% (figura 7). Se recogió el material que eluye en el pico posterior mediante recogida de fracciones y volvió a someterse a cromatografía en la columna de SE-HPLC descrita anteriormente. Este pico posterior 2 eluye en el cromatograma de SE-HPLC en la posición de dímero demostrando que i) este dímero no se disocia en estas condiciones y que ii) este dímero eluye más tarde en la columna de IEX-HPLC. Por tanto puede concluirse que el pico posterior 2 es la forma dimerizada de RANKL008a.

1.3.4 Análisis de potencia de Biacore del RANKL008a almacenado a 37°C

Se comparó la unión a RANKL y HSA de RANKL008a en muestras de estabilidad almacenadas durante 10 semanas a 37°C con la actividad del lote de referencia no sometido a estrés usando análisis de Biacore. En la tabla 6 se facilitan las potencias relativas y se expresan como el % de actividad en comparación con el lote de referencia.

Tras 10 semanas de almacenamiento a 37°C la potencia relativa de RANKL008a para la unión a RANKL había disminuido hasta el 70-80% en los diferentes tampones (tabla 6). En histidina, pH 6 + manitol al 10%, la actividad seguía siendo la más alta (87,4%). Cuanto más alta era la concentración de NaCl en el tampón, menor era la potencia relativa en la muestra (compárense los valores obtenidos en tampones con NaCl 50 mM y NaCl 100 mM en la tabla 6).

La potencia relativa para la unión a HSA había disminuido más en comparación con la actividad para la unión a RANKL tras 10 semanas de almacenamiento a 37°C. Sin embargo, esta disminución en la actividad era menos significativa en los tampones que contienen manitol que en los tampones que contienen NaCl. Tal como se observa para la unión a RANKL, el porcentaje de actividad sobre HSA disminuyó con las concentraciones crecientes de NaCl en los diferentes tampones.

Ejemplo 1.4: Medición de osmolalidad para los nanocuerpos en los diferentes tampones

Se realizaron mediciones de osmolalidad sobre las diferentes formulaciones usadas en los estudios de estabilidad:

RANKL008a en fosfato 10 mM/manitol al 10%:	635 mOsm/kg
RANKL008a en acetato 10 mM/manitol al 10%:	643 mOsm/kg
RANKL008a en L-histidina 20 mM pH 5,5/manitol al 10%:	712 mOsm/kg
RANKL008a en L-histidina 20 mM pH 6,0/manitol al 10%:	667 mOsm/kg
RANKL008a en tampón acetato 10 mM pH 5,5/NaCl 100 mM:	272 mOsm/kg
RANKL008a en fosfato 10 mM/manitol al 5%:	389 mOsm/kg

Las formulaciones que contenían manitol al 10% eran hipertónicas.

Ejemplo 1.5: Estabilidad de los nanocuerpos durante estrés mecánico

Se realizaron experimentos de estrés mecánico sobre RANKL008a (62,2 mg/ml) en tampón fosfato 10 mM pH 7,0 con NaCl 115 mM. Se diluyó la muestra de RANKL008a (en el tampón fosfato 10 mM pH 7,0 con 115 mM) o no se diluyó con y sin Tween 80 al 0,01%. Se removieron las muestras, se agitaron, se hicieron rotar y se empujaron a través de una aguja con una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml) tal como sigue:

- se diluyeron hasta 5 mg/ml o no se diluyeron y se removieron (10 s - 1 min);
- se empujaron a través de una jeringuilla (3 ml) con aguja 25G (no diluidas) (10x);
- se hicieron rotar (10 rpm) sobre una mezcladora vertical durante 2 días a temperatura ambiente (no diluidas)
- se agitaron 1 hora a temperatura ambiente durante 2 días a 5°C (diluidas hasta 5 mg/ml).

Se compararon las diferentes muestras visualmente para detectar cualquier diferencia en aspecto.

Al remover fuerte durante un tiempo corto (10 s) se provocó una fuerte formación de espuma de las muestras en ausencia de Tween 80, la muestra diluida se volvió muy opaca (figura 8) mientras que esto era menos pronunciado para la muestra no diluida. En presencia del Tween 80 no se observó esta opacidad.

Se empujó la muestra no diluida de RANKL008a con y sin Tween 80 al 0,01% 10 veces a través de una aguja (25G)

con una jeringuilla de 3 ml. La muestra sin Tween 80 se volvió opaca, había algo de formación de espuma y eran visibles burbujas de aire diminutas cuando se daban golpes suaves en el vial, en el vial con Tween 80 al 0,01% la opacidad era limitada.

- 5 Se hizo rotar la muestra no diluida de RANKL008a con o sin Tween 80 al 0,01% durante 2 días a 10 rpm. Ambas muestras permanecieron transparentes.

10 Se agitó la muestra diluida (hasta 5 mg/ml) de RANKL008a con o sin Tween 80 al 0,01% durante 1 hora a temperatura ambiente y adicionalmente durante 2 días a 5°C. Las observaciones visuales son las siguientes: la agitación durante 1 h a temperatura ambiente indujo una opacidad que no se observó en presencia de Tween 80 al 0,01%. Tras agitar 1 hora a temperatura ambiente, la muestra sin Tween 80 era ligeramente opaca mientras que la muestra con Tween 80 permaneció transparente. Tras 2 días de agitación a 5°C, ambas muestras eran opacas pero la opacidad en la muestra sin Tween 80 era superior.

- 15 Con la adición de Tween 80 al 0,01%, la muestra de RANKL008a era menos opaca o no era opaca tras estrés mecánico y había menos formación de espuma. Esto indica que la muestra es menos susceptible a la desnaturalización en la superficie de contacto aire-agua si se añade Tween 80.

20 Ejemplo 1.6: Jeringabilidad de las diferentes formulaciones de nanocuerpos

25 Se determinó el efecto del uso de diferentes diluyentes, es decir, solución salina, tampón fosfato sin Tween 80 o tampón fosfato con Tween 80 sobre el contenido, aspecto visual y potencia de RANKL008a a baja concentración (0,28 mg/ml) tras su paso a través de diferentes jeringuillas y agujas. Se diluyó RANKL008a en diferentes diluyentes seguido por su paso o almacenamiento de 24 h en jeringuillas (Becton Dickinson) (figura 9). La figura 9 contiene las leyendas de las diferentes muestras generadas durante este experimento en el que se aplican los siguientes códigos:

S25/0: almacenamiento a 25°C durante 0 minutos

30 S25/24: almacenamiento a 25°C durante 24 h

-TW: tampón menos Tween 80

+TW: tampón + Tween 80

35 PLACEBO se refiere al siguiente tampón: Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,0 + NaCl 115 mM

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

40 En la tabla 7 se facilita la inspección visual y la determinación del contenido de RANKL008a tras la dilución en diferentes diluyentes y el paso/almacenamiento en jeringuillas. En la figura 10 se facilitan datos sobre la medición de turbidez a 320 y 350 nm. En la figura 11 se muestra la potencia relativa frente a HSA y RANKL de RANKL008a tras la dilución en diferentes diluyentes y el paso/almacenamiento en jeringuillas.

45 El paso a través de una jeringuilla aumentó ligeramente la turbidez cuando se usa Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 115 mM (pH 7,0). La dilución en solución salina provocó una disminución en la actividad de unión de RANKL/HSA del 18-34,0%. Se observó un efecto similar usando Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 115 mM (pH 7,0) sin Tween 80, es decir una disminución del 15-27%. En contraposición, la dilución en Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 115 mM (pH 7,0) con Tween 80 no parecía tener un efecto drástico que confirmase el papel beneficioso de Tween 80 en el tampón.

50 Ejemplo 1.7: Estabilidad de formulaciones de nanocuerpos durante el paso por jeringuillas con diferente tamaño de aguja

55 Se evaluó el efecto del paso por jeringuillas sobre el aspecto visual del RANKL008a usando diferentes tamaños de aguja y combinaciones de tamaños de aguja. Se diluyó RANKL008a en un tubo Eppendorf (TUB) en Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 115 mM, Tween 80 al 0,01% (v:v), (pH 7,0) hasta una concentración final de 0,28 mg/ml seguido por paso individual a través de una jeringuilla de Becton Dickinson de 1 ml equipada con diferente agujas (es decir Terumo 18G, 23G, 27G y 30G) (figura 12). En esta figura y la tabla 8 se aplican los siguientes códigos:

60 +TW: tampón + Tween 80

PLACEBO se refiere al siguiente tampón: Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,0 + NaCl 115 mM

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

65 18G/18G: muestra extraída con una aguja 18G y expelida a través de una aguja 18G

18G/27G: extraída con una aguja 18G y expelida a través de una aguja 27G

Todos los demás códigos son similares a los dos ejemplos facilitados anteriormente.

5 Se determinó la turbidez mediante inspección visual y mediante medición de la absorción a longitudes de onda de 320 nm, 340 nm, 350 nm y/o 500 nm, y determinando la razón del valor obtenido con respecto a la absorción a A278 nm (principalmente 320/278 y 350/278). Una razón de >0,05 se consideró significativa. En la tabla 8 se muestran la inspección visual, el contenido y la turbidez de RANKL008a antes (TUB) y después del paso a través de jeringuillas con diferente tamaño de aguja.

15 En un experimento adicional, se sometió RANKL008a a paso individual a través de una jeringuilla de 1 ml equipada con diferentes tamaños de aguja (es decir 27G y 29G) tanto no diluido (65 mg/ml) como diluido en Na₂HPO₄ 10 mM, NaCl 115 mM, Tween 80 al 0,01% (v:v), (pH 7,0) hasta una concentración final de 0,28 mg/ml (figura 13). En la tabla 9 se muestran la inspección visual, el contenido y la turbidez de RANKL008a antes (TUB) y después del paso a través de jeringuillas con diferente tamaño de aguja.

En la tabla 9 y la figura 13 se usan los siguientes códigos:

20 +TW: tampón + Tween 80

PLACEBO se refiere al siguiente tampón: Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,0 + NaCl 115 mM

25 TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

27G/27G: muestra extraída con una aguja 27G y expelida a través de una aguja 27G

29G/29G: extraída con una aguja 29G y expelida a través de una aguja 29G

30 T: aguja de Terumo, B aguja de Becton Dickinson

0028 se refiere a una concentración a 0,28 mg/ml, 6500 a aproximadamente 65 mg/ml

35 Diferentes combinaciones de tamaños de aguja no tuvieron ningún efecto significativo sobre la recuperación de RANKL008a o la turbidez de la muestra tanto a baja (0,28 mg/ml) como a alta (62,8 mg/ml) concentración (hasta tamaños de calibre de 29 y 27 respectivamente). En ambos experimentos los valores de turbidez fueron bajos (<0,05).

40 Ejemplo 2: Formulación y estudios de estabilidad con nanocuerpos que se unen a IL-6R

Ejemplo 2.1: Materiales y métodos usados en el estudio

2.1.1 Dominios variables individuales

45 Tres nanocuerpos que se usaron en este estudio se han descrito en la solicitud PCT n.º PCT/EP2010/054764 concedida a Ablynx N.V. IL6R304 es un nanocuerpo biespecífico que consiste en dos dominios variables humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada, uno que se une a IL-6R, el otro (Alb8) que se une a HSA. Los nanocuerpos biespecíficos trivalentes IL6R305 e IL6R306 consisten en dos subunidades idénticas que son específicas para IL-6R mientras que la tercera subunidad se une a HSA. La constitución de las subunidades difiere en IL6R305 e IL6R306 (véase la tabla C-27 del documento PCT/EP2010/054764). Las subunidades en los tres nanocuerpos se fusionan de cabeza a cola con un ligador 9G/S. En la tabla 10 se facilitan las secuencias y características de los tres nanocuerpos.

55 Se expresaron los nanocuerpos en *Pichia pastoris*. La concentración del nanocuerpo y el cambio de tampón a PBS u otro tampón de formulación se realizaron por medio de UF/DF (Sartorius Hydrosart Sartocon Slice 200, 10 kDa). Se llevó a cabo una filtración final a 0,22 µm. En la tabla 11 se facilita un resumen de los diferentes lotes de nanocuerpos frente a IL-6R.

60 Se usaron muestras no sometidas a estrés en PBS u otras formulaciones como material de referencia para analizar las muestras de estabilidad en almacenamiento.

2.1.2 Otros reactivos

65 En la tabla 12 se facilitan los reactivos usados en el estudio. La composición completa de D-PBS era NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato de sodio dibásico 10 mM, fosfato de potasio monobásico 2 mM.

2.1.3 Equipo y métodos para las mediciones

Se llevaron a cabo experimentos de HPLC en un instrumento de la serie Agilent 1200 de Agilent Technologies (Palo Alto, EE.UU.) o en un instrumento Dionex Ultimate 3000. Las columnas usadas fueron:

- RP-HPLC: Zorbax 300SB-C3 5 micrómetros, 4,6 X 150 mm (Agilent, n.º de cat. 883995-909) o Zorbax 300SB-C8 5 micrómetros, 4,6 X 150 mm (Agilent, n.º de cat. 883995-906);
- SE-HPLC: Phenomenex BioSep SEC S2000 (00H-2145-KD)

Se realizaron las determinaciones de concentración de los nanocuerpos con NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific), con un espectrofotómetro Uvikon 943 (Kontron Instruments) o con un biofotómetro Eppendorf 6131 a 280 nm.

Se midió la distribución de tamaño de partícula en un contador de partículas SVSS-C de PAMAS (PARTikelMess- und AnalyseSysteme GMBH).

Se realizó la medición de osmolalidad con un osmómetro modelo 3320 de Advanced Instruments.

Para la medición de la actividad de unión se usó Biacore 3000 (GE Healthcare).

Se realizó el ensayo de desplazamiento térmico (TSA) en un dispositivo de Q-PCR LightCycler480 (Roche).

Para la determinación de la T_m, se usó un calorímetro diferencial de barrido VP-capillary automatizado (DSC, MicroCal).

2.1.4 Ensayo de pureza de los nanocuerpos frente a IL-6R mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC)

El ensayo de SE-HPLC consistía en una columna Phenomenex BioSep SEC S2000 preempaquetada, una fase móvil que consistía en KCl, NaCl y tampón fosfato pH 7,2 (D-PBS) y detección UV a 280 nm. La cantidad relativa de impureza proteica específica se expresó como el % de área, y se calculó dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza proteica entre el área total integrada.

El método puede resolver y cuantificar las cantidades relativas de material intacto e impurezas relacionadas con el producto tales como agregados y fragmentos de degradación.

2.1.5 Ensayo de pureza de los nanocuerpos frente a IL-6R mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

En el ensayo de RP-HPLC se usaron una columna Zorbax 300SB-C3 o Zorbax 300SB-C8 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.) a temperaturas elevadas. Con la columna C3, la fase móvil A consistía en TFA al 0,1% y la fase móvil B consistía en TFA al 0,1% en ACN/isopropanol. Con la columna C8, la fase móvil A consistía en TFA al 0,1% y la fase móvil B consistía en TFA al 0,1% en 1-propanol. Se determinó la cantidad relativa de una impureza proteica específica midiendo la absorbancia de luz (280 nm) de los componentes que eluyen de la columna de RP-HPLC. Se calculó la cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como el % de área, dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza entre el área total integrada.

2.1.6 Medición de la distribución de tamaño de partícula (PAMAS)

Se realizaron las mediciones en el contador de partículas SVSS-C de PAMAS tal como sigue: se diluyó una muestra de 100 µl 1/10 en 1 ml de agua MilliQ y se realizaron 10 mediciones consecutivas en los 16 canales (conjunto de diámetros de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 50, 100, 150 y 200 µm). Para el cálculo del valor promedio, se excluyeron las primeras 2 mediciones y se tuvo en cuenta el factor de dilución. Se facilitan los resultados como datos acumulativos (recuentos de partículas totales >x µm) o datos diferenciales (recuentos de partículas totales entre diámetro de x e y µm). Solo se presentan los datos acumulativos.

2.1.7 Medición de afinidad en Biacore

En primer lugar se inmovilizó un chip con HSA (acoplamiento de aminos usando el kit de acoplamiento de aminos Biacore). Tras una etapa de acondicionamiento previo de 5 inyecciones del nanocuerpo, se diluyeron todas las muestras hasta 2,5 nM por triplicado y se analizaron sobre el chip. Se incluyó un control de calidad de los chips usando la muestra de referencia en el experimento para detectar cualquier pérdida de actividad o disminución en la respuesta (deterioro del chip). Se determinaron las pendientes usando el método de ajuste general y el modelo de ajuste lineal (software BIAevaluation). Para determinar la tasa de unión inicial (IBR), se seleccionó la pendiente entre 5 s y 30 s. Se transfirieron los valores de estas pendientes a Excel y se determinó el porcentaje de actividad en comparación con la referencia.

2.1.8 Ensayo de potencia basado en ELISA para determinar la unión a HSA

5 Se inmovilizó albúmina sérica humana (HSA) sobre una placa de ELISA Maxisorp de múltiples pocillos mediante adsorción. Tras bloquear los sitios de unión en exceso sobre las placas con tampón de bloqueo Superblock T20 (PBS), se aplicó una serie de dilución de muestras de prueba y de referencia sobre la placa. Se detectó posteriormente el nanocuerpo unido usando un nanocuerpo bivalente anti-nanocuerpo conjugado directamente con peroxidasa del rábano (HRP). En presencia de H₂O₂ HRP cataliza una reacción química con tetrametilbencidina (TMB) que da como resultado la formación de un color. Se detuvo la reacción añadiendo HCl 1 N. Se midió la densidad óptica del color a 450 nm.

2.1.9 Ensayo de potencia basado en ELISA para la unión a IL-6R

15 Para las muestras de referencia, control y de prueba, se prepararon diferentes diluciones de los nanocuerpos. Se preincubaron estas diluciones con una cantidad constante de IL-6 100 ng/ml, seguido por la adición de IL-6R soluble 4 ng/ml. Posteriormente, se transfirió esta mezcla a una placa de microtitulación recubierta con un nanocuerpo anti-IL-6R no neutralizante. Tras lavar, se detectó la IL-6 unida residual con anticuerpo monoclonal biotinilado anti-IL-6 humana, seguido por detección con estreptavidina marcada con HRP. En presencia de H₂O₂ HRP cataliza una reacción química con tetrametilbencidina (TMB) que da como resultado la formación de un color. Se detuvo la reacción añadiendo HCl 1 N. Se midió la densidad óptica del color a 450 nm. Se analizó la potencia relativa de las muestras de prueba en comparación con la muestra de referencia mediante el uso del software PLA 2.0.

2.1.10 Isoelectroenfoque capilar (cIEF)

25 El isoelectroenfoque capilar (cIEF) es una técnica de análisis/separación que diferencia proteínas con respecto a la carga, es decir, separa proteínas según sus puntos isoelectrónicos (pI). El principio de separación es similar a IEF basado en gel/en lecho plano pero difiere principalmente en su formato, es decir, la separación tiene lugar en un tubo abierto de formato estrecho (capilar) eliminando la necesidad de cualquier soporte de matriz anticonvectiva. Además, cIEF es un instrumento completamente automatizado con detección y adquisición de datos en línea. Una desventaja de cIEF tradicional en un instrumento de CE convencional es que las zonas enfocadas (estacionarias) deben moverse pasada el área de detección de un único punto con el fin de registrar la señal. Durante la movilización las zonas pueden ensancharse con pérdida contaminante de resolución y disminución de la capacidad de detección. Además, el tiempo de análisis y el riesgo de agregación/precipitación de proteínas aumentarán. Mediante la obtención de imágenes de cIEF el procedimiento de enfoque se sigue en tiempo real a lo largo de toda la columna/capilar mediante una cámara CCD excluyendo la etapa de movilización. Tan pronto como el proceso de enfoque se completa se finaliza la ejecución de análisis.

Ejemplo 2.2: Determinación de la T_m

40 Se determinó la temperatura de fusión (T_m) en diferentes tampones usando el ensayo de desplazamiento térmico basado en fluorescencia (TSA, para IL6R304 e IL6R305) y mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC, para IL6R304).

2.2.1 Ensayo de desplazamiento térmico

45 El ensayo de desplazamiento térmico o TSA puede realizarse en una placa de 96 pocillos en un dispositivo de Q-PCR para evaluar el efecto de la pareja de tampón, la fuerza iónica, el pH y los excipientes sobre la estabilidad térmica de las proteínas. El ensayo da como resultado un valor de T_m que es indicativo de la estabilidad térmica en los tampones sometidos a prueba. En resumen, el ensayo sigue los cambios de señal de un colorante de fluorescencia, tal como Sypro Orange, mientras la proteína experimenta desplegamiento térmico. Cuando se añade Sypro Orange a una disolución de proteína plegada apropiadamente, se expone en un entorno acuoso y su señal de fluorescencia se extingue. Cuando se eleva la temperatura, la proteína experimenta desplegamiento térmico y expone su región de núcleo hidrófobo. Sypro Orange se une entonces a las regiones hidrófobas y revierte la extinción, lo que da como resultado el aumento de la señal de fluorescencia.

55 En un primer experimento, se evaluó la T_m para IL6R304 e IL6R305 en diferentes tampones, excipientes y combinaciones de los mismos usando el ensayo de TSA. Los valores de T_m obtenidos se presentan gráficamente en la figura 14 y la figura 15.

60 En todas las condiciones sometidas a prueba, los valores de T_m eran ligeramente superiores para IL6R304 que para IL6R305. Los tampones y excipientes sometidos a prueba tenían un efecto similar sobre los valores de T_m de IL6R304 e IL6R305:

65 Efecto del pH del tampón: se obtuvieron los mayores puntos de fusión en tampón HEPES (pH 7 y pH 8) y L-histidina pH 6,5, seguido por tampón fosfato (pH 6,7 y 7,7), Tris pH 7,2 y tampón succinato pH 6,2. Se obtuvieron los menores puntos de fusión en PBS (58,82°C para IL6R304) y en los tampones con el pH más bajo, es decir succinato

pH 5,2 y L-histidina pH 5,5. El punto de fusión superior en L-histidina pH 6,5 se correlaciona bien con la solubilidad superior de IL6R304 en este tampón (véase el ejemplo 2.3).

5 Efecto de la concentración de [NaCl]: se midieron las mayores temperaturas de fusión cuando no se añadió cloruro de sodio a los tampones. Los valores de T_m disminuyeron gradualmente con la concentración creciente de NaCl; el efecto alcanza una meseta a NaCl 300 mM.

10 Efecto de los excipientes manitol, sacarosa y glicina: todos los excipientes sometidos a prueba parecían tener un efecto de estabilización sobre IL6R304 e IL6R305, puesto que las temperaturas de fusión aumentaron con la concentración de excipiente creciente. Se obtuvieron los mayores valores de T_m en tampones que contenían manitol al 7,5% o sacarosa al 5%.

15 En resumen, IL6R304 e IL6R305 parecen ser más estables en tampones que tenían un pH neutro y que contenían una baja concentración de NaCl y cantidades significativas de manitol o sacarosa. Esto se representa esquemáticamente en la tabla 13. L-histidina pH 6,5 parecía ser un buen tampón para su utilización en pruebas de estabilidad adicionales y el trabajo de formulación. Otro argumento importante para continuar con un tampón L-histidina es que se mostró que la solubilidad de IL6R304 aumentaba drásticamente en este tampón en comparación con PBS (véase el ejemplo 2.3). Deben evitarse tampones que contienen una alta concentración de NaCl, mientras que podrían usarse preferiblemente tampones HEPES a pH neutro.

20 2.2.2 Calorimetría diferencial de barrido

Para identificar otros tampones adecuados que van a usarse en protocolos de purificación, es decir en los que la proteína presenta una estabilidad aceptable, se usó calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la temperatura de fusión de IL6R304 en diferentes tampones candidatos.

30 La figura 16 muestra los resultados de un experimento de DSC realizado sobre IL6R304 formulado en diferentes tampones. Se observaron las mayores temperaturas de fusión en MES (pH 6,0) y HEPES (pH 7,0), mientras que acetato, Tris-HCl y fosfato indican una estabilidad térmica ligeramente inferior. El valor de T_m obtenido en citrato (pH 3,5) era en promedio 10°C más bajo que en los otros tampones. Todos los picos de fusión de capacidad térmica (C_p) eran nítidos y bastante simétricos en todos los tampones. La restauración de una línea de base tras la transición indicó que no se había producido precipitación.

35 En la tabla 14 se muestra un resumen de todos los valores de T_m obtenidos en los experimentos de DSC. A partir de estos resultados puede concluirse que añadir más NaCl conduce a una disminución gradual en la temperatura de fusión, tal como se observó también en el TSA.

40 2.2.3 Experimento de TSA usando diseño experimental

Se realizó un segundo experimento de TSA sobre IL6R304 usando diseño experimental (DOE). El DOE consistía en diferentes etapas. Se usó el resultado de cada etapa para definir el DOE para la siguiente etapa. En resumen, los sistemas experimentales y los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- 45 • Etapa 1: Se sometieron a prueba L-histidina, succinato, fosfato y Tris a diferente pH (6-7) y fuerza de tampón (10 - 40 mM). Se encontró que la formulación más prometedora eran tampones L-histidina y fosfato de baja fuerza iónica con un pH de 7 y 6, respectivamente.
- 50 • Etapa 2: Se sometió a prueba el efecto de añadir NaCl y diferentes excipientes a L-histidina 15 mM pH 6,5 y 7 y fosfato 15 mM pH 6 y 6,5. Se incluyó un representante de tres familias de excipientes: manitol (poliol), sacarosa (azúcar no reductor) y arginina (aminoácido). Se concluyó que arginina y/o NaCl disminuyen la T_m de IL6R304. Se alcanzó una temperatura de fusión máxima en sacarosa o una mezcla de sacarosa/manitol (el 10% en total). Además, se obtuvo una T_m superior en L-histidina que en fosfato. Para ambos tampones, se obtuvieron los mejores resultados a pH 6,5.
- 55 • Etapa 3: Se sometieron a prueba otros representantes, es decir sorbitol, xilitol, ribitol, trehalosa y glicina, de las tres familias de excipientes en L-histidina 15 mM y fosfato 15 mM, ambos a pH 6,5. De nuevo, la T_m de IL6R304 era superior en tampón L-histidina que en fosfato para todos los excipientes y combinaciones de excipientes. La mejor formulación de tampón contenía trehalosa o sorbitol al 10%. (Tabla 15).

60 En una cuarta etapa, se confirmó el resultado del análisis estadístico del DOE mediante una repetición del TSA y mediante calorimetría diferencial de barrido.

Ejemplo 2.3: Solubilidad de los nanocuerpos en diferentes tampones

65 2.3.1 Solubilidad en PBS y el efecto de Tween 80

5 Durante el procesamiento posterior y almacenamiento de los nanocuerpos frente a IL6R304, IL6R305 e IL6R306 en tampón D-PBS, se produjo precipitación. Se formaron ya precipitados durante el almacenamiento durante la noche a 5°C o -20°C, incluso en muestras que se filtraron (0,22 µm) antes del almacenamiento. Esto no sólo dio como resultado una pérdida de producto significativa, sino que también hizo que no fuera conveniente realizar experimentos posteriores puesto que era necesario incorporar constantemente etapas de filtración. A partir de estas observaciones quedaba claro que PBS no es un tampón de formulación adecuado para ninguno de los nanocuerpos frente a IL-6R y que era necesario identificar tampones de almacenamiento alternativos. En un experimento inicial, se evaluó si Tween 80 podía impedir que se produjese esta precipitación (agregación).

10 En resumen, se diluyó IL6R304 (P#051108nr1) hasta 2 mg/ml en tampón PBS, tampón PBS + Tween 80 al 0,1% (v:v) o tampón PBS + Tween 80 al 0,2% (v:v). Se almacenaron las tres muestras durante 4 días a 5°C y se analizaron posteriormente para detectar materiales particulados visibles (pruebas de aspecto mediante inspección visual; tabla 16), recuentos de partículas subvisibles (PAMAS; figura 17), por medio de espectroscopia UV (razón A320/A280, es decir una medida de la presencia de materiales particulados; tabla 16) y SE-HPLC (figura 18). Estaban presentes significativamente más y mayores partículas en la muestra de IL6R304 formulada en PBS en comparación con la muestra de IL6R304 formulada en PBS + Tween 80.

20 2.3.2 Experimentos de concentración para determinar la solubilidad de IL6R304 e IL6R305

25 Se concentraron gradualmente IL6R304 e IL6R305, ambos formulados en PBS, con un concentrador Vivascience (Vivaspin 500 MWCO de 5.000, concentrador de 500 µl). Durante el experimento de concentración, se mezcló suavemente el material retenido de manera regular y se analizó visualmente para detectar materiales particulados/precipitación. Se verificó la presencia de agregados insolubles en el material retenido comprobando la concentración de proteína antes y después de la centrifugación a velocidad máxima. Basándose en los resultados del ensayo de desplazamiento térmico (véase el ejemplo 2.2.1), se analizó también la solubilidad de IL6R304 en histidina 20 mM, pH 6,5.

30 En conclusión, la solubilidad de IL6R304 e IL6R305 en PBS era limitada, con valores estimados de 20 mg/ml y 15 mg/ml, respectivamente (concentración a la que se producía la precipitación de la proteína). No se observó precipitación de IL6R304 a una concentración entre 20-90 mg/ml en tampón L-histidina, lo que sugiere que la solubilidad puede aumentarse significativamente cambiando el tampón de formulación. Obsérvese que no se ha observado pérdida de proteína significativa.

35 2.3.3 Determinación de la solubilidad teórica

40 Se determinó la solubilidad teórica de IL6R304 e IL6R305 usando el método de exclusión de PEG en tampón PBS (IL6R304, IL6R305) o en L-histidina 20 mM, pH 6,5 (IL6R304). En resumen, se incubó una disolución de nanocuerpos concentrada (30-80 mg/ml) en el respectivo tampón durante 15 minutos a temperatura ambiente en presencia de concentraciones crecientes de PEG6000. Tras la centrifugación a 20000 x g durante 3 minutos, se representaron gráficamente los valores logarítmicos de la [concentración de proteína soluble] frente a la concentración de PEG6000 (figura 19). Mediante análisis de regresión y extrapolación a una concentración cero de PEG6000, pudo obtenerse la concentración máxima teórica de proteína (y por tanto los valores de solubilidad) para los nanocuerpos en los tampones sometidos a prueba. Los valores de solubilidad obtenidos se correlacionan bien con los valores obtenidos experimentalmente usando los experimentos de concentración gradual con los concentradores centrífugos Vivaspin. Cuando se compara la solubilidad de IL6R304 en PBS y L-histidina a pH 6,5, podía concluirse que la solubilidad de IL6R304 aumentaba significativamente en el tampón L-histidina.

50 Ejemplo 2.4: Estudio de estabilidad en almacenamiento de los nanocuerpos a 37°C

55 Se realizó un estudio de estabilidad en almacenamiento inicial para conseguir una comprensión general de la estabilidad de los nanocuerpos frente a IL-6R y para determinar si la adición de manitol en el tampón de formulación tiene un efecto beneficioso en la minimización de la formación de posibles dímeros, tal como se observó para RANKL008a (véase el ejemplo 1.3).

60 Se formularon los tres nanocuerpos frente a IL-6R en diferentes tampones (tabla 17) a una concentración de 10 mg/ml (IL6R304), 7,1 mg/ml (IL6R305) y 10,3 mg/ml (IL6R306). Se evaluó la estabilidad de las diferentes muestras en condiciones de estrés acelerado a 37°C. Se analizaron las muestras tras 1 semana usando SE-HPLC y RP-HPLC. También se analizaron muestras seleccionadas de IL6R304 e IL6R305 tras 3 semanas de almacenamiento.

2.4.1 Análisis de SE-HPLC

65 Para los tres nanocuerpos frente a IL-6R, el almacenamiento prolongado a 37°C dio como resultado la formación de picos previos y algunos picos posteriores menores. Los picos posteriores correspondían probablemente a productos de degradación (debido a la actividad proteolítica restante en la muestra). El área de superficie de estos picos

posteriores seguía siendo muy baja, lo que sugiere sólo una degradación mínima tras 3 semanas a 37°C.

Los tres nanocuerpos frente a IL-6R tenían una fuerte tendencia a formar dímeros/oligómeros (agregados), que eran visibles como pico(s) previo(s) en los cromatogramas del análisis de SE-HPLC. En la figura 20 se muestra un cromatograma de ejemplo. El área de pico del pico previo aumentó significativamente a lo largo del tiempo (representado como el % de agregados en la figura 21 y la figura 22) y estuvo acompañado por una disminución concomitante en el área de superficie del pico principal. La propensión a formar dímeros/oligómeros parecía ser algo superior para IL6R305 que para IL6R304. Además, estaban formándose más dímeros/oligómeros en PBS en comparación con los otros tampones que se sometieron a prueba. De manera importante, se observaron las menores cantidades de oligómeros en las formulaciones que contenían manitol.

2.4.2 Análisis de RP-HPLC

El perfil de RP-HPLC de IL6R304 a punto de tiempo de 0 semanas incluía un pico principal con un hombro que eluía antes que el material principal y un pico posterior que no estaba bien resuelto con respecto al pico principal. Este pico posterior correspondía lo más probablemente a la variante que contiene piroglutamato de IL6R304. El área de superficie de este pico aumentó con el tiempo de almacenamiento y era la mayor en PBS y tampón fosfato en comparación con los tampones acetato e histidina. Tras 3 semanas de almacenamiento, las áreas de superficie de dos picos previos no identificados hasta ahora aumentó (figura 23).

El perfil de RP-HPLC de IL6R305 a punto de tiempo de 0 semanas incluía un pico principal con algunos picos previos menores. La potencia de resolución del método de RP-HPLC usado era insuficiente para separar la variante que contiene piroglutamato del material principal.

Ejemplo 2.5: Medición de la osmolalidad

Según la farmacopea europea, una disolución se considera isotónica si tiene una osmolalidad de 290 ± 30 mOsm/kg. Se realizaron por tanto mediciones de osmolalidad sobre L-histidina 20 mM pH 6,5 que contenía diferentes concentraciones de excipientes para definir el intervalo de concentración de excipientes que sería aceptable para una formulación líquida isotónica de IL6R304.

Se formuló IL6R304 (10 mg/ml) en los diferentes tampones de la tabla 18. En la figura 24 se muestran los resultados de la medición de osmolalidad de estas formulaciones.

Ejemplo 2.6: Estudio de estabilidad en almacenamiento de IL6R304 a 5°C y 37°C

En la tabla 18 y la tabla 19 se facilita un resumen de los diferentes tampones de formulación y métodos usados en las pruebas de estabilidad de IL6R304 lote P#051108nr1, respectivamente. Debido a que se encontró que IL6R304 era propenso a agregación y precipitación, se añadió Tween 80 a la mayoría de las formulaciones.

2.6.1 Aspecto y DO280

No se observó turbidez en las muestras almacenadas durante 5 semanas a 5°C, lo que indica que L-histidina 20 mM pH 6,5 es un tampón de almacenamiento mucho mejor para IL6R304 que PBS.

Tras el almacenamiento durante 1 semana a 37°C, se observó una ligera turbidez en las 12 muestras. En las muestras de IL6R304 en los tampones 1, 2, 3, 7, 8 y 9 se observó más opalescencia en comparación con IL6R304 en los tampones 4, 5, 6, 10, 11 y 12, que contenían todos manitol. Tras el almacenamiento durante 2 semanas a 37°C, se observó ligeramente más turbidez en comparación con las muestras de 1 semana. Sin embargo, la tendencia observada para las muestras de 1 semana continuó: las muestras de IL6R304 en los tampones 1, 2, 3, 7, 8 y 9 mostraron más opalescencia en comparación con los tampones que contenían manitol. Tras el almacenamiento durante 5 semanas a 37°C, todavía estaba presente turbidez y ligeramente menos en las muestras que contenían manitol. Sin embargo, parecía que la turbidez no había aumentado en comparación con las muestras de 2 semanas.

A pesar de la opacidad observada en las muestras sometidas a estrés, la concentración de proteína en las muestras no ha disminuido significativamente (datos no mostrados) aunque había una ligera tendencia a una concentración inferior debido a una turbidez superior. Además, la razón DO320/DO280, que es una medida para la turbidez o la presencia de materiales particulados, era $<0,05$ en todas las condiciones de tampón. De hecho, la razón era 2-10 veces inferior a la observada en la muestra no sometida a estrés en PBS, mostrando de nuevo que el tampón L-histidina pH 6,5 tiene un efecto de estabilización sobre IL6R304.

2.6.2 Análisis de SE-HPLC

Se analizaron muestras del material de referencia (0 semanas) y muestras almacenadas durante hasta 6 meses a 5°C y 37°C usando SE-HPLC.

- 5 No se observaron diferencias entre los perfiles de SE-HPLC de las muestras de referencia (a 0 semanas) y las muestras almacenadas durante hasta 5 semanas a 5°C. Además, no hubo diferencias significativas entre los diferentes tampones. Las pequeñas cantidades de agregados ya presentes en el material de partida no estaban aumentando con el tiempo de almacenamiento prolongado (figura 25(B)), lo que indica que el tampón histidina tenía un efecto de estabilización sobre ILR304, incluso en ausencia de excipientes tales como Tween 80, manitol o sacarosa. Obsérvese que IL6R304 formaba agregados cuando se almacenaba durante un tiempo corto (horas-días) a 5°C en tampón D-PBS.
- 10 El análisis de SE-HPLC de las muestras almacenadas durante 6 meses a 5°C tampoco mostró aumento en el % de área de los picos previos, lo que significa que no se formaron oligómeros en estas condiciones de almacenamiento, ni siquiera en la formulación que contiene sólo L-histidina 20 mM, pH 6,5 es decir sin Tween-80 o ningún excipiente (datos no mostrados).
- 15 El almacenamiento prolongado a 37°C dio como resultado la formación de picos previos y algunos picos posteriores menores. Los picos posteriores correspondían probablemente a productos de degradación (debido a la actividad proteolítica restante en la muestra). El área relativa (%) de estos picos aumentó sólo ligeramente, lo que implica que la degradación se restringió a un mínimo. Los otros picos visibles en los cromatogramas eran picos de fondo que surgían de los componentes del tampón.
- 20 El área de pico de los picos previos aumentó significativamente a lo largo del tiempo (figura 25 (A) y figura 26(B)). Dada la posición relativa de los picos previos con respecto al pico principal, los picos previos representaban lo más probablemente formas diméricas u oligoméricas (agregados) de IL6R304. El área de superficie de pico del pico previo aumentó con el tiempo de almacenamiento y estaba acompañado por una disminución concomitante en el
- 25 área de superficie del pico principal.
- Una observación importante era que la propensión a formar dímeros/oligómeros dependía del tampón: la propensión a oligomerizarse era significativamente inferior en las formulaciones que contenían manitol y sacarosa. La glicina no parecía tener un efecto positivo de este tipo en la prevención del proceso de oligomerización. Tween 80 no tenía
- 30 ningún efecto inhibitor sobre la formación de oligómeros.
- De manera importante, el % de oligómeros observados en los 12 tampones L-histidina tras almacenamiento durante 3 semanas a 37°C era significativamente inferior que para la muestra equivalente en tampón D-PBS, es decir al 2,2-4,6% en L-histidina, pH 6,5 en comparación con el 11,7% en PBS (figura 26(A)). Este efecto dependiente del tampón
- 35 sobre la estabilidad física de IL6R304 se correlacionaba muy bien con las diferencias dependientes del tampón observadas en pruebas de estabilidad térmica de IL6R304 (ejemplo 2.2): se encontró que la temperatura de fusión de IL6R304 era de sólo 58,8°C en PBS pero de 62,8°C en L-histidina 20 mM, pH 6,5. El aumento de la estabilidad intrínseca de IL6R304 cambiando el tampón de formulación desde PBS hasta L-histidina demostró tener un efecto beneficioso claro sobre su estabilidad en almacenamiento.
- 40 En las muestras almacenadas durante 6 meses a 37°C, se encontró el % más bajo de oligómeros en la formulación que contenía sacarosa al 10%, corroborando de nuevo el efecto de estabilización de sacarosa sobre IL6R304 (tabla 20).
- 45 2.6.3 Análisis de RP-HPLC
- Se analizaron muestras del material de referencia (0 semanas) y muestras almacenadas durante hasta 5 semanas a 5°C y 37°C usando RP-HPLC.
- 50 Los perfiles de RP-HPLC a punto de tiempo de 0 semanas incluían un pico principal, dos picos previos y un pico posterior mal resuelto. Este pico posterior correspondía lo más probablemente a la variante que contiene piroglutamato de IL6R304.
- Se encontró que los perfiles de RP-HPLC del lote de referencia y las muestras de estabilidad almacenadas durante
- 55 hasta 5 semanas a 5°C eran comparables.
- En las muestras de estabilidad almacenadas a 37°C, el área de superficie de pico del pico de piroglutamato aumentó con el tiempo de almacenamiento mientras que el área de superficie del pico principal disminuyó. El área total permaneció sin cambios.
- 60 Tras 5 semanas de almacenamiento a 37°C, el área de superficie de los dos picos previos había aumentado en todas las condiciones de tampón. La identidad de estas variantes se desconoce por el momento, pero podrían corresponder a fragmentos de degradación.
- 65 No hubo diferencias significativas dependientes de tampón en los perfiles de RP-HPLC de las diferentes muestras, lo que sugiere que las modificaciones químicas, tales como formación de piroglutamato y oxidación que se detectan

normalmente mediante RP-HPLC, eran limitadas y en ese momento no se veían afectadas por el tampón.

Ejemplo 2.7: Estudio de estabilidad en almacenamiento de IL6R304 a -70°C, -20°C, 5°C, 25°C y 37°C

5 Se formuló IL6R304 a 10 mg/ml en los 10 diferentes tampones mostrados en la tabla 21, se almacenó a -70°C, -20°C, +5°C y +37°C durante 8 semanas y durante 1 semana a +25°C. Se analizaron muestras de estabilidad usando SE-HPLC, RP-HPLC, DO280 e inspección visual. Se analizaron también muestras seleccionadas usando Biacore (unión a HSA) y ensayos de potencia (HSA e IL-6R).

10 2.7.1. Almacenamiento durante 8 semanas a -70°C, -20°C, 5°C y 1 semana a 25°C

Se mostró que IL6R304 era estable tras almacenamiento durante 8 semanas a -70°C, -20°C, 5°C y durante 1 semana a 25°C en los 10 tampones sometidos a prueba. No se observaron diferencias significativas en potencia, turbidez, perfiles de SE-HPLC y RP-HPLC entre el material de referencia y las 10 diferentes muestras de almacenamiento.

15 2.7.2. Almacenamiento durante 8 semanas a 37°C

20 *Aspecto y DO280*

En comparación con las muestras almacenadas a -70°C, -20°C y 5°C, se observó turbidez en las muestras almacenadas a 37°C. Los valores de absorbancia a 350 nm habían aumentado por consiguiente hasta >0,01 UA en la mayoría de los tampones, aunque la razón A350/A280 era todavía <0,05 en todas las condiciones de tampón. A pesar de la opacidad observada en las muestras sometidas a estrés, la concentración de proteína en las muestras no había disminuido significativamente.

25 *SE-HPLC*

El almacenamiento prolongado a 37°C dio como resultado la formación dependiente del tiempo de un pico posterior y un pico previo. El pico posterior tiene un tiempo de retención de entre 22 y 23 minutos y correspondía lo más probablemente a fragmentos de degradación de IL6R304. Sin embargo, el área de superficie de este pico seguía siendo baja (aproximadamente el 2%), lo que sugiere sólo una degradación mínima tras 8 semanas a 37°C. Los otros picos posteriores visibles en los cromatogramas eran picos de fondo que surgían de los componentes del tampón.

El perfil de SE-HPLC de IL6R304 a punto de tiempo de 0 semanas incluía un pico principal y dos picos previos menores, que no estaban completamente resueltos hasta la línea de base. El área de superficie de los picos previos aumentó a lo largo del tiempo y estaba acompañado por una disminución concomitante en el área de superficie del pico principal. Dada la posición relativa y heterogeneidad de los picos previos, representaban lo más probablemente formas dimericas y/u oligomericas de IL6R304. Debido a esta heterogeneidad y a la disminución de la resolución entre los picos previos a lo largo del tiempo, los picos se integraron por simplicidad como un único pico.

Una observación importante era que la propensión a formar dímeros/oligómeros dependía del tampón: estaban formándose aproximadamente 2 veces menos oligómeros en tampón L-histidina en comparación con tampón fosfato (figura 27, figura 28). Se observó la menor cantidad de oligómeros en la formulación que contenía trehalosa, seguida por la formulación que contenía sacarosa. Globalmente, tras el almacenamiento de IL6R304 a 37°C durante varias semanas, la cantidad de oligómeros presentes en estos tampones era significativamente inferior a la observada anteriormente en D-PBS o en L-histidina pH 6,5 carentes de cualquier excipiente.

50 La presencia de un azúcar no reductor suprimió la magnitud de la oligomerización de IL6R304 considerablemente.

RP-HPLC

En la figura 29 se muestran los cromatogramas de RP-HPLC a partir de muestras de estabilidad de ILR304 almacenadas durante hasta 8 semanas a 37°C.

El perfil de RP-HPLC de ILR304 a punto de tiempo de 0 semanas incluía un pico principal, con 2 hombros mal resueltos que eluían antes del material principal, un primer pico posterior correspondiente a la variante que contiene piroglutamato de ILR304 y un segundo pico posterior, correspondiente a la variante de ILR304 en la que falta un puente disulfuro. La identidad de ambas variantes se ha confirmado mediante CL-EM.

Tras el almacenamiento durante 1 semana, el área de superficie del segundo pico posterior había disminuido hasta un % de área relativa de 0, lo más probablemente debido a la oxidación espontánea en la molécula plegada correctamente.

65 El área de superficie del pico de piroglutamato aumentó con el tiempo de almacenamiento mientras que el área de

superficie del pico principal disminuyó. El área de superficie total no estaba cambiando significativamente a lo largo del tiempo o entre los diferentes tampones. La figura 30 demuestra claramente que la cinética de formación de piroglutamato era diferente en L-histidina, pH 6,5 frente a fosfato, pH 6,5. A todos los puntos de tiempo, estaba presente menos piroglutamato en el tampón L-histidina. Por otro lado, no había correlación entre el tipo de excipiente presente en el tampón y la cantidad de piroglutamato que estaba observándose.

Tras el almacenamiento durante 8 semanas, estaban formándose dos nuevos picos posteriores. El primer pico posterior estaba situado entre el pico principal y el pico de piroglutamato, mientras que el segundo pico posterior eluyó justo después del pico de piroglutamato. La identidad de estas variantes no se conoce actualmente

Isoelectroenfoque capilar (cIEF)

En la tabla 22 se muestran los datos de integración de cIEF de IL6R304 almacenado durante 8 semanas a 37°C en los diferentes tampones. Las muestras formuladas en L-histidina 15 mM, pH 6,5 contienen menos variantes de carga en comparación con el tampón fosfato.

Ensayo de potencia y Biacore

Se determinó la potencia de las muestras almacenadas durante 8 semanas a 37°C en los tampones 1-5 en relación con un lote de referencia no sometido a estrés usando el ELISA de unión a HSA y el ELISA de inhibición para IL-6R tal como se describe en los ejemplos 2.1.8 y 2.1.9 (tabla 23). Se analizó también la funcionalidad de unión a HSA de las muestras almacenadas en los tampones 1-10 usando Biacore (tabla 24). Se incluyeron muestras formuladas en los mismos tampones y almacenadas a -70°C como moléculas de referencia.

Mientras que los ensayos de potencia mostraron potencias de unión a HSA e IL-6R comparables entre las muestras de estabilidad y el material de referencia, el análisis Biacore demostró algunas diferencias en las actividades de unión a HSA.

Globalmente, las actividades de las muestras formuladas en tampón fosfato (tampones 6-10) eran más bajas que en L-histidina (tampones 1-5). Se observó una pérdida de funcionalidad de aproximadamente el 16% en los tampones que contienen una combinación de sacarosa y glicina (tampón 4 y 9). La combinación de sacarosa y manitol (tampón 5 y 10) no mostró pérdida de funcionalidad de IL6R304 en el tampón L-histidina, mientras que se observó una disminución del 10% en el tampón fosfato. Las formulaciones que contenían o bien manitol, sacarosa o bien trehalosa mostraron una actividad de entre el 90 y el 100% tras almacenamiento durante 8 semanas a 37°C.

Conclusión general sobre el estudio de estabilidad en almacenamiento a 37°C

El almacenamiento durante hasta 8 semanas de IL6R304 en diferentes tampones de formulación en condiciones de estrés de temperatura (37°C) dio como resultado las siguientes observaciones:

- La propensión de IL6R304 a formar oligómeros dependía del tampón y el excipiente: estaban formándose aproximadamente 2 veces menos oligómeros en tampón L-histidina en comparación con tampón fosfato, mientras que la presencia de un azúcar no reductor suprimió la magnitud de la oligomerización de IL6R304 incluso adicionalmente;
- La estabilidad química de IL6R304 era mejor en tampón L-histidina en comparación con tampón fosfato;
- La actividad de unión a HSA se mantenía durante más tiempo en tampón L-histidina en comparación con tampón fosfato.

Ejemplo 2.8: Estabilidad bajo estrés por agitación

Se formuló IL6R304 a 1 mg/ml en los 10 diferentes tampones mostrados en la tabla 21. Se agitaron alícuotas de 5 ml a velocidad máxima durante hasta 24 horas a 2-8°C. Se analizaron muestras tras 2, 4 y 24 horas de agitación.

Todas las disoluciones permanecieron transparentes tras 2 horas de agitación (tabla 25). Se observó un aumento en la turbidez en seis de diez tampones tras 4 horas. La mayor opalescencia estaba presente en el tampón 10. Globalmente, el aumento en la turbidez era más pronunciado en los tampones fosfato (tampón 6-10). Se confirmaron estas observaciones tras la determinación del índice de agregación, definido como $100 * DO_{350} / (DO_{280} - DO_{350})$ (figura 31). No se observaron agregados solubles durante SE-HPLC de las diferentes muestras.

En conclusión, los datos de estrés por agitación sugieren una estabilidad al estrés por agitación algo mejor de IL6R304 en L-histidina, pH 6,5 en comparación con tampón fosfato, pH 6,5. No se observaron diferencias significativas entre los diversos excipientes, aunque se observó una turbidez ligeramente superior en presencia de trehalosa al 10% y manitol al 2,5%/sacarosa al 5%.

Ejemplo 2.9: Estudio de estabilidad a largo plazo a -70°C, +5°C y +25°C

Se almacenó el lote de IL6R304 CMC-D-0048, formulado en L-histidina 15 mM, sacarosa al 8%, Tween80 al 0,01% (pH 6,5) a 10,52 mg/ml, durante 6 meses a -70°C, +5°C y +25°C. Se analizaron muestras tras 3 y 6 meses de almacenamiento mediante inspección visual (aspecto), A280 (contenido), SEC-HPLC, cIEF, RP-HPLC y ensayos de potencia (ensayo de inhibición de IL6R y ensayo de unión a HSA). Se resumen los resultados en la tabla 42, tabla 43 y tabla 44 para el almacenamiento a -70°C, +5°C y +25°C, respectivamente.

No hubo cambios significativos en aspecto, contenido, potencia, cIEF y perfiles de HPLC entre la muestra control (punto de tiempo de 0 meses) y todas las muestras de prueba almacenadas a -70°C o 5°C, lo que indica que IL6R304 es estable durante al menos 6 meses en estas condiciones. Con respecto a la muestra almacenada a +25°C, se hicieron las siguientes observaciones al comparar los resultados de las muestras sometidas a estrés y la muestra control:

- 15 - SE-HPLC: hay un aumento pequeño, aunque gradual en el área de superficie del pico previo (oligómeros) y el pico posterior (fragmentos de degradación).
- cIEF: está formándose un pico posterior que se cree que corresponde a la variante de piroglutamato.
- 20 - RP-HPLC: están formándose tres nuevos picos, es decir un pico previo, lo más probablemente correspondiente a fragmentos de degradación que están presentes en las muestras (véanse también los datos de SEC-HPLC) y dos picos posteriores aún no identificados. El área de superficie del pico previo 2 y el pico posterior 2 (piroglutamato) aumentan gradualmente con el tiempo de incubación prolongado.
- 25 - No se observa pérdida de potencia en las muestras almacenadas durante hasta 6 meses a +25°C.

Ejemplo 3: Formulación y estudios de estabilidad con nanocuerpos que se unen a IL23

Ejemplo 3.1: Materiales y métodos usados en el estudio

3.1.1 Dominios variables individuales

231L0064 (SEQ ID NO: 5; EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSACAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKG RELVATINSGSRYYADSVKGRFTISRDNSSKCLYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSVSGSPNFWGQGLVTVSSGGGG SGGSEVQLVESGGGLVQPNSLRSLRSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTIS RDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSLRQQGLTVTVSSGGGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSACA ASGRTLSSYAMGWFRQAPGKGRFVSRISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAKDP SPYYRGSAYLLSGSYDSWGQGLVTVSS) se ha descrito como SEQ ID NO: 2616 en el documento WO 2009/068627. 231L0064 consiste en tres dominios variables humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada: 119A3v16 y 81A12v4, que se unen a epítopos diferentes de p19 de IL23 y el ALB8 que se une a HSA. 231L0075 (SEQ ID NO: 6; EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSACAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGRVATINSGSRYYADSVK GRFTISRDNSSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSVSGSPNFWGQGLVTVSSGGGGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLRSLRSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPED TAVYYCTIGGSLRSSLRQQGLTVTVSSGGGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSACAASGRTLSSYAMGWFRQAP GKGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSW GQGLVTVSS) se ha descrito como SEQ ID NO: 2622 en el documento WO 2009/068627. 231L0075 consiste en tres dominios variables humanizados de un anticuerpo de llama de cadena pesada: 119A3v16 y 81A22v5, que se unen a epítopos diferentes de p19 de IL23 y el ALB8 que se une a HSA. Las subunidades en ambos nanocuerpos se fusionan de cabeza a cola con un ligador 9G/S.

Se expresaron 231L0064 (3,79 mg/ml en D-PBS) y 231L0075 (4,21 mg/ml en D-PBS) en *Pichia pastoris*. Tras clarificar el caldo de fermentación por medio de una etapa de centrifugación, seguida por una etapa de TFF, se capturaron los nanocuerpos en MabCapture A (Poros), seguido por una elución a pH 2,6 usando glicina 100 mM. Se realizó un intercambio de tampón a D-PBS 1/10, y se pulieron adicionalmente los nanocuerpos en Poros 50HS (Poros). Finalmente, se realizó un tratamiento con OGP 50 mM para la eliminación de LPS, seguido por una etapa de exclusión molecular final usando Superdex 75 pg (GE Healthcare).

Se usaron muestras no sometidas a estrés en D-PBS u otras formulaciones como material de referencia para analizar las muestras de estabilidad en almacenamiento.

3.1.2 Otros reactivos críticos

En la tabla 26 se facilitan los reactivos usados en el estudio. La composición completa de D-PBS era NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, fosfato de sodio dibásico 10 mM, fosfato de potasio monobásico 2 mM.

3.1.3 Equipo y métodos para las mediciones

Se llevaron a cabo experimentos de HPLC en un instrumento de la serie Agilent 1200 de Agilent Technologies (Palo Alto, EE.UU.). Las columnas usadas fueron:

- RP-HPLC: Zorbax 300SB-C3 5 micrómetros, 4,6 X 150 mm (Agilent, n.º de cat. 883995-909) o Zorbax 300SB-C8 5 micrómetros, 4,6 X 150 mm (Agilent, n.º de cat. 883995-906);
- SE-HPLC: TSKgel G2000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Japón; n.º de parte 08540).
- IEX-HPLC: ProPac WCX-10, 4x250 mm, 10 µm (Dionex).

Se realizaron las determinaciones de concentración de los nanocuerpos con NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific), con un espectrofotómetro Uvikon 943 (Kontron Instruments) o con un biofotómetro Eppendorf 6131 a 280 nm.

Se midió la distribución de tamaño de partícula en un contador de partículas SVSS-C de PAMAS (PARTikelMess- und AnalyseSysteme GMBH).

Se realizó la medición de osmolalidad con un osmómetro modelo 3320 de Advanced Instruments.

Se realizó el ensayo de desplazamiento térmico en un dispositivo de Q-PCR LightCycler480 (Roche).

Para la determinación de la T_m, se usó un calorímetro diferencial de barrido VP-capillary automatizado (DSC, MicroCal).

Se midió la dispersión elástica de la luz en un espectrofluorómetro Jasco (FP-6500).

3.1.4 Ensayo de pureza de los nanocuerpos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de exclusión molecular (SE-HPLC)

El ensayo de SE-HPLC consistía en una columna de gel de sílice TSKgel G2000SW_{XL} preempaquetada equipada con un filtro de precolumna de columna de guarda, una fase móvil que consistía en KCl, NaCl y tampón fosfato pH 7,2 (D-PBS) y detección UV a 280 nm. Se expresó la cantidad relativa de impureza proteica específica como el % de área, y se calculó dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza proteica específica entre el área total integrada.

3.1.5 Ensayo de pureza de los nanocuerpos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

En el ensayo de RP-HPLC, se usó una columna Zorbax 300SB-C3 o una columna Zorbax 300SB-C8 (Agilent Technologies, Palo Alto, EE.UU.). Se determinó la cantidad relativa de una impureza proteica específica midiendo la absorbancia de luz de los componentes que eluían de la columna de RP-HPLC. Se calculó la cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como el % del área, dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza entre el área total integrada.

3.1.6 Ensayo de pureza de los nanocuerpos mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio iónico (IEX-HPLC)

El ensayo de IEX-HPLC combinaba el uso de una columna de intercambio catiónico débil Dionex ProPac WCX-10 preempaquetada, una fase móvil que consistía en tampón citrato pH 5,5 y detección UV a 280 nm. Tras cargar la(s) proteína(s) en la columna, se eluyeron los materiales unidos mediante un gradiente de cloruro de sodio. Se calculó la cantidad relativa de la proteína, variante o impurezas específicas expresadas como el % de área dividiendo el área de pico correspondiente a la proteína específica o a cualquier impureza proteica entre el área total de todos los picos integrados.

3.1.7 Medición de la distribución de tamaño de partícula (PAMAS)

Se realizaron las mediciones en el contador de partículas SVSS-C de PAMAS tal como sigue: Se diluyeron 100 µl de muestra 1/10 en 1 ml de agua MilliQ y se realizaron 10 mediciones consecutivas en los 16 canales (conjunto de diámetros de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 50, 100, 150 y 200 µm). Para el cálculo del valor promedio, se excluyeron las primeras 2 mediciones y se tuvo en cuenta el factor de dilución. Los resultados se facilitan como datos acumulativos (recuentos de partículas totales >x µm) o datos diferenciales (recuentos de partículas totales de diámetro entre x e y µm). Sólo se presentan los datos acumulativos.

3.1.8 Isoelectroenfoque capilar (cIEF)

El isoelectroenfoco capilar (cIEF) es una técnica de análisis/separación que diferencia proteínas con respecto a la carga, es decir, separa proteínas según sus puntos isoeléctricos (pI). El principio de separación es similar a IEF basado en gel/en lecho plano pero difiere principalmente en su formato, es decir, la separación tiene lugar en un tubo abierto de formato estrecho (capilar) eliminando la necesidad de cualquier soporte de matriz anticonvectiva. Además, cIEF es un instrumento completamente automatizado con detección y adquisición de datos en línea. Una desventaja de cIEF tradicional en un instrumento de CE convencional es que las zonas enfocadas (estacionarias) deben movilizarse pasada el área de detección de un único punto con el fin de registrar la señal. Durante la movilización las zonas pueden ensancharse con pérdida contaminante de resolución y disminución de la capacidad de detección. Además, el tiempo de análisis y el riesgo de agregación/precipitación de proteínas aumentarán. Mediante la obtención de imágenes de cIEF el procedimiento de enfoque se sigue en tiempo real a lo largo de toda la columna/capilar mediante una cámara CCD excluyendo la etapa de movilización. Tan pronto como el proceso de enfoque se completa se finaliza la ejecución de análisis.

15 Ejemplo 3.2: Temperatura de fusión de los nanocuerpos

La medición de la temperatura de fusión de una proteína en diferentes tampones es un modo más rápido para examinar tampones en los que la proteína tiene la mayor estabilidad física. Se acepta generalmente que esto será predictivo para la estabilidad a largo plazo a temperaturas inferiores. La temperatura de fusión puede determinarse usando muchas técnicas diferentes.

20 3.2.1 Temperatura de fusión de 23IL0064 en diferentes tampones de formulación medida mediante ensayo de desplazamiento térmico

25 Se usó el ensayo de desplazamiento térmico (TSA), que mide el cambio en la intensidad de fluorescencia cuando el Sypro Orange se une a las partes hidrófobas de la proteína que está sometándose a desplegamiento térmico. Se realizó el ensayo de desplazamiento térmico en el dispositivo de Q-PCR LightCycler480 (Roche) haciendo uso de placas de 96 pocillos.

30 En un primer estudio, se evaluó el efecto de la pareja de tampón, la fuerza iónica y el pH sobre la estabilidad termodinámica de 23IL0064 en un experimento de análisis de desplazamiento térmico. En la tabla 28 se presentan los tampones sometidos a prueba. Se sometió a prueba cada tampón a un intervalo de pH que abarca 1 unidad de pH alrededor de su pKa. En la figura 32 se presenta un resumen de los resultados. Las temperaturas de fusión disminuyeron con la concentración salina creciente. Además pH 5,2 y pH 5,5 parecían ser menos favorables en comparación con pH 6,2 y por encima. Los mejores tampones fueron HEPES (pH 7 y 8) e histidina pH 6,5. En todos los tampones, la adición de manitol aumentó ligeramente las temperaturas de fusión.

35 3.2.2 Temperatura de fusión de 23IL0064 y 23IL0075 en diferentes tampones de formulación medida mediante ensayo de desplazamiento térmico y calorimetría diferencial de barrido (DSC)

40 Se analizaron 23IL0064 y 23IL0075 en paralelo en diferentes tampones de formulación y purificación mediante el ensayo de desplazamiento térmico (TSA) (tablas 34) y DSC (tabla 33). Para ambas moléculas y en todos los tampones sometidos a prueba (acetato, MES, HEPES, TRIS e histidina), las temperaturas de fusión disminuyeron con la concentración creciente de NaCl, y las temperaturas de fusión eran las más altas en presencia de manitol.

45 3.2.3 Temperatura de fusión de 23IL0075 en una amplia gama de tampones de formulación medida mediante ensayo de desplazamiento térmico

50 Se examinó la temperatura de fusión para 23IL0075 en otra gama de tampones y un intervalo de pH inferior mediante TSA. Para esto, se estableció un diseño de experimentos para investigar la Tm de 23IL0075 variando los siguientes parámetros: intervalo de pH entre 5 y 6, concentración de tampón entre 10 y 50 mM, y 4 tampones diferentes: histidina, acetato, fosfato y succinato. Se realizó un diseño factorial completo + diseño compuesto central, en total se sometieron a prueba 22 tampones diferentes en 84 experimentos. Se dividieron los experimentos sobre dos placas de 96 pocillos, en la segunda placa se expandió el intervalo de pH hasta 4,8 y 6,2, y la concentración de tampón hasta 7 y 65 mM. El tampón fosfato sólo se sometió a prueba a pH 6 y 6,2. A partir de los resultados experimentales, se construyó un modelo para cada tampón que se usó para predecir la Tm como función de la concentración de tampón y el pH. Se muestran los resultados en la tabla 35.

60 Globalmente, el succinato tenía claramente los menores valores de Tm predichos. Para acetato e histidina a bajas concentraciones y alto pH se obtuvieron los mayores valores de Tm predichos. De hecho, el modelo mostró para todos los tampones los mayores valores de Tm predichos para las menores concentraciones de tampón. Según la optimización numérica mediante Design-Expert del modelo el mejor tampón era tampón histidina pH 6,2 (conveniencia 1), seguido estrechamente por acetato pH 6 (conveniencia 0,96) y fosfato pH 6 (conveniencia 0,90).

65 3.2.4 Confirmación de Tm mediante calorimetría diferencial de barrido

Se confirmó la determinación de T_m mediante calorimetría diferencial de barrido en los tampones seleccionados en el ejemplo 3.2.3. Los resultados se muestran en el gráfico de la figura 33. Las tendencias eran idénticas a lo que se observó en el TSA aunque los valores absolutos de la T_m eran superiores: alrededor de 62°C en DSC en comparación con alrededor de 59°C en el TSA.

5 3.2.5 Temperatura de fusión de 23IL0075 en una gama de tampones de formulación para explorar una amplia gama de excipientes medida mediante ensayo de desplazamiento térmico

10 Se preparó un segundo diseño de experimentos (DOE) para estudiar la influencia de algunas combinaciones de excipientes sobre la estabilidad termodinámica de 23IL0075. Se estudió la combinación de un azúcar o un poliol (manitol, sacarosa o sorbitol) con un aminoácido (glicina o mezcla de arginina/ácido glutámico), y un detergente no iónico (Tween 80, Tween 20 o P-F68). Se sometieron a prueba estas combinaciones en tres tampones (acetato 10 mM pH 5,5, histidina 10 mM pH 6,0 y fosfato 10 mM pH 6,0) (véase la tabla 35). Basándose en las temperaturas de fusión medidas, se calcularon las composiciones de tampón óptimas (véase la tabla 36). Se predijeron las temperaturas de fusión más altas para el tampón histidina, las temperaturas de fusión más bajas para el tampón fosfato. Para los tres tampones la sacarosa resultó ser el mejor excipiente, la mezcla de arginina y ácido glutámico el peor. Manitol y sorbitol, solos o en combinación con glicina también eran buenos como excipiente, aunque siempre dieron una T_m un poco más baja que la sacarosa. Glicina sola no era tan eficaz.

20 Ejemplo 3.3: Solubilidad de los nanocuerpos

3.3.1 Experimentos de concentración para determinar la solubilidad de 23IL0064

25 Se concentró gradualmente el nanocuerpo frente a IL23 23IL0064, respectivamente en tampón D-PBS, en NaFosfato 10 mM pH 7 con NaCl 50 mM y en L-histidina 40 mM pH 6 con NaCl 50 mM, con un concentrador Vivaspin (Vivascience MWCO de 5.000 concentradores de 0,5 ml y 5 ml). Durante el experimento de concentración, se mezcló suavemente el material retenido de manera regular y se determinó la concentración mediante mediciones de DO280. Se verificó la presencia de agregados insolubles en el material retenido comprobando la concentración de proteína antes y después de la centrifugación a velocidad máxima en una centrífuga Eppendorf de sobremesa. 30 En los tres tampones pudo alcanzarse una concentración de 50 mg/ml sin precipitación visual. Entonces se transfirió la disolución de proteína desde el concentrador Vivaspin® de 5 ml hasta el de 0,5 ml y se concentró a una fuerza centrífuga mucho más alta (15000xg en lugar de 1500xg). Esto provocó una concentración adicional rápida, y concentraciones locales próximas a la membrana eran incluso mucho más altas que la concentración promedio medida tras la recuperación del material retenido. En la tabla 27 se resumen las concentraciones finales logradas, obtenidas tras pipetear arriba y abajo el material retenido, y centrifugación para eliminar el precipitado.

Se analizaron también todas las muestras mediante SE-HPLC. La concentración en tampón D-PBS dio como resultado un aumento en el % de pico previo. En el tampón fosfato 10 mM y en el tampón histidina 40 mM, ambos con NaCl 50 mM, el perfil de SE-HPLC permaneció exactamente igual a 83 y 150 mg/ml en comparación con el material de partida (figura 34). Se usó un método de SE-HPLC genérico sobre una columna BioSep SEC S-2000 de Phenomenex, con D-PBS como fase móvil a 0,2 ml/min.

Se diluyó una muestra de las disoluciones de proteína 23IL0064 concentradas hasta 55 mg/ml usando los respectivos tampones para su uso adicional en el método de precipitación de PEG.

45 3.3.2 Determinación de la solubilidad teórica de 23IL0064

Se determinó la solubilidad teórica de 23IL0064 usando el método de exclusión de PEG en tampón D-PBS, en NaFosfato 10 mM pH 7, NaCl 50 mM, y en L-histidina 40 mM pH 6, NaCl 50 mM. En resumen, se incubó una disolución de nanocuerpos concentrada (55 mg/ml) en el respectivo tampón durante 15 minutos a temperatura ambiente en presencia de concentraciones crecientes de PEG6000. Tras la centrifugación a 20000 x g durante 3 minutos, se representaron gráficamente los valores logarítmicos de la [concentración de proteína soluble] frente a la concentración de PEG6000 (figura 35). Mediante análisis de regresión y extrapolación a una concentración cero de PEG6000, pudo obtenerse la concentración máxima teórica de proteína (y por tanto los valores de solubilidad) para el nanocuerpo en los tampones sometidos a prueba.

60 Cuando se extrapoló a partir de los gráficos de regresión hasta una concentración cero de PEG6000, se calculó un valor de solubilidad teórico de 60 mg/ml y de 288 mg/ml para 23IL0064 en D-PBS y en tampón fosfato 10 mM/NaCl 50 mM respectivamente. 23IL0064 mostró una solubilidad extremadamente buena en el tampón histidina: en el experimento que comienza a partir de 55 mg/ml sólo a una concentración de PEG del 27% la proteína comenzó a precipitar ligeramente. Por tanto se repitió el experimento con la proteína disuelta a 150 mg/ml. Entonces sólo se produjo precipitación a PEG al 10%, pero entonces no quedaba volumen para las mediciones de DO. Por tanto la solubilidad era realmente demasiado alta como para obtener un valor en este ensayo.

65 En conclusión, se obtuvo la mayor solubilidad en histidina 40 mM pH 6 con NaCl 50 mM. En tampón fosfato con NaCl 50 mM, la solubilidad era mejor que en D-PBS (con NaCl 137 mM).

3.3.3 Determinación de la solubilidad teórica de 23IL0064 y 23IL0075

Se determinó la solubilidad teórica para 23IL0064 y 23IL0075 usando el método de exclusión de PEG en NaFosfato 10 mM pH 7, NaCl 50 mM, y en L-histidina 40 mM pH 6, NaCl 50 mM (los mismos tampones que se usaron en el estudio de solubilidad previo para 23IL0064 descrito anteriormente). Las gráficas (figura 36 y figura 37) que representan la concentración de proteína en el sobrenadante como función del % de concentración de PEG eran muy similares a las obtenidas en el experimento previo. De nuevo la solubilidad aparente en histidina era más alta que en el tampón fosfato, y no pudo calcularse debido a la precipitación mínima en las condiciones de proteína (5 mg/ml) y PEG (26,7%) usadas. La solubilidad calculada en tampón fosfato pH 7 para 23IL0064 y 23IL0075 era más baja que en el experimento previo, es decir de 55 y 42 mg/ml respectivamente, mientras que se observó hasta 288 mg/ml en el experimento anterior. Sin embargo, debe resaltarse que estos experimentos se realizaron pipeteando volúmenes extremadamente bajos de disoluciones altamente viscosas, y por tanto los números absolutos de solubilidad deben confirmarse con otras técnicas.

Ejemplo 3.4: Estudios de estabilidad con estrés para 23IL0064 en D-PBS

Se realizó un estudio de estabilidad con estrés a 37°C inicial en D-PBS. Se esterilizó el lote original a través de un filtro de 0,22 µm y se almacenaron 500 µl a 37°C en viales Eppendorf de 1,5 ml para cada punto de tiempo (4, 8, 12, 16, 20 y 24 semanas). Adicionalmente, se almacenaron aproximadamente 9x 100 µl a -20°C (referencia). Se analizó ya una primera muestra tras 3 semanas usando SE-HPLC y se detectó un pico previo de agregados (3%) (figura 38). Tras 4 semanas a 37°C, se redujo el área de pico total en SE-HPLC y en RP-HPLC hasta sólo la mitad de la muestra de referencia (figuras 38 y 39). Por tanto, se decidió terminar prematuramente el estudio de estabilidad. En algunas de las muestras restantes se midió todavía el contenido mediante DO280 tras la centrifugación. Se confirmó la pérdida de material en la muestra a 37°C de 4 semanas a través de precipitación (se centrifugaron todas las muestras antes del análisis) en las 3 muestras adicionales sometidas a estrés durante 6 semanas a 37°C: en 2 de las 3 muestras se perdió la mitad del material (tabla 29).

Puede concluirse que 23IL0064 en D-PBS formaba fácilmente agregados que precipitan tras el almacenamiento durante 4 semanas a 37°C. En el análisis de RP-HPLC de la muestra sometida a estrés a 37°C, también se observó un pico posterior del 12% correspondiente a la formación de piro-glutamato N-terminal (figura 41).

Ejemplo 3.5: Estudio de estabilidad con estrés para 23IL0064 en tampón histidina

A partir de los resultados descritos en los ejemplos previos sobre la solubilidad, el ensayo de desplazamiento térmico y la estabilidad con estrés a 37°C en D-PBS para 23IL0064, se concluyó que fosfato no era el tampón óptimo para la formulación de 23IL0064. En el TSA descrito en el ejemplo 3.2.2, se exploraron algunos posibles tampones de formulación y se obtuvieron las mayores T_m en histidina a pH 6,5, HEPES pH 7 y HEPES pH 8. En el experimento de solubilidad (véase el ejemplo 3.3) la solubilidad en histidina 40 mM pH 6, con NaCl 50 mM era muy alta. Por tanto se decidió someter a prueba la estabilidad en almacenamiento en tampón histidina. En la tabla 30 se facilita una lista de tampones de formulación sometidos a prueba. El objetivo de este sistema era comparar histidina pH 6,5 con histidina pH 6, investigar la influencia de algunos excipientes usados comúnmente y la influencia de una concentración superior sobre la estabilidad (diferencia entre 5 mg/ml y 22 mg/ml). También se incluyó una muestra en HEPES pH 8, que va a someterse a prueba sólo tras 3 semanas a 37°C.

Para este estudio, se dializaron 3,2 ml del lote original frente al tampón HEPES 20 mM pH 8 y se dializaron aproximadamente 65 ml (aproximadamente 246 g) frente al tampón histidina 20 mM pH 6,5. Se añadieron los excipientes en disoluciones concentradas (2x), y se preparó la muestra a pH 6 añadiendo HCl. Entonces se concentraron las muestras hasta aproximadamente 5 mg/ml, se esterilizaron a través de un filtro de 0,22 µm y se tomaron alícuotas en tubos Eppendorf de 1,5 ml (500 µl/tubo Eppendorf) para su almacenamiento en las diferentes condiciones.

3.5.1 Estabilidad durante congelación-descongelación

Se sometió una muestra de cada una de las formulaciones anteriores en histidina a 10 ciclos de congelación/descongelación. Se analizaron las muestras mediante RP-HPLC y contenido en DO280. No se observaron diferencias con la muestra de referencia (una congelación/descongelación).

3.5.2 Estrés por cizalladura

Se sometieron dos muestras de cada una de las formulaciones anteriores en histidina a estrés por cizalladura. Se realizó la prueba en una sala fría (4-8°C) en tubos de vidrio pequeños con 300 µl de disolución de proteína, se agitaron con una barra magnética durante 4 y 8 horas a una velocidad de rotación media.

En todas las muestras sometidas a estrés con 4 y 8 horas de cizalladura estaba presente una opalescencia clara. Se

cuantificó esto mediante análisis del contenido en DO280 tras la centrifugación de las muestras. El análisis mediante SE-HPLC no reveló ningún agregado. El análisis de RP-HPLC tras 4 horas de estrés por cizalladura no mostró degradación, pero tras 8 horas de estrés apareció algo de aumento del pico previo no resuelto, especialmente en la muestra concentrada. Además en SDS-PAGE generalmente no se detectó degradación. En la tabla 31 se facilita una clasificación en bruto basándose en la opalescencia y la pérdida de material en el análisis de contenido.

3.5.3 Almacenamiento a 4°C, 25°C y 37°C durante 6 semanas

Se realizó el primer análisis tras 2,5 semanas en almacenamiento a 25°C y 37°C. Se analizaron las muestras en RP-HPLC (véase también la tabla 32), SE-HPLC, SDS-PAGE y DO 280/350. Se observó muy poca degradación tras 2,5 semanas (datos no mostrados). Los resultados tras 6 semanas de almacenamiento a 37°C se comentan a continuación (para la muestra en HEPES pH 8, se comentan los resultados de 2,5 semanas a 37°C).

Análisis de RP-HPLC

Se realizó análisis de RP-HPLC principalmente para detectar degradación química. El estrés a 25°C y a 37°C provocaba normalmente un aumento en el pico posterior correspondiente al piroglutamato N-terminal. Este pico posterior aumentó menos en el tampón histidina a pH 6 que en pH 6,5, y lo más rápidamente en el tampón HEPES pH 8: por ejemplo tras 2,5 semanas a 37°C había un pico posterior de piroglutamato del 11% en HEPES pH 8, del 7% en histidina pH 6,5 y del 5% en histidina pH 6 (datos no mostrados).

Además apareció un segundo pico posterior desconocido. En la figura 40 se facilita un resumen de los datos de integración. En la figura 41 se facilita una superposición entre los cromatogramas obtenidos para las diferentes temperaturas de almacenamiento de 23IL0064 en tampón histidina a pH 6,5 a 22 mg/ml.

Análisis de SE-HPLC

Para las muestras a 5 mg/ml sometidas a estrés durante 6 semanas a 37°C, se observaron pequeñas cantidades de agregados (entre el 0,5 y el 1%). Se integraron los picos. Los picos previos y posteriores separados nunca fueron superiores al 1 por ciento.

Sin embargo, para la muestra a 22,4 mg/ml, se detectó un 3% de agregados en la muestra almacenada a 37°C.

Análisis de SDS-PAGE

El análisis mediante SDS-PAGE mostró poca degradación. Para las muestras sometidas a estrés a 37°C durante 6 semanas, se observó un ligero aumento en la intensidad de una banda de degradación a un Mw de aproximadamente 27 kDa y estaban presentes algunas bandas finas bajo la banda principal (figura 42). No se observaron diferencias entre los diferentes tampones de formulación.

Análisis de DO280, DO350 y partículas subvisibles

Se analizaron adicionalmente todas las muestras en el estudio de estabilidad en almacenamiento para determinar su contenido en nanocuerpos (mediante DO280), para determinar su opacidad (mediante DO350) y para detectar partículas subvisibles (mediante PAMAS). Se obtuvieron resultados muy similares entre la referencia y las muestras de almacenamiento a diferentes temperaturas (datos no mostrados).

Ejemplo 3.6: Dispersión elástica de la luz

Se determinó la tendencia para la formación de agregado de 23IL0075 en los diferentes tampones de formulación usando dispersión elástica de la luz medida a un ángulo de 90° mediante desnaturalización inducida por temperatura tal como se mide en el espectrofluorómetro Jasco (longitud de onda de excitación y emisión 500 nm). En primer lugar se buscó la concentración de proteína óptima, usando el tampón fosfato 10 mM pH 6,0. A concentraciones de 23IL0075 175 µg/ml o inferiores no se observó aumento en la intensidad de dispersión en el intervalo de temperatura sometido a prueba: (45-95°C). Sólo a 250 µg/ml se observó dispersión. La curva parecía presentar dos transiciones, lo que podría indicar la formación de dos tipos de agregados diferentes (véase la figura 43).

Se repitió el experimento para los tampones acetato e histidina, ambos a pH 6,0. Las temperaturas de comienzo de la agregación en los tres tampones eran muy similares (tabla 37). La principal diferencia entre los tres tampones era la dispersión máxima: permaneció dentro del intervalo del detector (alrededor de 435 abs) para histidina mientras que se salió del intervalo en el tampón fosfato así como en el acetato (figura 44 y 45). En histidina la segunda transición estaba ausente (figura 46). Puesto que la dispersión es proporcional al nivel de agregados formados, esto indicó que la histidina 10 mM sería un tampón de formulación más óptimo que acetato 10 mM y fosfato 10 mM pH 6.

Ejemplo 3.7. Estudio de congelación/descongelación y estrés por cizalladura sobre 23IL0075 en un tampón de formulación histidina, acetato y fosfato con manitol o una mezcla de un manitol y glicina como excipientes, y un

detergente no iónico como tensioactivo

Se ha investigado la sensibilidad de 231L0075 a la congelación/descongelación y a la cizalladura o agitación en diferentes tampones de formulación candidatos (véase la tabla 38). El estudio de estrés por congelación/descongelación consistía en 10 ciclos: se congelaron 100 µl de muestra en un tubo Eppendorf a -20°C hasta que se congelaron completamente, y se descongelaron a temperatura ambiente durante 30 minutos seguido por mezclado suave. Se realizó la prueba de estrés por cizalladura en una sala fría (4-8°C) en tubos de vidrio pequeños con 150 µl de disolución de proteína; se agitó la disolución de proteína con una barra magnética durante 4 horas a una velocidad de rotación media. Se analizaron todas las muestras mediante RP-HPLC, SE-HPLC y DO500, algunas muestras también mediante Biacore. En RP-HPLC, no se detectó influencia de la cizalladura o congelación/descongelación.

En SE-HPLC, dependiendo del tampón de formulación, el estrés por congelación/descongelación provocó un aumento en el % de pico previo hasta el 2,5% (figura 47 (B)). Una mezcla de manitol y glicina protegió mejor contra el estrés por congelación/descongelación que sólo manitol como excipiente (figura 47).

En las muestras sometidas a estrés por cizalladura casi no se detectó ningún aumento en el % de pico previo en SE-HPLC pero se midió hasta 10 veces más opalescencia (DO500) que en las muestras de congelación/descongelación. La densidad óptica a 500 nm (DO500) aumentó en las muestras con agitación y se correlacionó con la opalescencia en las muestras. Se concluye que en el tampón histidina con poloxámero al 0,05% o con Tween 80 al 0,005% la opalescencia seguía siendo la más baja (figura 48).

Ejemplo 3.8. Estudio de estabilidad en congelación/descongelación, estrés por cizalladura y estrés de temperatura (37°C) para 231L0075 en un tampón de formulación histidina con diferentes combinaciones de excipientes.

Basándose en las conclusiones del ejemplo 3.7, se sometió a prueba adicionalmente la estabilidad en congelación/descongelación, estrés por cizalladura y estrés de temperatura (37°C) en diferentes tampones de formulación histidina (figura 49 y figura 50). Se sometieron a prueba diferentes excipientes en una formulación con 25 mg/ml de proteína. En la tabla 39 se presenta un resumen de los tampones de formulación sometidos a prueba en estabilidad a C/D y en almacenamiento. En la figura 49 se presentan los resultados de las mediciones de DO500 y SE-HPLC tras estrés por congelación/descongelación. Se observó un aumento insignificante de DO500. En SE-HPLC, se observó un aumento de oligómeros sólo para la muestra con manitol al 5,4% como excipiente. La tabla 40 presenta los tampones sometidos a prueba para el estrés por cizalladura. En este caso no se incluyeron detergentes, para imitar la situación durante la etapa de concentración final del procedimiento de DSP. En la figura 50 se presentan los resultados de DO500, SE-HPLC y Biacore obtenidos tras 4 horas de agitación de la formulación. La agitación de la muestra provocó un aumento en la absorción de DO500, pero no influencia sobre el % de oligómeros solubles tal como se midió mediante SE-HPLC. Estas muestras también se sometieron a prueba para determinar la unión a albúmina en Biacore. Se concluye que la proteína se protegía de la mejor forma frente al estrés por cizalladura mediante sacarosa al 10%, seguido por una mezcla de manitol y glicina como excipientes. Mediante la comparación de los valores con los valores del ejemplo 3.7, se observa que los resultados eran reproducibles, y que para el estrés por cizalladura la adición de algún detergente era beneficiosa.

Se analizaron las muestras de estabilidad acelerada a 25 mg/ml en los diferentes tampones de formulación candidatos mediante DO500, SE-HPLC y RP-HPLC tras 3 y 6 semanas de almacenamiento. En SE-HPLC, el aumento de oligómeros sólo se observó a 37°C (figura 51). En RP-HPLC el pico posterior correspondiente al piroglutamato aumentó desde el 3% hasta el 4% tras 6 semanas de almacenamiento a 25°C, pero hasta el 9% en promedio tras 6 semanas a 37°C. En la tabla 41 se muestran los resultados de RP-HPLC y SE-HPLC tras 3 y 6 semanas de almacenamiento a 37°C y 6 semanas a 25°C. Los valores de DO500 siguieron siendo para todos los tampones (excepto para un resultado atípico) inferiores a 0,01.

TABLAS

Tabla 1. Resumen de los diferentes tampones de formulación de RANKL008a usados en pruebas de estabilidad.

Tampón	Concentración de RANKL008a (mg/ml)	Tampón	[NaCl] (mM)	% de manitol (p:v)
1	60	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 10 mM, pH 7	50	0
2	60	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 10 mM, pH 7	100	0
3	60	NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O 10 mM, pH 7	0	10
4	59	Na-acetato 10 mM, pH 5,5	50	0
5	59	Na-acetato 10 mM, pH 5,5	100	0
6	59	Na-acetato 10 mM, pH 5,5	0	10
7	60	L-histidina 20 mM, pH 5,5	50	0
8	60	L-histidina 20 mM, pH 5,5	100	0

9	60	L-histidina 20 mM, pH 5,5	0	10
10	58	L-histidina 20 mM, pH 6	50	0
11	58	L-histidina 20 mM, pH 6	100	0
12	58	L-histidina 20 mM, pH 6	0	10
13	84,3	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O 10 mM, pH 7	100	0
14	70	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O 10 mM, pH 7	0	5

Tabla 2. Potencias relativas de restos de unión a HSA y RANKL de RANKL008a tras 10 ciclos de C/D tal como se determina mediante los ensayos de potencia de ELISA (inhibición y unión a HSA).

Tampón	Potencia relativa (relativa al material de referencia)	
	RANKL	HSA
Fosfato + NaCl 50 mM, pH 7	0,904	0,767
Fosfato + NaCl 100 mM, pH 7	0,966	0,672
Fosfato + manitol al 10%, pH 7	0,956	0,715
Acetato + NaCl 50 mM, pH 5,5	1,033	0,747
Acetato + NaCl 100 mM, pH 5,5	0,905	0,705
Acetato + manitol al 10%, pH 5,5	0,878	0,737
Histidina + NaCl 50 mM, pH 5,5	0,724	0,723
Histidina + NaCl 100 mM, pH 5,5	0,719	0,670
Histidina + manitol al 10%, pH 5,5	0,692	0,572
Histidina + NaCl 50 mM, pH 6	0,927	0,768
Histidina + NaCl 100 mM, pH 6	0,923	0,680
Histidina + manitol al 10%, pH 6	0,882	0,754

Tabla 3. Datos de integración (% de área de superficie total) de los diferentes picos observados en los cromatogramas de SE-HPLC de RANKL008a tras 10 ciclos de C/D o almacenado a 37°C en diferentes tampones de formulación a todos los puntos de tiempo sometidos a prueba y en comparación con cada muestra de control (cada tampón)

SE-HPLC	Muestra	Fosfato pH 7 NaCl 50 mM 60 mg/ml	Fosfato pH 7 NaCl 100 mM 60 mg/ml	Fosfato pH 7 al 10% 60 mg/ml	Acetato pH 5,5 NaCl 50 mM	Acetato pH 5,5 NaCl 100 mM	Acetato pH 5,5 al 10% 59 mg/ml	Histidina pH 5,5 NaCl 50 mM	Histidina pH 5,5 NaCl 100 mM	Histidina pH 5,5 al 10% 60 mg/ml	Histidina pH 6 NaCl 50 mM	Histidina pH 6 NaCl 100 mM	Histidina pH 6 al 10% 58 mg/ml	
% de pico previo	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ciclos de C/D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 sem. a 37°C	5,6	6,9	1,3	4,6	5,3	2,3	5,5	7,5	0,54	6,3	7,7	0,63	
	3 sem. a 37°C	4,4	6,2	0,65	3,9	5,9	0,18	5,6	7,9	0,34	7,0	8,6	0,39	
	5 sem. a 37°C	13,7	15,8	3,9	11,5	14,2	1,22	14,0	17,1	1,5	16,2	17,4	2,0	
	10 sem. a 37°C	23,8	25,3	11,1	21,0	23,9	3,4	27,2	27,8	5,4	26,8	27,0	7,3	
	control	100	100	100	100	100	100	100	100	100*	100	100	100*	
	10 ciclos de C/D	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
	2 sem. a 37°C	93,5	92,2	97,9	94,8	93,1	98,8	94,0	92,1	98,8	93,1	91,5	96,7	
	3 sem. a 37°C	93,7	92,0	95,2	95,0	92,8	96,9	93,4	91,5	98,6	91,3	90,2	98,8	
% de pico principal	5 sem. a 37°C	81,14	78,87	91,52	87,38	84,63	97,87	84,85	81,73	97,49	82,22	81,19	96,76	
	10 sem. a 37°C	69,2	68,0	80,5	77,5	74,7	95,1	71,3	73,5	93,1	71,3	71,2	91,0	
	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10 ciclos de C/D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	2 sem. a 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	3 sem. a 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	5 sem. a 37°C	3,16	3,36	3,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	% de pico posterior ¹	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		10 ciclos de C/D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		2 sem. a 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3 sem. a 37°C		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5 sem. a 37°C		3,16	3,36	3,12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

	10 sem. a 37°C	3,7	3,5	5,0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% de pico posterior 2	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 ciclos de C/D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2 sem. a 37°C	0,23	0,27	0,19	0,23	0,26	0,19	0,19	0,17	0,19	0,20	0,23	0,18				
	3 sem. a 37°C	0,57	0,58	0,31	0,49	0,53	0,27	0,48	0,55	0,27	0,54	0,5	0,27				
	5 sem. a 37°C	0,41	0,47	0,27	0,37	0,39	0,25	0,45	0,29	0,23	0,52	0,42	0,37				
	10 sem. a 37°C	0,5	0,5	0,3	0,4	0,4	0,2	0,4	0,5	0,2	0,4	0,4	0,3				
% de pico posterior 3	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	10 ciclos de C/D	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	2 sem. a 37°C	0,62	0,64	0,60	0,37	0,41	0,46	0,31	0,26	0,37	0,40	0,58	0,53				
	3 sem. a 37°C	1,15	1,25	1,07	0,52	0,64	0,61	0,49	0,55	0,57	1,12	0,71	0,56				
	5 sem. a 37°C	1,59	1,50	1,49	0,75	0,78	0,66	0,70	0,88	0,78	1,06	0,99	0,87				
	10 sem. a 37°C	2,7	2,6	3,1	1,1	1,0	1,3	1,1	1,3	1,3	1,5	1,4	1,5				

Tabla 4. Datos de integración (% de área de superficie total) de los diferentes picos observados en los cromatogramas de RP-HPLC de RANKL008a tras 10 ciclos de C/D o almacenado a 37°C en diferentes tampones de formulación a todos los puntos de tiempo sometidos a prueba y en comparación con cada muestra de control (cada tampón)

SE-HPLC	Muestra	Fosfato pH 7 NaCl 50 mM 60 mg/ml	Fosfato pH 7 NaCl 100 mM 60 mg/ml	Fosfato pH 7 Manitol al 10% 60 mg/ml	Acetato pH 5,5 NaCl 50 mM	Acetato pH 5,5 NaCl 100 mM	Acetato pH 5,5 Manitol al 10% 59 mg/ml	Histidina pH 5,5 NaCl 50 mM	Histidina pH 5,5 NaCl 100 mM	Histidina pH 5,5 Manitol al 10% 60 mg/ml	Histidina pH 6 NaCl 50 mM	Histidina pH 6 NaCl 100 mM	Histidina pH 6 Manitol al 10% 58 mg/ml
% de pico previo 1	control	0,25	0,14	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0
	10 ciclos de C/D	0,20	0,08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2 sem. a 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3 sem. a 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 5. Datos de integración (% de área de superficie total) de los diferentes picos observados en los cromatogramas de IEX-HPLC de RANKL008a almacenado durante 10 semanas a 37°C en diferentes tampones de formulación.

5

Tampón	% de pico principal	% de pico posterior 1	% de pico posterior 2
Fosfato + NaCl 50 mM, pH 7	69,6	4,4	26,0
Fosfato + NaCl 100 mM, pH 7	67,0	4,5	28,1
Fosfato + manitol al 10%, pH 7	84,6	3,2	12,1
Acetato + NaCl 50 mM, pH 5,5	72,8	2,7	24,4
Acetato + NaCl 100 mM, pH 5,5	69,6	2,8	27,6
Acetato + manitol al 10%, pH 5,5	95,4	0	4,6
Histidina + NaCl 50 mM, pH 5,5	66,0	2,8	31,2
Histidina + NaCl 100 mM, pH 5,5	68,1	2,8	29,0
Histidina + manitol al 10%, pH 5,5	92,8	0	7,2
Histidina + NaCl 50 mM, pH 6	67,4	2,6	30,1
Histidina + NaCl 100 mM, pH 6	67,0	2,6	30,4
Histidina + manitol al 10%, pH 6	88,8	2,6	9,0

Tabla 6. Potencias relativas de los restos de unión a HSA y RANKL de RANKL008a tras 10 semanas a 37°C tal como se mide mediante análisis de Biacore.

Tampón	Potencia relativa	
	RANKL	HSA
Fosfato + NaCl 50 mM, pH 7	81,0	57,4
Fosfato + NaCl 100 mM, pH 7	78,6	56,6
Fosfato + manitol al 10%, pH 7	76,3	66,8
Acetato + NaCl 50 mM, pH 5,5	80,1	63,0
Acetato + NaCl 100 mM, pH 5,5	78,0	59,0
Acetato + manitol al 10%, pH 5,5	80,9	79,4
Histidina + NaCl 50 mM, pH 5,5	80,2	59,7
Histidina + NaCl 100 mM, pH 5,5	73,1	55,0
Histidina + manitol al 10%, pH 5,5	75,2	73,6
Histidina + NaCl 50 mM, pH 6	79,1	59,3
Histidina + NaCl 100 mM, pH 6	78,3	57,5
Histidina + manitol al 10%, pH 6	87,4	83,4

10

Tabla 7. Inspección visual y determinación del contenido de RANKL008a tras dilución hasta 0,28 mg/ml en diferentes diluyentes y paso/almacenamiento en jeringuillas (en referencia a la figura 9).

Muestra*	Inspección visual	Contenido (mg/ml) (intervalo de confianza del 95%)
0028 SOLUCIÓN SALINA TUB	precipitados pequeños	0,265 (0,261-0,270)
0028 SOLUCIÓN SALINA SYR S25/0	precipitados pequeños	0,263 (0,261-0,265)
0028 SOLUCIÓN SALINA SYR S25/24	precipitados pequeños	0,259 (0,256-0,262)
0028 PLACEBO-TW TUB	precipitados pequeños	0,272 (0,271-0,273)
0028 PLACEBO-TW SYR S25/0	precipitados pequeños	0,268 (0,267-0,269)
0028 PLACEBO-TW SYR S25/24	precipitados pequeños	0,268 (0,259-0,276)
0028 PLACEBO+TW TUB	transparente	0,281 (0,281-0,281)
0028 PLACEBO+TW SYR S25/0	ligeramente turbio	0,280 (0,278-0,282)
0028 PLACEBO+TW SYR S25/24	ligeramente turbio	0,279 (0,277-0,281)

* S25/0: almacenamiento a 25°C durante 0 minutos

S25/24: almacenamiento a 25°C durante 24 h

-TW: tampón menos Tween 80

+TW: tampón + Tween 80

PLACEBO se refiere al siguiente tampón: Na₂HPO₄ 10 mM pH 7,0 + NaCl 115 mM

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

Tabla 8. Inspección visual, contenido (intervalo de confianza) y turbidez de RANKL008a diluido hasta 0,28 mg/ml antes (TUB) y después del paso a través de jeringuillas con diferentes tamaños de aguja tal como se describe en el ejemplo 1.8.

Muestra*	Inspección visual	Contenido (mg/ml) (intervalo de confianza)	Razón DO320/278	Razón DO350/278
----------	-------------------	--	-----------------	-----------------

		del 95%)		
0028 PLACEBO+TW TUB	transparente	0,288 (0,275-0,301)	0,0010	0,0019
0028 PLACEBO+TW 18G/18G	transparente	0,285 (0,284-0,286)	0,0003	0,0000
0028 PLACEBO+TW 18G/23G	transparente	0,288 (0,271-0,307)	0,0000	0,0000
0028 PLACEBO+TW 18G/27G	transparente	0,285 (0,279-0,290)	0,0000	0,0002
0028 PLACEBO+TW 18G/30G	transparente	0,286 (0,285-0,287)	0,0005	0,0002
0028 PLACEBO+TW 23G/23G	transparente	0,287 (0,285-0,289)	0,0005	0,0007
0028 PLACEBO+TW 27G/27G	transparente	0,285 (0,284-0,286)	0,0001	0,0005
0028 PLACEBO+TW 30G/30G	transparente	0,287 (0,280-0,294)	0,0007	0,0019

* +TW: tampón + Tween 80

PLACEBO se refiere al siguiente tampón: Na₂HPO₄ 10 mM a pH 7,0 + NaCl 115 mM

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

18G/18G: muestra retirada con una aguja 18G y expelida a través de una aguja 18G

18G/27G: retirada con una aguja 18G y expelida a través de una aguja 27G

Todos los demás códigos son similares a los ejemplos facilitados anteriormente

Tabla 9. Inspección visual, contenido (con un intervalo de confianza del 95%) y turbidez de RANKL008a antes (TUB) y después del paso a través de jeringuillas con diferentes tamaños de aguja tal como se describe en el ejemplo 1.7 a una concentración de 0,28 mg/ml o de aproximadamente 65 mg/ml.

5

Muestra*	Inspección visual	Contenido (mg/ml) (intervalo de confianza del 95%)	Razón DO320/278	Razón DO350/278
0028 PLACEBO+TW TUB	transparente	0,284 (0,283-0,285)	0,0014	0,0010
0028 PLACEBO+TW 27G/27G (3x)	transparente	0,284 (0,283-0,285)	0,0031	0,0021
0028 PLACEBO+TW 29G/29G B	transparente	0,282 (0,280-0,284)	0,0024	0,0010
0028 PLACEBO+TW 29G/29G T	transparente	0,283 (0,282-0,284)	0,0041	0,0033
6500 PLACEBO+TW TUB	transparente	63,5 (62,4-64,6)	0,0019	0,0006
6500 PLACEBO+TW 27G/27G (3x)	transparente	62,9 (62,7-63,1)	0,0015	0,0008

* +TW: tampón + Tween 80

PLACEBO se refiere al siguiente tampón: Na₂HPO₄ 10 mM a pH 7,0 + NaCl 115 mM

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

27G/27G: muestra retirada con una aguja 27G y expelida a través de una aguja 27G

29G/29G: retirada con una aguja 29G y expelida a través de una aguja 29G

T: aguja de Terumo, B: aguja de Becton Dickinson

0028 se refiere a la concentración a 0,28 mg/ml, de 6500 a 65 mg/ml

Tabla 10. Secuencias de proteína de nanocuerpos usados en el ejemplo 2.

IL6R304, SEQ ID NO: 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMAWYRQAPGKRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLVTVSS
IL6R305, SEQ ID NO: 2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMAWYRQAPGKRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGVSFKINVMAWYRQAPGKRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTAV YYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGL VTVSS
IL6R306, SEQ ID NO: 3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMAWYRQAPGKRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLVTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKLEWVSSIISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGLVTVVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMAWYRQAPG KRELVAGIISGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGL VTVSS

- 5 **Tabla 11.** Resumen de los lotes de IL6R usados en la formulación y los estudios de estabilidad descritos en el ejemplo 2.

N.º de lote	Nanocuerpo	Tampón	Concentración
P#051108nr1	IL6R304	PBS	4,58 mg/ml
P#051108nr2	IL6R305	PBS	3,46 mg/ml
P#051108nr2	IL6R306	PBS	5,65 mg/ml
B5#030309nr1.5-9	IL6R304	HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM	3,79 mg/ml
B5#060509nr1	IL6R304	HEPES 25 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM	4,6 mg/ml

Tabla 12. Reactivos usados en la formulación y el estudio de estabilidad descrito en el ejemplo 2

10

Reactivo	Proveedor	N.º de cat.
ACN, calidad para HPLC	Biosolve	N.º de cat. 012007
TFA	Biosolve	N.º de cat. 20234131
Isopropanol, calidad para HPLC	Biosolve	N.º de cat. 162606
Agua de calidad para MilliQ		
D-PBS	Gibco	N.º de cat. 14190-094
NaCl	Merck	N.º de cat. 1.06404.1000
Patrón de filtración en gel	Bio-Rad	N.º de cat. 151-1901
HSA	Sigma	N.º de cat. A3782
L-histidina	Fluka	N.º de cat. 53319
D-Manitol	Fluka	N.º de cat. 17311
Sacarosa	Fluka	N.º de cat. 18219
Glicina	Fluka	N.º de cat. 50058
Tween-80	Merck	N.º de cat. K351 65661 609
L-histidina-HCl monohidratada	Sigma	N.º de cat. 53369
Ácido succínico de sodio hexahidratado	Fluka	N.º de cat. 14158
Base Trizma	Sigma	N.º de cat. T6066-5
Sorbitol	Fluka	N.º de cat. 85529
Xilitol	Sigma	N.º de cat. X3375-100g
Ribitol	Fluka	N.º de cat. 02240
L-Arginina	Fluka	N.º de cat. 11009
MES	Sigma	N.º de cat. M3671
Dihidrogenofosfato de sodio	Merck	N.º de cat. 1.06345.1000
Hidrogenofosfato de sodio	Merck	N.º de cat. 1.06576.1000

Tabla 13. Resumen de los resultados del ensayo TSA. Los valores de Tm obtenidos en los diferentes tampones están codificados desde blanco hasta gris oscuro, es decir desde valores de Tm mayores a menores.

Tampón/pH	Histidina pH 6,5 HEPES pH 7	HEPES pH 8 Fos. pH 6,7	Fos pH 7,7	Succinato pH 6,2	Histidina pH 5,5 Succinato pH 5,2	Tris pH 7 PBS
NaCl	0	100	200	300	400	500
Manitol	7,5%	5%	2,5%	0		
Sacarosa	10%	5%				
Glicina	200 mM	100 mM				

Tabla 14. Resumen de los valores de Tm obtenidos mediante DSC usando IL6R304.

Tampón	Tm (°C) en NaCl 0 mM	Tm (°C) en NaCl 25 mM	Tm (°C) en NaCl 100 mM	Tm (°C) en NaCl 500 mM
Citrato 25 mM pH 3,5	50,21	/	/	/
Acetato 25 mM pH 5,5	61,30	61,21	60,19	58,59
MES 25 mM pH 6,0	62,52	61,83	60,60	58,66
HEPES 25 mM pH 7,0	62,48	62,27	61,13	59,24
Fosfato 25 mM pH 7,0	60,70	/	/	/
Tris 25 mM pH 7,5	61,82	61,82	60,91	59,43

5 **Tabla 15.** Resumen de los resultados de Tm obtenidos mediante DSC y TSA usando IL6R304 formulado en diferentes tampones.

Excipiente(s)	DSC		TSA	
	Tm (°C) en L-histidina 15 mM, pH 6,5	Tm (°C) en fosfato 15 mM, pH 6,5	Tm (°C) en L-histidina 15 mM, pH 6,5	Tm (°C) en fosfato 15 mM, pH 6,5
/	ND	ND	61,09* / 61,11**	60,48 / 60,48
Manitol al 5%	64,74	63,81	61,91 / 61,87	61,34 / 61,31
Sacarosa al 10%	65,40	64,35	62,78 / 63,20	62,34 / 62,78
Trehalosa al 10%	65,28	64,51	62,78 / 63,59	63,17 / 63,61
Manitol al 2,5% + sacarosa al 2,5%	64,37	63,83	61,52 / 61,91	61,53 / 61,30
Sorbitol al 2,5% + trehalosa al 2,5%	64,65	63,85	62,34 / 62,34	62,77 / 62,77
Sorbitol al 2,5% + trehalosa al 2,5% + glicina 1,5 mM	64,83	64,33	62,33 / 62,35	63,19 / 62,96
Trehalosa al 10% + Tween-80 al 0,01%	Fallo de ejecución	63,77	ND	ND

* medición 1, ** medición 2

10 **Tabla 16.** Aspecto visual, espectroscopía de UV y datos de PAMAS que demuestran una solubilidad mayor para IL6R304 en presencia de Tween 80.

	IL6R304 (2 mg/ml) almacenado durante 4 días a 5°C		
	PBS	PBS + Tween 80 al 0,1%	PBS + Tween 80 al 0,2%
Aspecto	Turbio, opaco	Transparente, incoloro	Transparente, incoloro
A320/A280	0,014	0,012	0,009
Recuentos de partículas subvisibles/100 µl			
> 1 µm	157.557	42.243	52.157
> 2 µm	69.471	19.514	21.429
> 3 µm	43.371	12.043	12.743
> 4 µm	29.757	8.329	8.600
> 5 µm	18.300	4.971	4.800
> 6 µm	11.814	3.114	3.143
> 7 µm	8.300	2.300	2.186

> 8 µm	5.900	1.671	1.500
> 9 µm	4.543	1.214	1.086
> 10 µm	3.400	971	800
> 15 µm	800	271	300
> 25 µm	200	100	86
> 50 µm	114	29	14
> 100 µm	86	0	14
> 150 µm	71	0	14
> 200 µm	71	0	14

Tabla 17. Resumen de los diferentes tampones de formulación usados en pruebas de estabilidad inicial de IL6R304, IL6R305 e IL6R306.

Condición	Tampón	[NaCl]	Manitol
1	PBS	0 mM	0%
2	PBS	0 mM	5%
3	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, 10 mM pH 7	100 mM	0%
4	NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O, 10 mM pH 7	100 mM	5%
5	Na-acetato 10 mM, pH 5,5	100 mM	0%
6	Na-acetato 10 mM, pH 5,5	100 mM	5%
7	L-histidina 20 mM, pH 6	100 mM	0%
8	L-histidina 20 mM, pH 6	100 mM	5%

5

Tabla 18. Resumen de los diferentes tampones de formulación usados en pruebas de estabilidad de IL6R304.

Tampón	Concentración de IL6R304	Tampón	% de Tween 80	% de manitol	% de sacarosa	Glicina mM
1	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	/	/	/	/
2	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,01	/	/	/
3	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	/	/	/
4	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	5	/	/
5	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	5	/	200
6	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	2,5	/	100
7	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	/	10	/
8	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	/	/	200
9	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	/	5	100
10	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	2,5	5	/
11	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	/	2,5	5	100
12	10 mg/ml	L-histidina 20 mM	0,05	2,5	5	100

Tabla 19. Métodos usados para evaluar la estabilidad de IL6R304 a diferentes puntos de tiempo (representado como x semanas o sem.) tras almacenamiento a 5°C y 37°C.

10

Método	Fin	Material de ref.	Condición de estrés	
			5°C	37°C
A280	Contenido	0 sem.	1, 2 y 5 sem.	1, 2, 3 y 5 sem.
Aspecto	Precipitación	0 sem.	1, 2 y 5 sem.	1, 2, 3 y 5 sem.
RP-HPLC	Pureza/variantes	0 sem.	1, 2 y 5 sem.	1, 2, 3 y 5 sem.
SE-HPLC	Pureza/agregación/hidrólisis	0 sem.	1, 2 y 5 sem.	1, 2, 3 y 5 sem.
Biacore	Potencia (unión a HSA)	0 sem.	5 sem.	5 sem.
Osmolalidad	Característica	0 sem.	/	/

Tabla 20. Resumen de los resultados de integración de SE-HPLC tras almacenamiento durante 6 meses a 37°C.

Tampón	% de pico previo 1	% de pico previo 2	% de pico principal	% de pico posterior
Ref.	0,52	0,17	99,3	0
Tampón 1	ND	ND	ND	ND
Tampón 2	20,4	2,1	73,4	4,1
Tampón 3	ND	ND	ND	ND
Tampón 4	18,1	1,7	76,0	4,2
Tampón 5	22,2	2,0	71,4	4,4
Tampón 6	21,4	1,7	72,7	4,2
Tampón 7	15,1	0	80,5	4,4
Tampón 8	21,1	2,4	72,0	4,5
Tampón 9	16,7	2,7	76,3	4,3
Tampón 10	15,8	1,9	77,9	4,4
Tampón 11	17,5	2,0	76,4	4,2
Tampón 12	16,8	3,3	75,7	4,2

5 **Tabla 21.** Resumen de los diferentes tampones de formulación sometidos a prueba en el estudio de estabilidad.

N.º	Conc.	Tampón	Manitol	Sacarosa	Trehalosa	Glicina	Tween-80
1	10 mg/ml	L-histidina 15 mM, pH 6,5	5%				0,01%
2	10 mg/ml	L-histidina 15 mM, pH 6,5		10%			0,01%
3	10 mg/ml	L-histidina 15 mM, pH 6,5			10%		0,01%
4	10 mg/ml	L-histidina 15 mM, pH 6,5		7,5%		35%	0,01%
5	10 mg/ml	L-histidina 15 mM, pH 6,5	2,5%	5%			0,01%
6	10 mg/ml	fosfato 15 mM, pH 6,5	5%				0,01%
7	10 mg/ml	fosfato 15 mM, pH 6,5		10%			0,01%
8	10 mg/ml	fosfato 15 mM, pH 6,5			10%		0,01%
9	10 mg/ml	fosfato 15 mM, pH 6,5		7,5%		35%	0,01%
10	10 mg/ml	fosfato 15 mM, pH 6,5	2,5%	5%			0,01%

Tabla 22. Datos de integración de cIEF de IL6R304 almacenado durante 8 semanas a 37°C en los diferentes tampones

10

Tampón	% de pico previo (variantes ácidas)	% de pico principal	% de pico posterior (variantes básicas)
1	5,5	81,3	13,0
2	5,0	81,5	13,5
3	6,1	79,7	14,2
4	5,7	81,2	13,2
5	5,1	81,2	13,7
6	9,0	71,6	19,3
7	9,9	70,5	19,6
8	8,3	71,8	19,9
9	11,7	68,5	19,8
10	8,7	70,5	20,2

Tabla 23. Potencia relativa de IL6R304 tras 8 semanas a +37°C en comparación con B5#030309nr2.3-5.

Tampón	HSA	IL-6R
1	1,080 (0,954-1,223)	1,153 (0,957-1,389)
2	0,975 (0,887-1,072)	0,980 (0,760-1,263)
3	1,038 (0,952-1,132)	1,117 (0,910-1,372)
4	1,182 (1,074-1,300)	1,061 (0,908-1,240)
5	1,080 (1,004-1,161)	1,082 (0,925-1,266)

15 **Tabla 24.** Resumen de los resultados de Biacore para la unión a HSA de las muestras de estabilidad almacenadas durante 8 semanas a 37°C, expresados como % de actividad en comparación con la muestra equivalente almacenada a -70°C.

Tampón	% de actividad en comparación con la referencia
--------	---

1	97,5
2	93,2
3	92,5
4	83,9
5	101,9
6	92,2
7	89,4
8	99,0
9	84,3
10	89,6

Tabla 25. Aspecto de IL6R304 tras 0, 2, 4 y 24 horas de agitación a 2-8°C.

Tampón	0 h	2 h	4 h	24 h
1	transparente	transparente	transparente	transparente/ligeramente opalescente
2	transparente	transparente	transparente	transparente/ligeramente opalescente
3	transparente	transparente	ligeramente opalescente	ligeramente opalescente
4	transparente	transparente	transparente	transparente/ligeramente opalescente
5	transparente	transparente	ligeramente opalescente	ligeramente opalescente
6	transparente	transparente	ligeramente opalescente	opalescente
7	transparente	transparente	ligeramente opalescente	opalescente
8	transparente	transparente	ligeramente opalescente	altamente opalescente
9	transparente	transparente	transparente	opalescente
10	transparente	transparente	opalescente	opalescente

5 **Tabla 26.** Reactivos usados en la formulación y el estudio de estabilidad descritos en los ejemplos 3.

Reactivo	Distribuidor	N.º de cat.
ACN, de calidad para HPLC	Biosolve	N.º de cat. 012007
TFA	Biosolve	N.º de cat. 20234131
N-propanol, de calidad para HPLC	Sigma-Aldrich	N.º de cat. 34871
Agua de calidad para MilliQ		
D-PBS	Invitrogen	N.º de cat. 14190
NaCl	Merck	N.º de cat. 1.06404.1000
Patrón de filtración en gel	Bio-Rad	N.º de cat. 151-1901
HSA	Sigma	N.º de cat. A3782
L-histidina	Fluka	N.º de cat. 53319
D-Manitol	Fluka	N.º de cat. 17311
Sacarosa	Fluka	N.º de cat. 18219
Glicina	Fluka	N.º de cat. 50058
Tween 80	Merck	N.º de cat. K351 65661 609

10 **Tabla 27.** Concentraciones finales obtenidas tras la concentración de 23IL0064 usando filtros Vivaspin. Se detuvo la filtración en el momento en el que el volumen final se volvió limitado (de 100 a 200 µl) y se produjo pérdida de proteína. Se analizaron todas las muestras mediante SE-HPLC: el porcentaje de pico previo (% de área de superficie total) representa agregados en la muestra.

Condición de tampón	Condiciones de partida		tras ULTRAFILTRACIÓN		
	concentración	% de pico previo en SE-HPLC	concentración	% de pico previo en SE-HPLC	% de recuperación
D-PBS	3,8 mg/ml	2,80%	110 mg/ml	6,30%	42% ⁽¹⁾
NaCl 50 mM, Fosfato 10 mM pH 7	3,4 mg/ml	2,70%	83 mg/ml	2,80%	66% ⁽¹⁾
NaCl 50 mM, Histidina 40 mM pH 6	3,4 mg/ml	2,70%	150 mg/ml	2,70%	59% ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Las bajas recuperaciones pueden deberse a efectos de concentración local obtenidos durante la configuración de ultrafiltración de flujo sin salida.

Tabla 28. Tampones sometidos a prueba en un ensayo de desplazamiento térmico para 23IL0064.

Tampón	pKa	pH	Concentración (mM)	NaCl mM	% de manitol
Succinato	5,64 (pK2)	5,2	20	0	0-2,5-5-7,5
		6,2		50-150-300-500	0
Histidina	6,04 (pK2)	5,5	20	0	0-2,5-5-7,5
		6,5		50-150-300-500	0
Fosfato	7,20 (pK2)	6,7	20	0	0-2,5-5-7,5
		7,7		50-150-300-500	0
HEPES	7,48	7,0	20	0	0-2,5-5-7,5
		8,0		50-150-300-500	0

5 **Tabla 29.** Concentraciones medidas mediante Nanodrop (promedio de 2 mediciones) en las muestras sometidas a estrés a 37°C. Se determinó la concentración tras una corta centrifugación a alta velocidad (1 min a 15000xg)

Muestras de P23IL0064 (4 mg/ml en D-PBS)	Concentración (mg/ml)
Referencia (-20°C)	4,05
3 semanas 37°C (marca 24 sem.)	3,99
4 semanas 37°C (marca 4 sem.)	2,0
6 semanas 37°C (marca 8 sem.)	2,30
6 semanas 37°C (marca 12 sem.)	4,11
6 semanas 37°C (marca 16 sem.)	2,33

Tabla 30. Tampones sometidos a prueba en estabilidad con estrés para 23IL0064.

Tampón	pH	Concentración*	Excipiente/ tensioactivo	Punto de tiempo analizado	Temp. de almacenamiento
HEPES 20mM	8	5 mg/ml		2,5 sem.	37°C
His 20mM	6,5	5 mg/ml		2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C
His 20mM	6,5	22 mg/ml**		2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C
His 20mM	6	5 mg/ml		2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C
His 20mM	6,5	5 mg/ml	Tween 80 al 0,02%	2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C
His 20mM	6,5	5 mg/ml	manitol al 8%	2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C
His 20mM	6,5	5 mg/ml	Sacarosa al 8%	2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C
His 20mM	6,5	5 mg/ml	Glicina al 1,5%	2,5 sem./6 sem.	4-25-37°C

*Las concentraciones exactas usadas en el estudio oscilaron entre 4,9 y 5,1 mg/ml

**Marcado como 'HIGH CONC' en las figuras, la conc. real era de 22,36 mg/ml.

10

Tabla 31. Clasificación en bruto del grado de opalescencia y pérdida de material inducida por estrés por cizalladura para 23IL0064 en diferentes tampones de formulación.

5 mg/ml	Histidina 20 mM pH 6,5 + sacarosa al 8%	Opalescencia menor ↓ mayor
	Histidina 20 mM pH 6,5 + manitol al 8%	
	Histidina 20 mM pH 6,0	
	Histidina 20 mM pH 6,5 + glicina al 1,5%	
	Histidina 20 mM pH 6,5 + Tween 80 al 0,02%	
	Histidina 20 mM pH 6,5	
	Histidina 20 mM pH 6,5 CONC. (22,36 mg/ml)	

15 **Tabla 32.** Datos de integración de los análisis de RP-HPLC de las muestras de estabilidad de 23IL0064 en diferentes condiciones de tampón (comparación de 6 semanas a 37°C, 6 semanas a 25°C, 6 semanas a 4°C y referencia a -80°C).

p23IL0064 en	Condición de estrés	pre 1 22,4	pre 2 23,3	pico principal 23,9	post 1 27,5	post 2 29,0	Área de pico total (%)*
Histidina 20mM pH 6,5	Ref. a -80°C	68	195	1671	76	20	2029
	%	3%	10%	82%	4%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	77	201	1791	85	29	2182
	%	4%	9%	82%	4%	1%	108%
	6 semanas a 25°C	77	196	1696	125	33	2127

	%	4%	9%	80%	6%	2%	105%
	6 semanas a 37°C	130	186	1499	274	57	2146
	%	6%	9%	70%	13%	3%	106%
	Ref. a -80°C	68	199	1807	66	20	2159
	%	3%	9%	84%	3%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	69	195	1751	71	17	2104
	%	3%	9%	83%	3%	1%	97%
	6 semanas a 25°C	67	206	1696	90	22	2080
	%	3%	10%	82%	4%	1%	96%
	6 semanas a 37°C	117	200	1573	152	37	2079
	%	6%	10%	76%	7%	2%	96%
	Ref. a -80°C	66	175	1564	49	14	1867
	%	4%	9%	84%	3%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	74	196	1749	85	29	2133
	%	3%	9%	82%	4%	1%	114%
	6 semanas a 25°C	86	196	1556	117	37	1992
	%	4%	10%	78%	6%	2%	107%
	6 semanas a 37°C	116	195	1258	245	66	1881
	%	6%	10%	67%	13%	4%	101%
	Ref. a -80°C	70	201	1770	66	19	2128
	%	3%	9%	83%	3%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	68	193	1739	80	14	2093
	%	3%	9%	83%	4%	1%	98%
	6 semanas a 25°C	82	192	1665	123	32	2094
	%	4%	9%	80%	6%	2%	98%
	6 semanas a 37°C	95	173	1438	256	35	1998
	%	5%	9%	72%	13%	2%	94%
	Ref. a -80°C	56	193	1685	70	16	2019
	%	3%	10%	83%	3%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	61	198	1691	62	17	2029
	%	3%	10%	83%	3%	1%	100%
	6 semanas a 25°C	80	202	1591	123	29	2026
	%	4%	10%	79%	6%	1%	100%
	6 semanas a 37°C	139	246	1292	316	73	2065
	%	7%	12%	63%	15%	4%	102%
	Ref. a -80°C	53	167	1413	51	15	1698
	%	3%	10%	83%	3%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	68	197	1669	67	18	2019
	%	3%	10%	83%	3%	1%	119%
	6 semanas a 25°C	74	189	1596	124	31	2014
	%	4%	9%	79%	6%	2%	119%
	6 semanas a 37°C	95	185	1359	278	52	1968
	%	5%	9%	69%	14%	3%	116%
	Ref. a -80°C	72	233	1984	81	15	2385
	%	3%	10%	83%	3%	1%	100%
	6 semanas a 4°C	90	218	1880	88	21	2297

	%	4%	9%	82%	4%	1%	96%
	6 semanas a 25°C	96	235	1848	143	33	2355
	%	4%	10%	78%	6%	1%	99%
	6 semanas a 37°C	126	261	1725	332	62	2505
	%	5%	10%	69%	13%	2%	105%

%;*: recuperación calculada usando el área total en comparación con la ref. a -80°C de la misma condición.

Tabla 33. Temperaturas de fusión para 23IL0064 y 23IL0075 en diferentes tampones tal como se determina mediante calorimetría de barrido diferencial (a 1 mg/ml). Se realizó el barrido a 1°C/min, partiendo de 30°C.

Tampón	23IL0064	23IL0075
acetato 25 mM; pH 5,5; NaCl 50 mM	55,5	58,0
acetato 25 mM; pH 5,5; NaCl 250 mM	52,9	55,5
MES 25 mM; pH 6,0; NaCl 50 mM	56,2	58,8
MES 25 mM; pH 6,0; NaCl 250 mM	53,2	55,7
HEPES 25 mM; pH 7,0; NaCl 50 mM	56,7	59,3
HEPES 25 mM; pH 7,0; NaCl 250 mM	53,7	56,2
25 mM Tris; pH 7,5; NaCl 50 mM	56,3	58,7
25 mM Tris; pH 7,5; NaCl 250 mM	53,5	56,1

5 **Tabla 34.** Temperaturas de fusión para 23IL0064 y 23IL0075 en tampones tal como se determinó mediante ensayo de desplazamiento térmico (a 0,1 mg/ml).

Tampón	23IL0064	23IL0075*	23IL0075*
Histidina 20mM pH 6,5; NaCl 50 mM	54,5	57,0	57,0
Histidina 20mM pH 6,5	56,6	59,2	59,3
Histidina 20mM pH 6,5; manitol al 7,5%	57,9	60,7	60,6
HEPES 20 mM pH 7; NaCl 50 mM	54,8	57,4	57,5
HEPES 20 mM pH 7	56,8	59,8	59,9
HEPES 20 mM pH 7; manitol al 7,5%	58,2	61,1	61,2
HEPES 20 mM pH 8; NaCl 50 mM	55,0	57,6	57,8
HEPES 20 mM pH 8	56,4	59,5	59,4
HEPES 20 mM pH 8; manitol al 7,5%	57,6	60,3	60,3

*Se realizaron mediciones en los 2 lotes

10 **Tabla 35.** Optimización numérica mediante Design-Expert del modelo. Cuanto mayor es el coeficiente de conveniencia mejor es la propuesta del óptimo.

Disoluciones para fosfato

Número	Conc. (log10) (mM)	pH	Tampón	Tm (°C)	Conveniencia
1	1,00	6,00	Fosfato	59,0012	0,895
2	1,04	6,00	Fosfato	58,9419	0,881

15

Disoluciones para acetato

Número	Conc. (log10) (mM)	pH	Tampón	Tm (°C)	Conveniencia
1	1,00	6,00	Acetato	59,2759	0,959
2	1,01	6,08	Acetato	59,2615	0,956
3	1,11	5,88	Acetato	59,1489	0,929
4	1,10	5,80	Acetato	59,1345	0,926
5	1,15	5,72	Acetato	59,0452	0,905
6	1,16	5,68	Acetato	59,0036	0,895
7	1,32	6,09	Acetato	58,9476	0,882
8	1,33	6,15	Acetato	58,9406	0,881
9	1,35	6,21	Acetato	58,9317	0,879

ES 2 531 083 T3

10	1,19	5,56	Acetato	58,8937	0,870
11	1,32	5,89	Acetato	58,8726	0,865
12	1,00	5,00	Acetato	58,77	0,841
13	1,35	5,69	Acetato	58,7182	0,829
14	1,50	6,12	Acetato	58,7181	0,829
15	1,10	5,10	Acetato	58,682	0,820
16	1,16	5,19	Acetato	58,6346	0,809
17	1,57	6,08	Acetato	58,5857	0,798
18	1,44	5,71	Acetato	58,5814	0,797
19	1,35	5,50	Acetato	58,5692	0,794
20	1,55	5,96	Acetato	58,5672	0,793
21	1,6	6,18	Acetato	58,5354	0,786
22	1,70	6,00	Acetato	58,3294	0,738
23	1,62	5,68	Acetato	58,215	0,711
24	1,34	5,01	Acetato	58,0486	0,672
25	1,47	5,20	Acetato	57,9981	0,660
26	1,33	4,96	Acetato	57,9943	0,659
27	1,56	5,35	Acetato	57,9714	0,654
28	1,27	4,83	Acetato	57,9579	0,651
29	1,62	5,41	Acetato	57,9098	0,639
30	1,53	5,16	Acetato	57,8061	0,615
31	1,61	5,29	Acetato	57,7715	0,607
32	1,57	5,20	Acetato	57,7583	0,604
33	1,56	5,18	Acetato	57,7496	0,602
34	1,35	4,79	Acetato	57,7035	0,591
35	1,65	5,24	Acetato	57,61	0,569
36	1,65	5,17	Acetato	57,5141	0,547
37	1,70	5,00	Acetato	57,0985	0,449

37 disoluciones encontradas

Disoluciones para histidina

Número	Conc. (log10) (mM)	pH	Tampón	Tm (°C)	Conveniencia
1	1,01	6,19	Histidina	59,4631	1,000
2	1,00	6,18	Histidina	59,4654	1,000
3	1,02	6,20	Histidina	59,4617	1,000
4	1,01	6,20	Histidina	59,4767	1,000
5	1,01	6,20	Histidina	59,4702	1,000
6	1,01	6,18	Histidina	59,4525	1,000
7	1,01	6,18	Histidina	59,4554	1,000
8	1,00	6,19	Histidina	59,4736	1,000
9	1,02	6,19	Histidina	59,4524	1,000
10	1,02	6,19	Histidina	59,4537	1,000
11	1,01	6,20	Histidina	59,4644	1,000
12	1,02	6,20	Histidina	59,4559	1,000
13	1,01	6,18	Histidina	59,4608	1,000
14	1,02	6,19	Histidina	59,4556	1,000
15	1,00	6,21	Histidina	59,485	1,000
16	1,01	6,18	Histidina	59,4505	1,000
17	1,02	6,19	Histidina	59,4579	1,000
18	1,03	6,21	Histidina	59,4523	1,000
19	1,01	6,18	Histidina	59,4562	1,000
20	1,01	6,21	Histidina	59,4702	1,000
21	1,00	6,19	Histidina	59,4689	1,000
22	1,01	6,20	Histidina	59,4711	1,000
23	1,05	6,21	Histidina	59,4363	0,997

5

23 disoluciones encontradas

Disoluciones para succinato

Número	Conc. (log10) (mM)	pH	Tampón	Tm (°C)	Conveniencia
1	1,00	5,94	Succinato	57,8819	0,633
2	1,00	5,94	Succinato	57,8819	0,633

3	1,00	5,94	Succinato	57,8819	0,633
4	1,00	5,93	Succinato	57,8819	0,633
5	1,00	5,95	Succinato	57,8818	0,633
6	1,00	5,92	Succinato	57,8818	0,633
7	1,00	5,96	Succinato	57,8817	0,633

7 disoluciones encontradas

Tabla 36. Resultados de optimización basados en temperaturas de fusión obtenidas en la exploración de una amplia gama de excipientes en un tampón histidina, acetato o fosfato para la formulación de 231L0075. Los resultados se ordenaron de mayor a menor valor de Tm. La composición de la formulación debe leerse combinando la identidad de los excipientes en las columnas 2 a 4 y la cantidad de cada excipiente en las columnas 5 a 7.

Número de combinación	Azúcar/ poliol	Detergente	Amino-ácido	Tampón	% de azúcar/ poliol	% de amino-ácido	% de detergente	Valor de Tm (°C)
47	Sacarosa	Tween 20	Glicina	HistidinaPH6	10,5	0	0	62,97
44	Sacarosa	Tween 20	Arg/Glu	HistidinaPH6	10,5	0	0	62,5
5	Manitol	P-F68	Glicina	HistidinaPH6	5,6	0	0	62,22
41	Sacarosa	P-F68	Glicina	HistidinaPH6	10,5	0	0	62,22
11	Manitol	Tween 20	Glicina	HistidinaPH6	5,6	0	0	62,18
46	Sacarosa	Tween 20	Glicina	AcetatoPH5,5	10,5	0	0	62,16
42	Sacarosa	P-F68	Glicina	FosfatoPH6	6,3	0,91	0	62,13
38	Sacarosa	P-F68	Arg/Glu	HistidinaPH6	10,5	0	0	61,9
6	Manitol	P-F68	Glicina	FosfatoPH6	3,7	0,77	0	61,86
43	Sacarosa	Tween 20	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	10,5	0	0	61,77
40	Sacarosa	P-F68	Glicina	AcetatoPH5,5	8,8	0,37	0	61,74
22	Sorbitol	P-F68	Glicina	AcetatoPH5,5	3,9	0,69	0	61,7
48	Sacarosa	Tween 20	Glicina	FosfatoPH6	9,2	0,28	0	61,67
4	Manitol	P-F68	Glicina	AcetatoPH5,5	4,7	0,37	0	61,58
53	Sacarosa	Tween 80	Glicina	HistidinaPH6	10,5	0	0	61,58
54	Sacarosa	Tween 80	Glicina	FosfatoPH6	6,4	0,90	0	61,52
17	Manitol	Tween 80	Glicina	HistidinaPH6	5,6	0	0	61,44
37	Sacarosa	P-F68	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	10,5	0	0	61,43
23	Sorbitol	P-F68	Glicina	HistidinaPH6	5,6	0	0	61,39
12	Manitol	Tween 20	Glicina	FosfatoPH6	5,6	0	0	61,33
10	Manitol	Tween 20	Glicina	AcetatoPH5,5	5,6	0	0	61,2
30	Sorbitol	Tween 20	Glicina	FosfatoPH6	0,0	2,3	0,0021	61,2
29	Sorbitol	Tween 20	Glicina	HistidinaPH6	5,6	0	0	61,19
50	Sacarosa	Tween 80	Arg/Glu	HistidinaPH6	10,5	0	0	61,14
52	Sacarosa	Tween 80	Glicina	AcetatoPH5,5	8,4	0,46	0	61,1
2	Manitol	P-F68	Arg/Glu	HistidinaPH6	5,6	0	0	61,07
45	Sacarosa	Tween 20	Arg/Glu	FosfatoPH6	10,5	0	0	61,01
18	Manitol	Tween 80	Glicina	FosfatoPH6	5,6	0	0	60,93
8	Manitol	Tween 20	Arg/Glu	HistidinaPH6	5,6	0	0	60,88
28	Sorbitol	Tween 20	Glicina	AcetatoPH5,5	5,6	0	0	60,86
24	Sorbitol	P-F68	Glicina	FosfatoPH6	3,2	1,00	0	60,84
16	Manitol	Tween 80	Glicina	AcetatoPH5,5	5,6	0	0	60,73
19	Sorbitol	P-F68	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	5,6	0	0,062	60,71
49	Sacarosa	Tween 80	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	10,5	0	0	60,68
20	Sorbitol	P-F68	Arg/Glu	HistidinaPH6	5,6	0	0,036	60,65
39	Sacarosa	P-F68	Arg/Glu	FosfatoPH6	10,5	0	0	60,5
1	Manitol	P-F68	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	5,6	0	0	60,43
34	Sorbitol	Tween 80	Glicina	AcetatoPH5,5	3,9	0,69	0	60,29
26	Sorbitol	Tween 20	Arg/Glu	HistidinaPH6	5,6	0	0,0004	60,27
35	Sorbitol	Tween 80	Glicina	HistidinaPH6	5,6	0	0	60,18
14	Manitol	Tween 80	Arg/Glu	HistidinaPH6	5,6	0	0	60,17
3	Manitol	P-F68	Arg/Glu	FosfatoPH6	5,5	0,06 + 0,05	0	60,15
25	Sorbitol	Tween 20	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	5,6	0	0,0017	60,04
7	Manitol	Tween 20	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	5,6	0	0	59,98
51	Sacarosa	Tween 80	Arg/Glu	FosfatoPH6	10,5	0	0	59,98
9	Manitol	Tween 20	Arg/Glu	FosfatoPH6	5,6	0	0	59,86
21	Sorbitol	P-F68	Arg/Glu	FosfatoPH6	5,6	0	0,106	59,73

13	Manitol	Tween 80	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	5,6	0	0	59,54
15	Manitol	Tween 80	Arg/Glu	FosfatoPH6	5,6	0	0	59,49
36	Sorbitol	Tween 80	Glicina	FosfatoPH6	5,6	0	0	59,46
31	Sorbitol	Tween 80	Arg/Glu	AcetatoPH5,5	5,6	0	0,0027	59,36
32	Sorbitol	Tween 80	Arg/Glu	HistidinaPH6	4,9	0,34 + 0,29	0,0009	59,34
27	Sorbitol	Tween 20	Arg/Glu	FosfatoPH6	5,6	0	0,0039	59,17
33	Sorbitol	Tween 80	Arg/Glu	FosfatoPH6	5,6	0	0,0049	58,59

Tabla 37. Comparación de las temperaturas de inicio de la agregación y dispersión máxima alcanzadas para 23IL0075 en 3 tampones (250 µg/ml), tal como se mide mediante dispersión elástica de la luz. (Intervalo de temperatura: 45-95°C, gradiente de temperatura: 2°C/min, pendiente de los datos: 1°C, longitud de onda (ex./em.): 500 nm, ancho de banda (ex./em.): 3 nm.)

	Temperatura de inicio de la agregación	Dispersión máxima alcanzada
fosfato 10 mM pH 6	52,1°C	Fuera de escala
acetato 10 mM pH 6	51,0°C	Fuera de escala
histidina 10 mM pH 6	52,7°C	435 abs

Tabla 38. Lista de tampones sometidos a prueba en estudio de congelación/descongelación y estudio de estrés por agitación de 23IL0075 (10 mg/ml)

N.º	Tampón		
1	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 5,6%	Tween 80 al 0,0025%
2	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 5,6%	Tween 80 al 0,005%
3	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 5,6%	P-F68 al 0,05%
4	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 5,6%	P-F68 al 0,1%
5	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	Tween 80 al 0,0025%
6	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	Tween 80 al 0,005%
7	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	P-F68 al 0,05%
8	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	P-F68 al 0,1%
9	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	Tween 80 al 0,0025%
10	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	Tween 80 al 0,005%
11	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	P-F68 AL 0,05%
12	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 5,6%	P-F68 al 0,1%
13	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	Tween 80 al 0,0025%
14	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	Tween 80 al 0,005%
15	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	P-F68 al 0,05%
16	Acetato 10 mM pH 5,5	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	P-F68 al 0,1%
17	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	Tween 80 al 0,0025%
18	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	Tween 80 al 0,005%
19	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	P-F68 al 0,05%
20	Histidina 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	P-F68 al 0,1%
21	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	Tween 80 al 0,0025%
22	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	Tween 80 al 0,005%
23	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	P-F68 al 0,05%
24	Fosfato 10 mM pH 6,0	manitol al 2,8%, glicina al 1,15%	P-F68 al 0,1%

Tabla 39. Estudio de estabilidad de 23IL0075 en histidina 10 mM pH 6,0 con diferente excipientes. Se sometieron las muestras a estrés mediante congelación/descongelación 10 veces, y se almacenaron a diferentes temperaturas (-70°C, 5°C, 25°C y 37°C) para un estudio de estabilidad. Se analizaron las muestras sometidas a estrés y de estabilidad usando medición de DO, RP-HPLC y SE-HPLC.

N.º	Conc. (mg/ml)	Tampón	Manitol	Sacarosa	Glicina	Poloxámero 188	Tween-80
1	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	5,4%				0,005%
2	25	L-Histidina 10 mM, pH 6		10,0%			0,005%
3	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	3,5%	3,5%			0,005%
4	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	2,8%		1,15%		0,005%

5	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	5,4%			0,05%	
6	25	L-Histidina 10 mM, pH 6		10,0%		0,05%	
7	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	3,5%	3,5%		0,05%	
8	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	2,8%		1,15%	0,05%	
9	25	L-Histidina 10 mM, pH 6	3,5%	3,5%			

Tabla 40. Muestras sometidas a estrés por cizalladura mediante agitación. Se analizaron posteriormente las muestras mediante mediciones de DO, RP-HPLC, SE-HPLC y Biacore.

N.º	Conc.	Tampón	Manitol	Sacarosa	Glicina
1	10 mg/ml	L-histidina 10 mM, pH 6	5,4%		
2	10 mg/ml	L-histidina 10 mM, pH 6		10,0%	
3	10 mg/ml	L-histidina 10 mM, pH 6	3,5%	3,5%	
4	10 mg/ml	L-histidina 10 mM, pH 6	2,8%		1,15%

5 **Tabla 41.** Resultados de cromatografía de SE-HPLC y RP-HPLC de 23IL0075 a 25 mg/ml en diferentes tampones de formulación candidatos (véanse los detalles de la tabla anterior) en estudio de estabilidad acelerado a 25 y 37°C.

Excipientes	3 semanas a 37°C		6 semanas a 37°C		6 semanas a 25°C	
	% de pico previo en SE-HPLC (oligómeros)*	% de pico posterior en RP-HPLC (pirrolutamato N-terminal)**	% de pico previo* en SE-HPLC	% de pico posterior** en RP-HPLC	% de pico previo* en SE-HPLC	% de pico posterior** en RP-HPLC
Manitol/Tween 80	4,8	6,7	6,9	9,5	0,7	4,9
Sacarosa/Tween 80	4,0	6,0	7,1	9,2	0,6	4,1
Manitol/sacarosa/Tween 80	5,3	5,6	9,5	8,5	0,6	3,8
Manitol/glicina/Tween 80	7,2	5,6	12	8,8	0,7	3,9
Manitol/PF	5,0	6,2	12***	14,7***	0,8	5,6
Sacarosa/PF	3,7	5,8	7,9	9,4	0,6	4,1
Manitol/sacarosa/PF	4,3	5,4	8,5	8,3	0,7	4,1
Manitol/glicina/PF	5,4	5,4	11	8,6	0,8	3,9
Manitol/sacarosa	3,5	5,2	7,5	8,3	0,8	3,8

*En la muestra de referencia del 0,3 al 0,4% del pico previo en SE-HPLC;

**estaba presente el % de pico posterior en RP-HPLC

***La muestra sometida a estrés durante 6 semanas a 37°C en manitol y poloxámero 188 fue un valor atípico también basándose en el valor de DO500 que era de 0,1 en comparación con valores de DO500 siempre por debajo de 0,01 para todas las demás muestras.

10 **Tabla 42.** Datos de estabilidad del lote CMC-D-0048 de IL6R304, almacenado a -70°C.

Método de prueba	Punto de tiempo (meses)		
	Inicial (0)	3	6
Aspecto	Disolución incolora transparente,	Disolución incolora transparente,	Disolución incolora transparente,
A280	10,52 mg/m	10,38 mg/ml	10,45 mg/ml
SEC-HPLC	Pureza = 99,20% Picos previos = 0,80% Picos posteriores = 0,00%	Pureza = 98,67% Picos previos = 1,33% Picos posteriores = 0,00%	Pureza = 98,76% Picos previos = 1,24% Picos posteriores = 0,00%
cIEF	Pureza = 100,00% Pico posterior = 0,00%	Pureza = 100,00% Pico posterior = 0,00%	Pureza = 99,30% Pico posterior = 0,70%
RP-HPLC	Pureza = 93,90%	Pureza = 91,93%	Pureza = 92,8%

	Pico previo 1 = 0,00% Pico previo 2 = 3,20% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 2,60% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,20% Pico posterior 5 = 0,00%	Pico previo 1 = 0,14% Pico previo 2 = 3,41% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 4,10% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,29% Pico posterior 5 = 0,14%	Pico previo 1 = 0,12% Pico previo 2 = 3,00% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 3,60% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,32% Pico posterior 5 = 0,15%
Potencia (inhibición de IL-6R)	1,256 ± 0,084	0,973 ± 0,072	1,049 ± 0,090
Potencia (unión HSA)	a 1,044 ± 0,094	0,955 ± 0,085	0,985 ± 0,069

Tabla 43. Datos de estabilidad del lote CMC-D-0048 de IL6R304, almacenado a +5°C.

Método de prueba	Punto de tiempo (meses)					
	Inicial (0)		3		6	
Aspecto	Disolución transparente, incolora		Disolución transparente, incolora		Disolución transparente, incolora	
A280	10,52 mg/m		10,29 mg/ml		10,33 mg/ml	
SEC-HPLC	Pureza = 99,20% Picos previos = 0,80% Picos posteriores = 0,00%		Pureza = 98,50% Picos previos = 1,50% Picos posteriores = 0,00%		Pureza = 98,62% Picos previos = 1,38% Picos posteriores = 0,00%	
cIEF	Pureza = 100,00% Pico posterior = 0,00%		Pureza = 100,00% Pico posterior = 0,00%		Pureza = 99,30% Pico posterior = 0,70%	
RP-HPLC	Pureza = 93,90% Pico previo 1 = 0,00% Pico previo 2 = 3,20% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 2,60% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,20% Pico posterior 5 = 0,00%		Pureza = 91,71% Pico previo 1 = 0,15% Pico previo 2 = 3,53% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 4,16% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,29% Pico posterior 5 = 0,15%		Pureza = 92,30% Pico previo 1 = 0,11% Pico previo 2 = 3,20% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 3,90% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,35% Pico posterior 5 = 0,12%	
Potencia (inhibición de IL-6R)	1,256 ± 0,084		0,959 ± 0,061		1,051 ± 0,076	
Potencia (unión HSA)	a	1,044 ± 0,094	0,930 ± 0,103		0,983 ± 0,078	

5 **Tabla 44.** Datos de estabilidad del lote CMC-D-0048 de IL6R304, almacenado a +25°C.

Método de prueba	Punto de tiempo (meses)					
	Inicial (0)		3		6	
Aspecto	Disolución transparente, incolora		Disolución transparente, incolora		Disolución transparente, incolora	
A280	10,52 mg/m		10,29 mg/ml		10,48 mg/ml	
SEC-HPLC	Pureza = 99,20% Picos previos = 0,80% Picos posteriores = 0,00%		Pureza = 97,81% Picos previos = 1,57% Picos posteriores = 0,62%		Pureza = 97,13% Picos previos = 1,87% Picos posteriores = 1,00%	
cIEF	Pureza = 100,00% Pico posterior = 0,00%		Pureza = 96,40% Pico posterior = 3,60%		Pureza = 92,30% Pico posterior = 7,70%	
RP-HPLC	Pureza = 93,90% Pico previo 1 = 0,00% Pico previo 2 = 3,20% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 2,60% Pico posterior 3 = 0,00% Pico posterior 4 = 0,20% Pico posterior 5 = 0,00%		Pureza = 87,77% Pico previo 1 = 0,44% Pico previo 2 = 4,56% Pico posterior 1 = 0,00% Pico posterior 2 = 6,26% Pico posterior 3 = 0,54% Pico posterior 4 = 0,30% Pico posterior 5 = 0,13%		Pureza = 82,30% Pico previo 1 = 0,87% Pico previo 2 = 6,40% Pico posterior 1 = 1,10% Pico posterior 2 = 8,80% Pico posterior 3 = 0,86% Pico posterior 4 = 0,32% Pico posterior 5 = 0,16%	
Potencia (inhibición)	1,256 ± 0,084		0,945 ± 0,065		0,949 ± 0,066	

de IL-6R)			
Potencia			
(unión a HSA)	1,044 ± 0,094	0,967 ± 0,095	0,926 ± 0,065

Lista de secuencias

- 5 <110> Ablynx NV
- <120> FORMULACIONES ESTABLES DE POLIPÉPTIDOS Y USOS DE LAS MISMAS
- <130> P09-023-PCT-1
- 10 <160> 6
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 15 <211> 245
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- 20 <223> Secuencia de nanocuerpo
- <400> 1

ES 2 531 083 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 Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30
 Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140
 Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
 180 185 190
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240
 Val Thr Val Ser Ser
 245

<210> 2

ES 2 531 083 T3

<211> 375
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Secuencia de nanocuerpo

<400> 2

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 Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30

Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45

Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140

10

ES 2 531 083 T3

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys
 145 150 155 160

Ile Asn Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
 165 170 175

Leu Val Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser
 180 185 190

Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu
 195 200 205

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
 210 215 220

Cys Ala Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr
 225 230 235 240

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
 260 265 270

Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr
 275 280 285

Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly
 290 295 300

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr
 305 310 315 320

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys
 325 330 335

Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala
 340 345 350

Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly
 355 360 365

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 370 375

<210> 3
 <211> 375
 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nanocuerpo

5

<400> 3

ES 2 531 083 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 Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30
 Val Met Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val
 35 40 45
 Ala Gly Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Phe Ile Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 130 135 140
 Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 145 150 155 160
 Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175
 Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr Leu Tyr Ala Asp
 180 185 190
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr
 195 200 205
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 210 215 220
 Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

ES 2 531 083 T3

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val
245 250 255

Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu
260 265 270

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn Val Met
275 280 285

Ala Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Gly
290 295 300

Ile Ile Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
305 310 315 320

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
325 330 335

Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Phe Ile
340 345 350

Thr Thr Glu Ser Asp Tyr Asp Leu Gly Arg Arg Tyr Trp Gly Gln Gly
355 360 365

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 4
<211> 385
5 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Secuencia de nanocuerpo

<400> 4

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

Pro Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Phe Val
35 40 45

Ser Ser Ile Thr Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

ES 2 531 083 T3

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val
 340 345 350

Tyr Tyr Cys Ala Ala Tyr Ile Arg Pro Asp Thr Tyr Leu Ser Arg Asp
 355 360 365

Tyr Arg Lys Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 370 375 380

Ser
 385

<210> 5

<211> 386

5 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Secuencia de nanocuerpo

10

<400> 5

Glu Val Gln Leu Leu 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 Arg Ile Phe Ser Leu Pro
 20 25 30

Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln
 35 40 45

Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Ser
 50 55 60

Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80

Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 85 90 95

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro
 100 105 110

Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125

Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 130 135 140

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly

<211> 386
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

5 <220>
<223> Secuencia de nanocuerpo

<400> 6

ES 2 531 083 T3

Glu Val Gln Leu Leu 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 Arg Ile Phe Ser Leu Pro
 20 25 30
 Ala Ser Gly Asn Ile Phe Asn Leu Leu Thr Ile Ala Trp Tyr Arg Gln
 35 40 45
 Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu Leu Val Ala Thr Ile Asn Ser Gly Ser
 50 55 60
 Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg
 65 70 75 80
 Asp Asn Ser Lys Lys Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro
 85 90 95
 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Thr Ser Gly Ser Gly Ser Pro
 100 105 110
 Asn Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly
 130 135 140
 Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 145 150 155 160
 Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 165 170 175
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 195 200 205
 Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 210 215 220
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser

REIVINDICACIONES

1. Formulación que comprende un portador acuoso que tiene un pH de 5,5 a 8,0 y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, formulándose dicha formulación para su administración a un sujeto humano y comprendiendo dicha formulación además
- 5 un tampón a una concentración de 10 mM a 100 mM seleccionado de histidina pH 6,0-6,5,
- 10 en la que dicha formulación tiene una concentración de sal inorgánica de 150 mM o menor y en la que el polipéptido se selecciona de una de SEQ ID NO: 1 a 6.
2. Formulación según la reivindicación 1, que no contiene ninguna sal inorgánica.
- 15 3. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en la que la concentración de polipéptido es de 5 a 100 mg/ml, más preferiblemente de 5 a 50 mg/ml, tal como 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml o incluso más.
- 20 4. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que
- el polipéptido tiene una solubilidad de al menos 20 mg/ml, preferiblemente de 50 mg/ml o más, más preferiblemente de 90 mg/ml, tal como se determina mediante el método de exclusión de PEG o mediante un experimento de concentración;
- 25 - menos del 10% del polipéptido forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal durante almacenamiento a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), midiéndose el % de piroglutamato mediante RP-HPLC;
- 30 - menos del 10% del polipéptido forma dímeros durante almacenamiento a una temperatura de 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 8 semanas, al menos 10 semanas, al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), midiéndose el % de dímeros mediante SE-HPLC;
- 35 - al menos el 80% de los polipéptidos conservan su actividad de unión a al menos una de sus dianas tras el almacenamiento a 37±5°C hasta al menos 2 semanas (preferiblemente al menos 3 semanas, al menos 5 semanas, al menos 2 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore; y/o
- 40 - el polipéptido tiene una razón DO320/DO280 de 0,05 o menor tras estrés mecánico seleccionado de:
- o remover la formulación durante de 10 s a 1 min;
 - o empujar la formulación a través de una aguja (25G, preferiblemente 26G, más preferiblemente 27G, incluso más preferiblemente 28G, lo más preferiblemente 29G o más) con una jeringuilla (la jeringuilla usada puede ser cualquier jeringuilla disponible comercialmente, tal como por ejemplo una jeringuilla de 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml hasta 50 ml);
 - o rotar durante dos días a 10 rpm; y/o
 - o agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 4-48 horas a 4°C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).
- 55 5. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el tampón es un tampón histidina pH 6,5 o histidina pH 6,0.
- 60 6. Formulación según la reivindicación 5, en la que el tampón histidina tiene una concentración de 10 a 50 mM, más preferiblemente de 10 a 20 mM, tal como 10 mM o 15 mM.
7. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además un excipiente a una concentración del 1% al 20%.
- 65 8. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el excipiente es un sacárido, un azúcar no reductor y/o poliol.

9. Formulación según la reivindicación 8, en la que el excipiente se selecciona de manitol, trehalosa, sorbitol y sacarosa.
- 5 10. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, en la que el excipiente tiene una concentración del 2,5% al 15%, más preferiblemente del 5% al 10%, tal como aproximadamente el 5%, el 7,5%, el 8% y el 10%.
- 10 11. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además un tensioactivo a una concentración del 0,001% al 1% seleccionado de polisorbato 20, polisorbato 80 o un poloxámero.
12. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el tensioactivo es polisorbato 80.
- 15 13. Formulación según la reivindicación 12, en la que el tensioactivo tiene una concentración del 0,01% al 0,1%, preferiblemente del 0,01% al 0,05%, tal como de aproximadamente el 0,01% o el 0,005%.
14. Formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende:
- 20 a) un tampón histidina pH 6,5 o pH 6,0 a una concentración de 10 mM a 100 mM;
- b) sacarosa a una concentración del 1% al 20%; y
- c) polisorbato 80 a una concentración del 0,001% al 1%.
- 25 15. Formulación según la reivindicación 14, que comprende:
- a) histidina 15 mM pH 6,5;
- 30 b) sacarosa al 8%; y
- c) polisorbato 80 al 0,01%.
16. Formulación según la reivindicación 14, que comprende:
- 35 a) histidina 10 mM pH 6,0;
- b) sacarosa al 10%; y
- 40 c) polisorbato 80 al 0,005%.
17. Método para la preparación de una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende al menos la etapa de concentrar el polipéptido e intercambiarlo con el tampón y/o excipiente seleccionado.
- 45 18. Recipiente sellado que contiene una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
19. Forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral a un ser humano, que comprende una formulación según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en un recipiente adecuado.
- 50 20. Kit que comprende uno o más de los recipientes sellados según la reivindicación 18 y/o formas de dosificación unitaria farmacéuticas según la reivindicación 19, e instrucciones para el uso de la formulación.
21. Formulación, recipiente, dosificación unitaria farmacéutica o kit según cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en terapia.
- 55 22. Formulación, recipiente, dosificación unitaria farmacéutica o kit según la reivindicación 21 para el tratamiento de osteoporosis, pérdida ósea inducida por cáncer, pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección viral, artritis reumatoide, crecimiento anómalo de células sinoviales, enfermedad de Castleman inducida por plasmocitosis, tumor, proteólisis de proteínas musculares, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria del intestino, pancreatitis, psoriasis, angiogénesis, artritis reumatoide juvenil de tipo de aparición sistémica, lesión de médula espinal, lesión o destrucción endotelial, mesotelioma, vasculitis, osteoartritis, trastorno del oído interno, cáncer, rechazo tras trasplante, trasplante de islotes pancreáticos, infarto de miocardio, cáncer de próstata, neovascularización coroidea, regeneración muscular, miopatía inflamatoria, rechazo crónico en trasplante cardiaco, función retardada del injerto, enfermedades intestinales (colitis, enfermedad de Crohn, EII), enfermedades infecciosas, psoriasis, cáncer, carcoidis, rechazo de trasplante, fibrosis quística, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, infección
- 60
- 65

viral, inmunodeficiencia variable común.

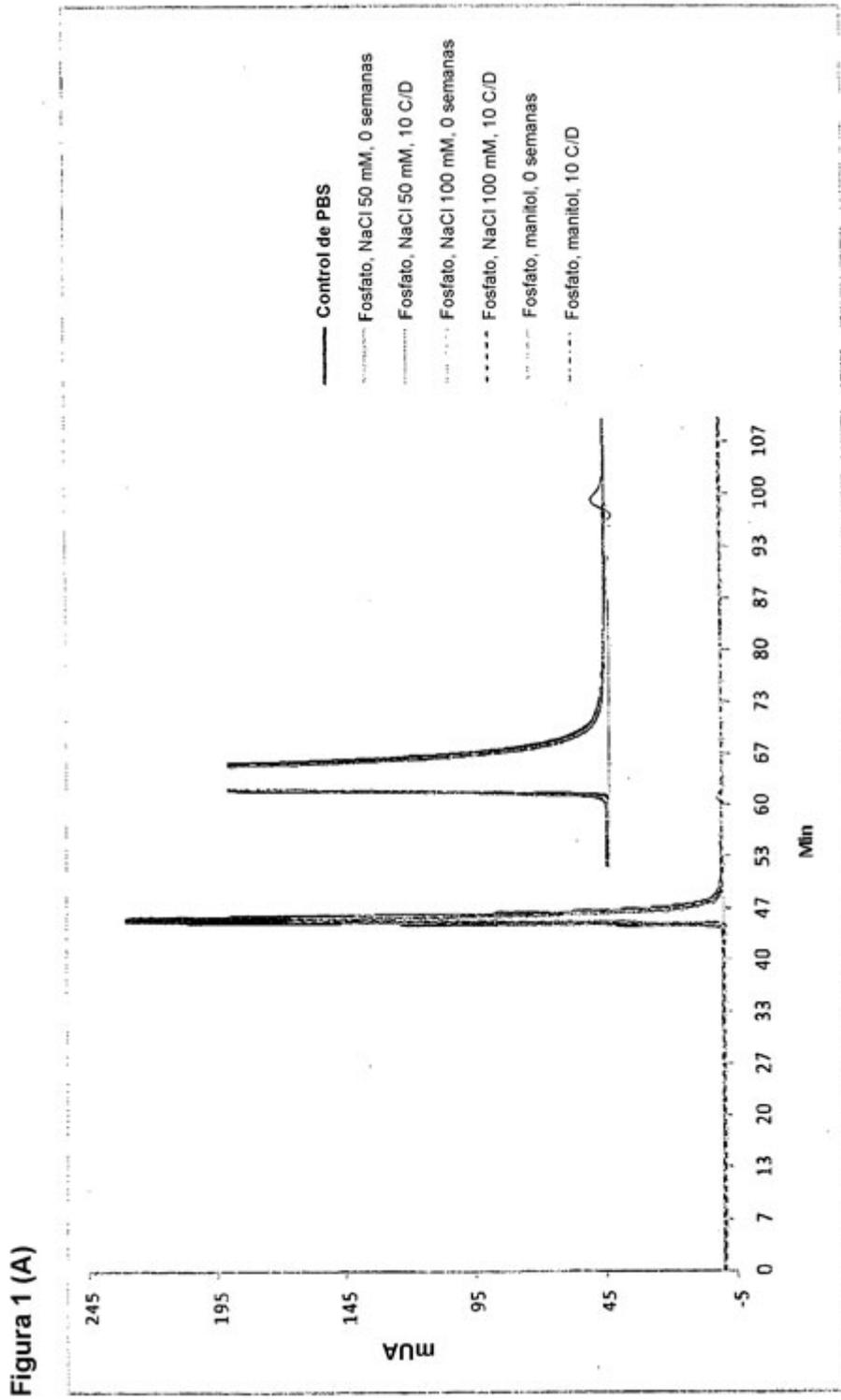


Figura 1(B)

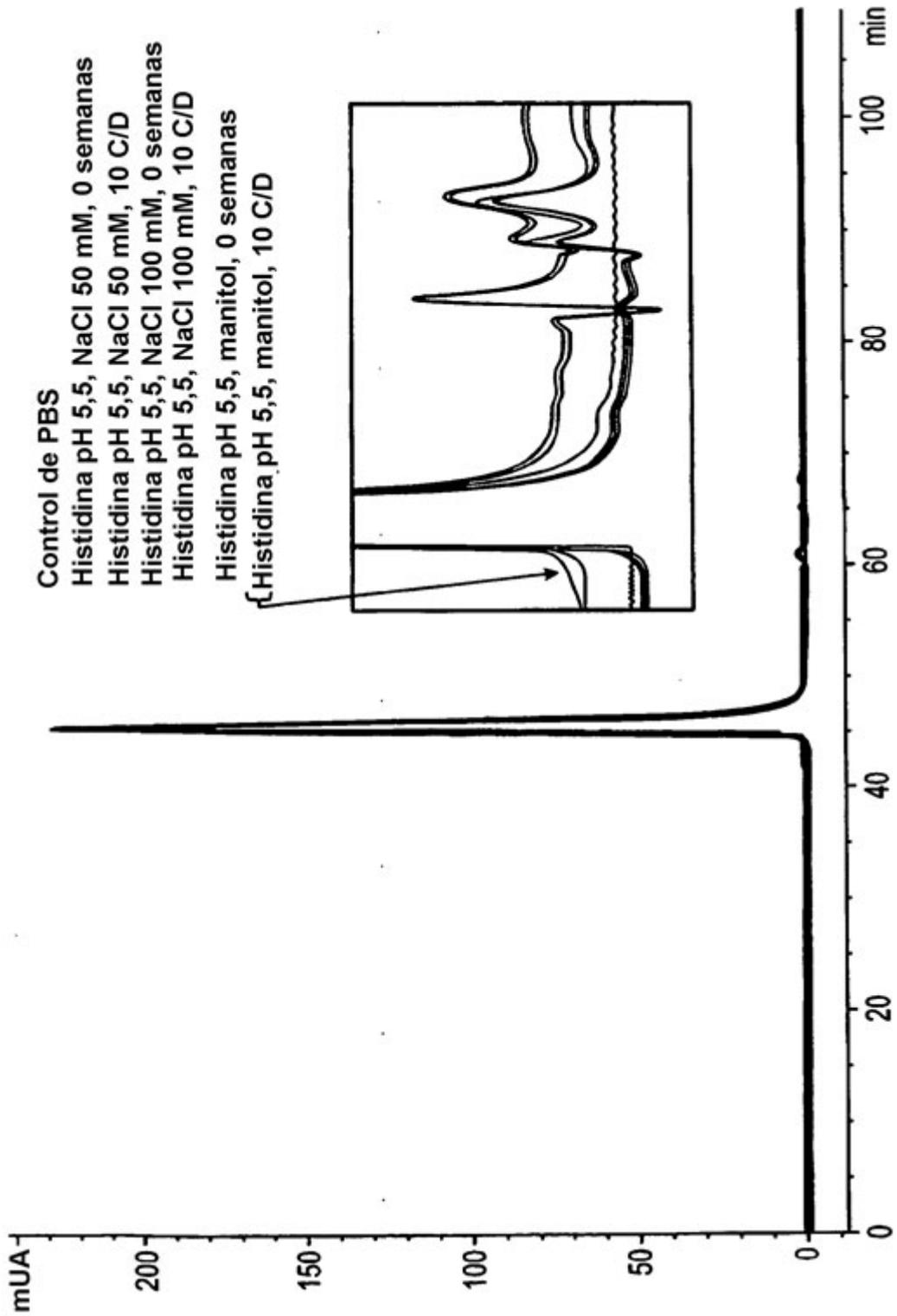


Figura 2

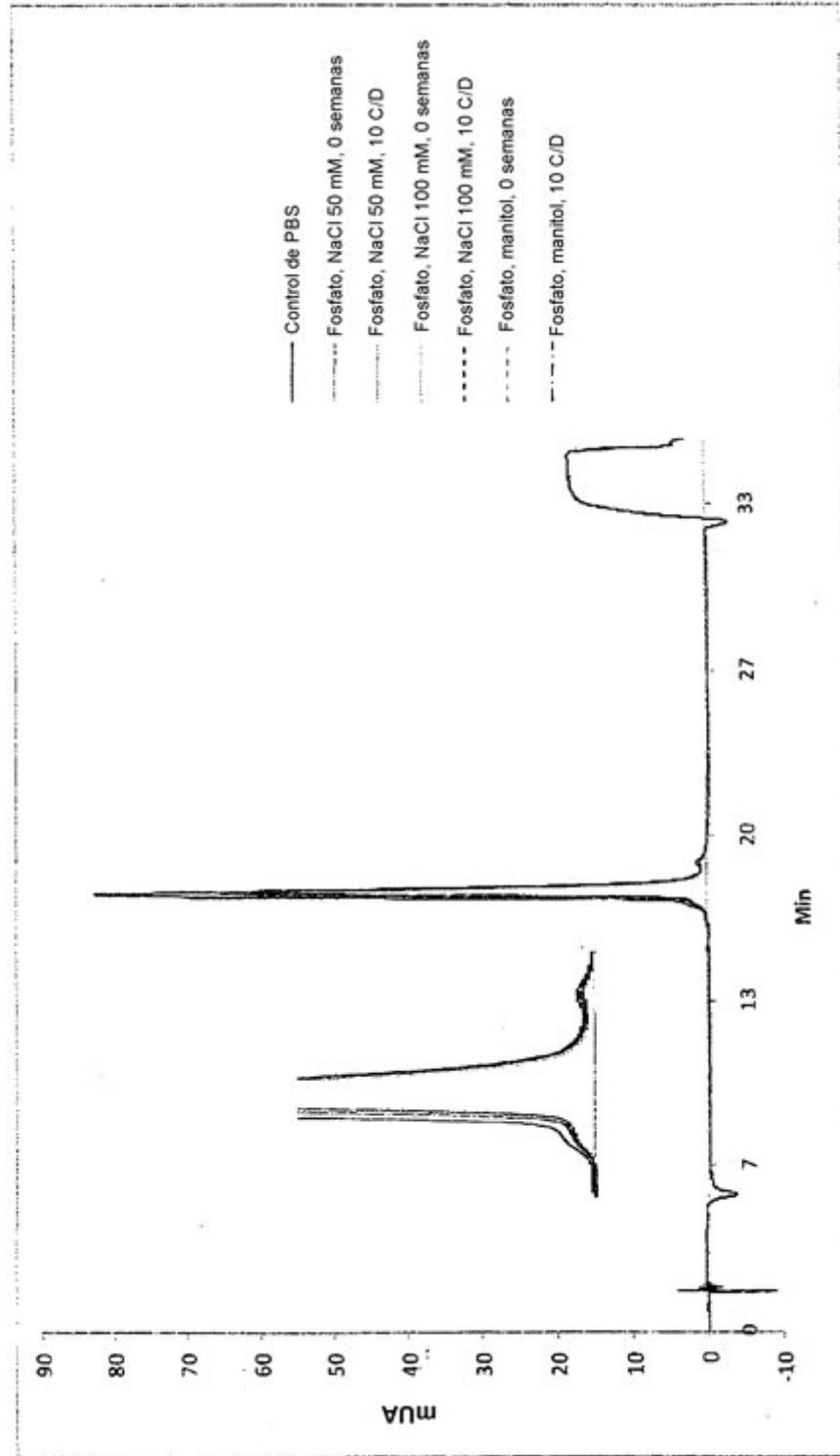


Figura 3

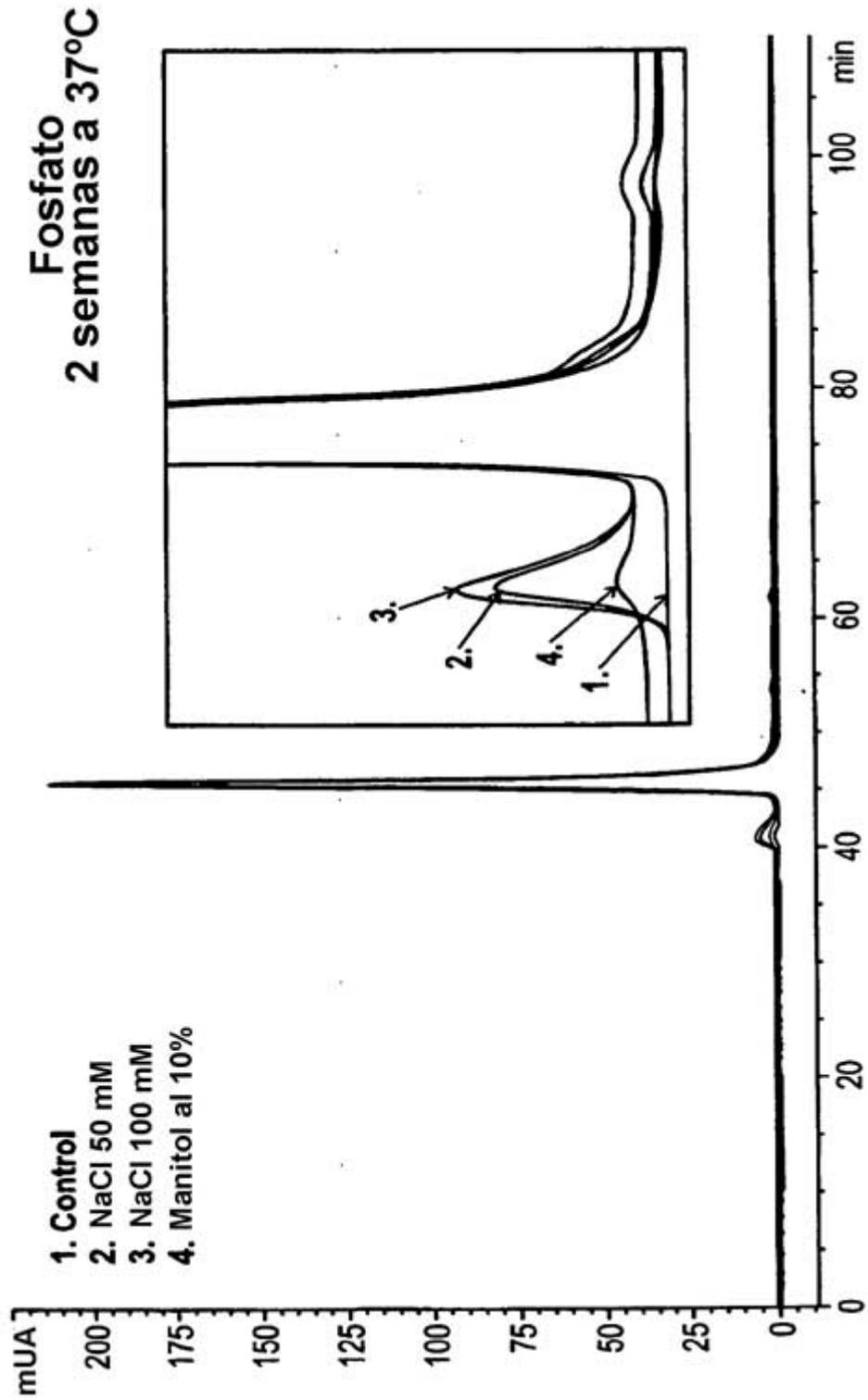


Figura 4(A)

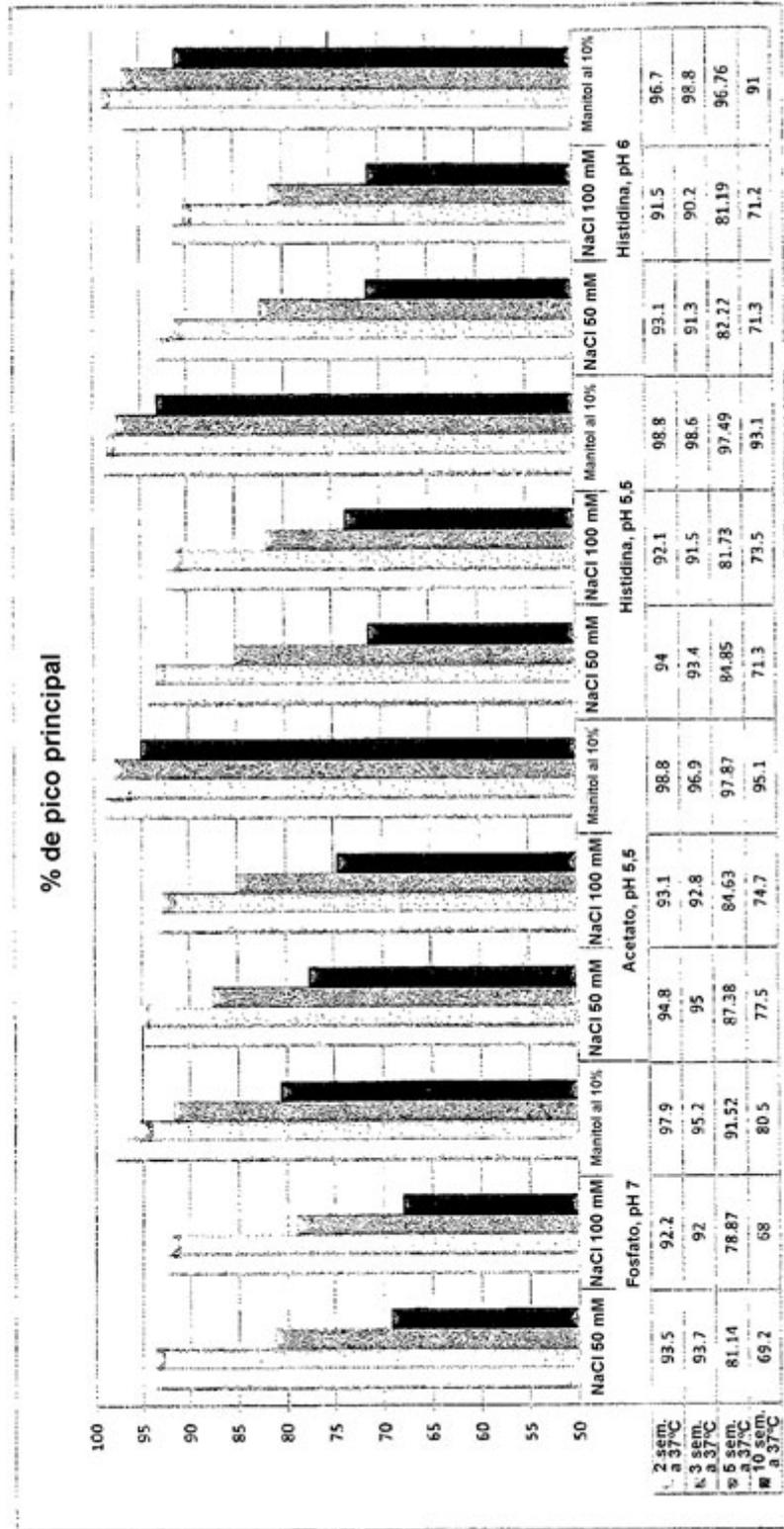


Figura 4(B)

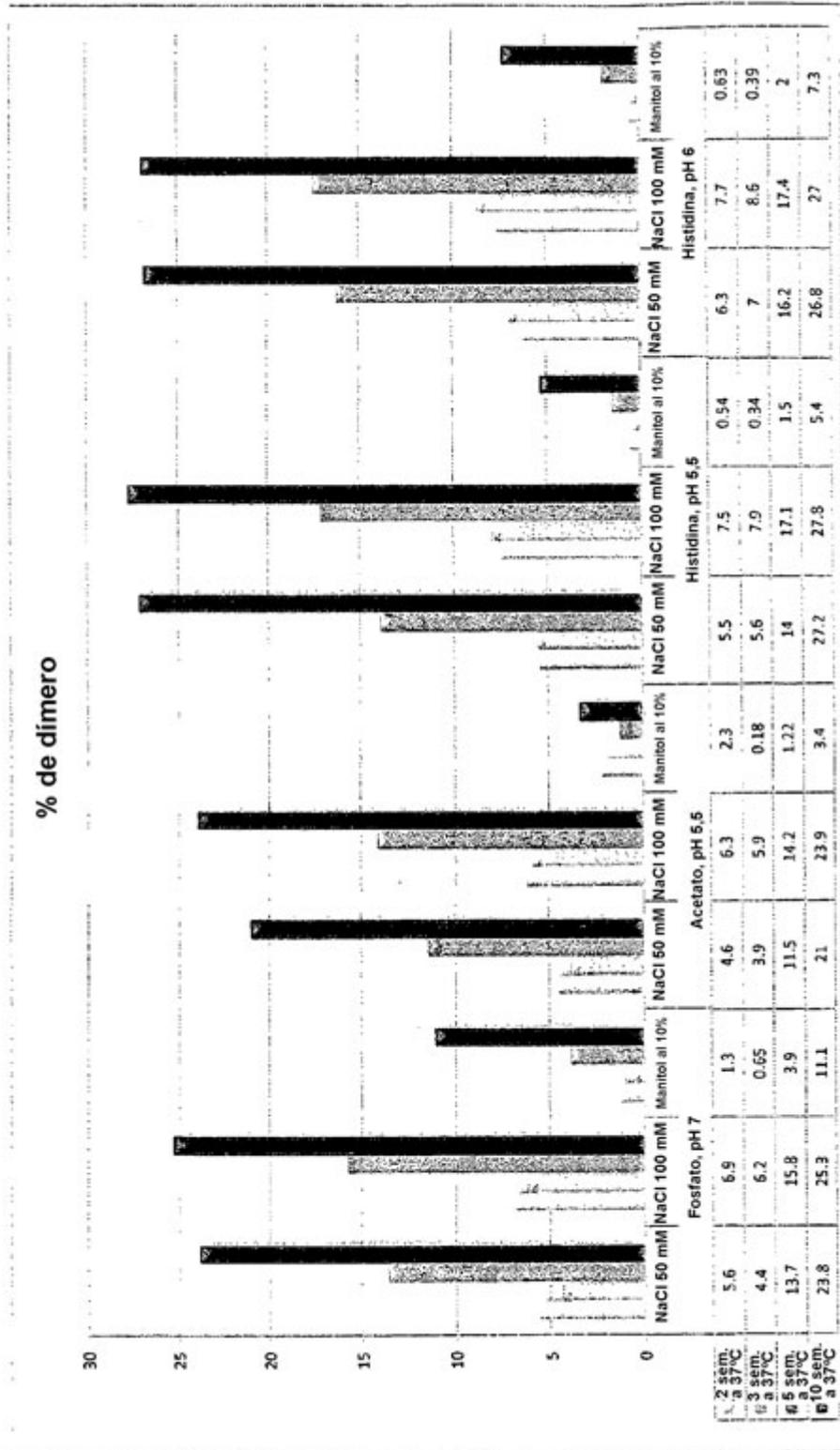
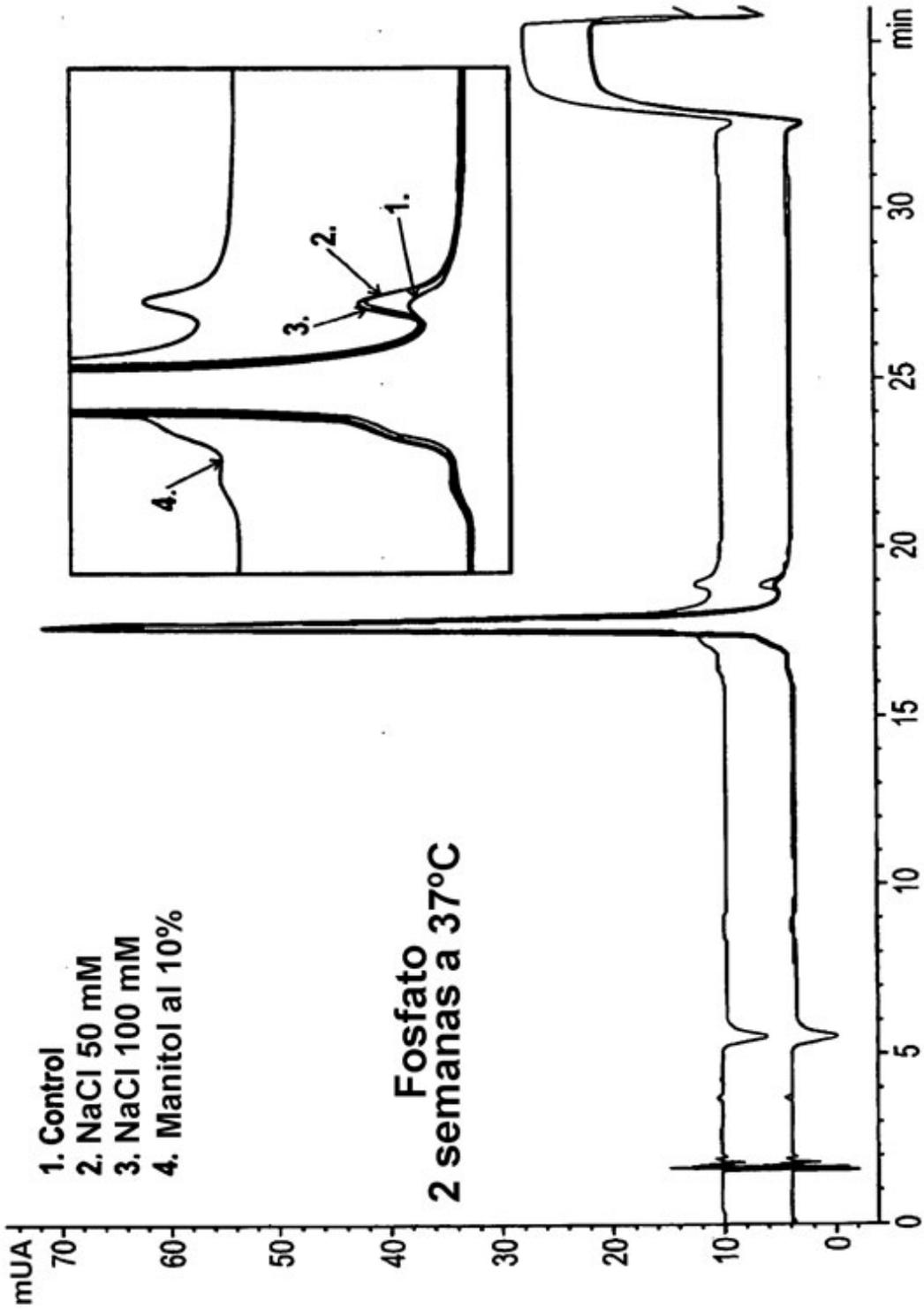


Figura 5



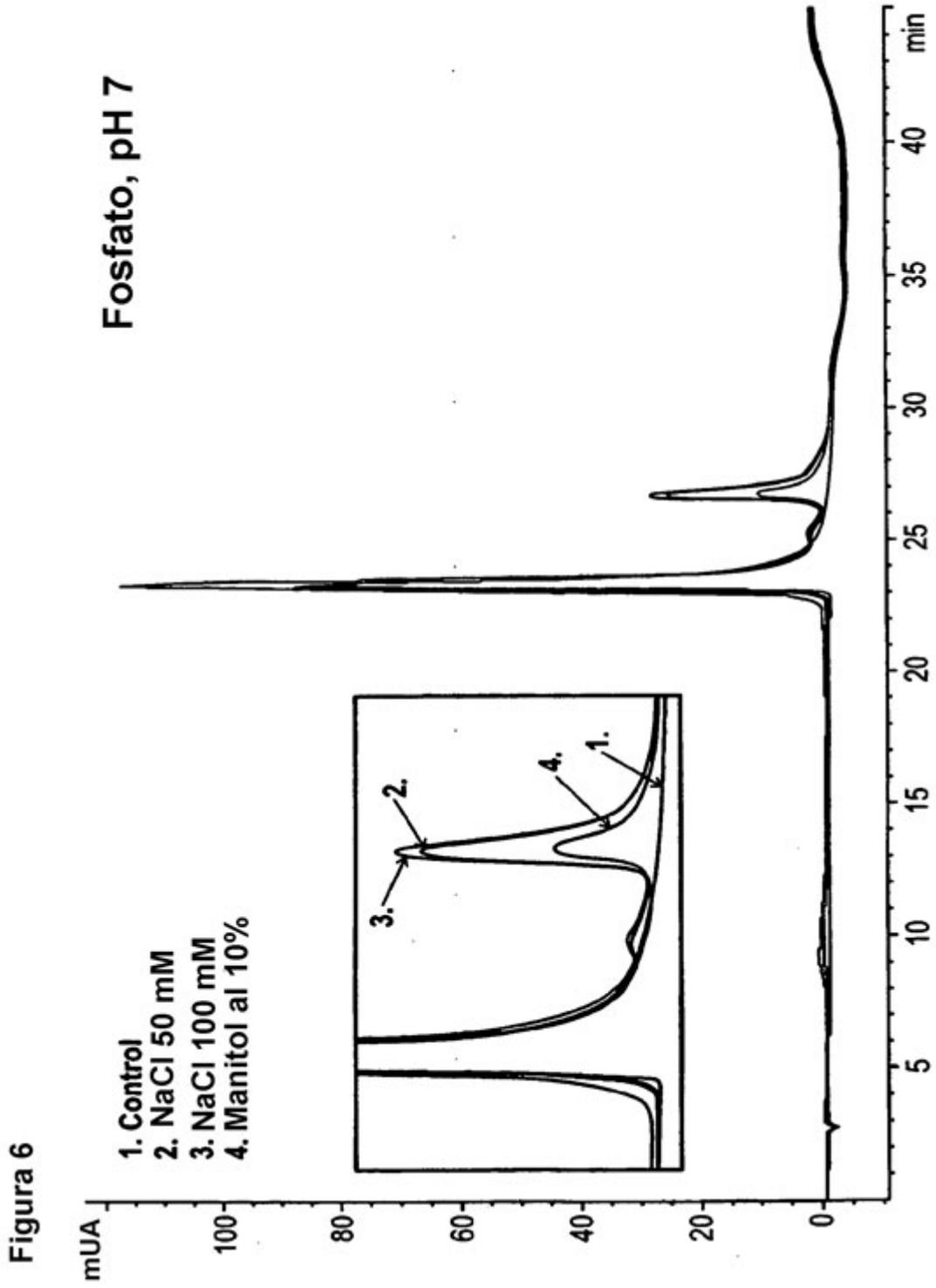


Figura 7

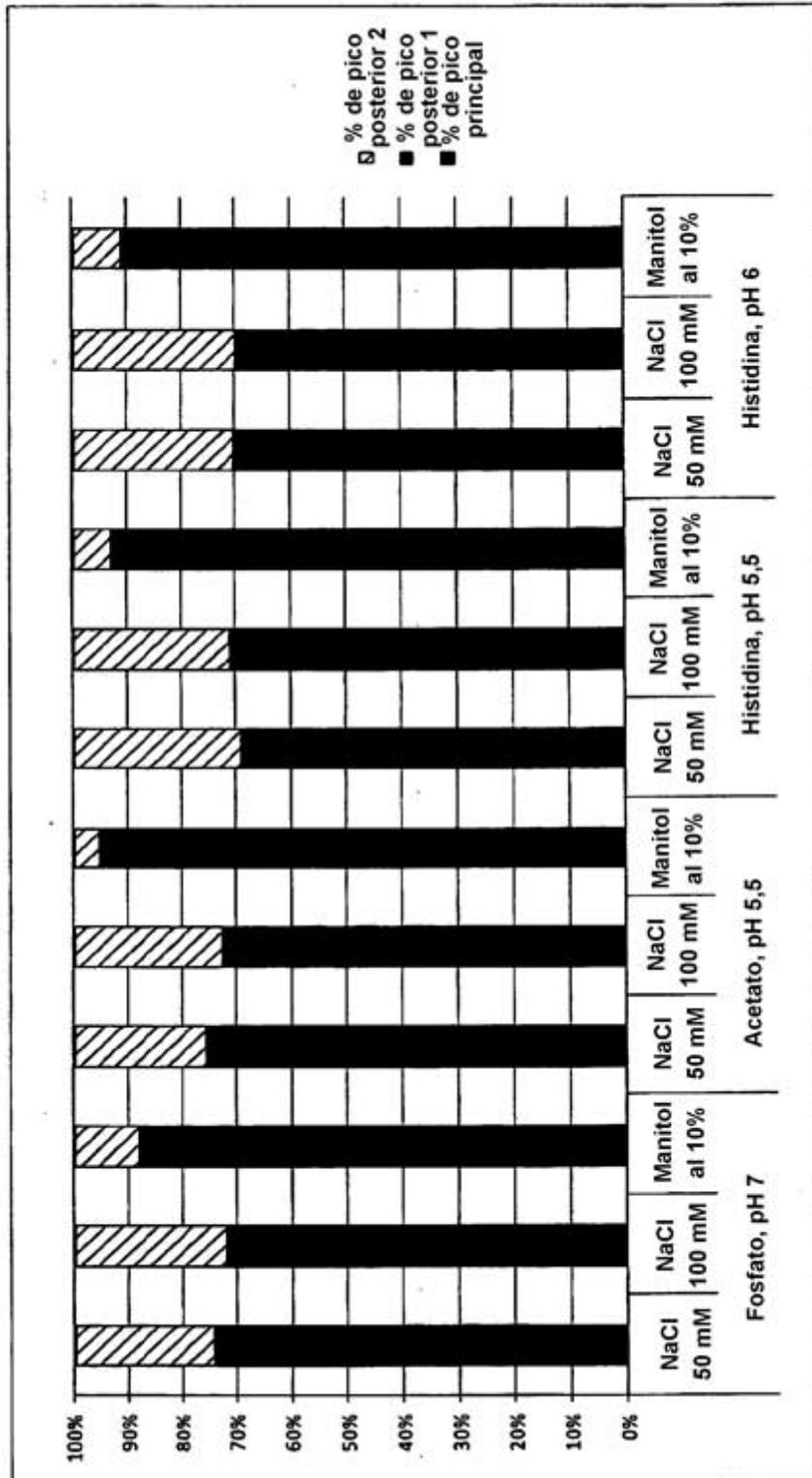
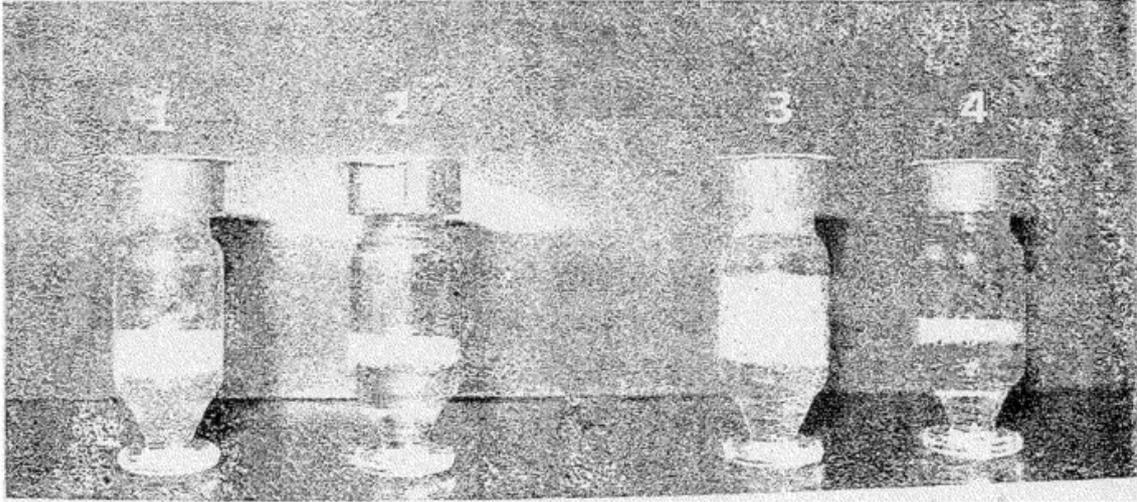


Figura 8



Muestras:

1. RANKL008a diluido hasta 5 mg/ml sin Tween 80
2. RANKL008a diluido hasta 5 mg/ml con Tween 80 al 0,01%
3. RANKL008a sin diluir sin Tween 80
4. RANKL008a sin diluir con Tween 80 al 0,01%

Diluido/sin diluir	Sin Tween 80	Tween 80 al 0,01%
Diluido hasta 5 mg/ml	Opaço (muestra 1)	Transparente (muestra 2)
	Más espuma (muestra 1)	Espuma (muestra 2)
Sin diluir	Transparente (muestra 3)	Transparente (muestra 4)
	Más espuma (muestra 3)	Espuma (muestra 4)

Figura 9

RANKL008a almacenado a -20°C (62,8 mg/ml) en vial de vidrio

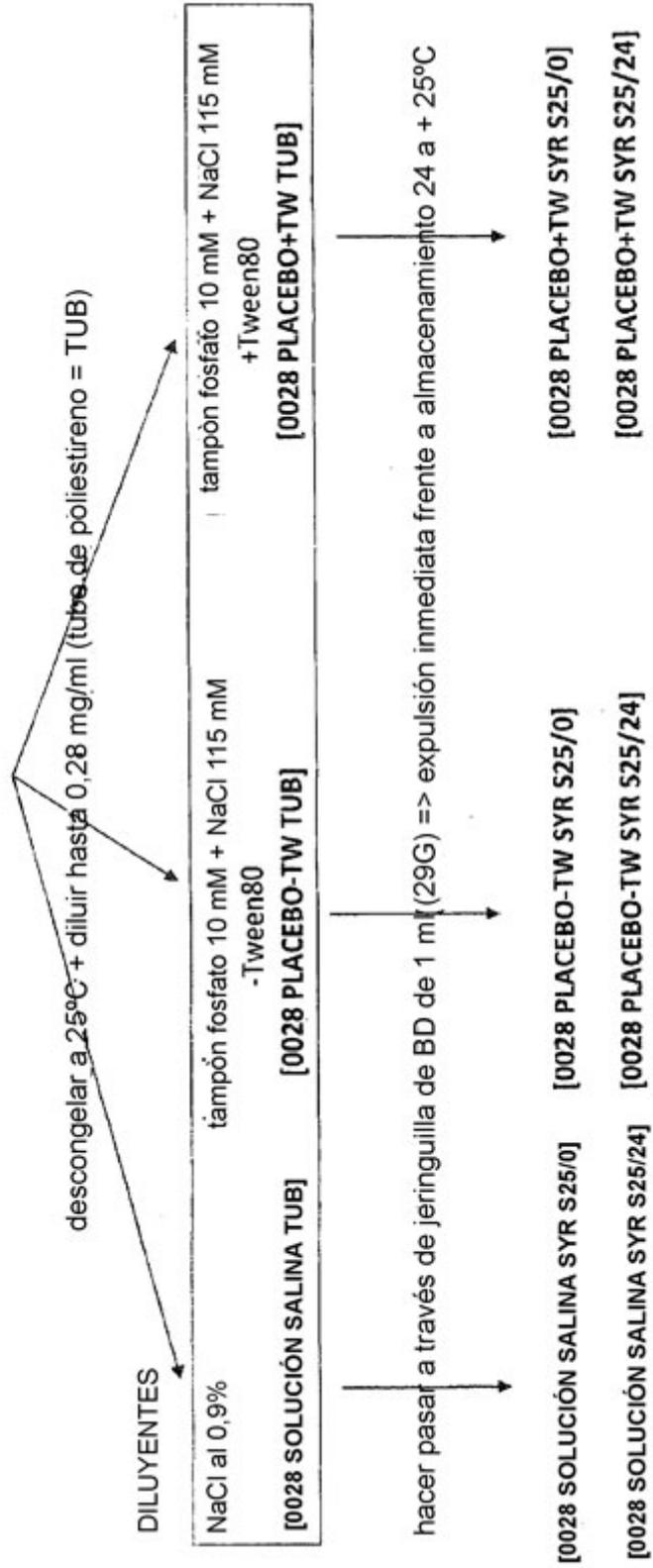


Figura 12

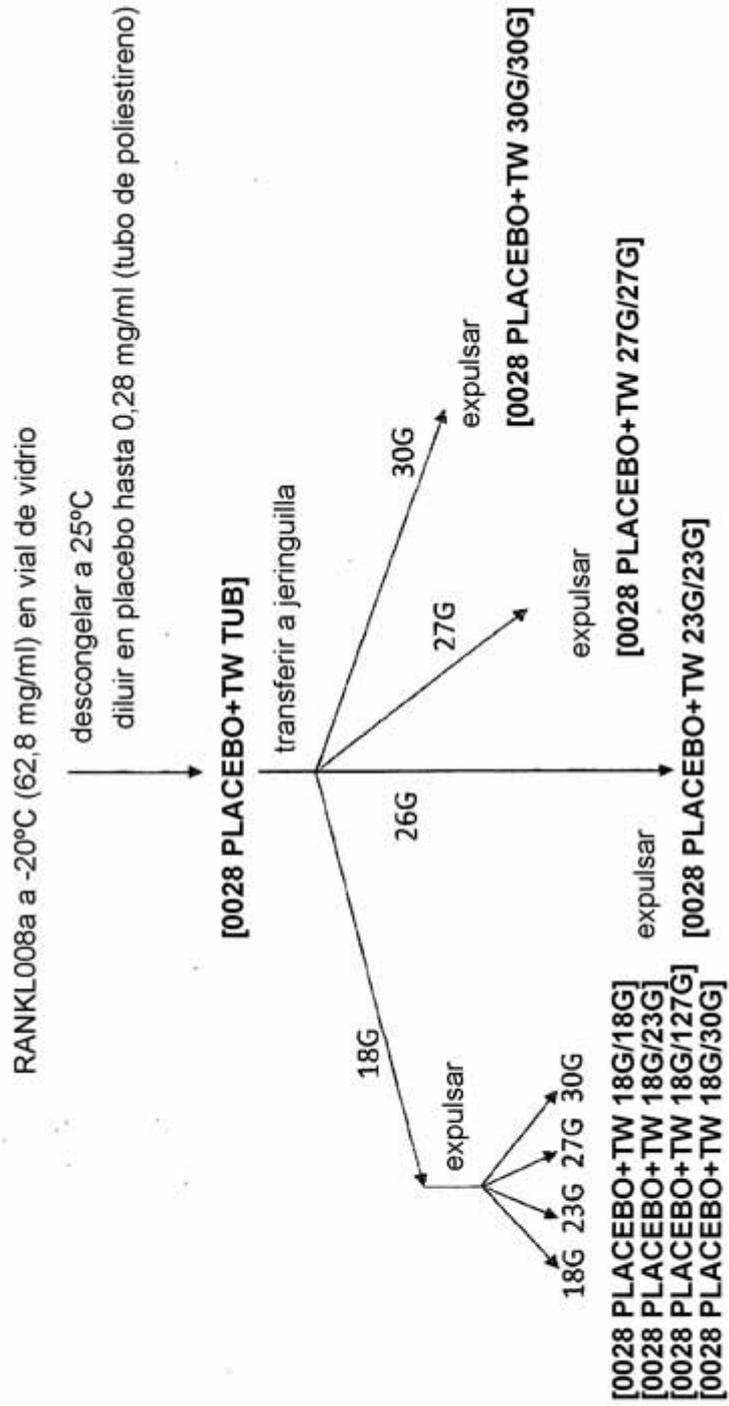


Figura 13

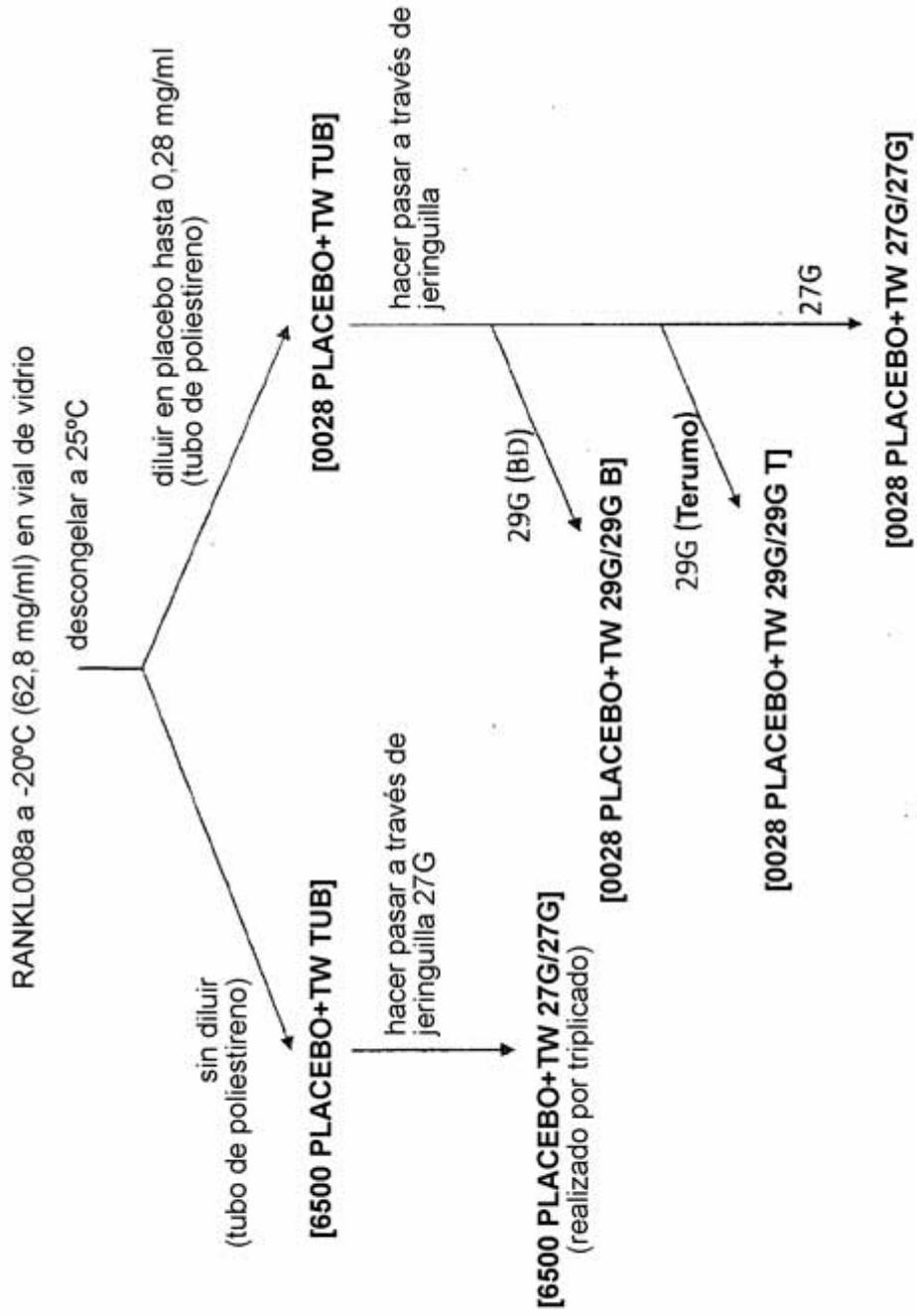


Figura 14(A)

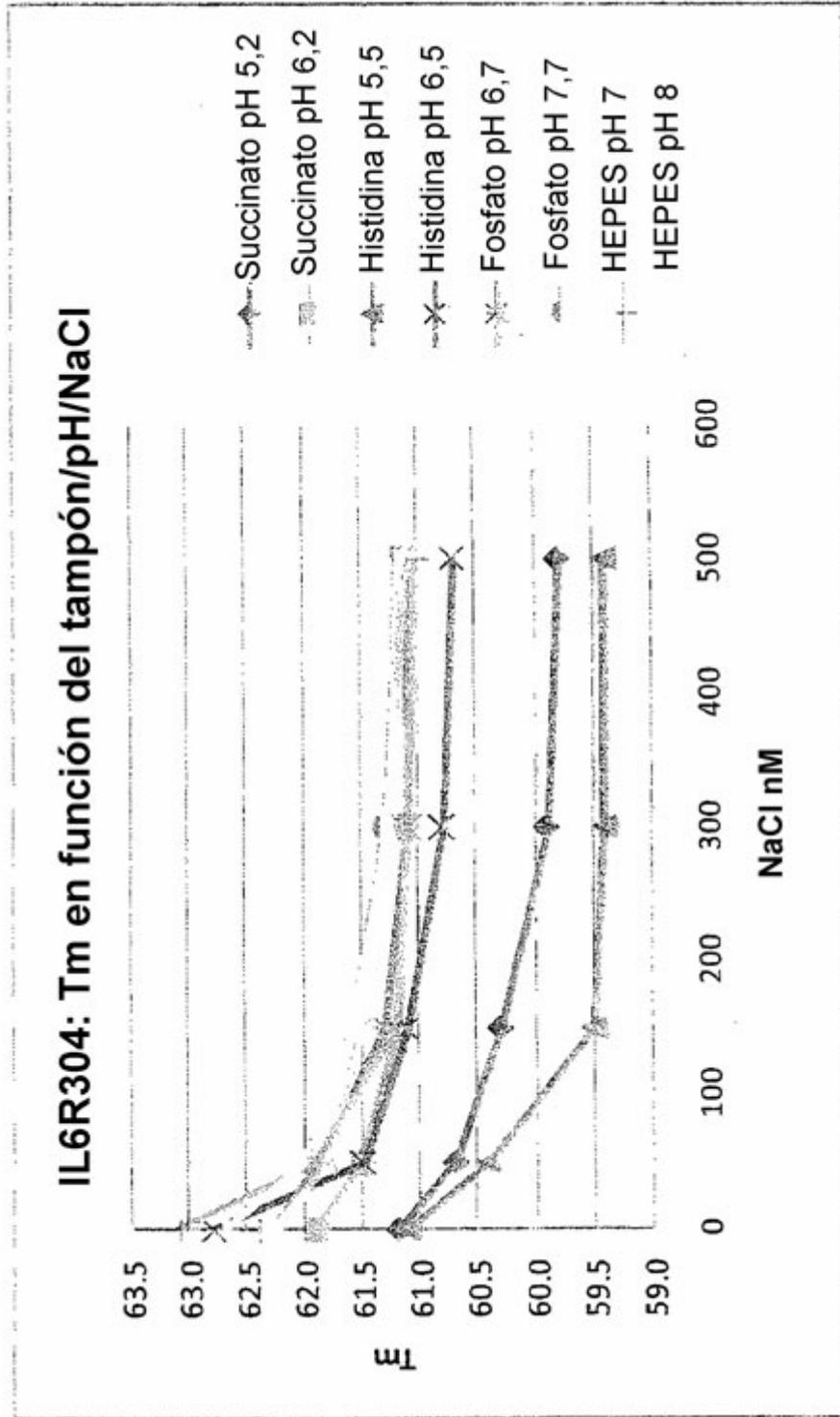


Figura 14(B)

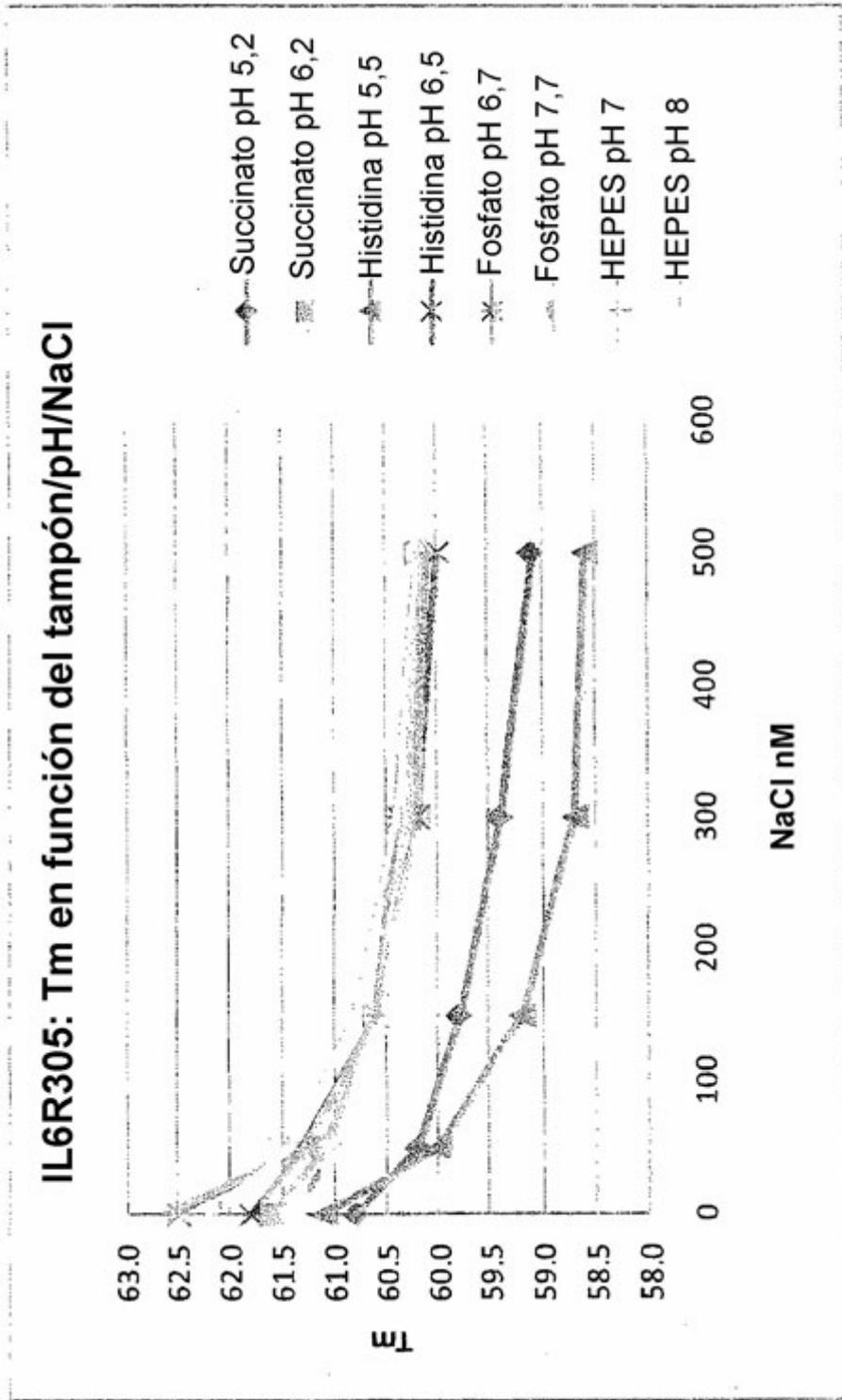


Figura 14(C)

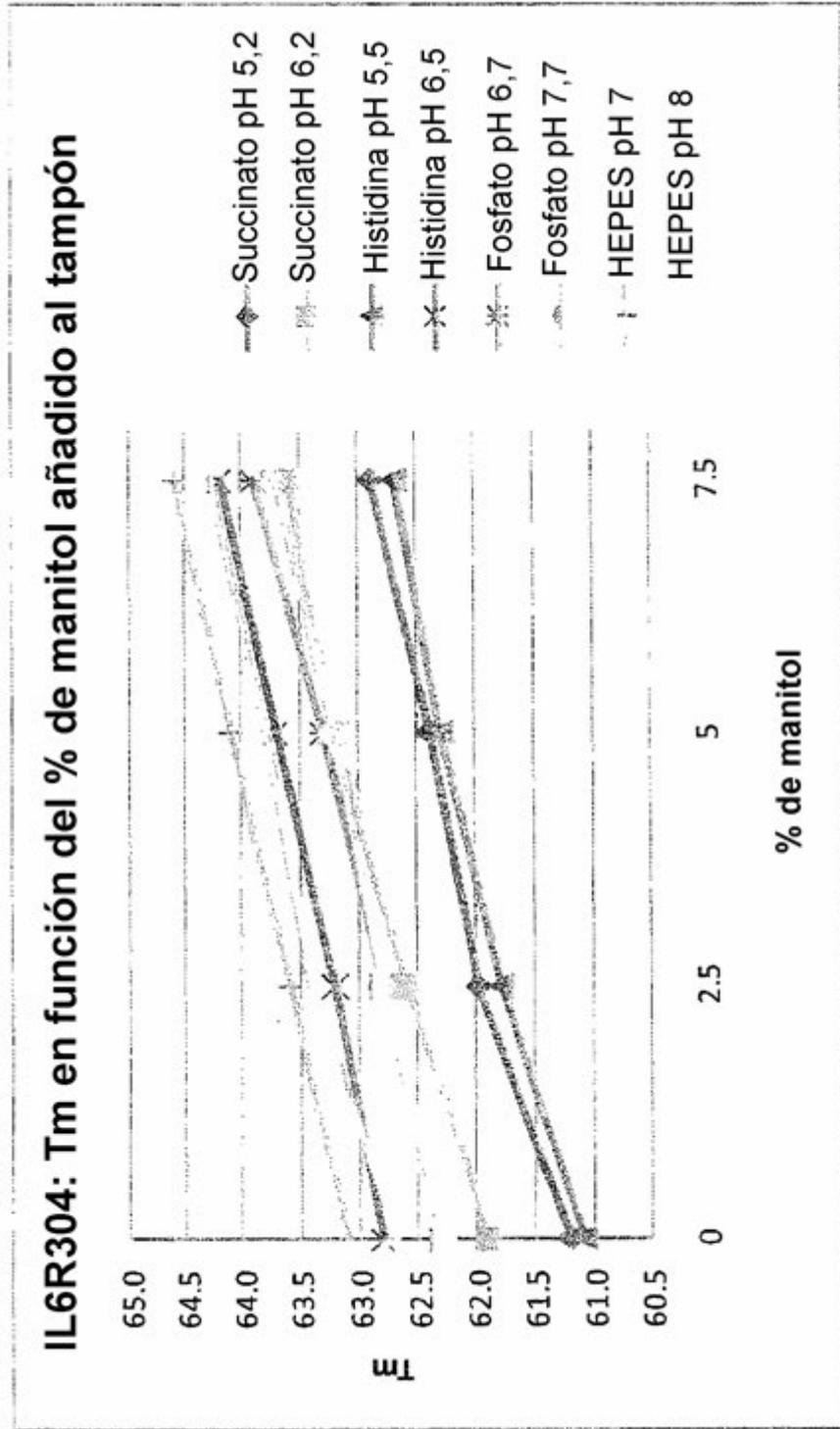


Figura 14(D)

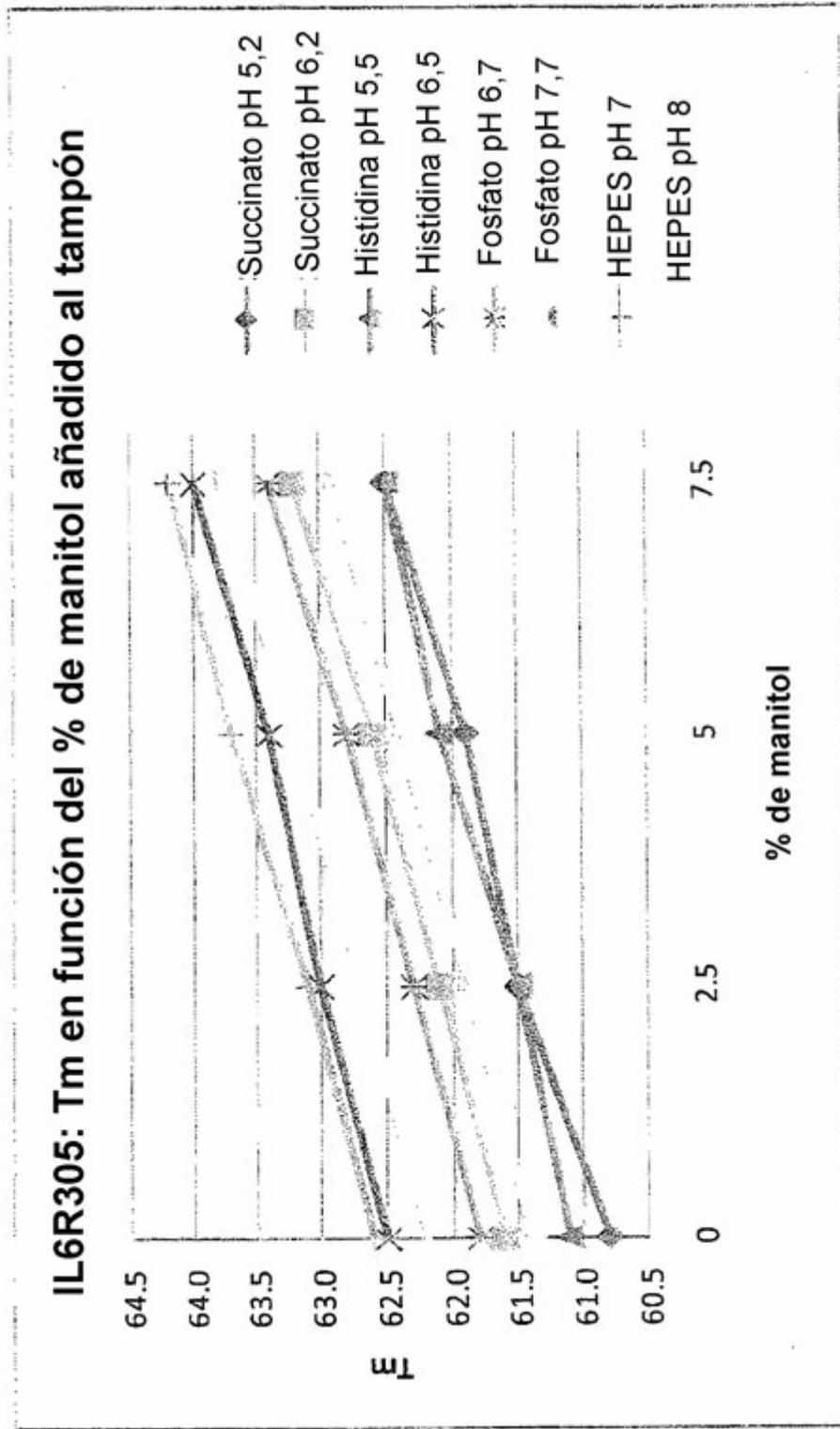


Figura 14 (E)

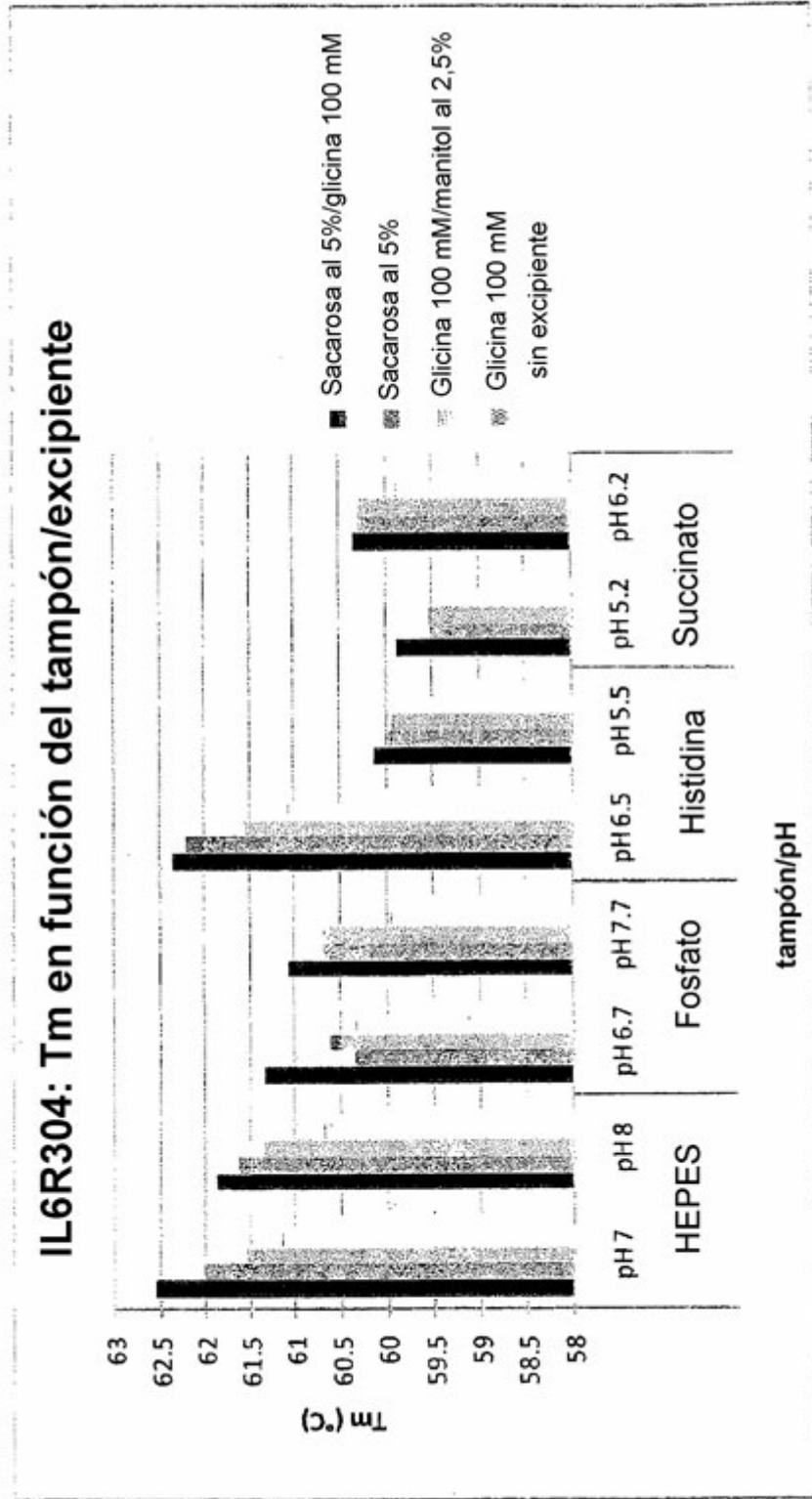


Figura 14 (F)

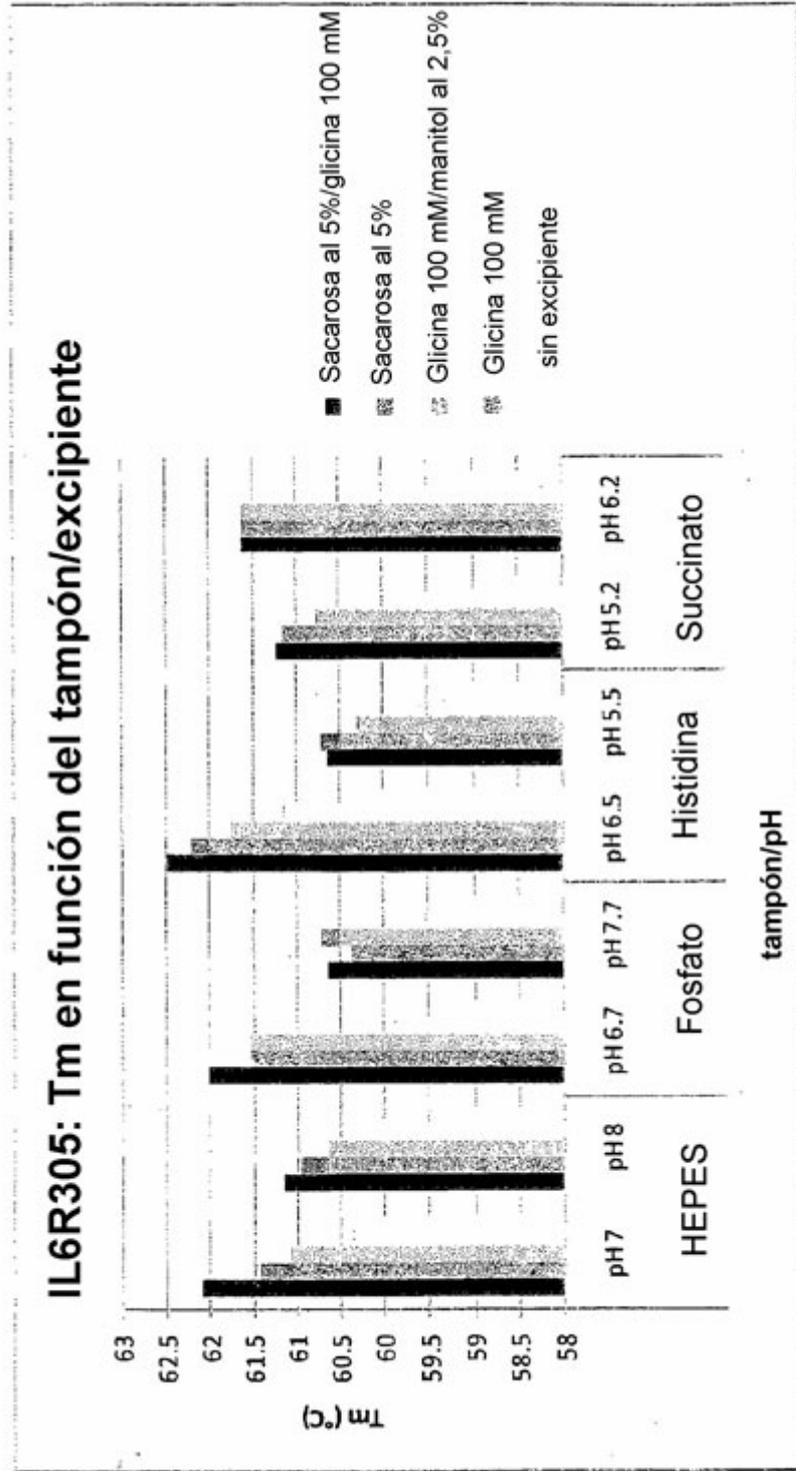


Figura 15(A)

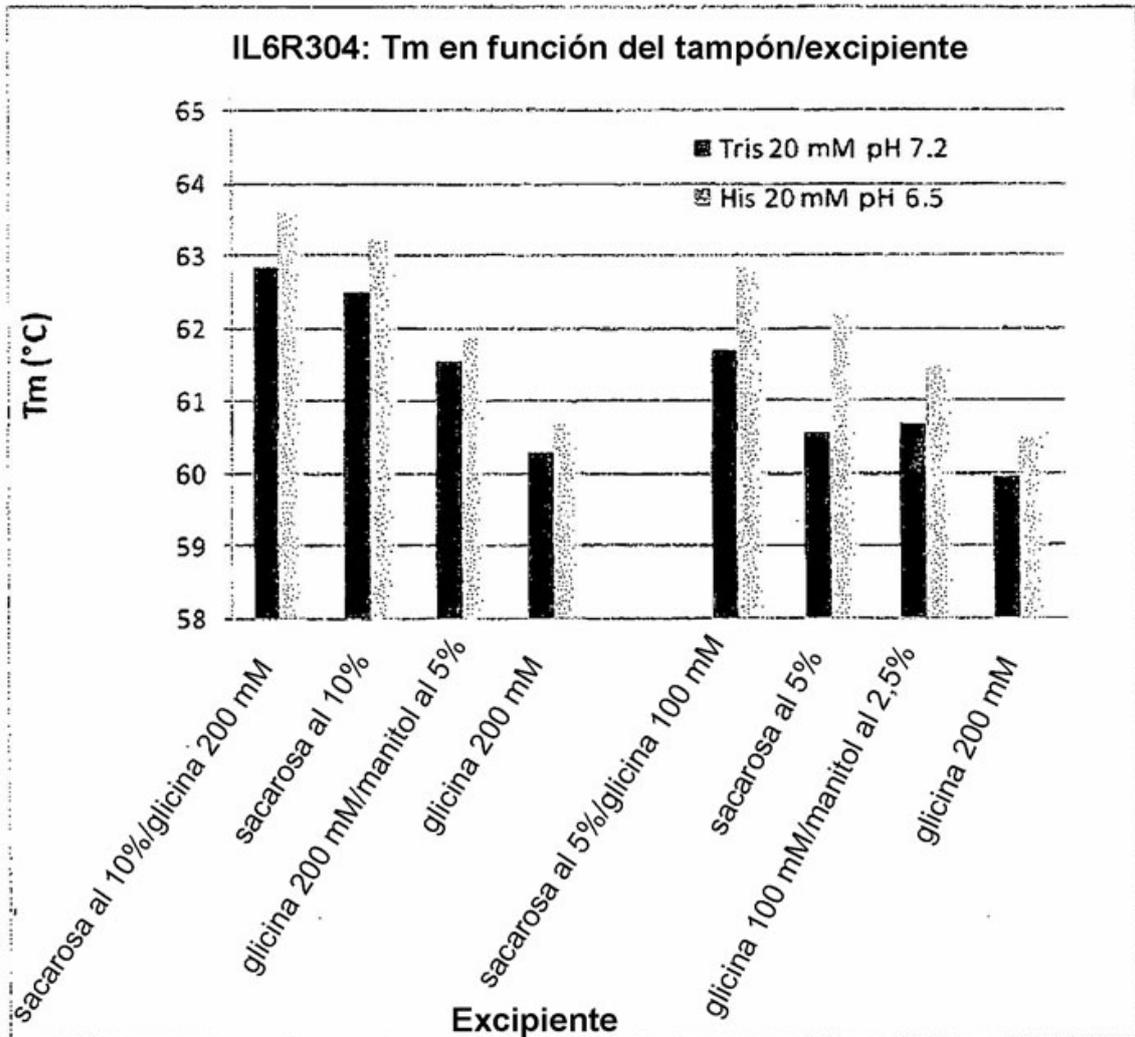


Figura 15 (B)

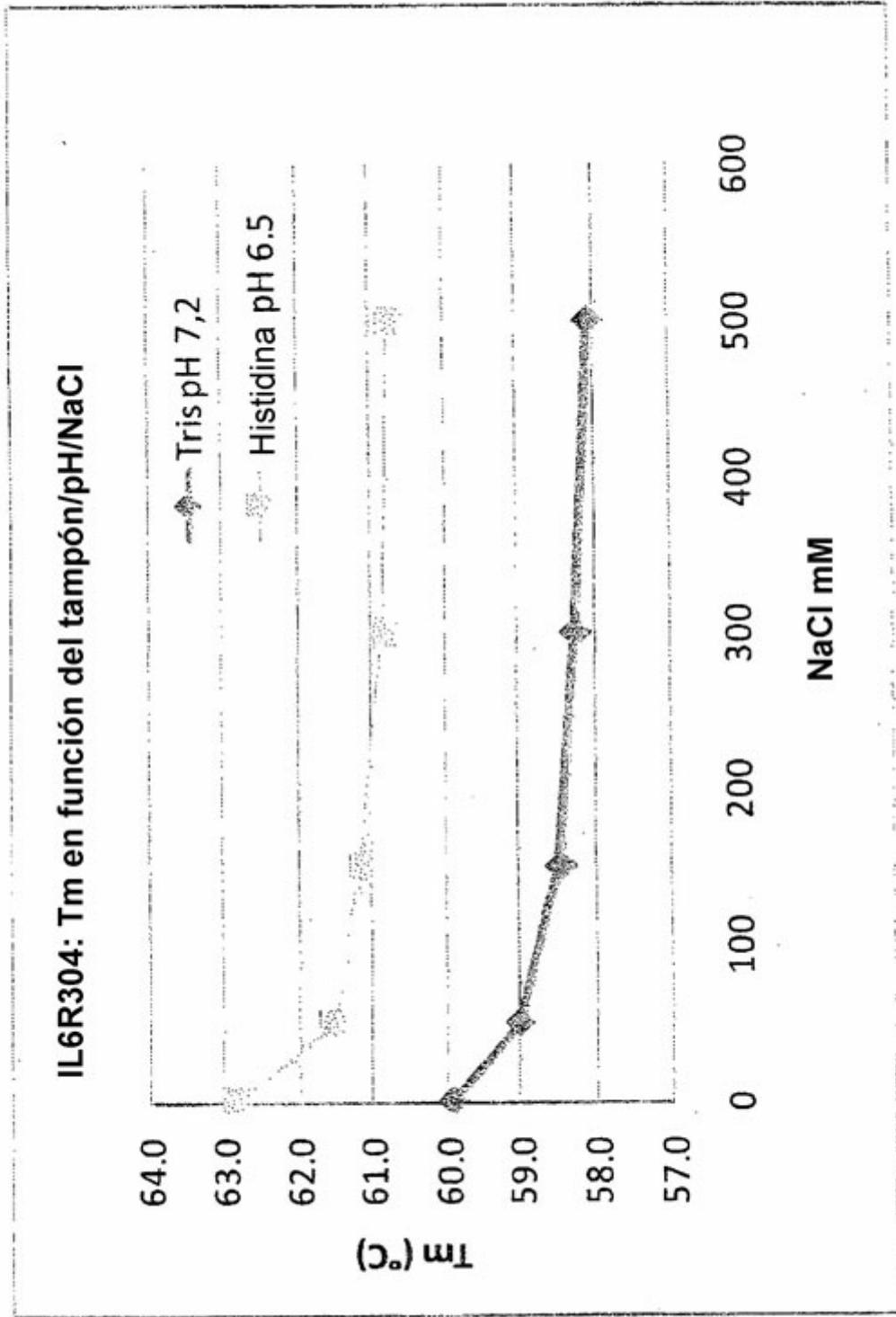


Figura 15(C)

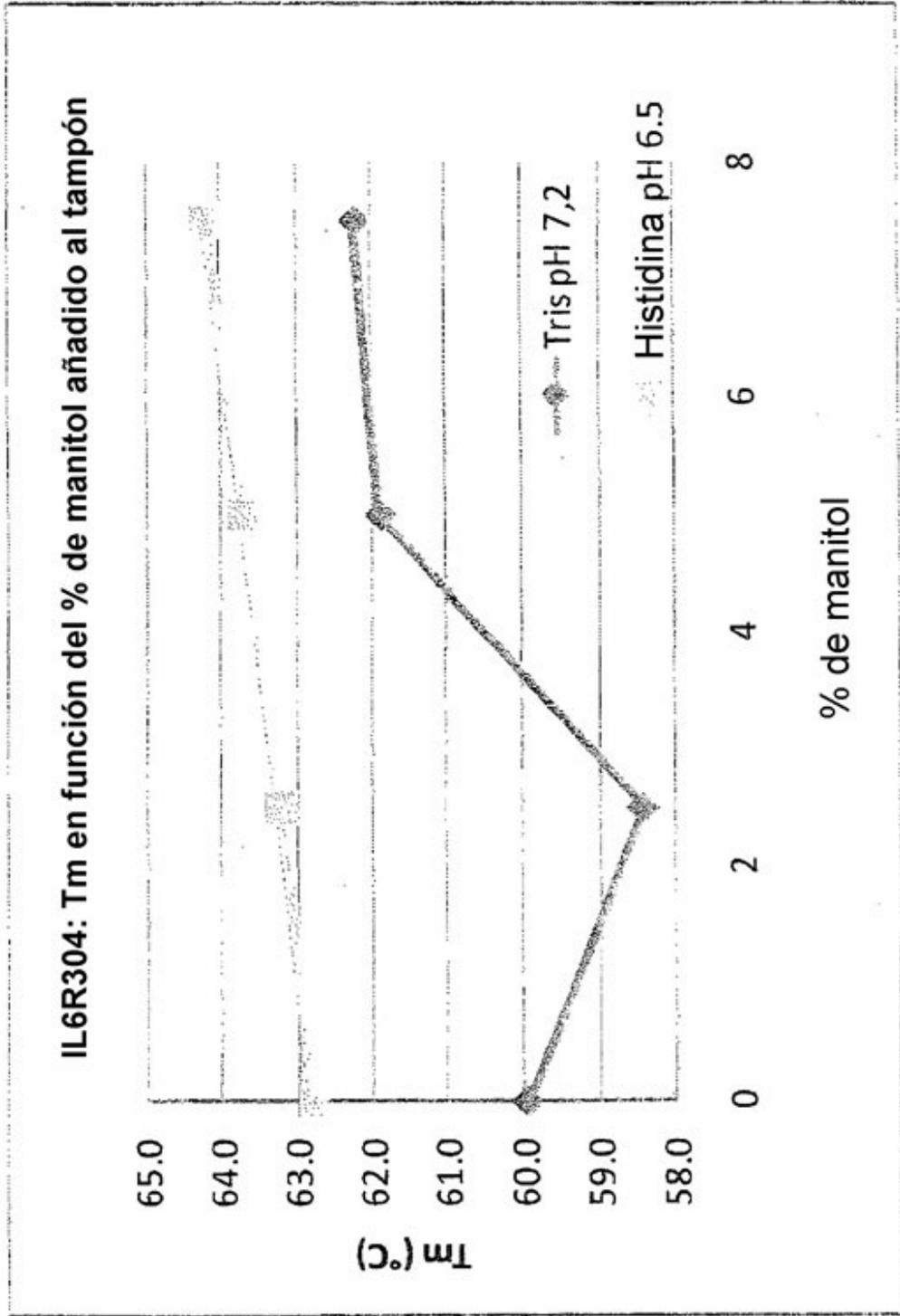


Figura 16(A)

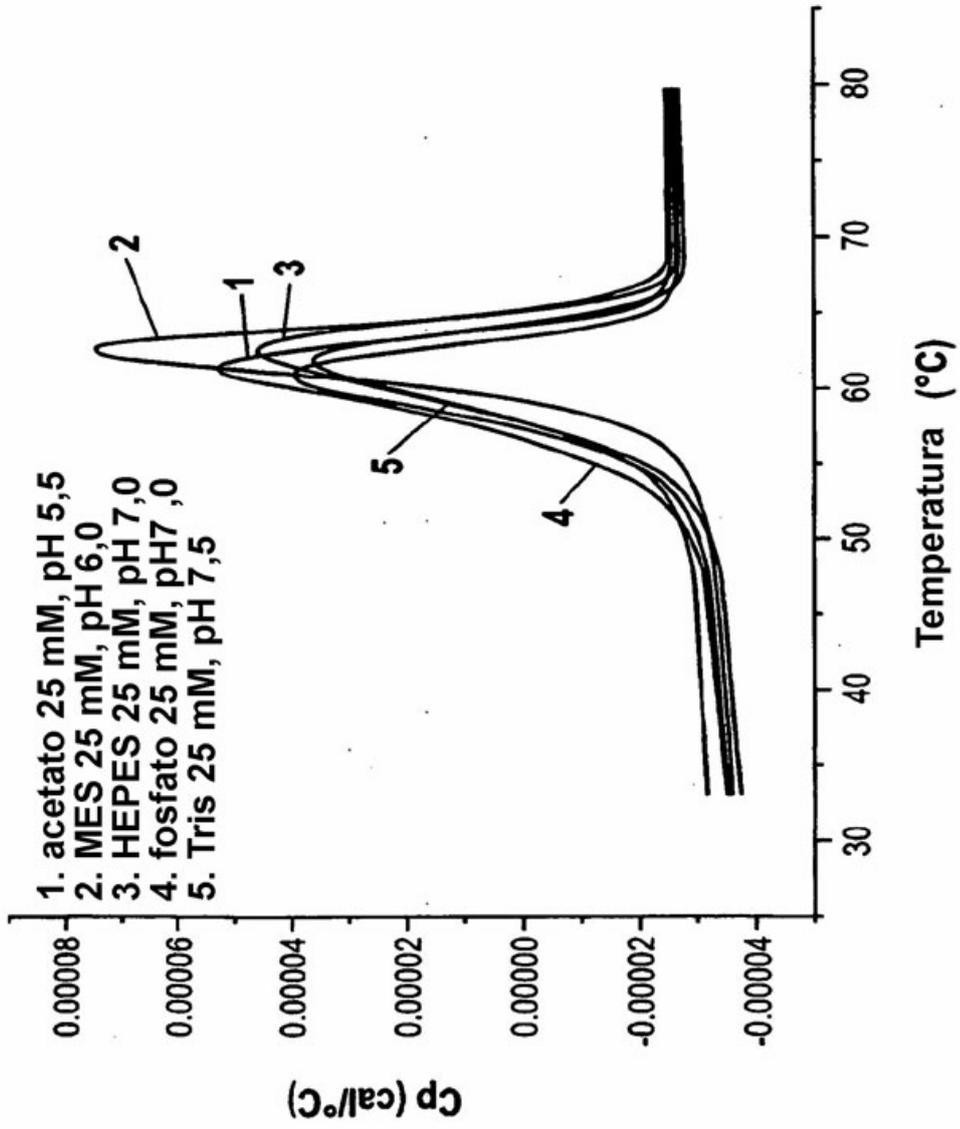


Figura 16 (B)

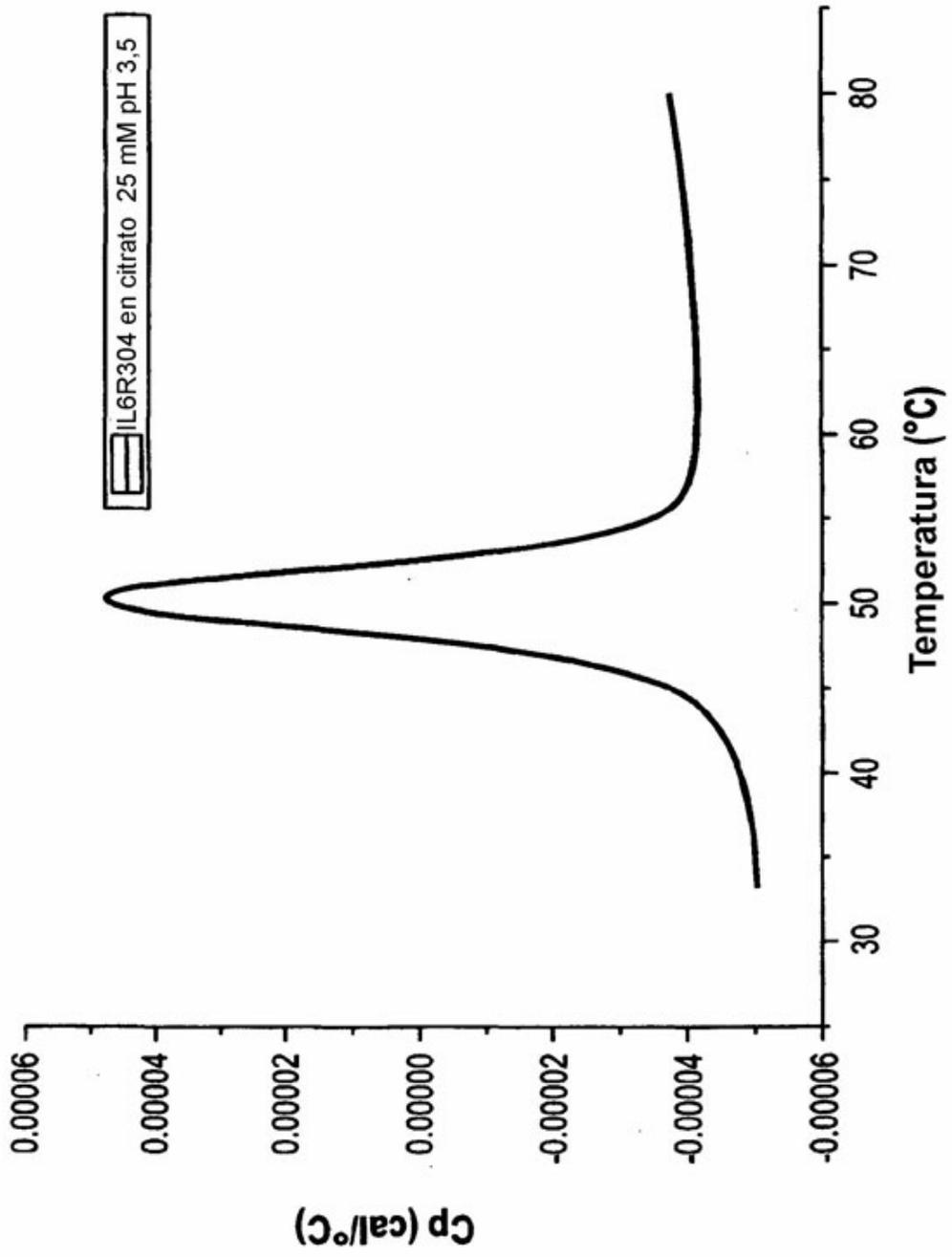


Figura 17 (A)

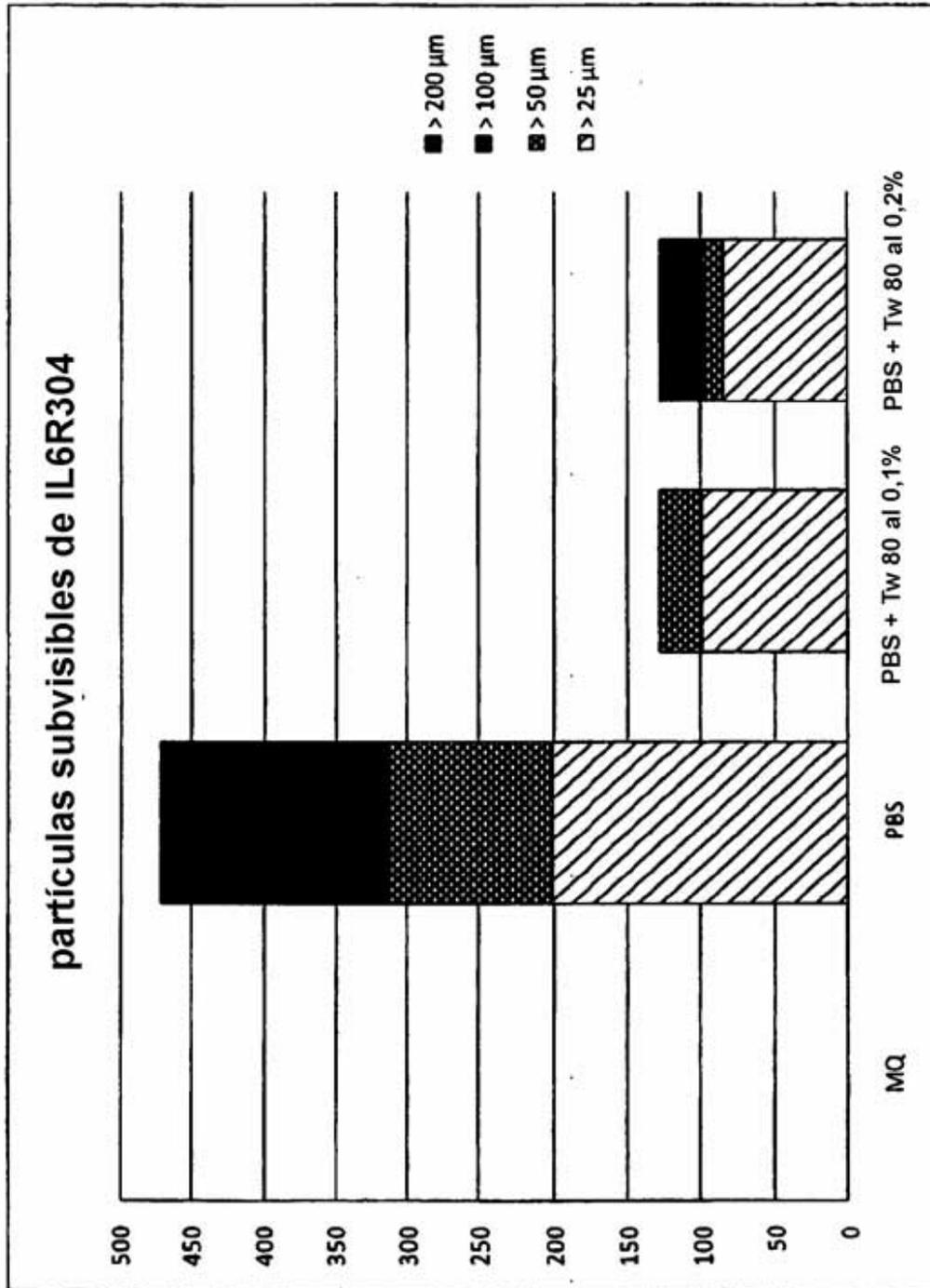


Figura 17 (B)

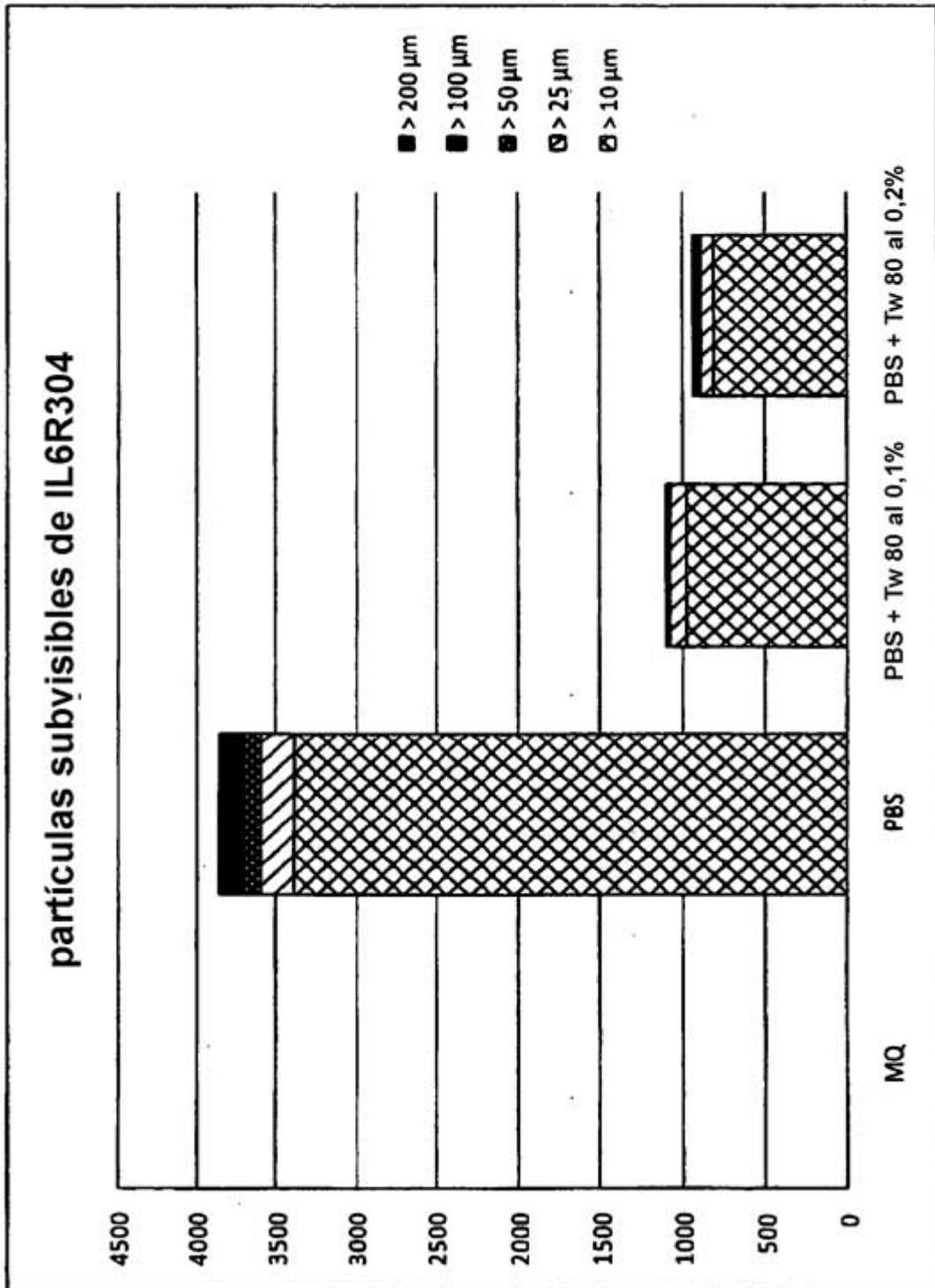


Figura 18

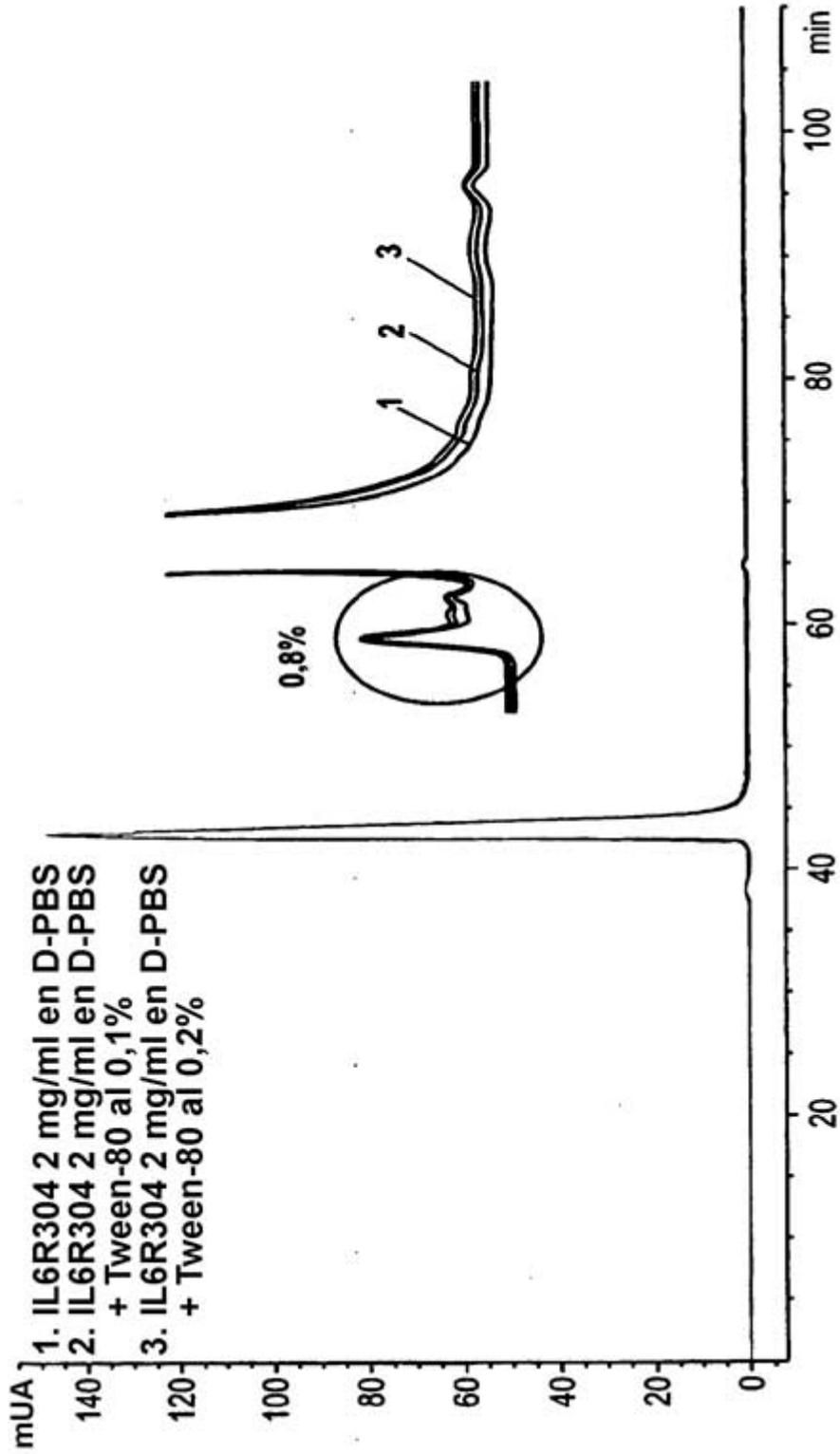


Figura 19 (A)

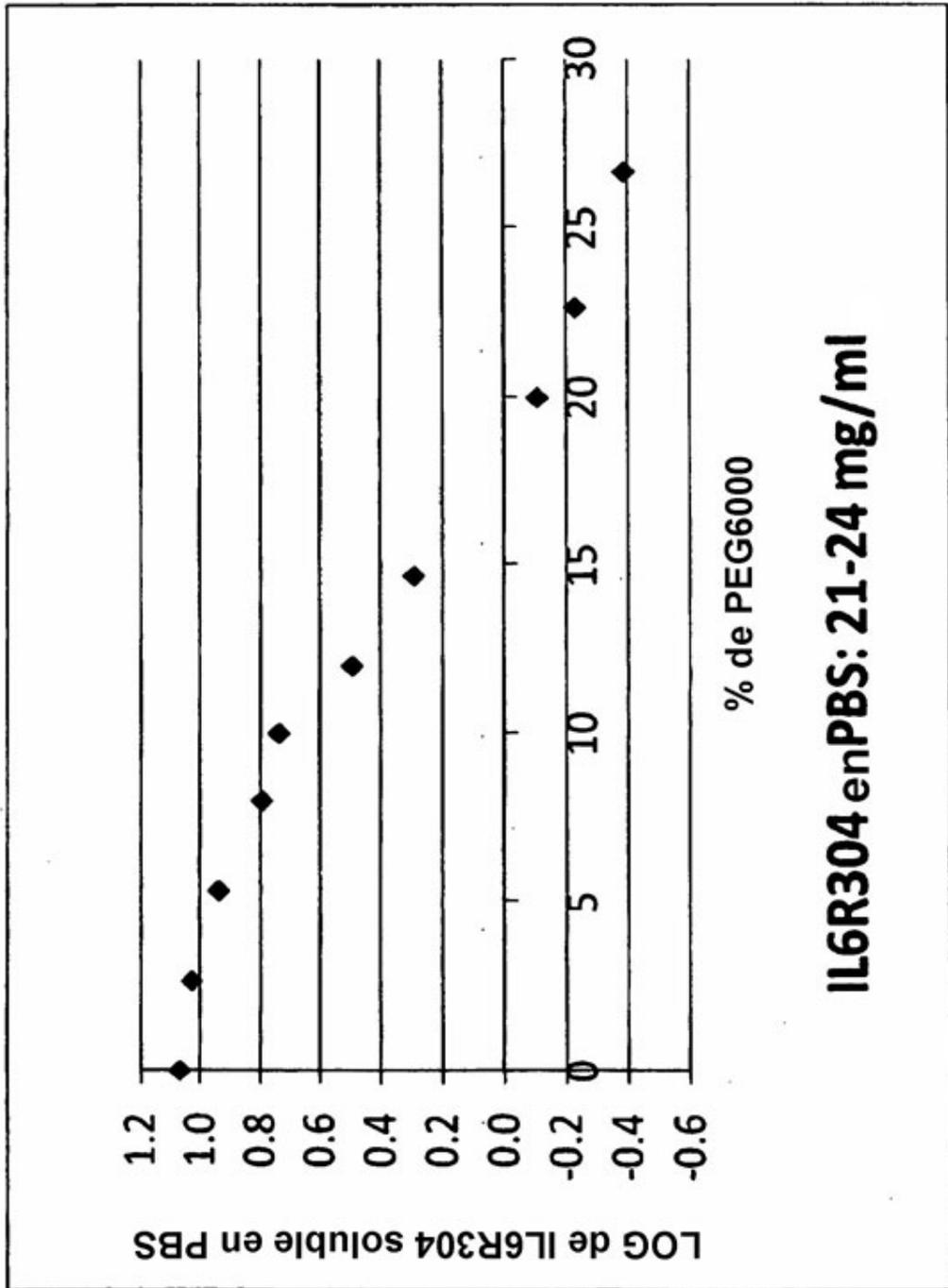


Figura 19 (B)

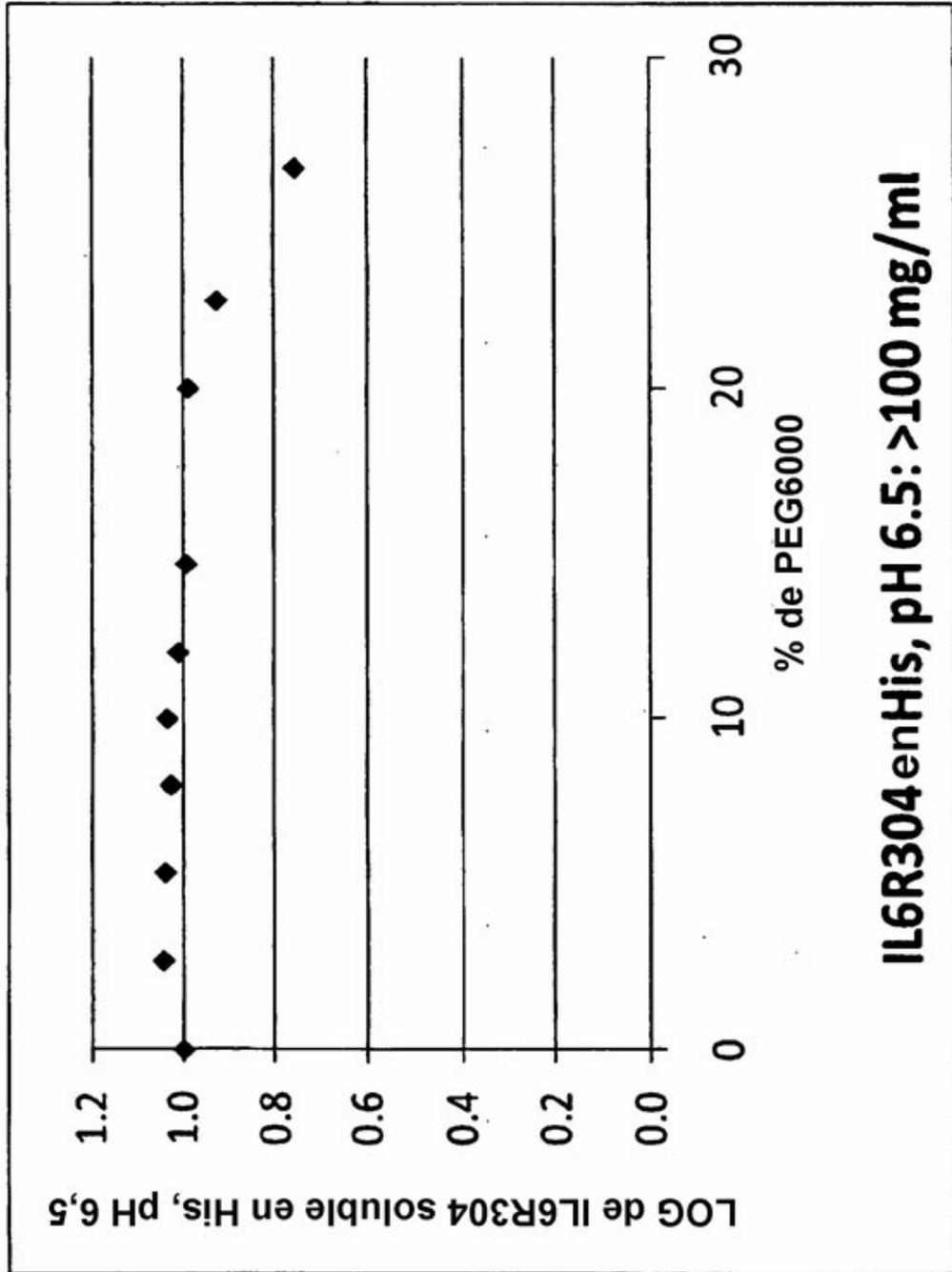


Figura 19 (C)

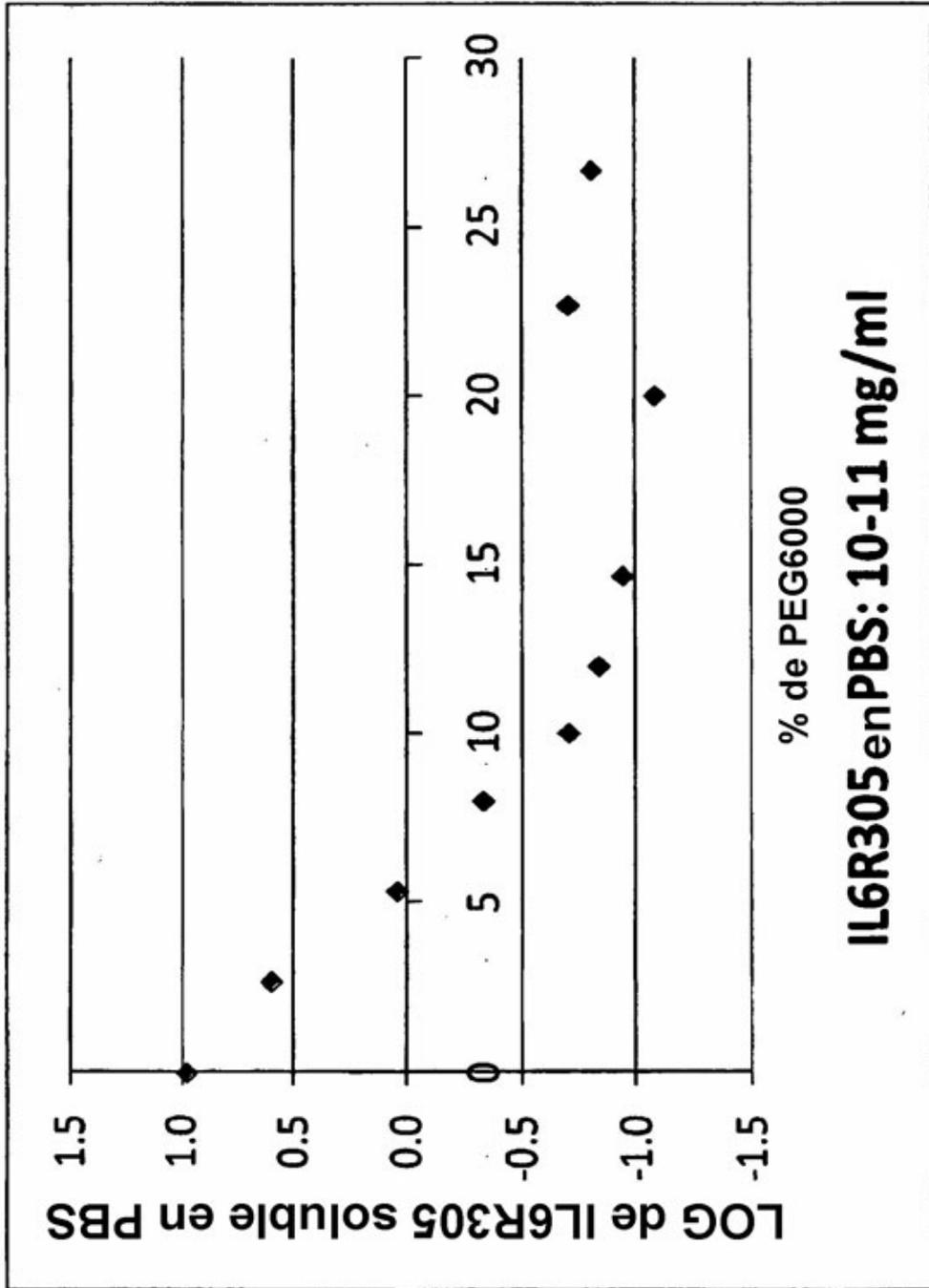
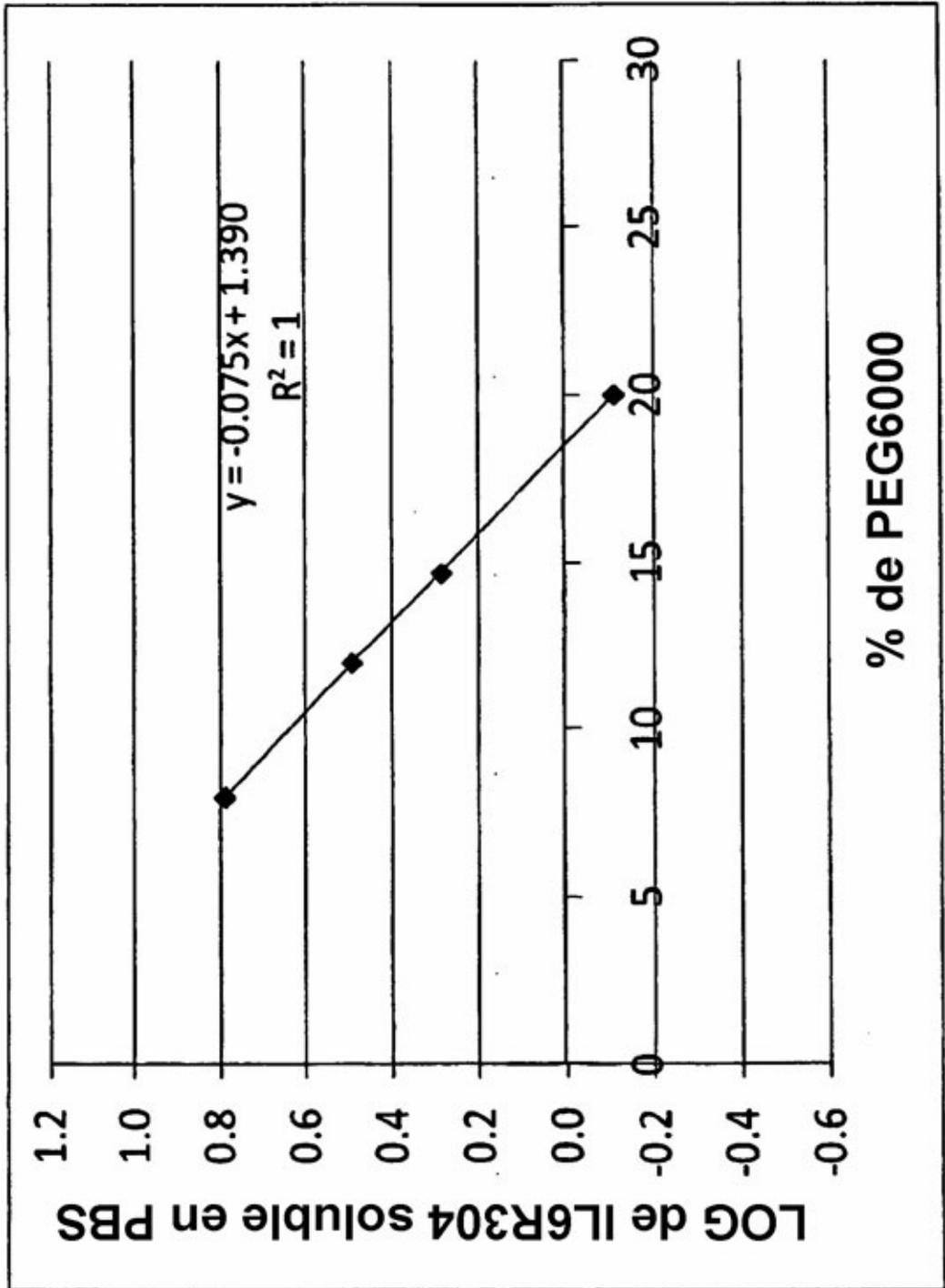


Figura 19(D)



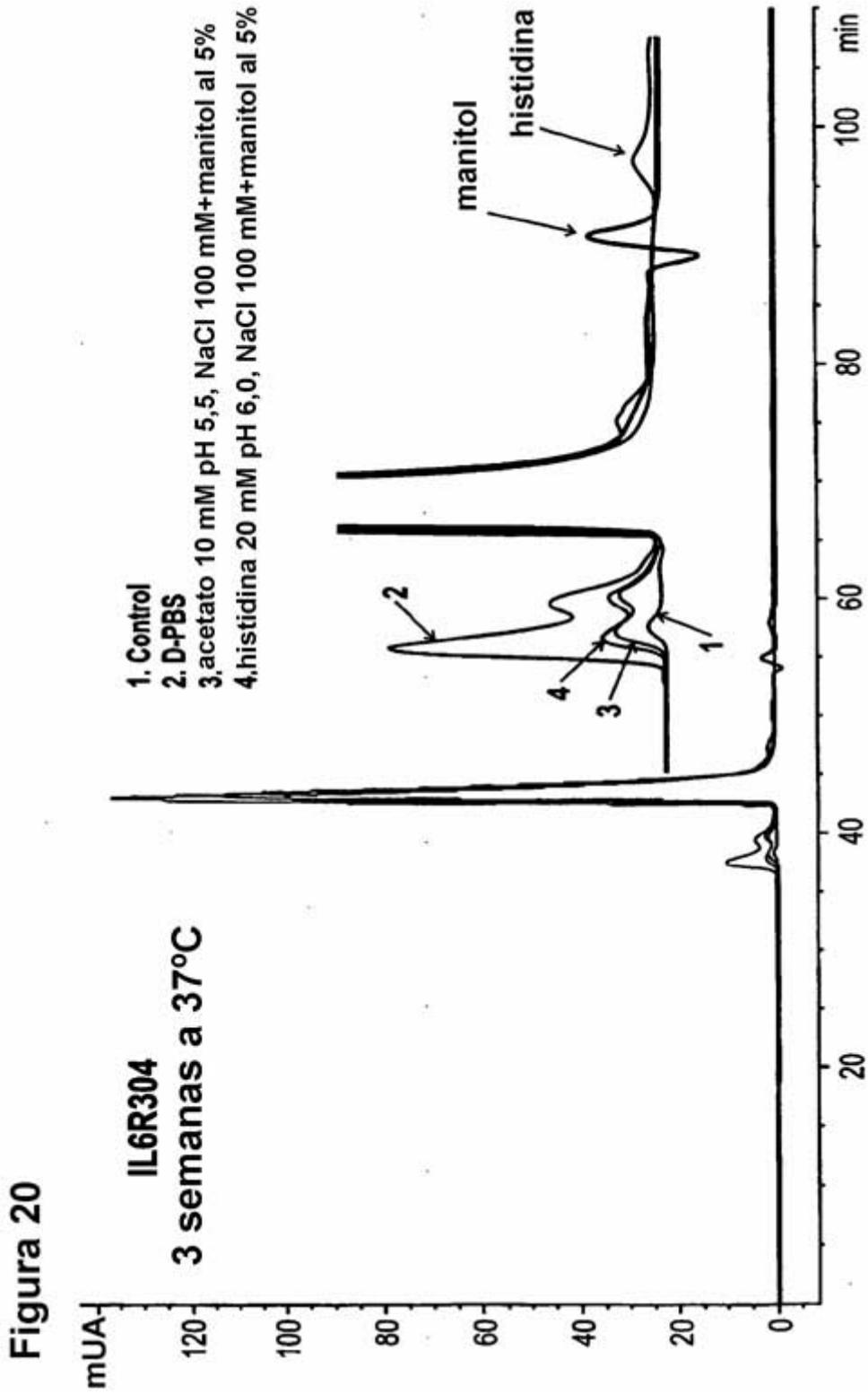


Figura 21

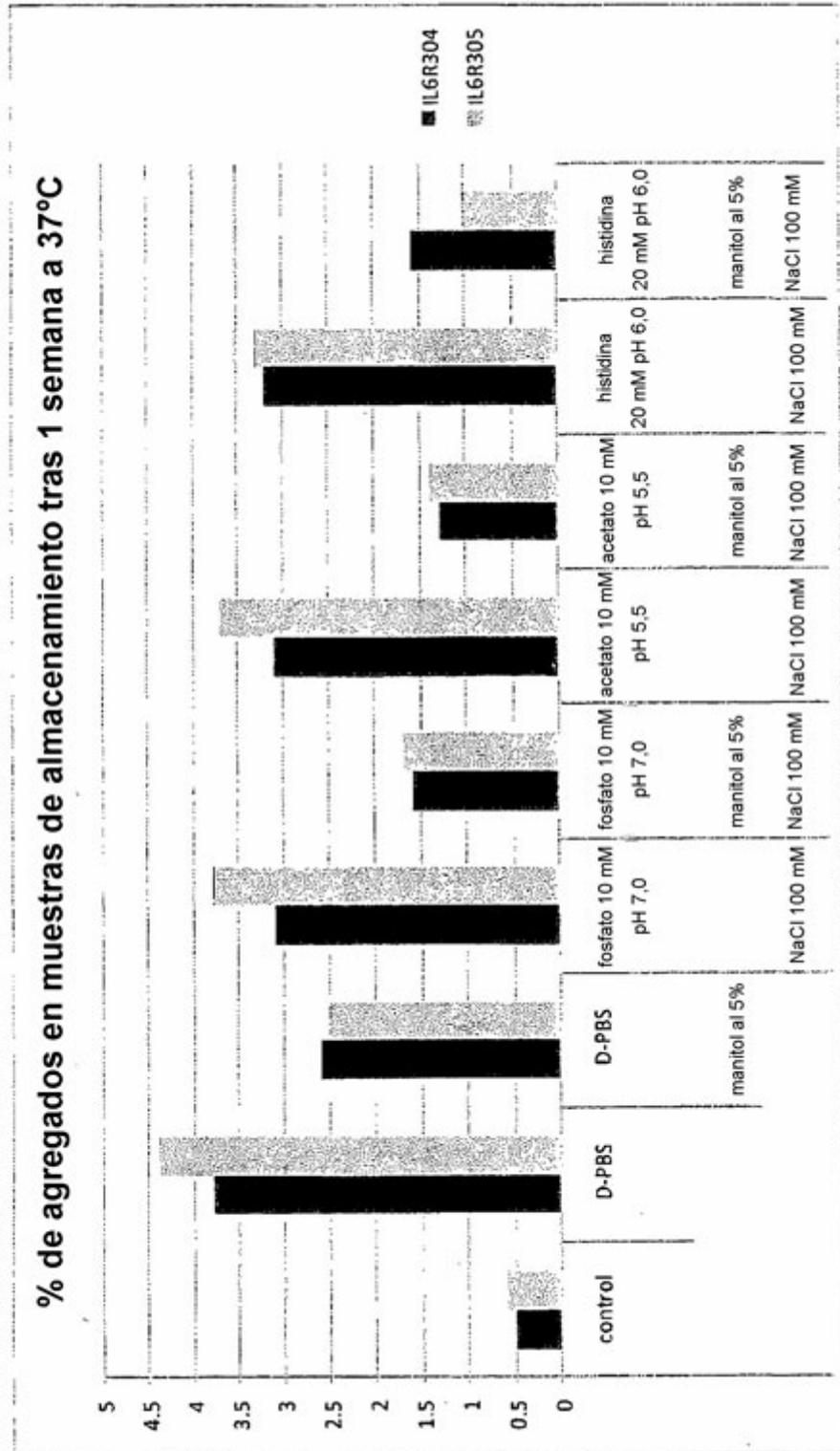


Figura 22

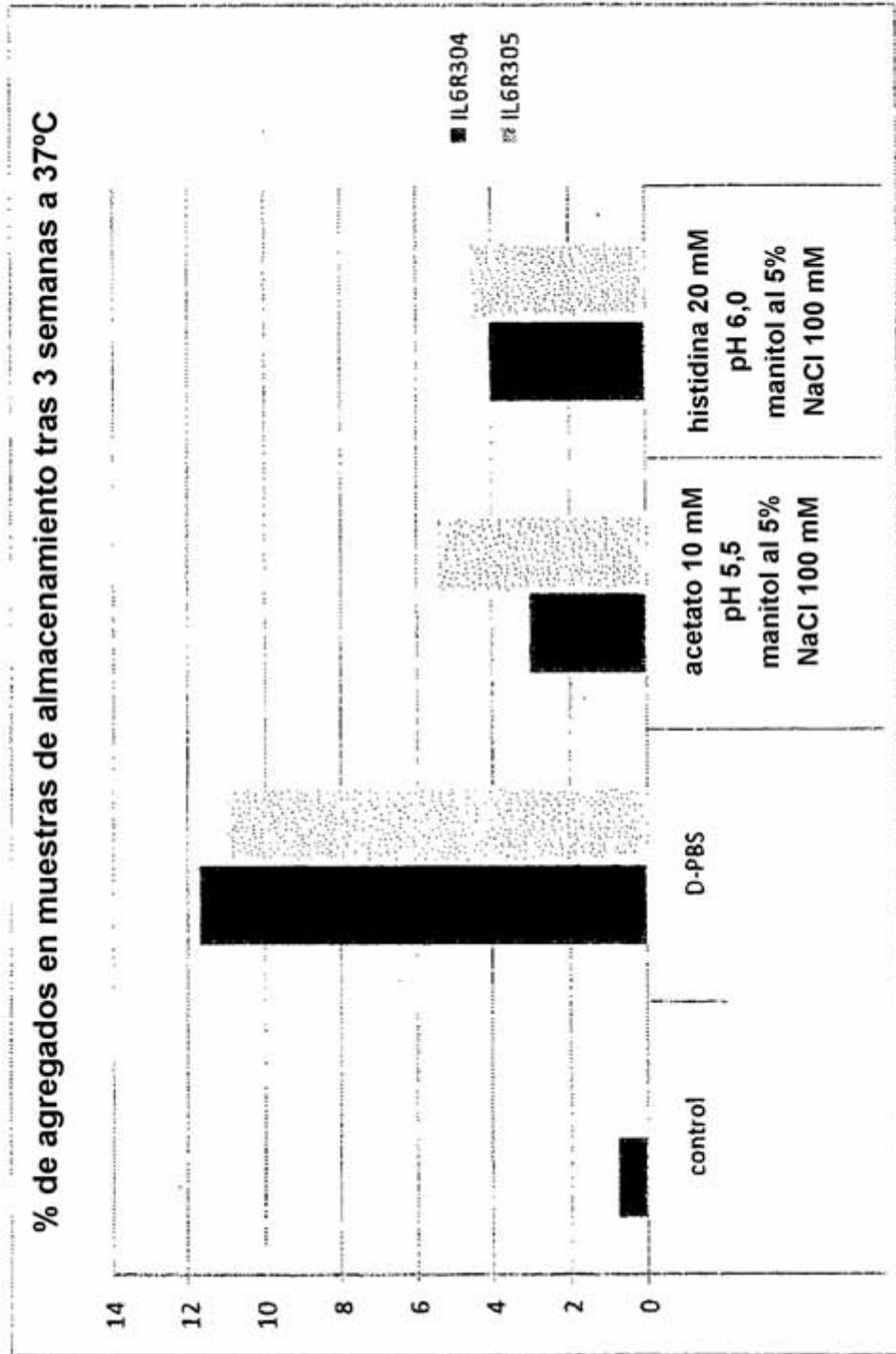


Figura 23(A)

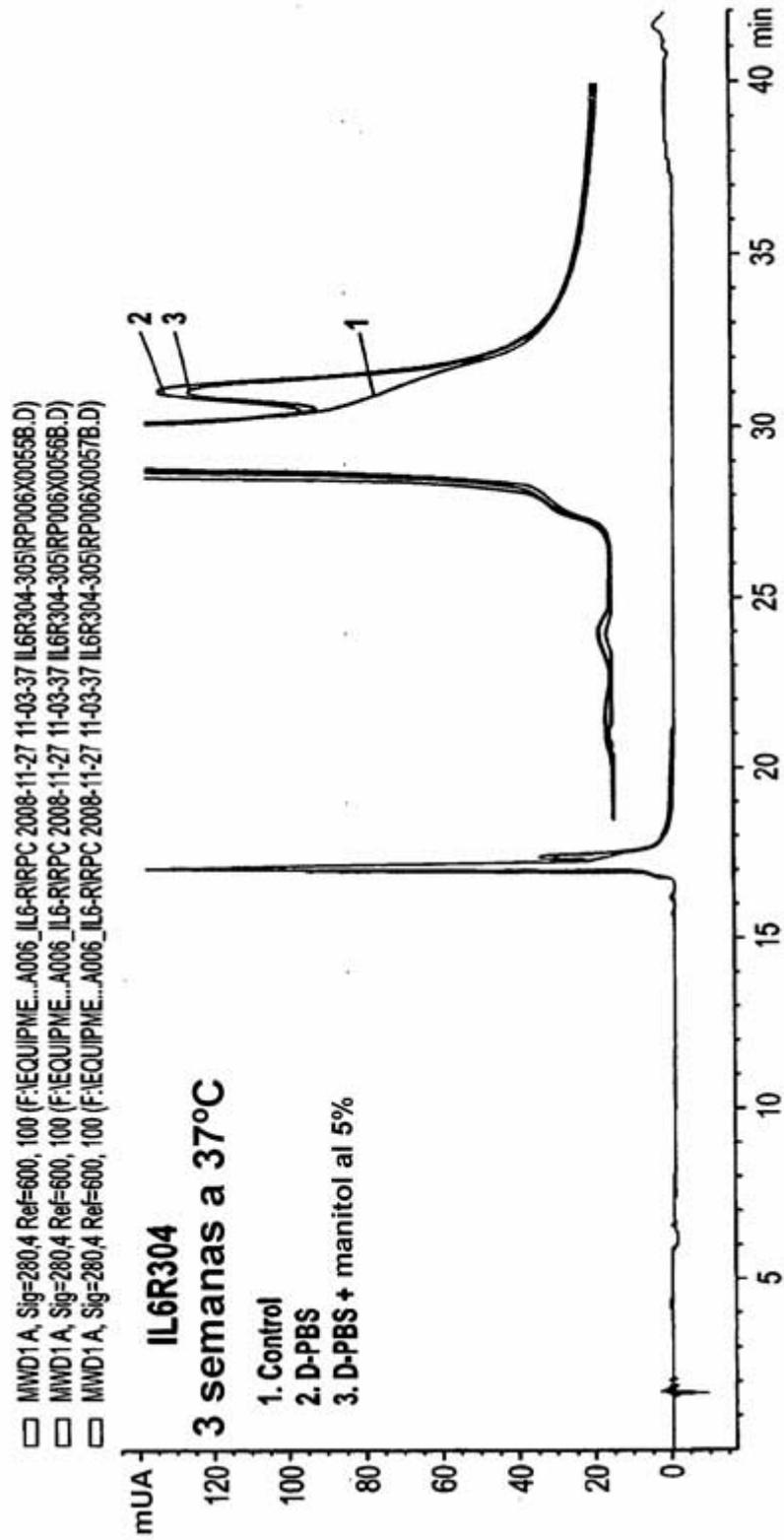


Figura 23(B)

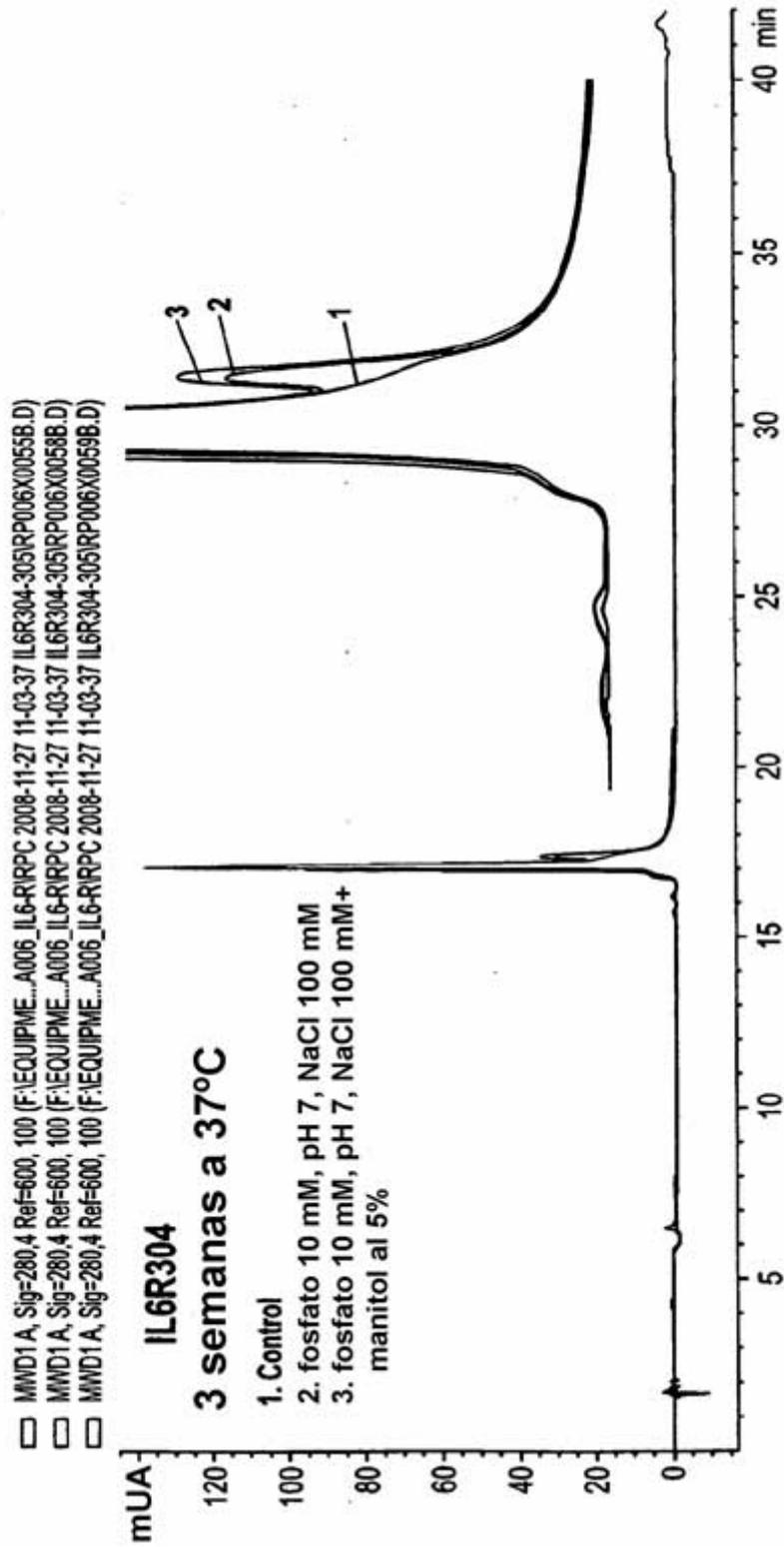


Figura 23(C)

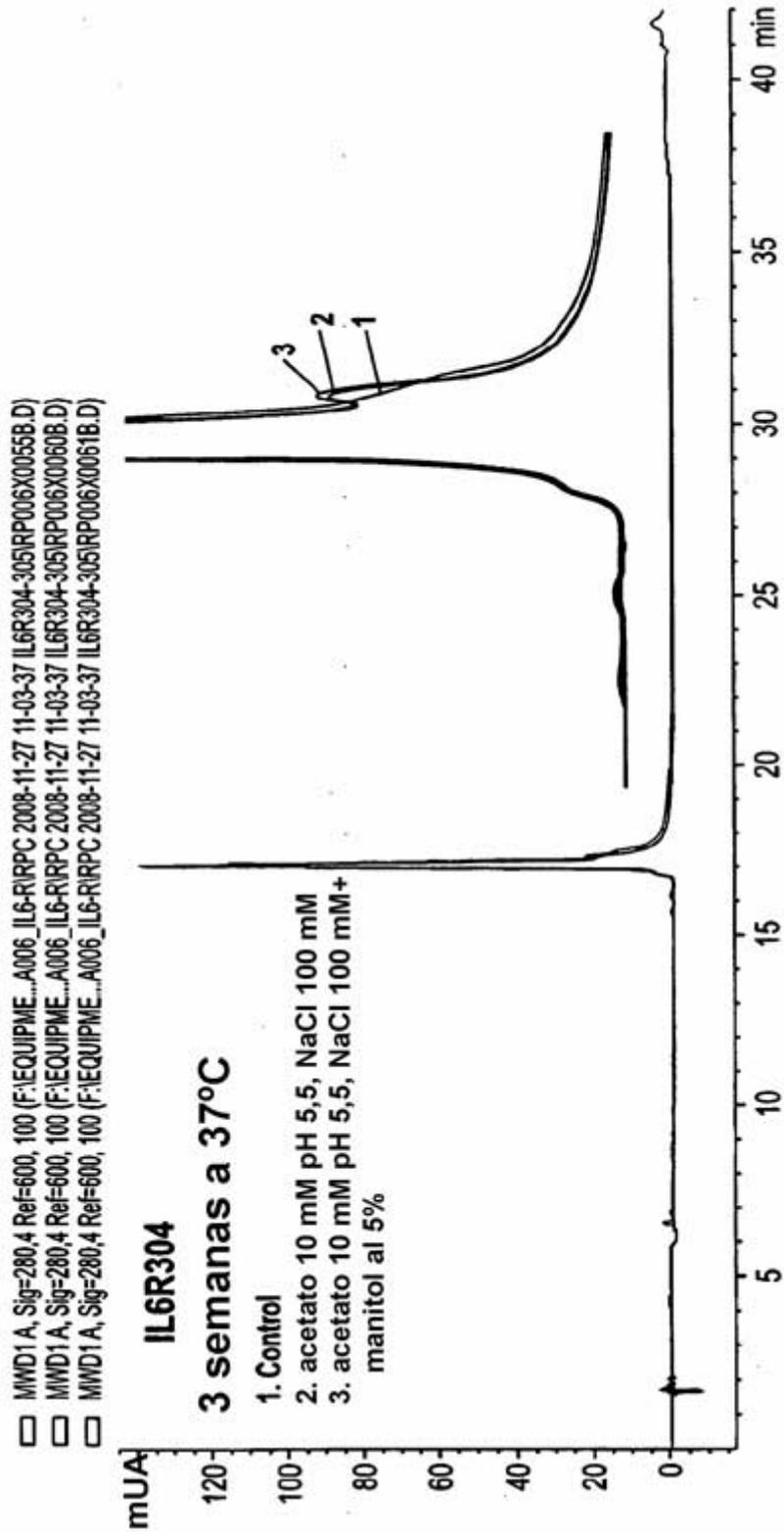
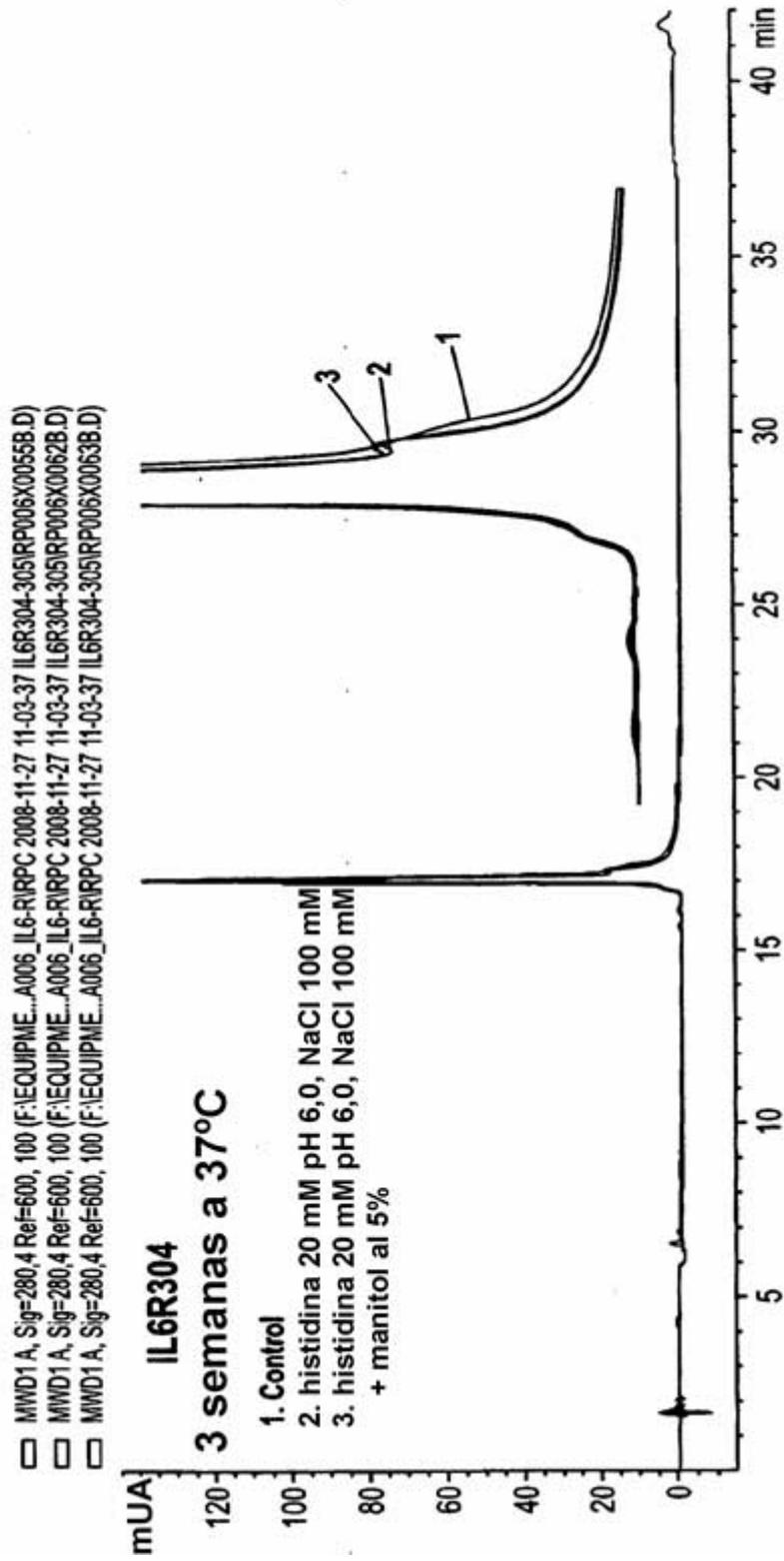


Figura 23(D)



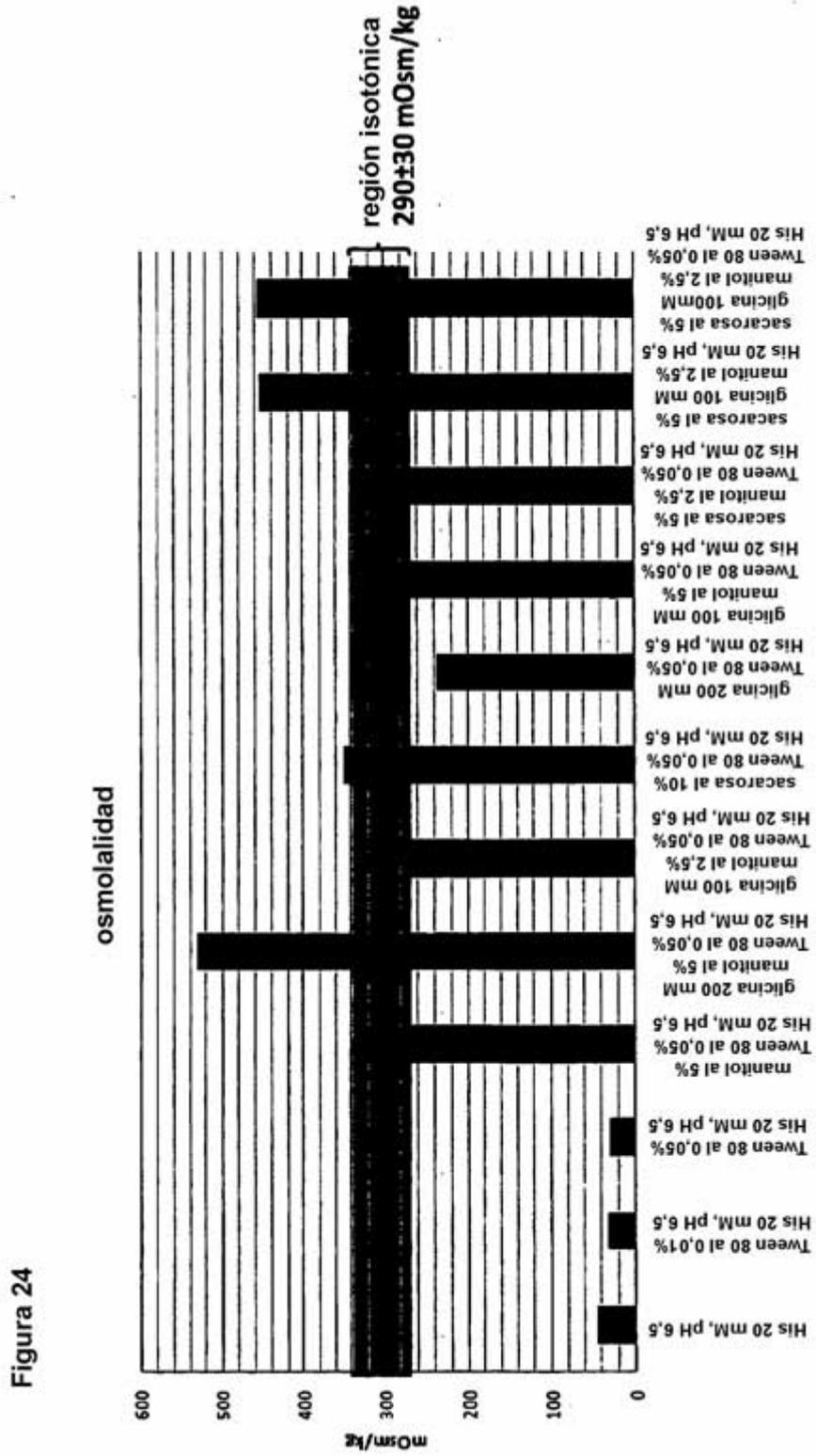


Figura 25(A)

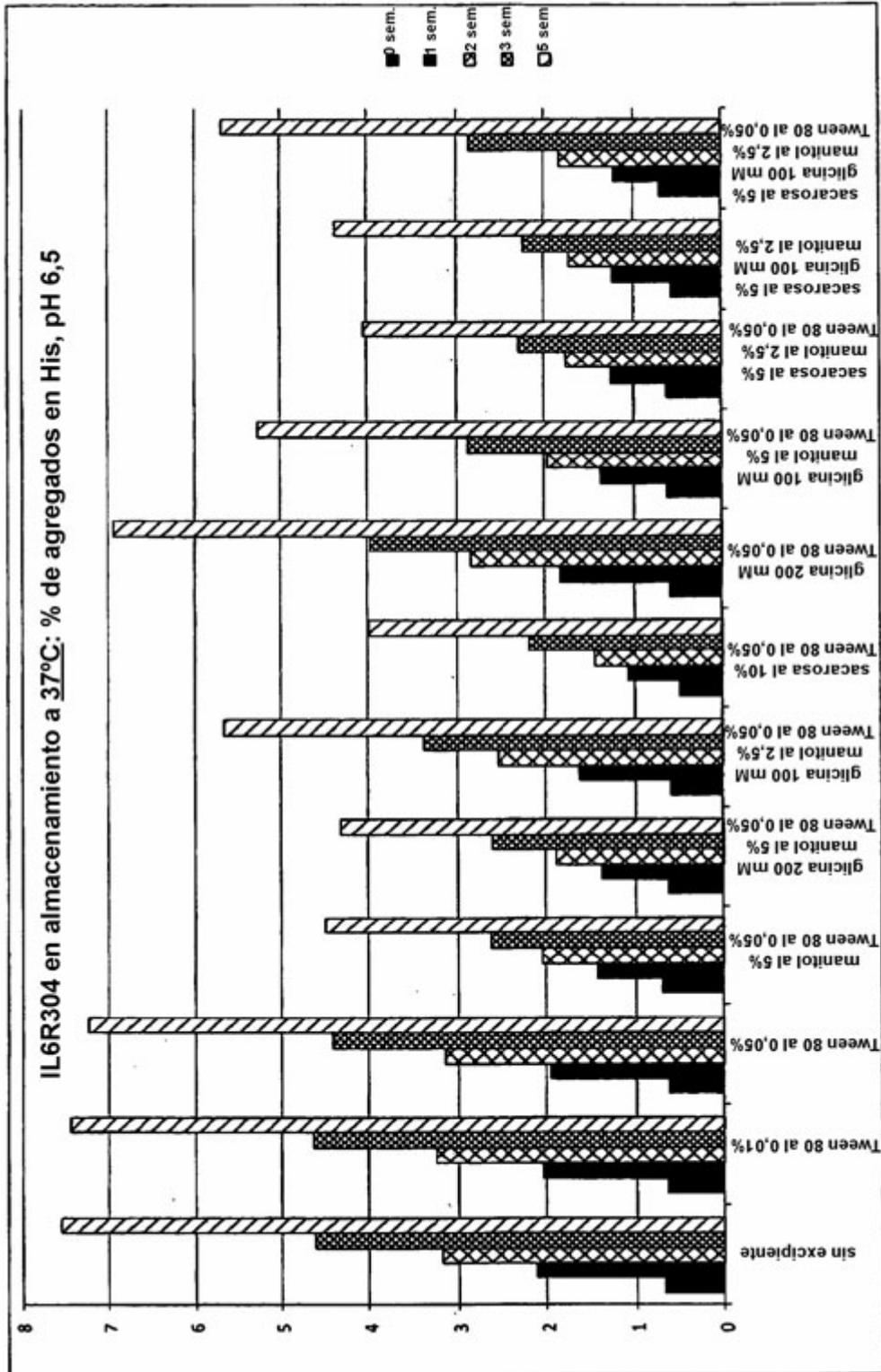


Figura 25(B)

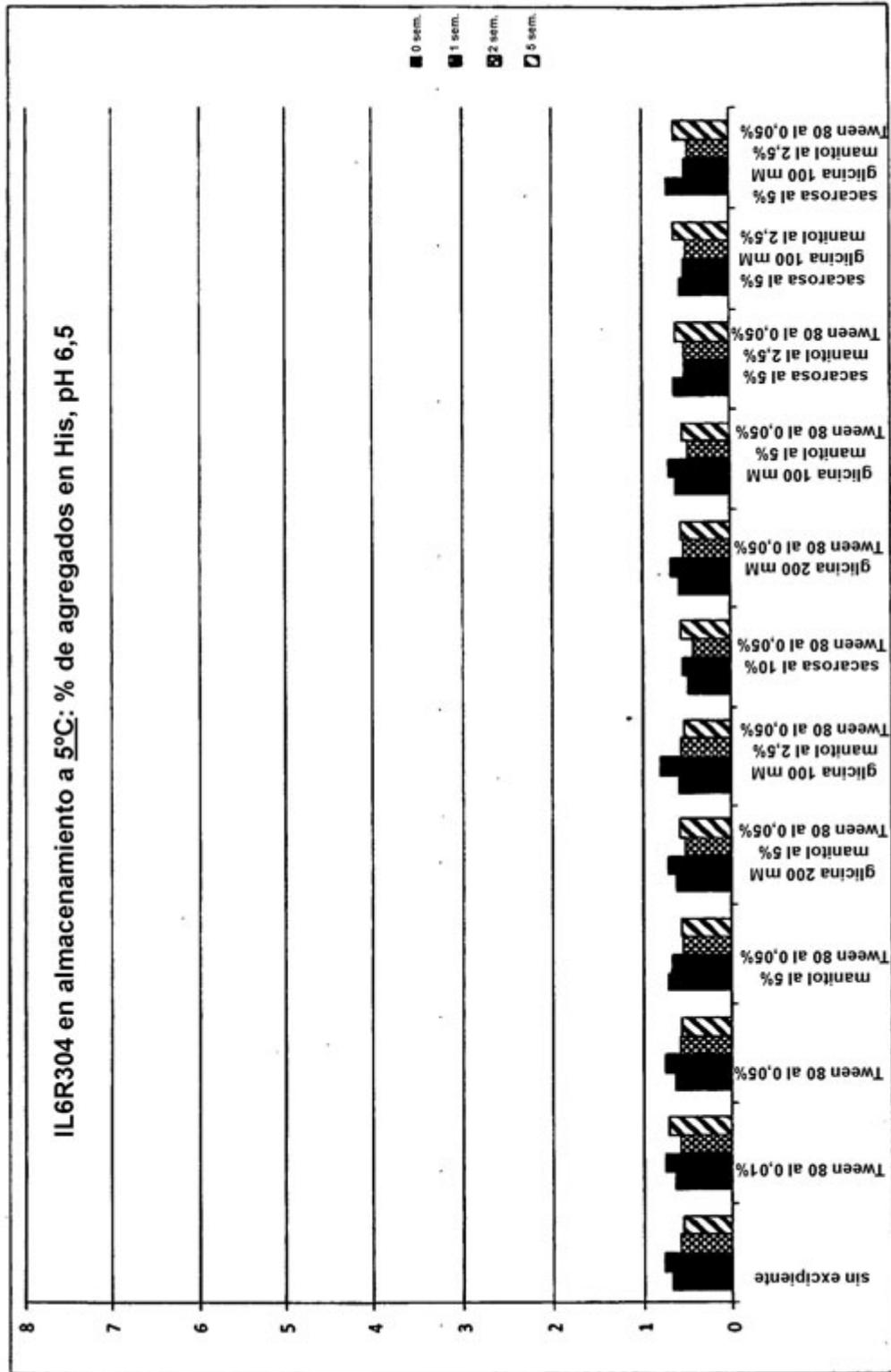


Figura 26(B)

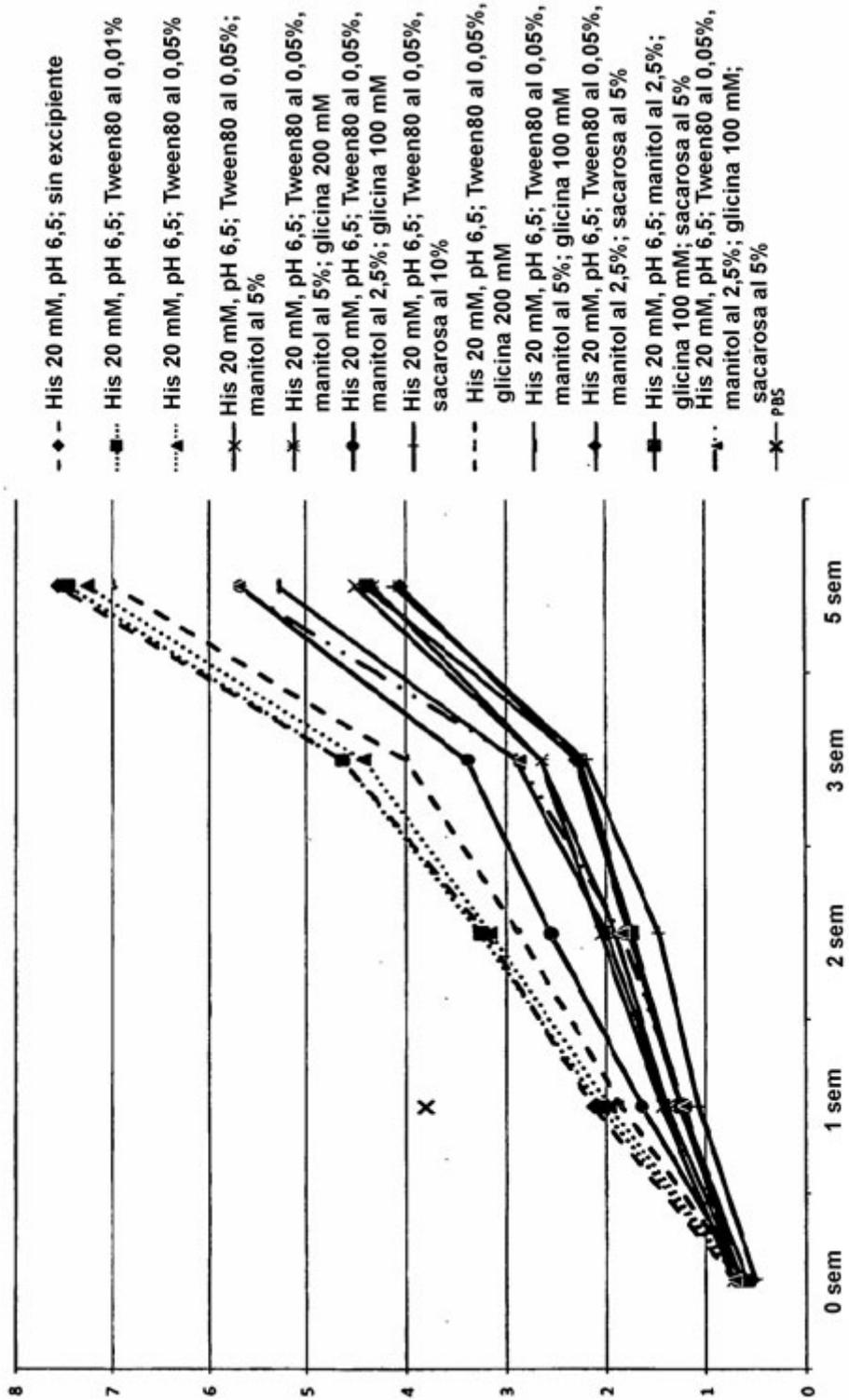


Figura 27 (A)

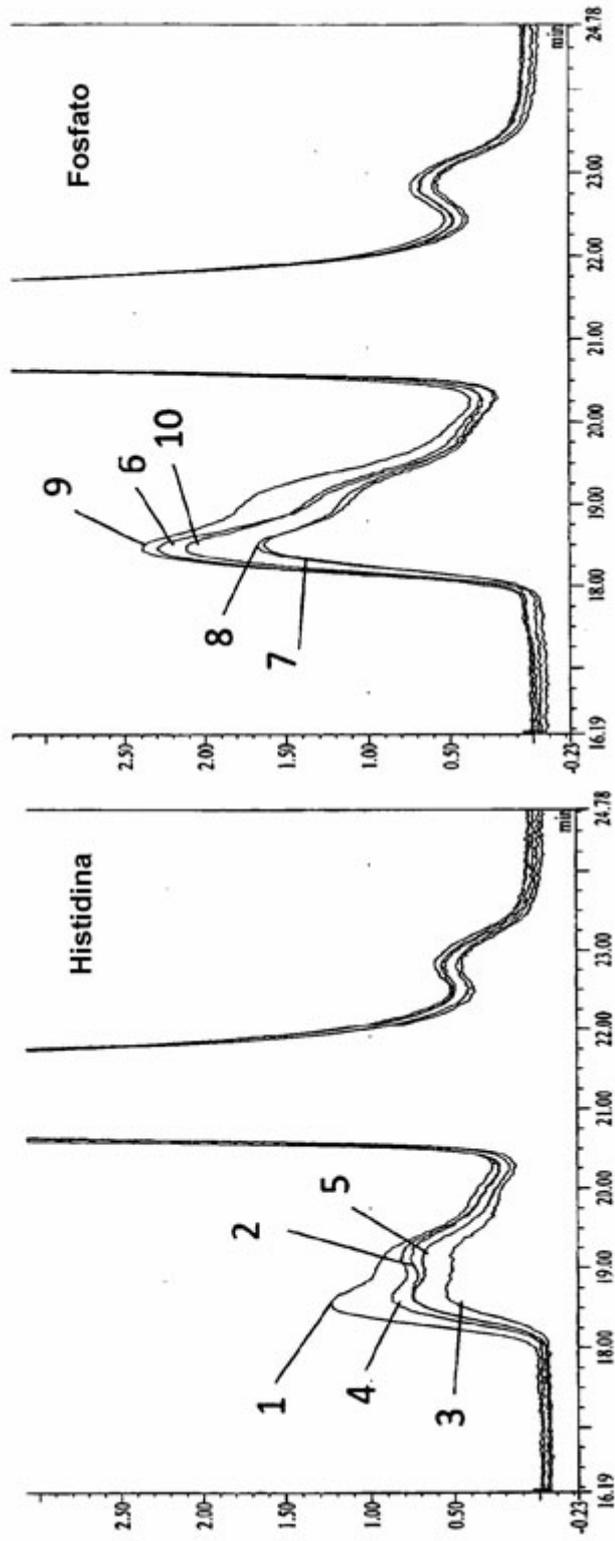


Figura 27 (B)

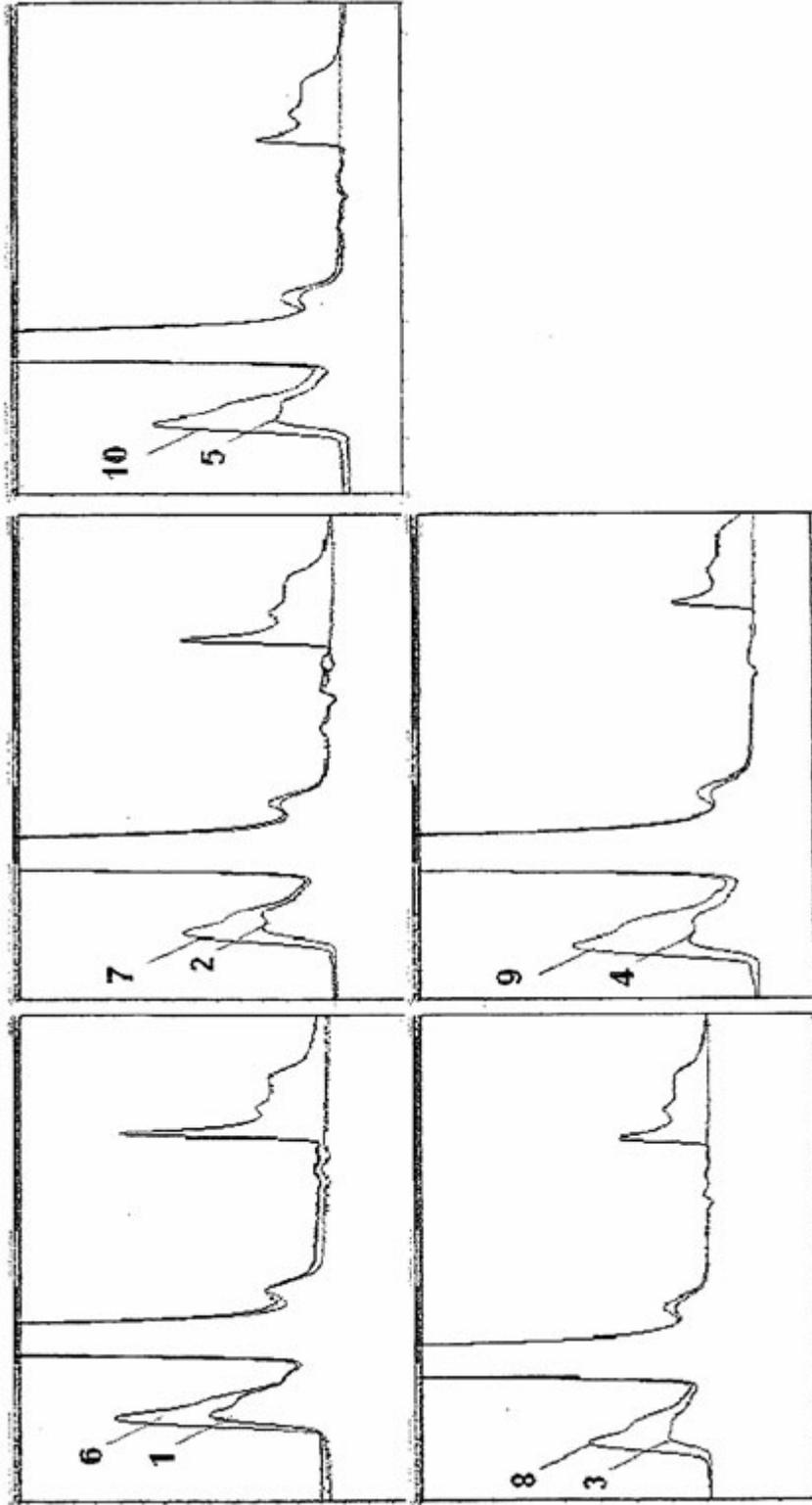


Figura 28

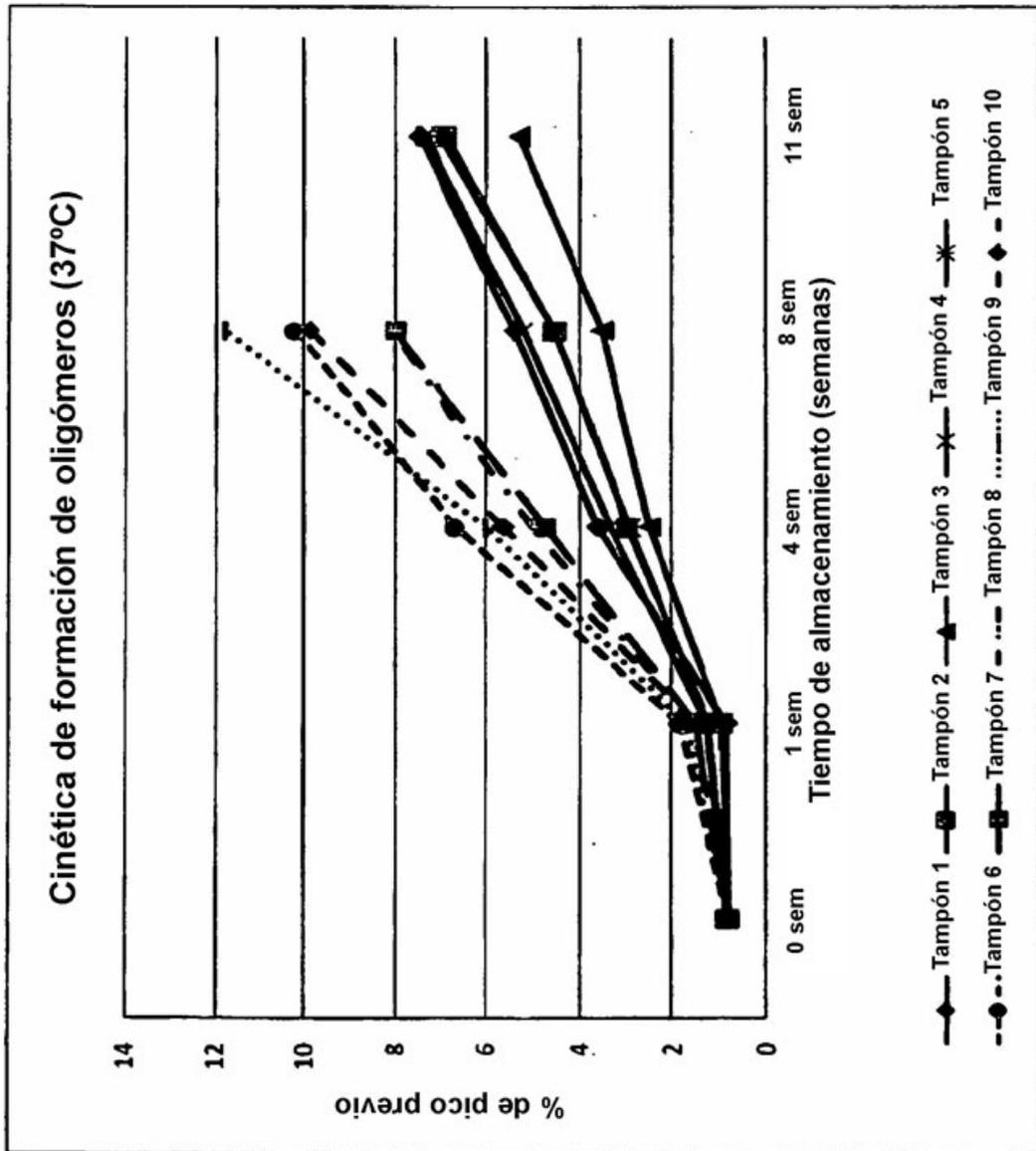


Figura 29(A)

- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME...05-19 15-04 16SAMPLES FOR WPAALX-0061_QCIRPCA0006X0492B.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME...05-19 15-04 16SAMPLES FOR WPAALX-0061_QCIRPCA0006X0492B.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME...05-19 15-04 16SAMPLES FOR WPAALX-0061_QCIRPCA0006X0493B.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME...05-19 15-04 16SAMPLES FOR WPAALX-0061_QCIRPCA0006X0494B.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME...05-19 15-04 16SAMPLES FOR WPAALX-0061_QCIRPCA0006X0495B.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 (F:\EQUIPME...05-19 15-04 16SAMPLES FOR WPAALX-0061_QCIRPCA0006X0496B.D)

1 semana
+37°C

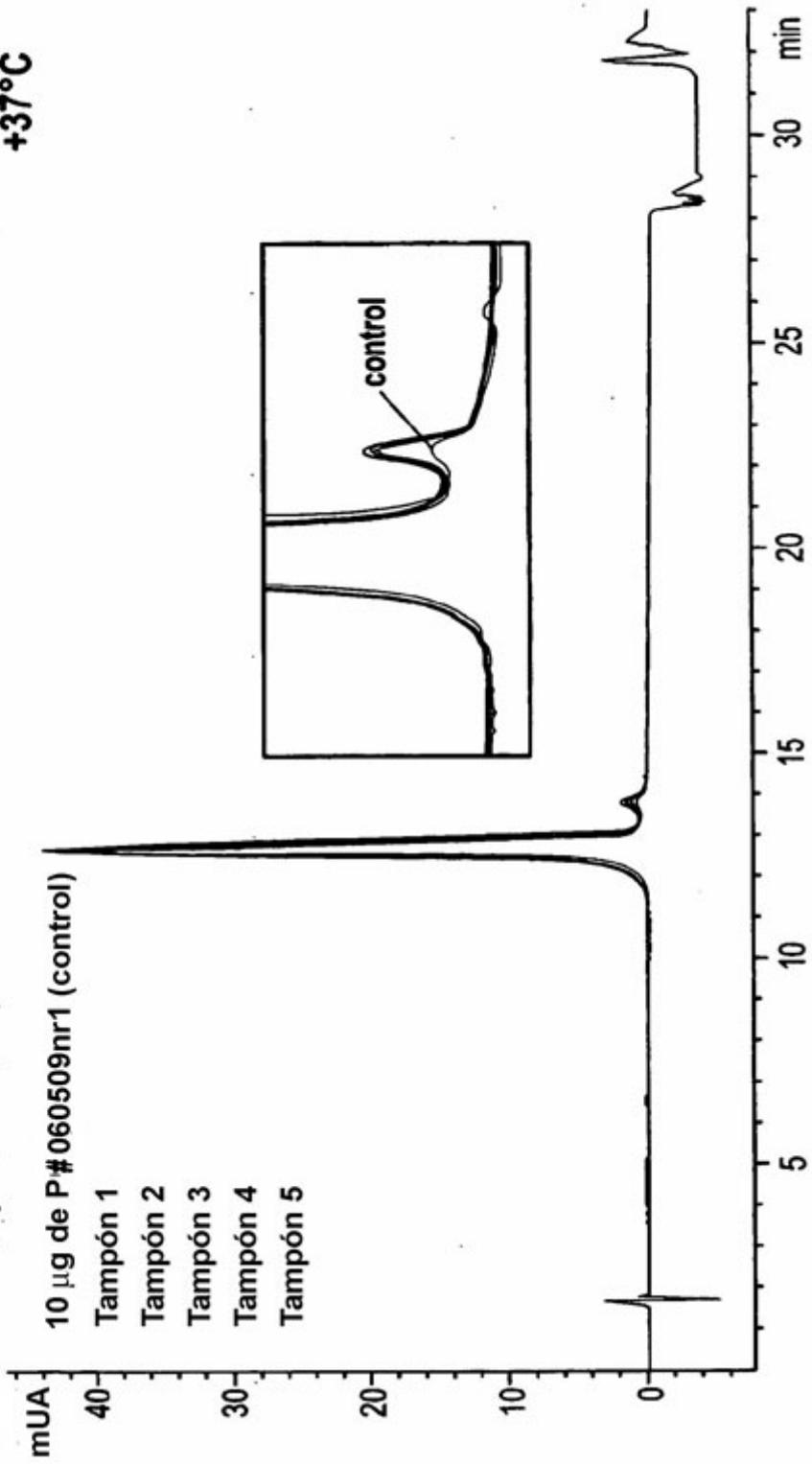


Figura 29(B)

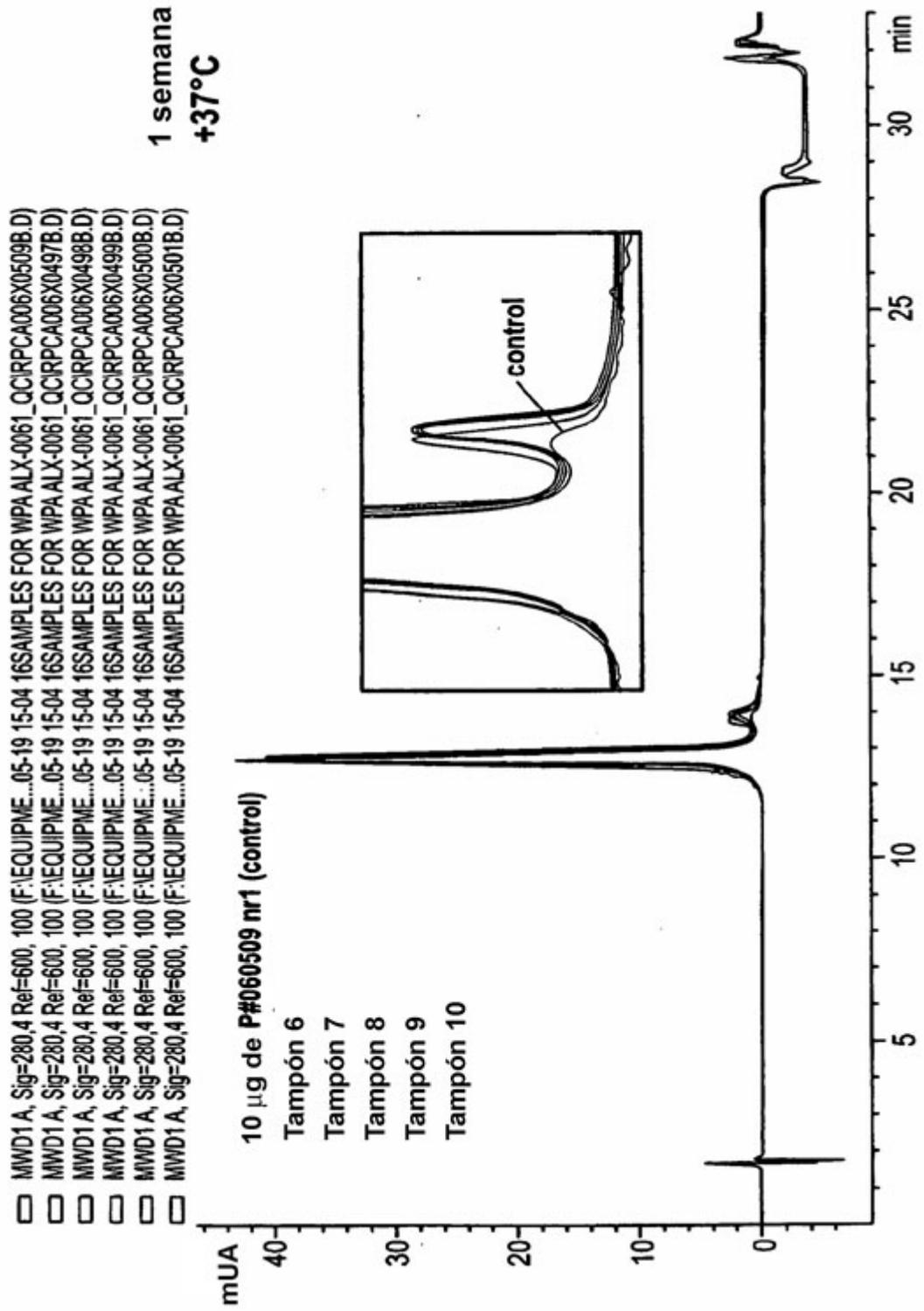


Figura 29(C)

- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 F:\EQUIPME...RPC 2009-06-10 11-56-00 ALX-0061 STAB 4WEEKSIRPCA006A0018D.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 F:\EQUIPME...RPC 2009-06-10 11-56-00 ALX-0061 STAB 4WEEKSIRPCA006A0049D.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 F:\EQUIPME...RPC 2009-06-10 11-56-00 ALX-0061 STAB 4WEEKSIRPCA006A0050D.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 F:\EQUIPME...RPC 2009-06-10 11-56-00 ALX-0061 STAB 4WEEKSIRPCA006A0051D.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 F:\EQUIPME...RPC 2009-06-10 11-56-00 ALX-0061 STAB 4WEEKSIRPCA006A0052D.D)
- MWD1 A, Sig=280,4 Ref=600, 100 F:\EQUIPME...RPC 2009-06-10 11-56-00 ALX-0061 STAB 4WEEKSIRPCA006A0053D.D)

4 semanas
+37°C

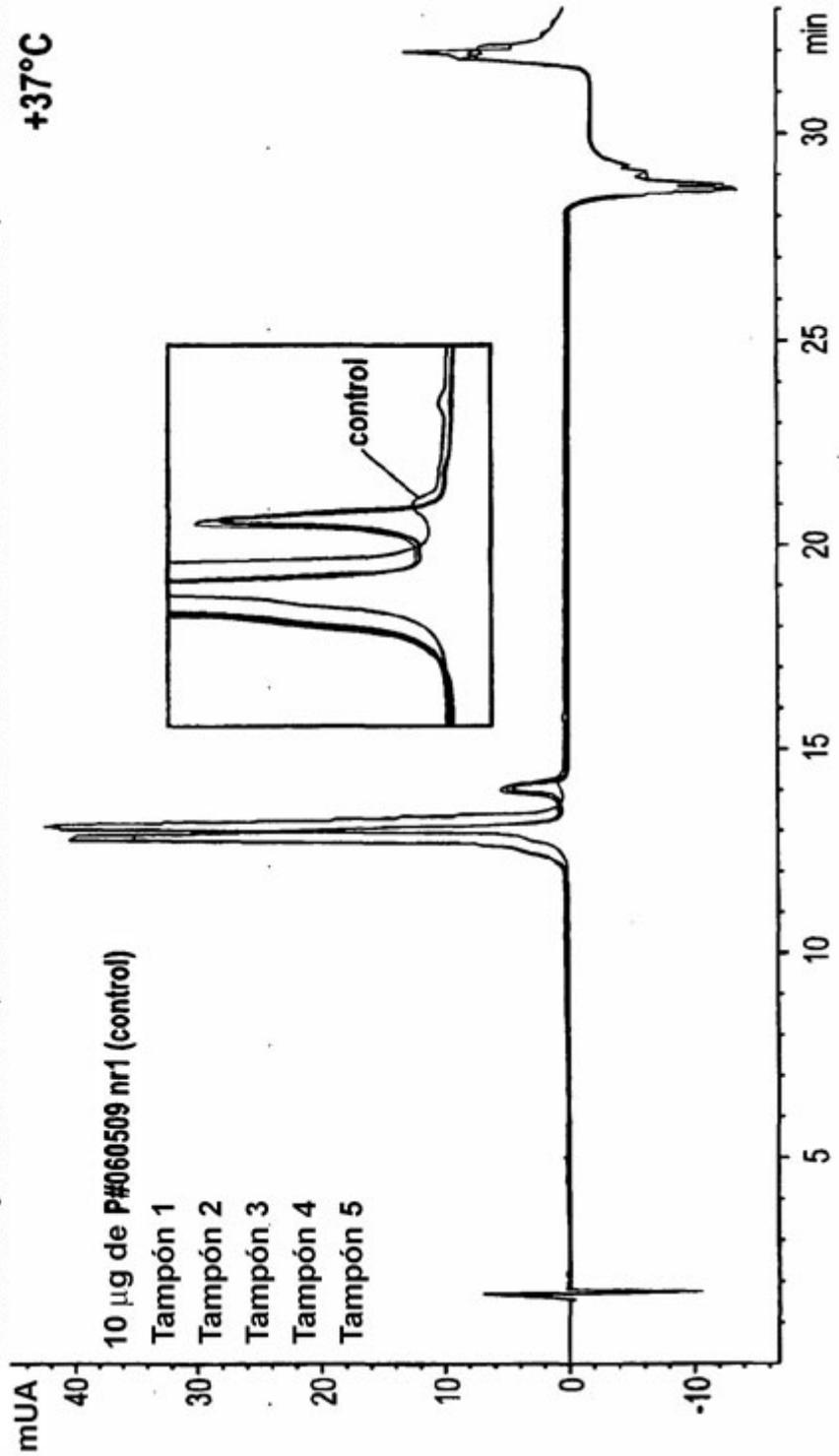


Figura 29(D)

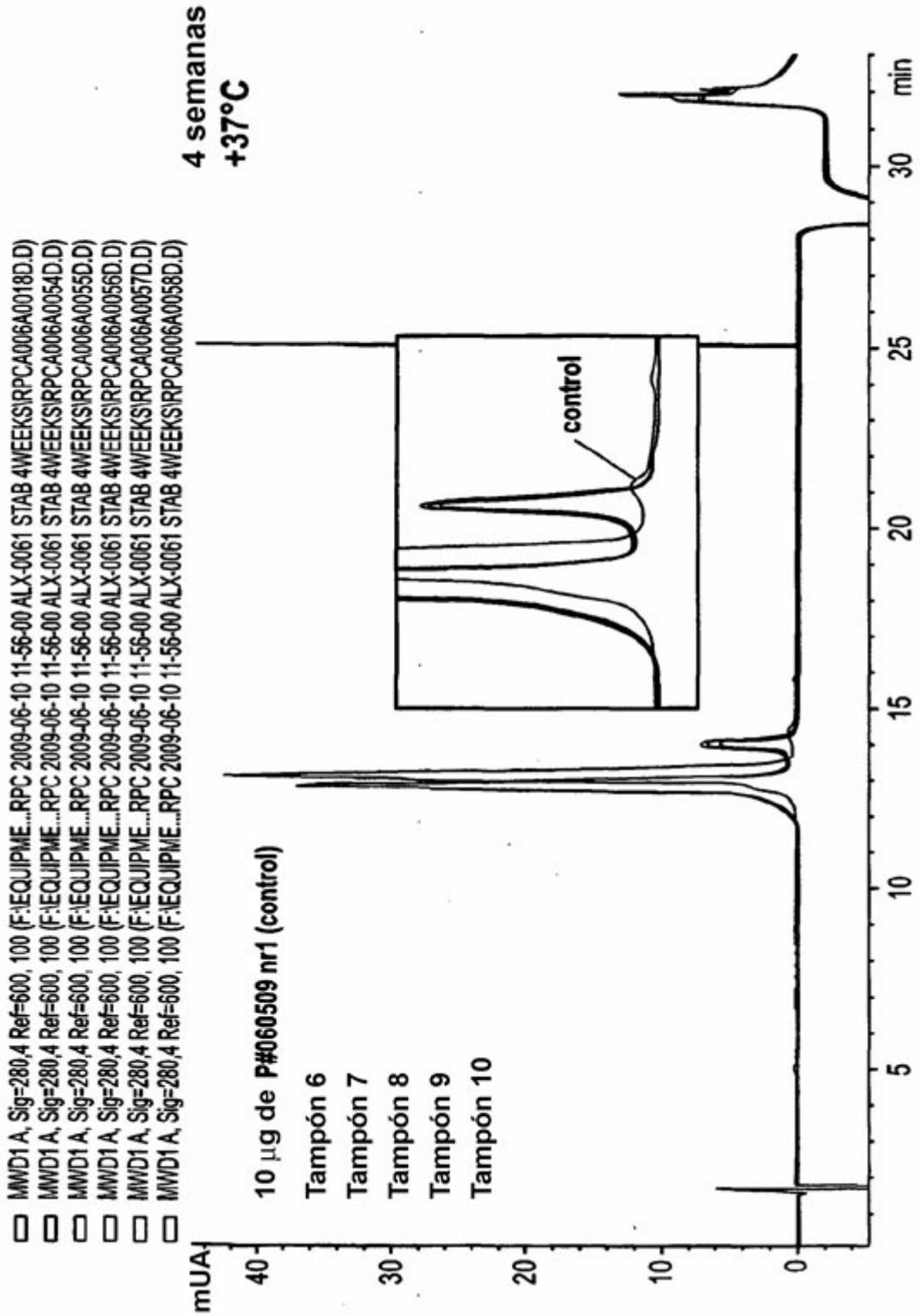


Figura 29(E)

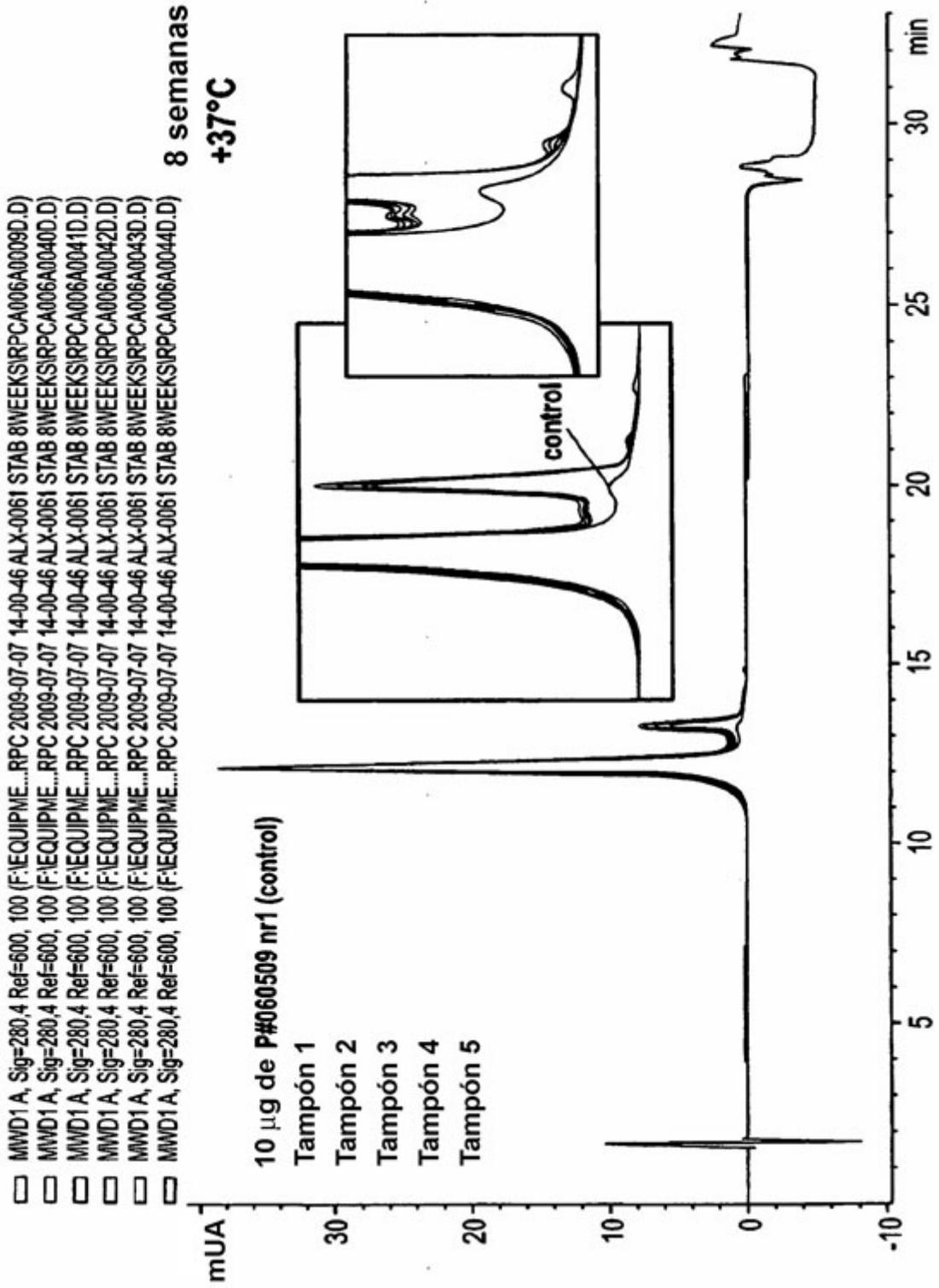


Figura 29(F)

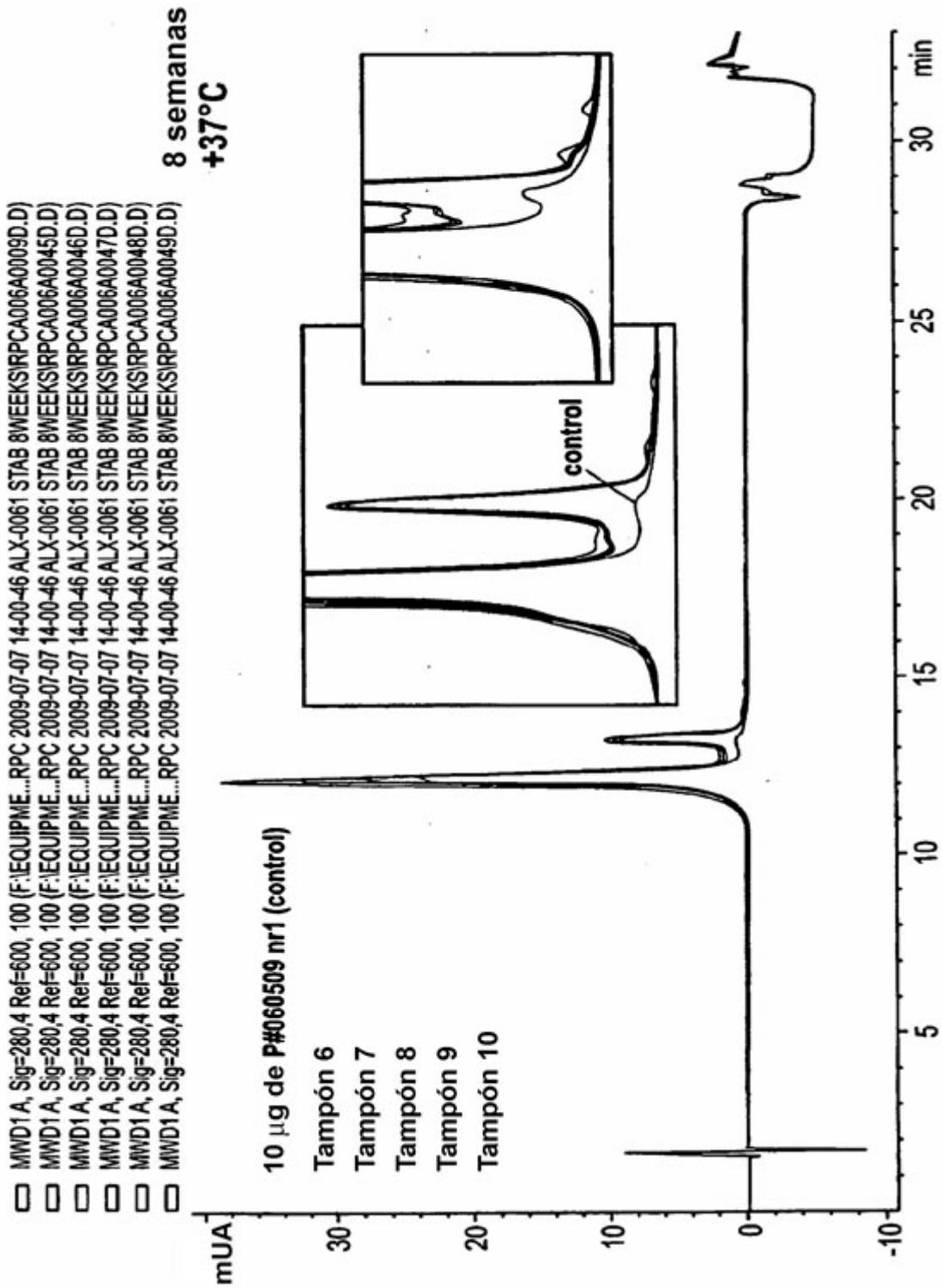


Figura 30

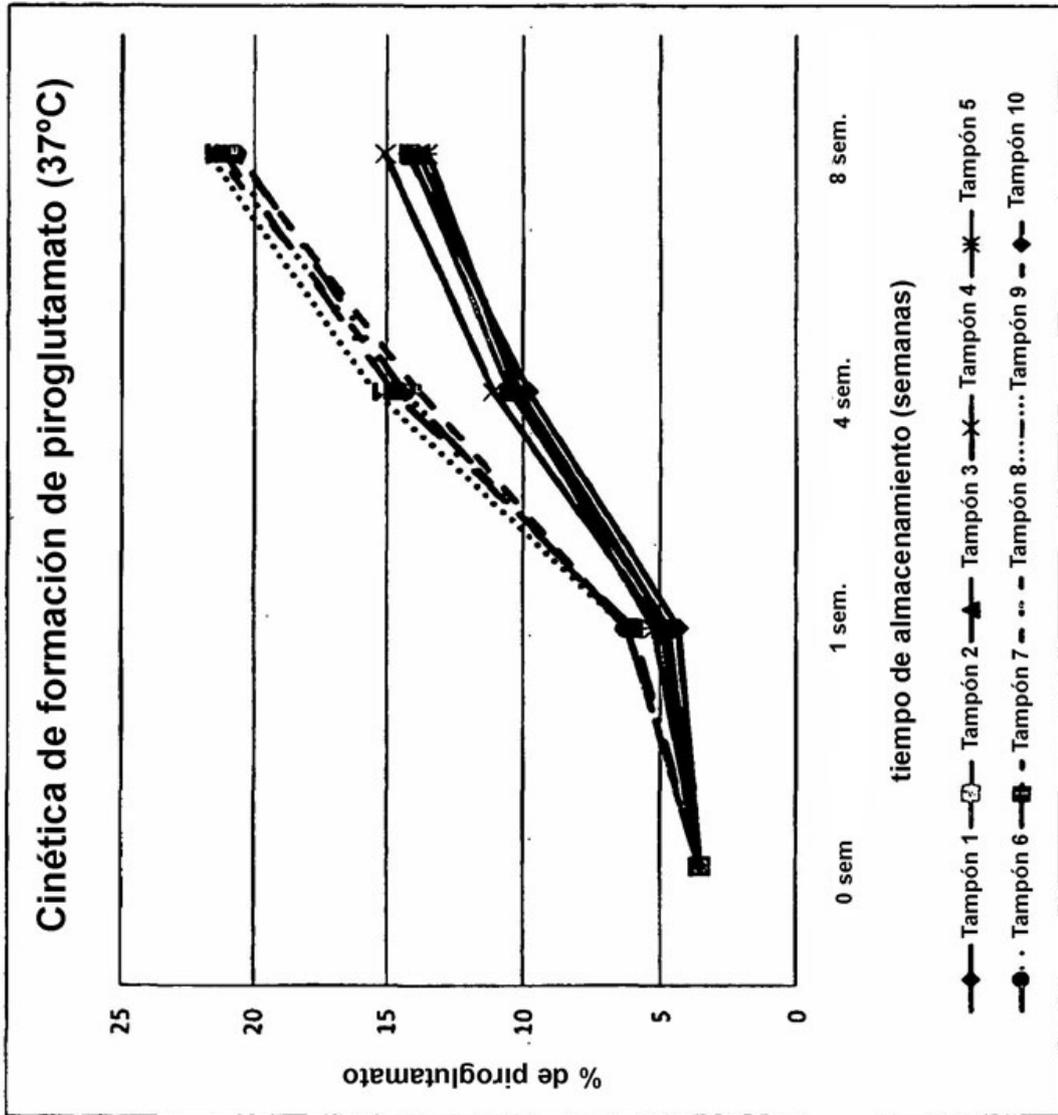


Figura 31

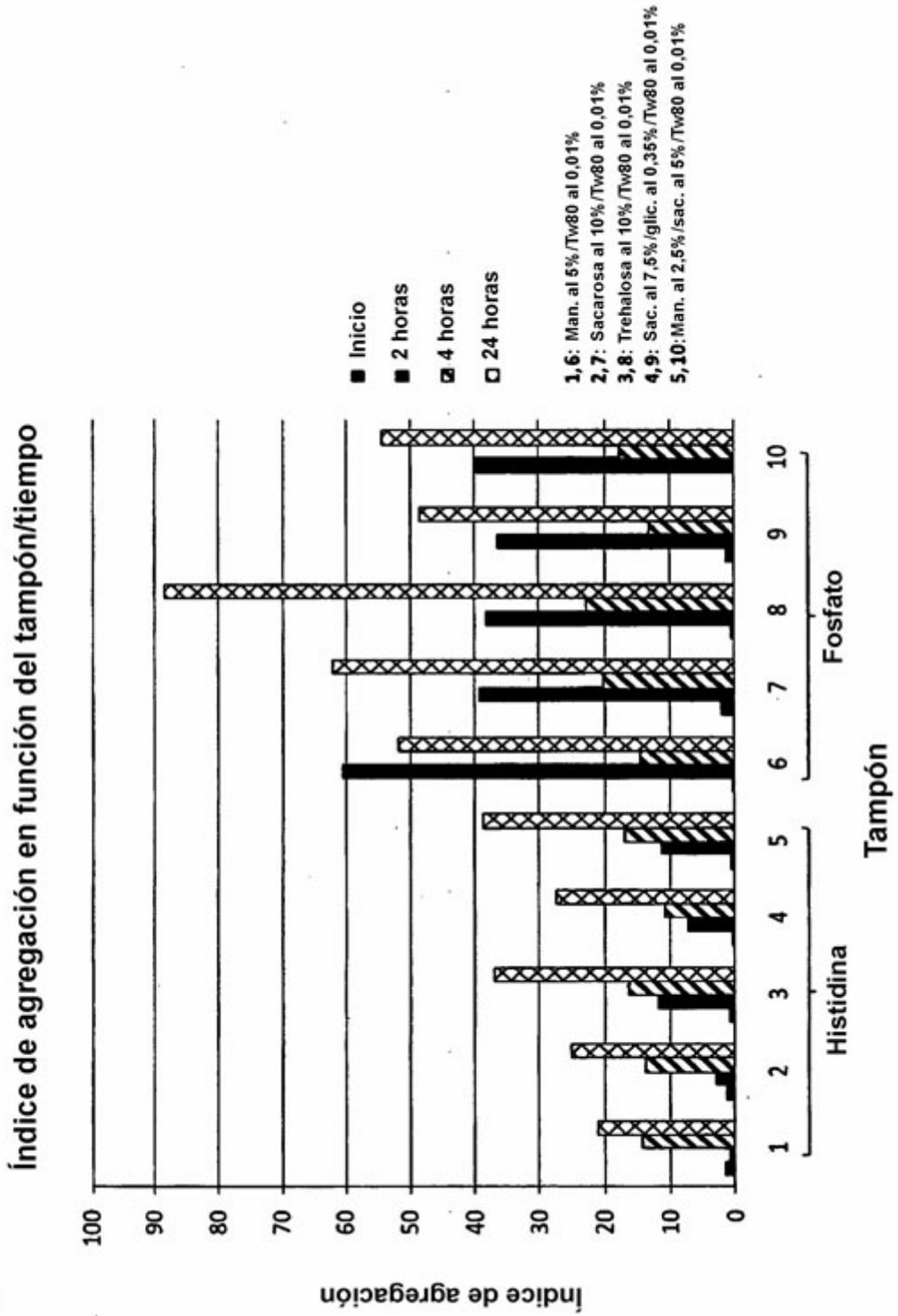


Figura 32(A)

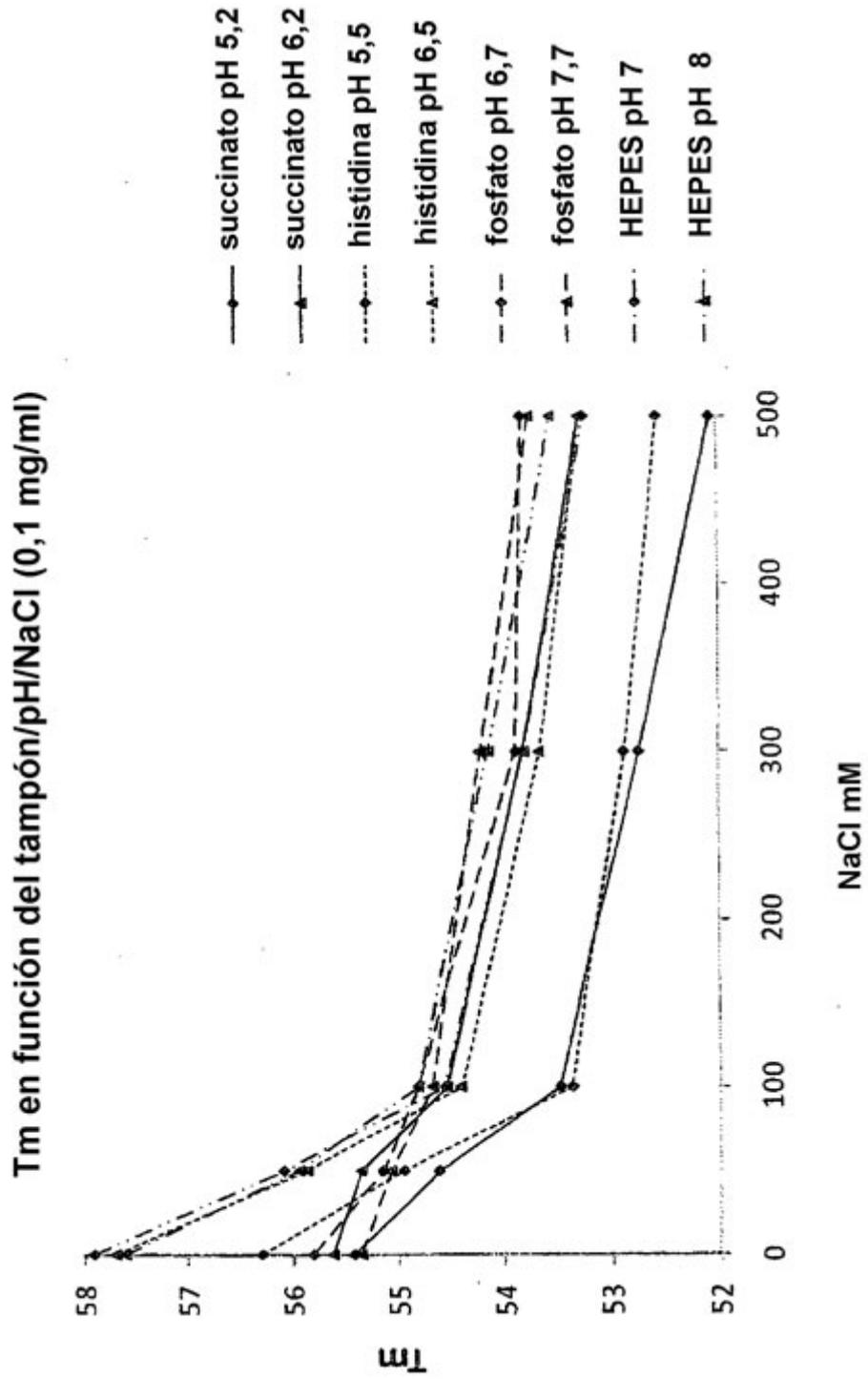


Figura 32(B)

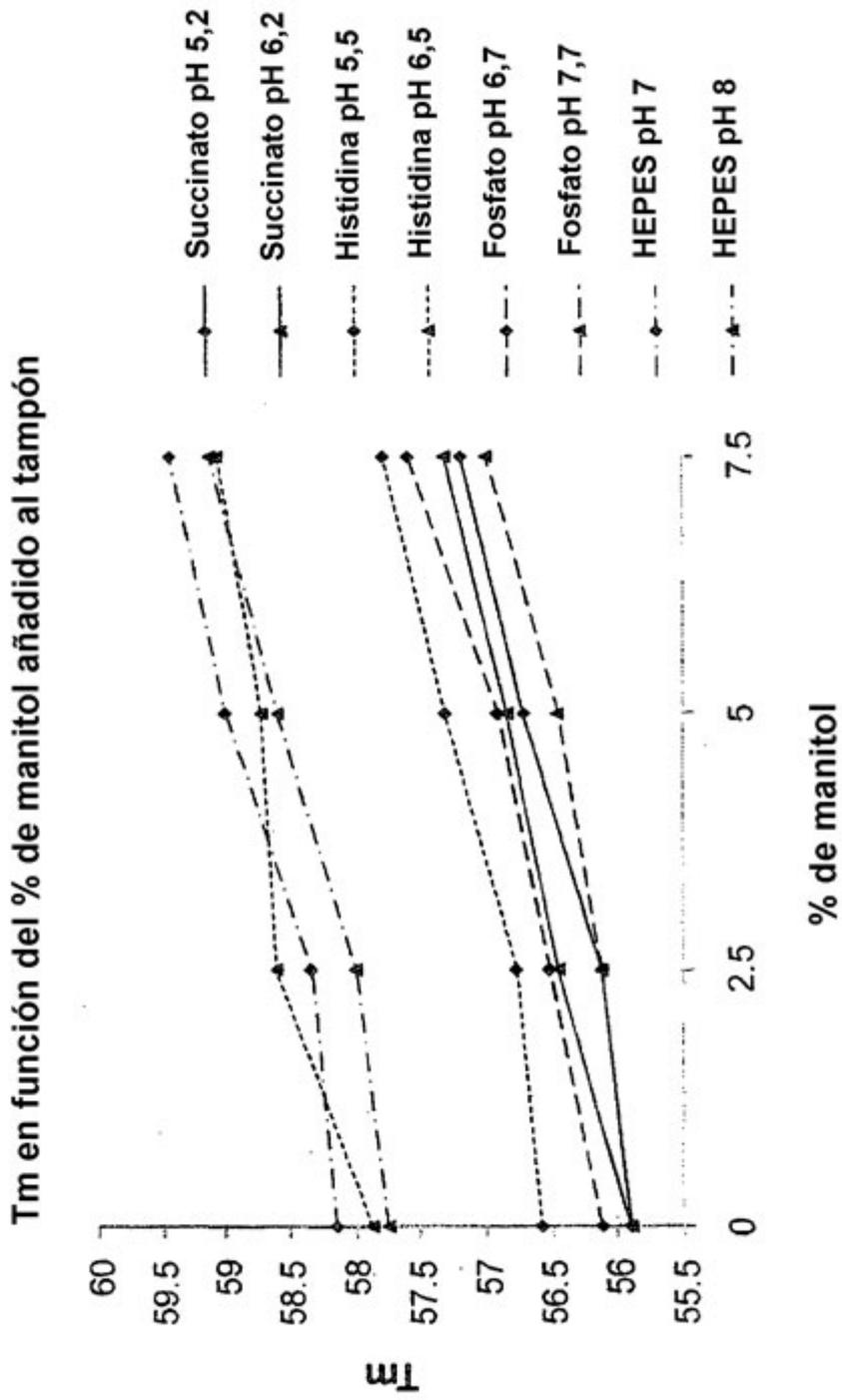
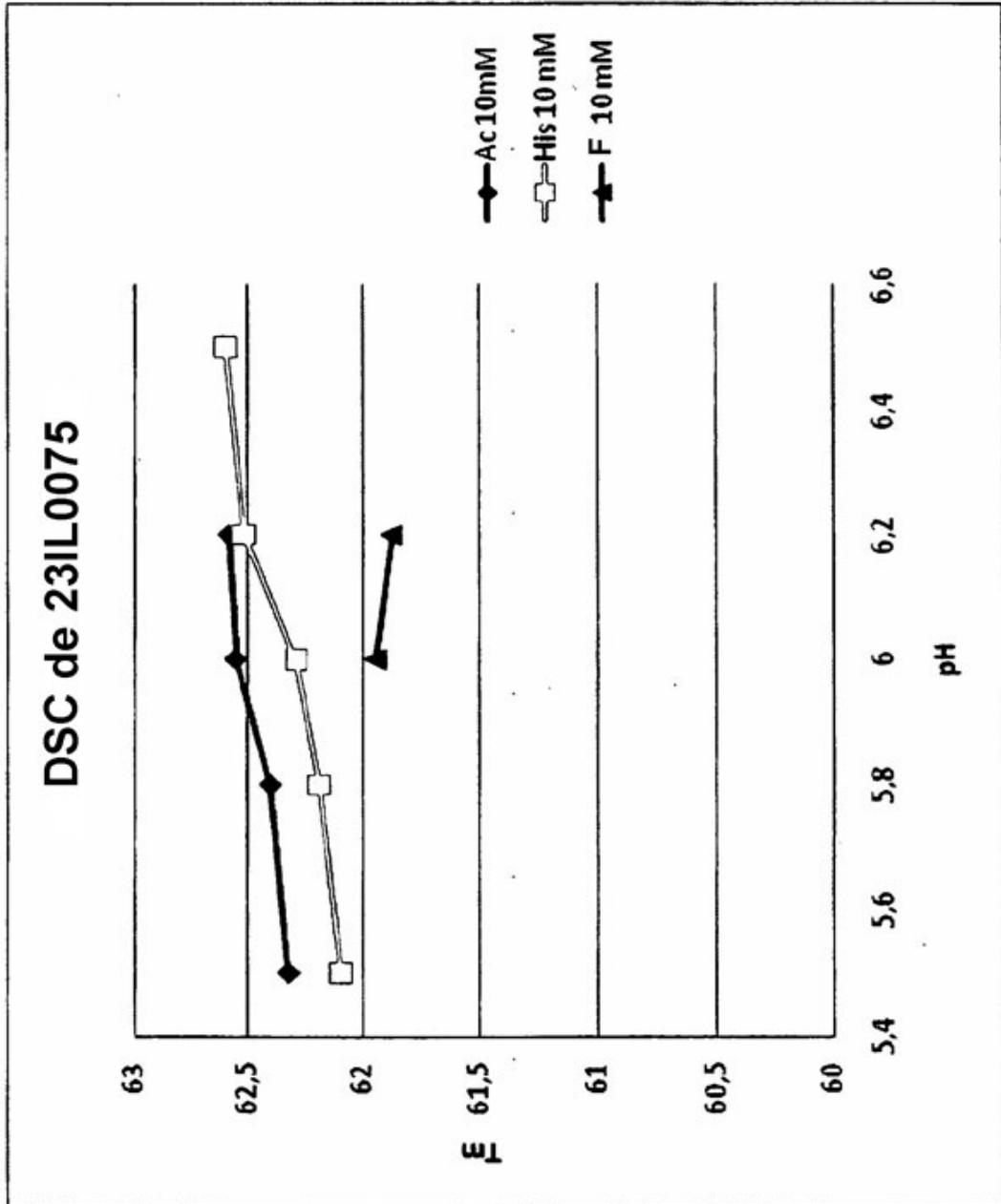


Figura 33



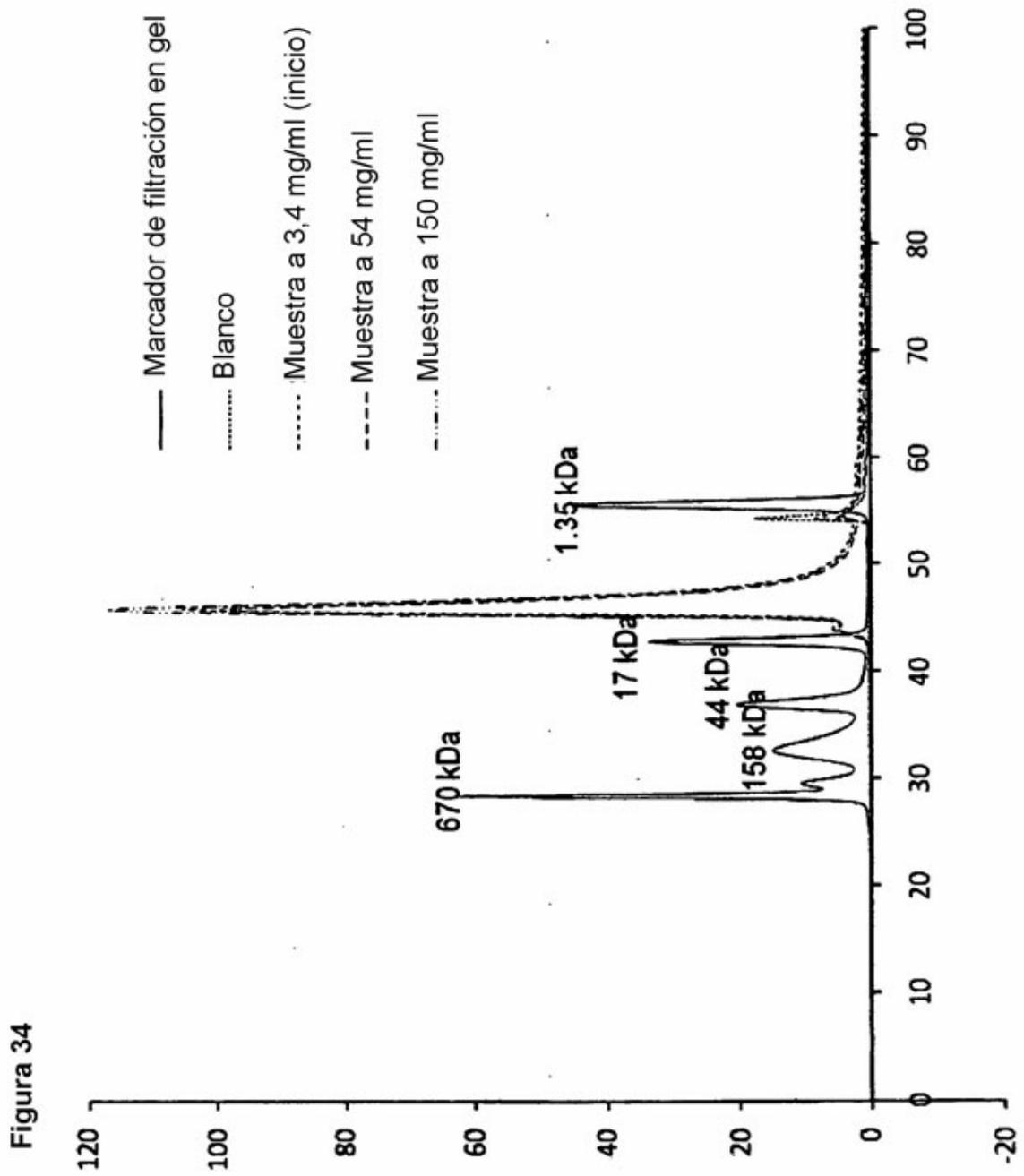


Figura 35

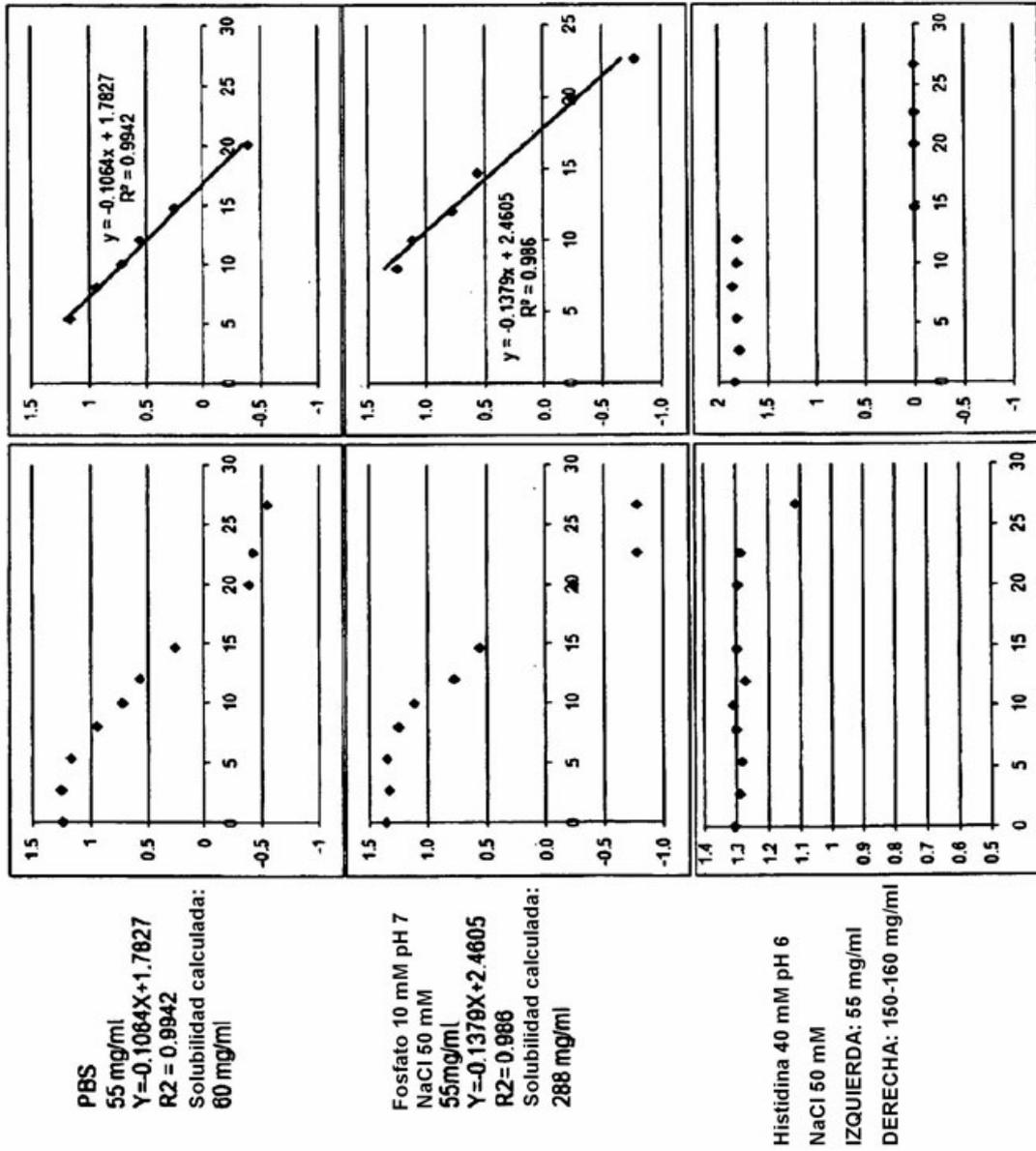


Figura 36

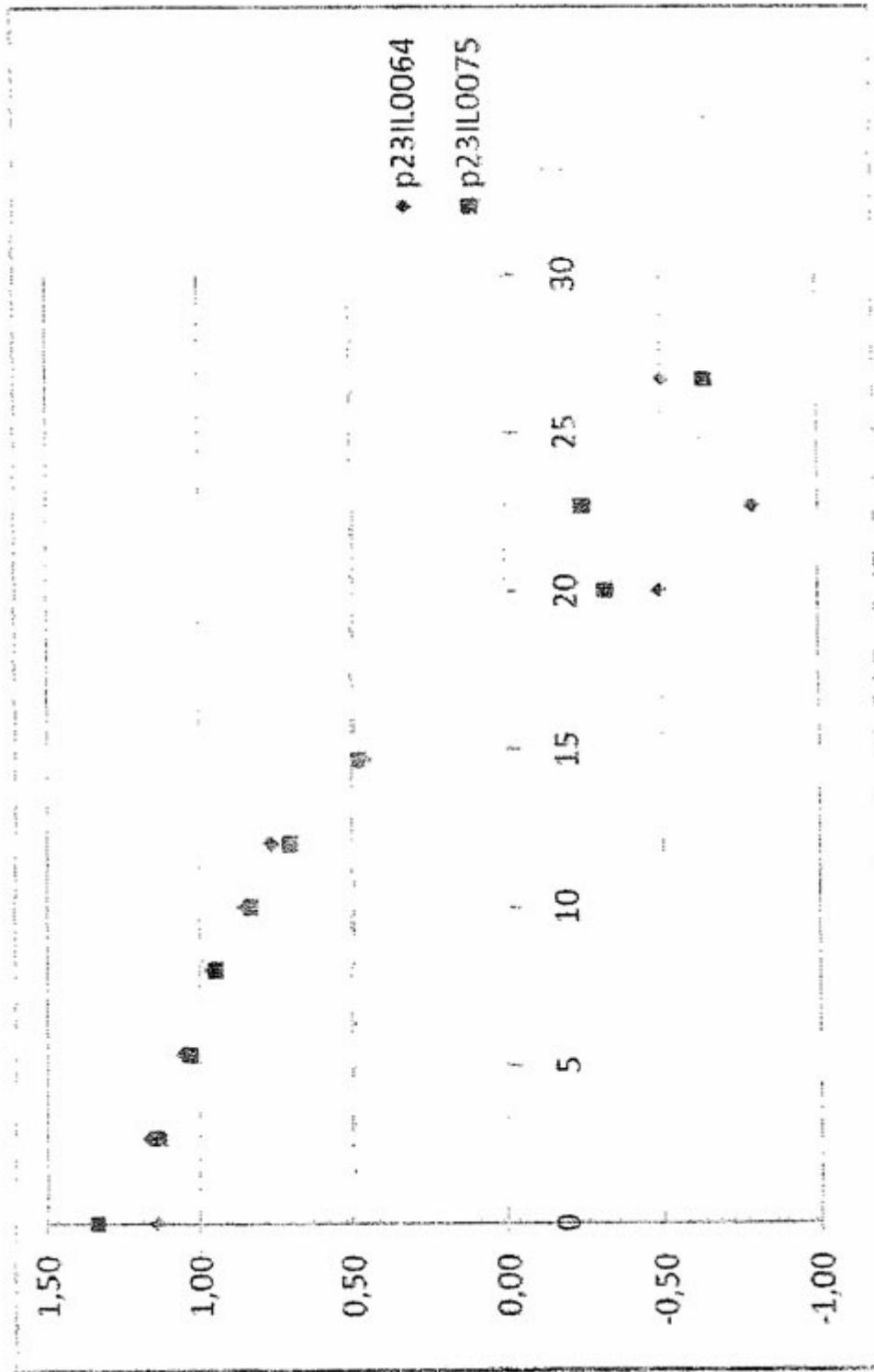


Figura 37

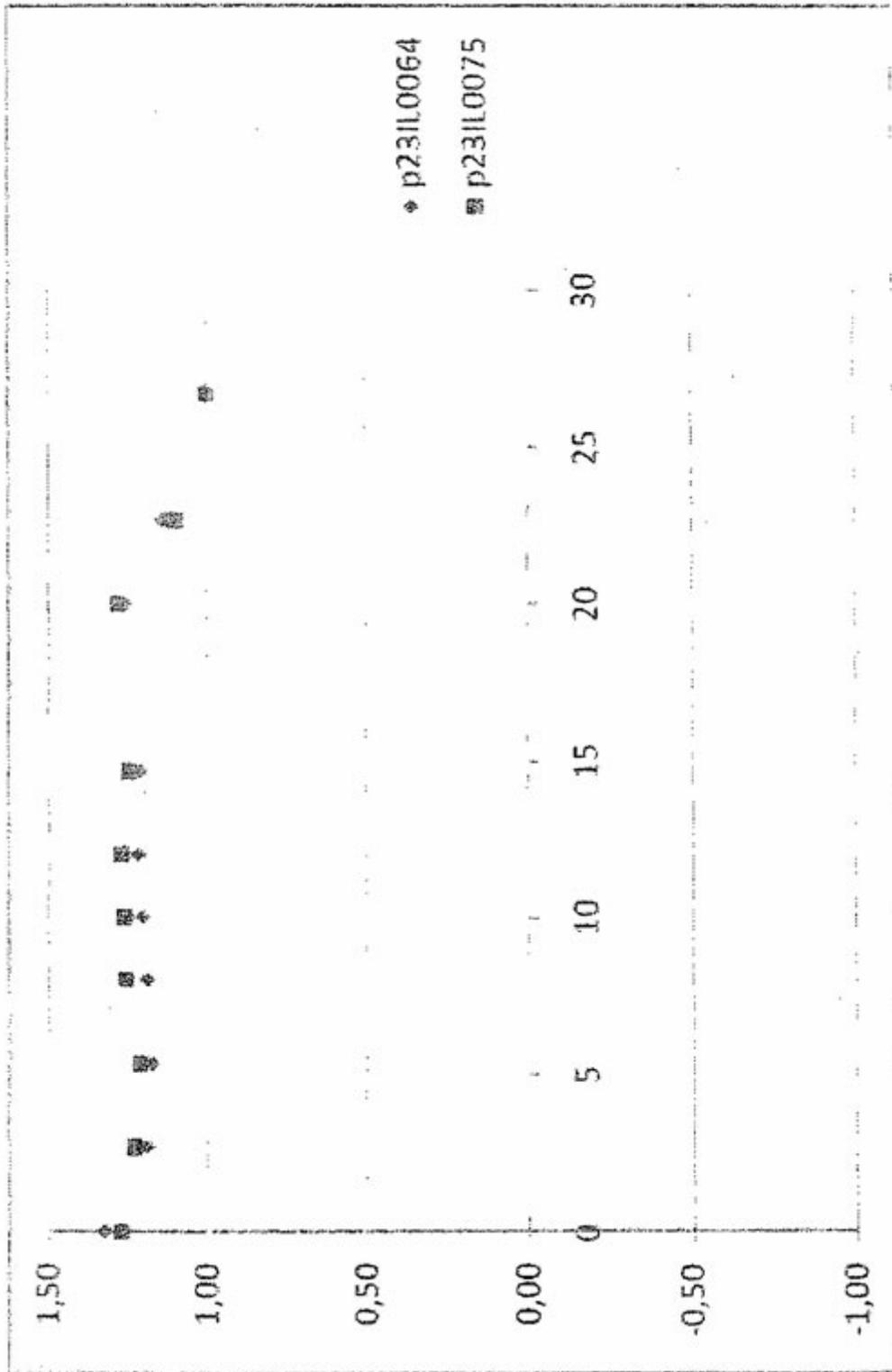
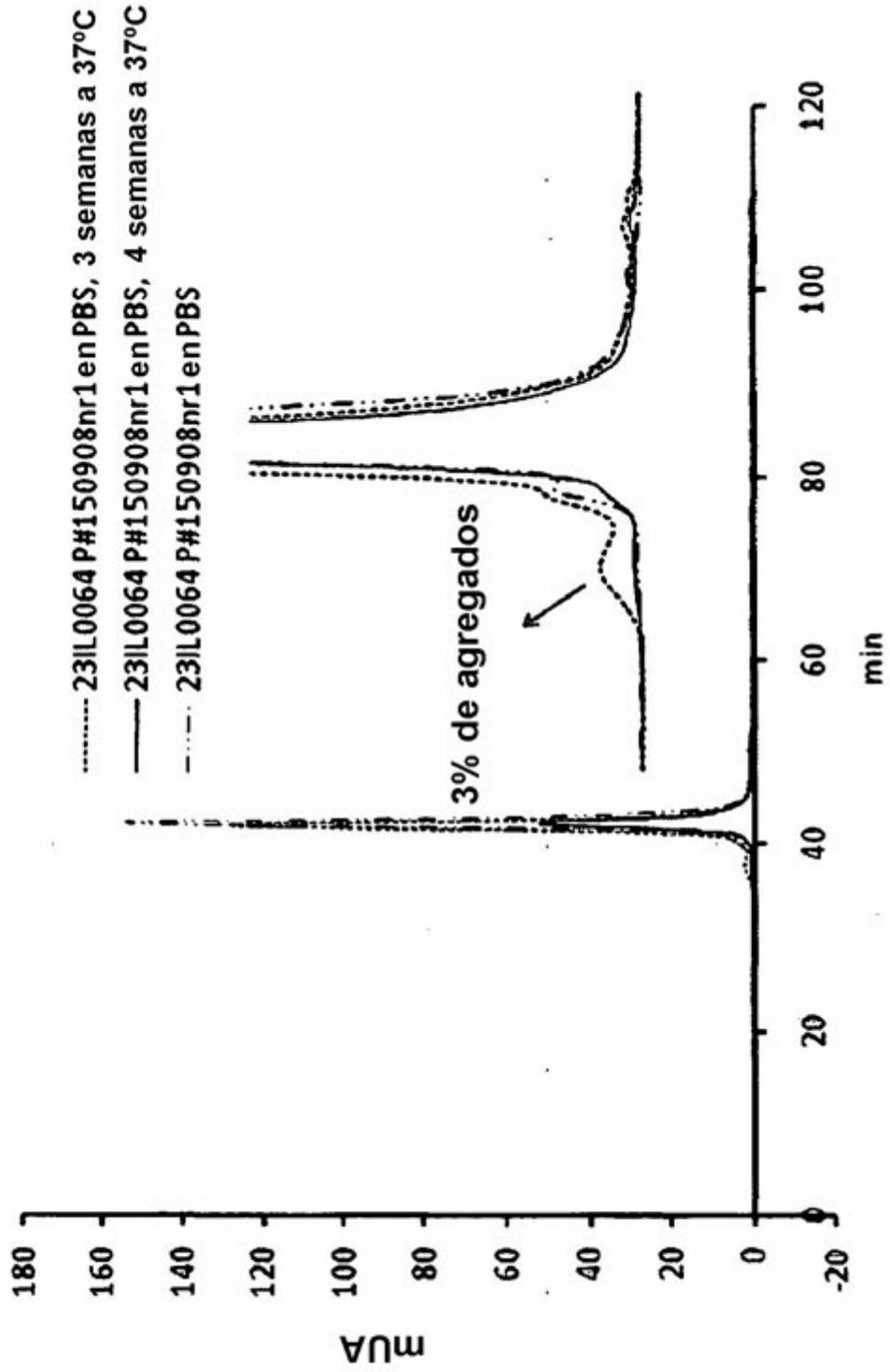


Figura 38



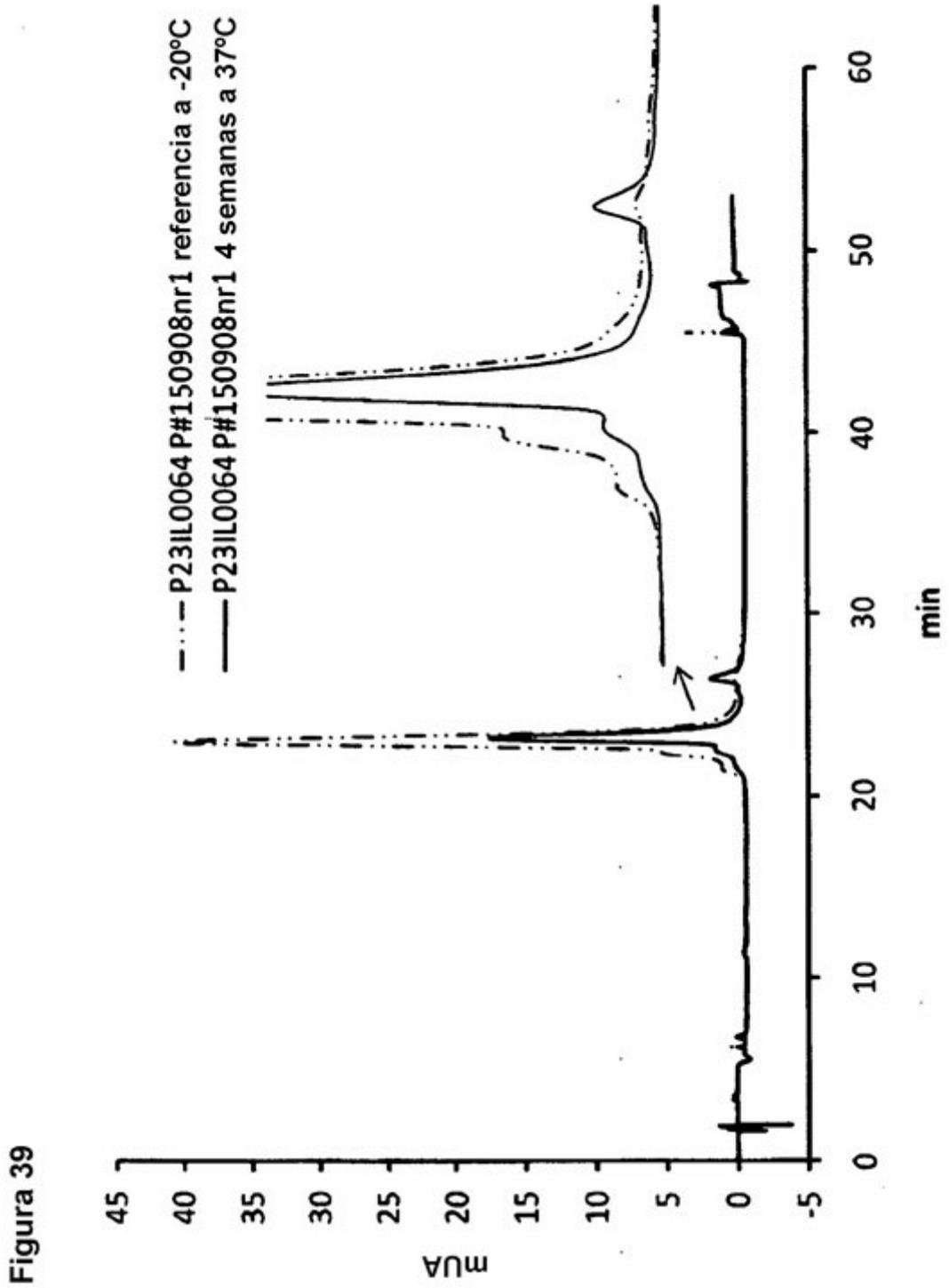
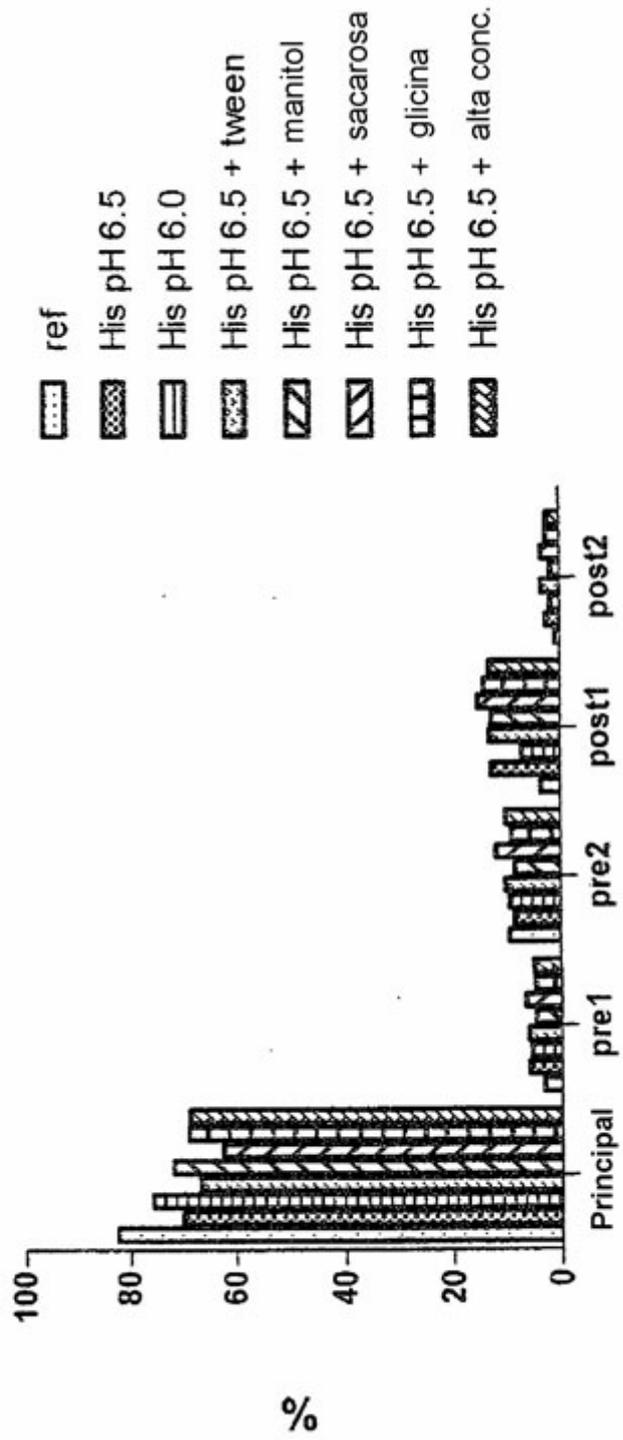


Figura 39

Figura 40

Picos de RPC (%) tras 6 semanas de almacenamiento a 37°C



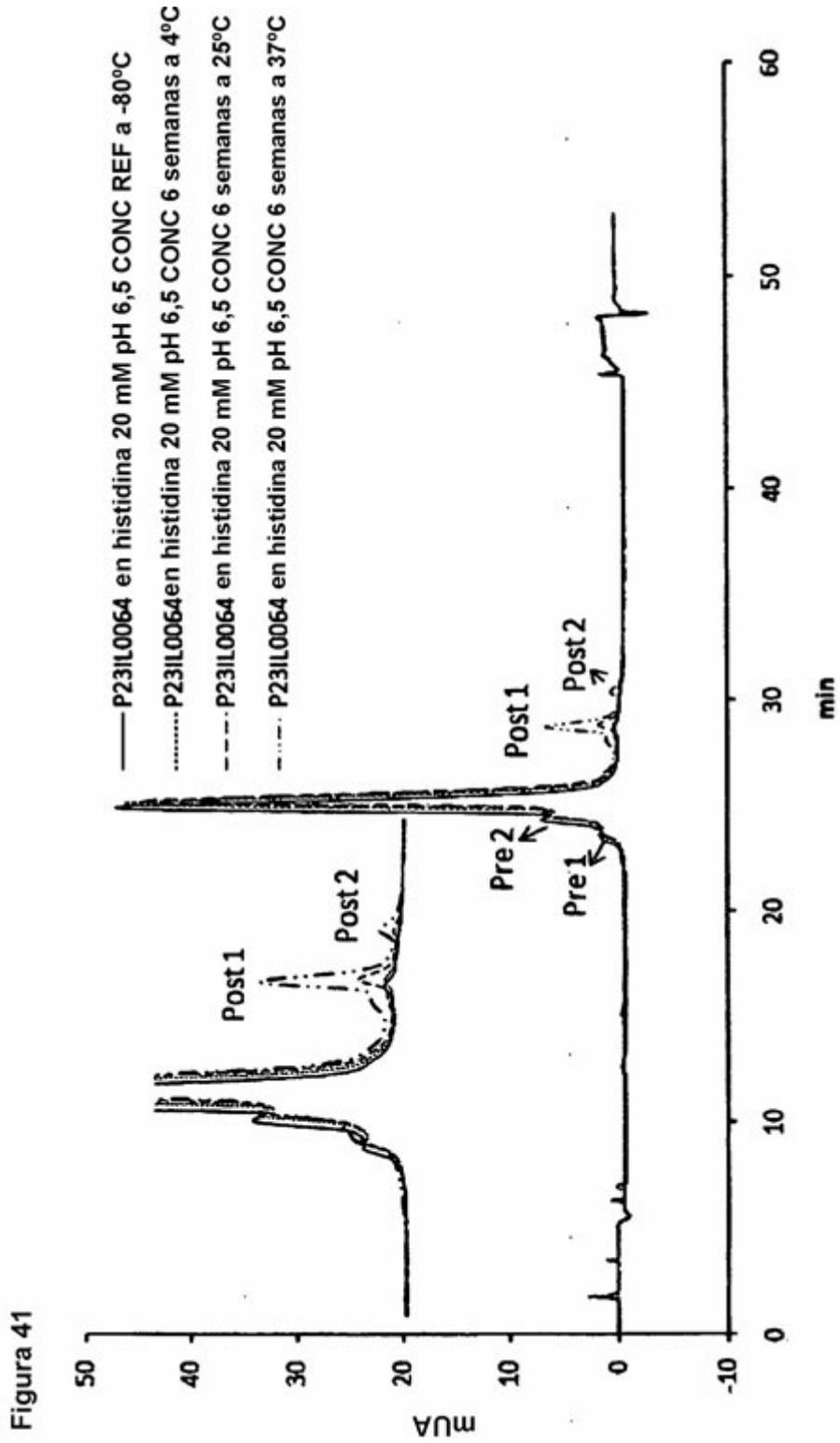
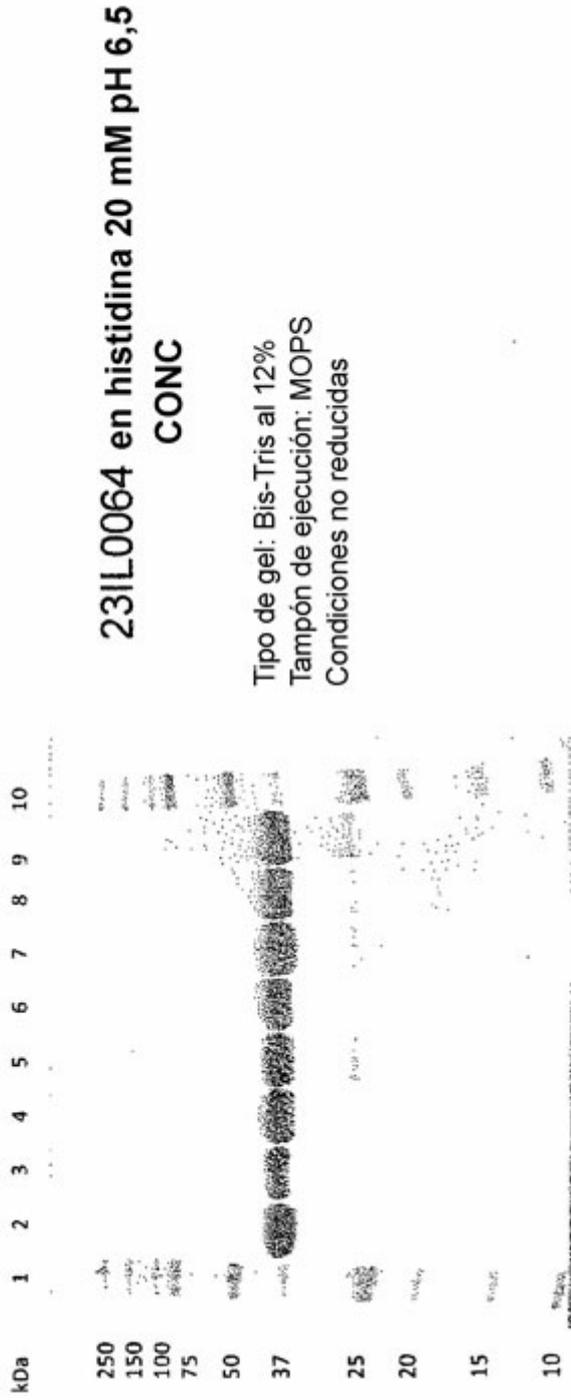


Figura 42



Carril	Muestra
1 y 10	Patrón de doble color de proteína Precision Plus
2	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, ref. a -80°C (antes de la cent.)
3	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, 4°C 6 semanas (antes de la cent.)
4	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, 25°C 6 semanas (antes de la cent.)
5	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, 37°C 6 semanas (antes de la cent.)
6	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, ref. a -80°C (después de la cent.)
7	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, 4°C 6 semanas (después de la cent.)
8	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, 25°C 6 semanas (después de la cent.)
9	p231L0064 en histidina 20 mM pH 6,5 CONC, 37°C 6 semanas (después de la cent.)

Figura 43

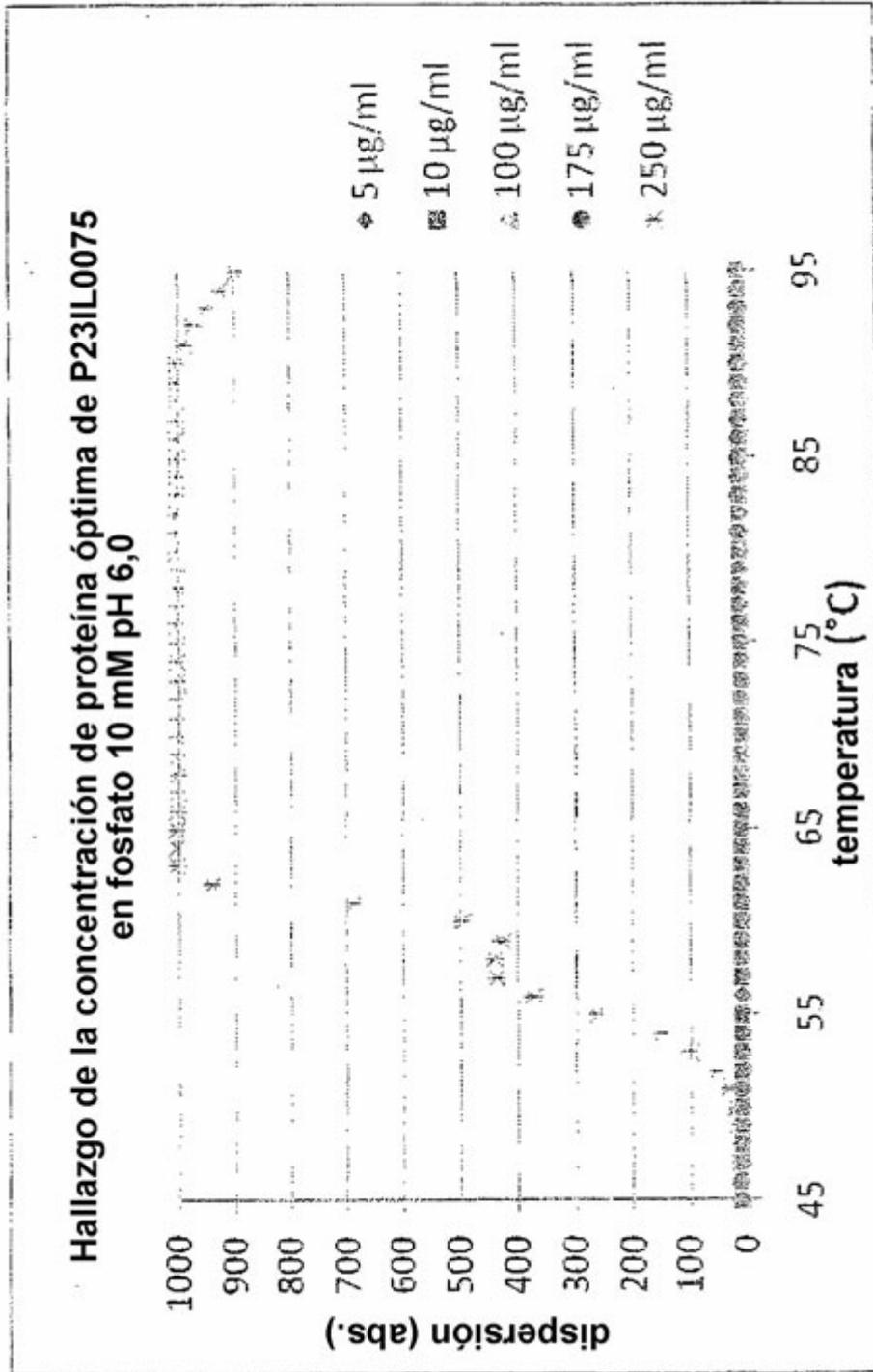


Figura 44

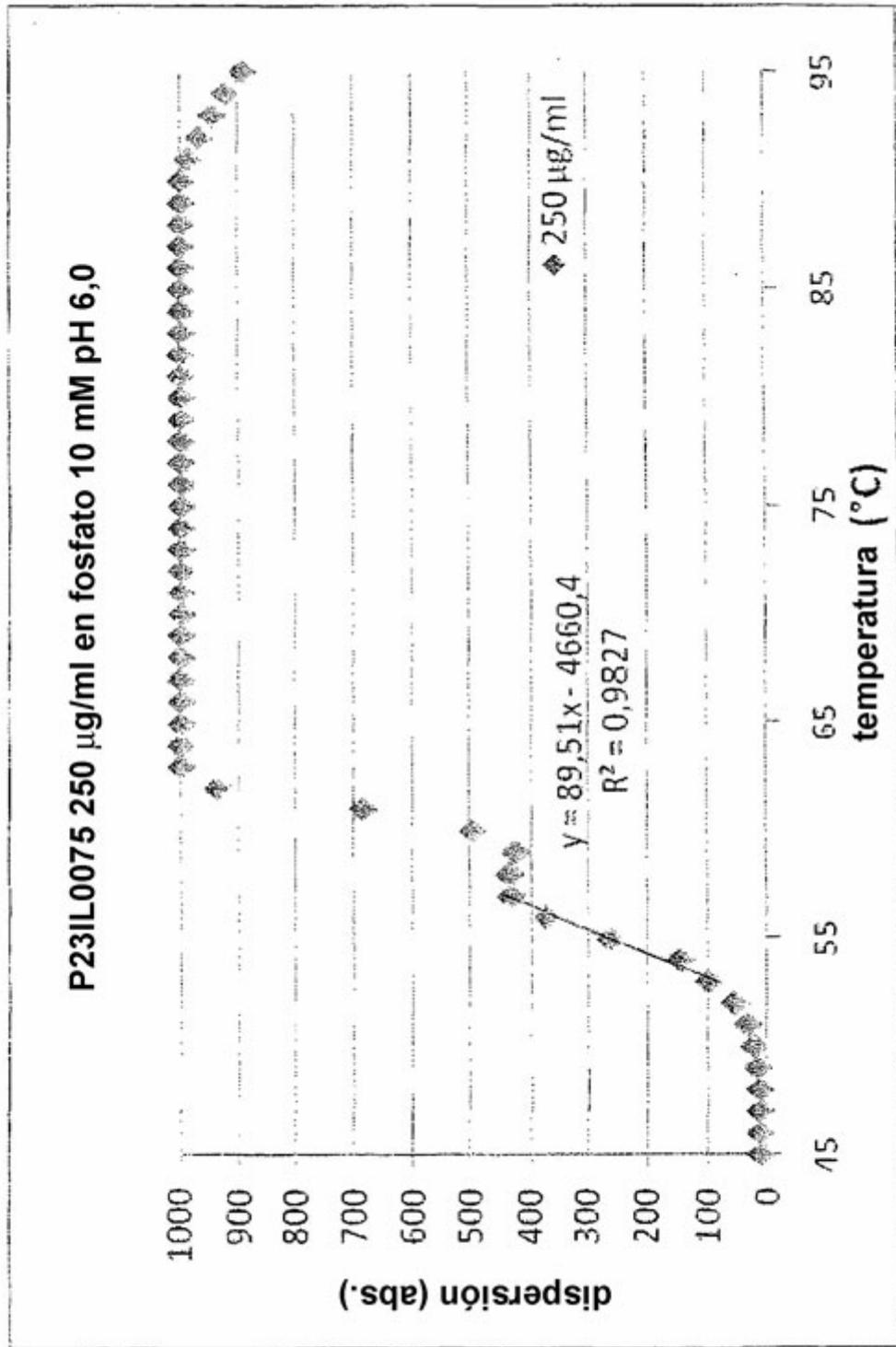


Figura 45

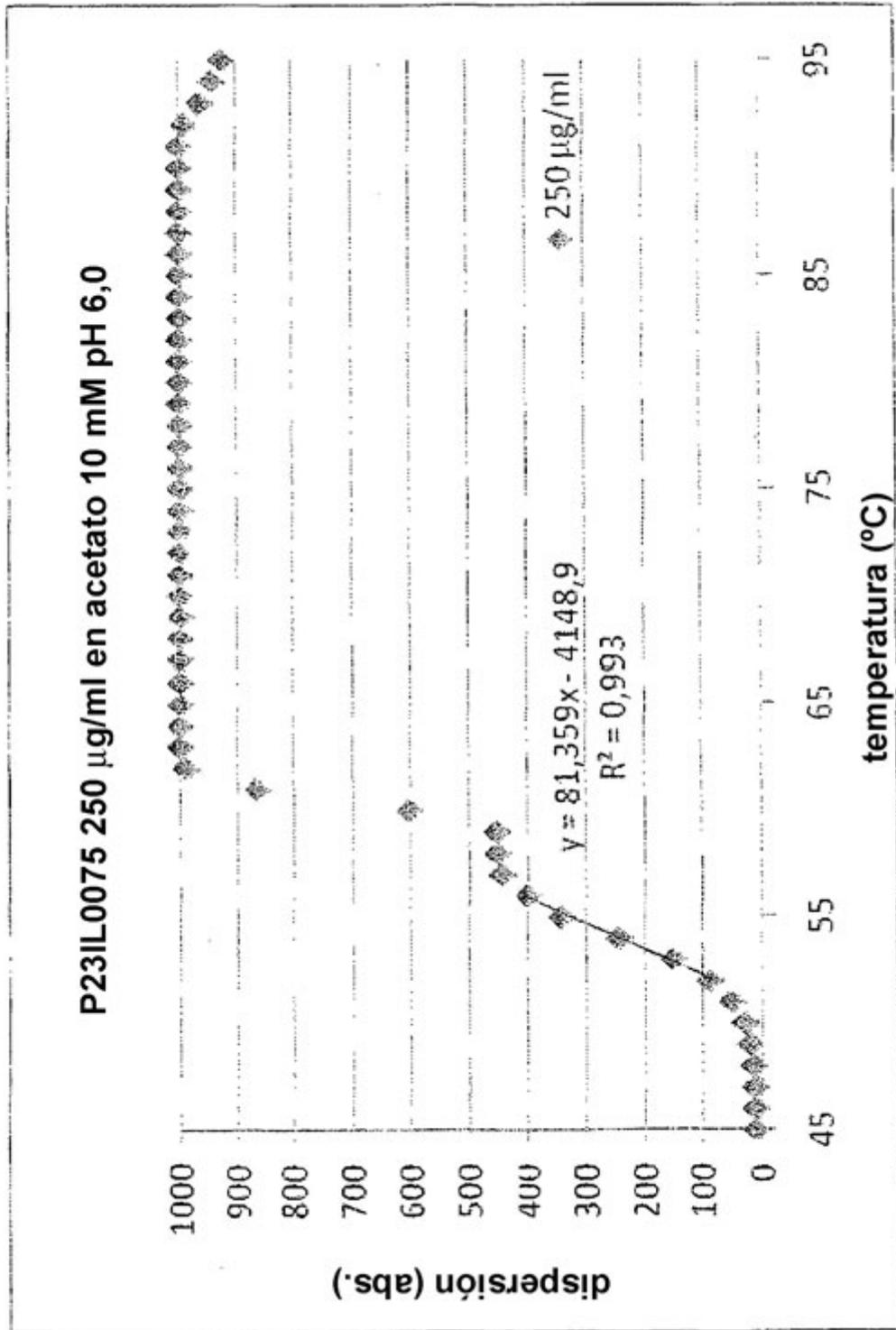


Figura 46

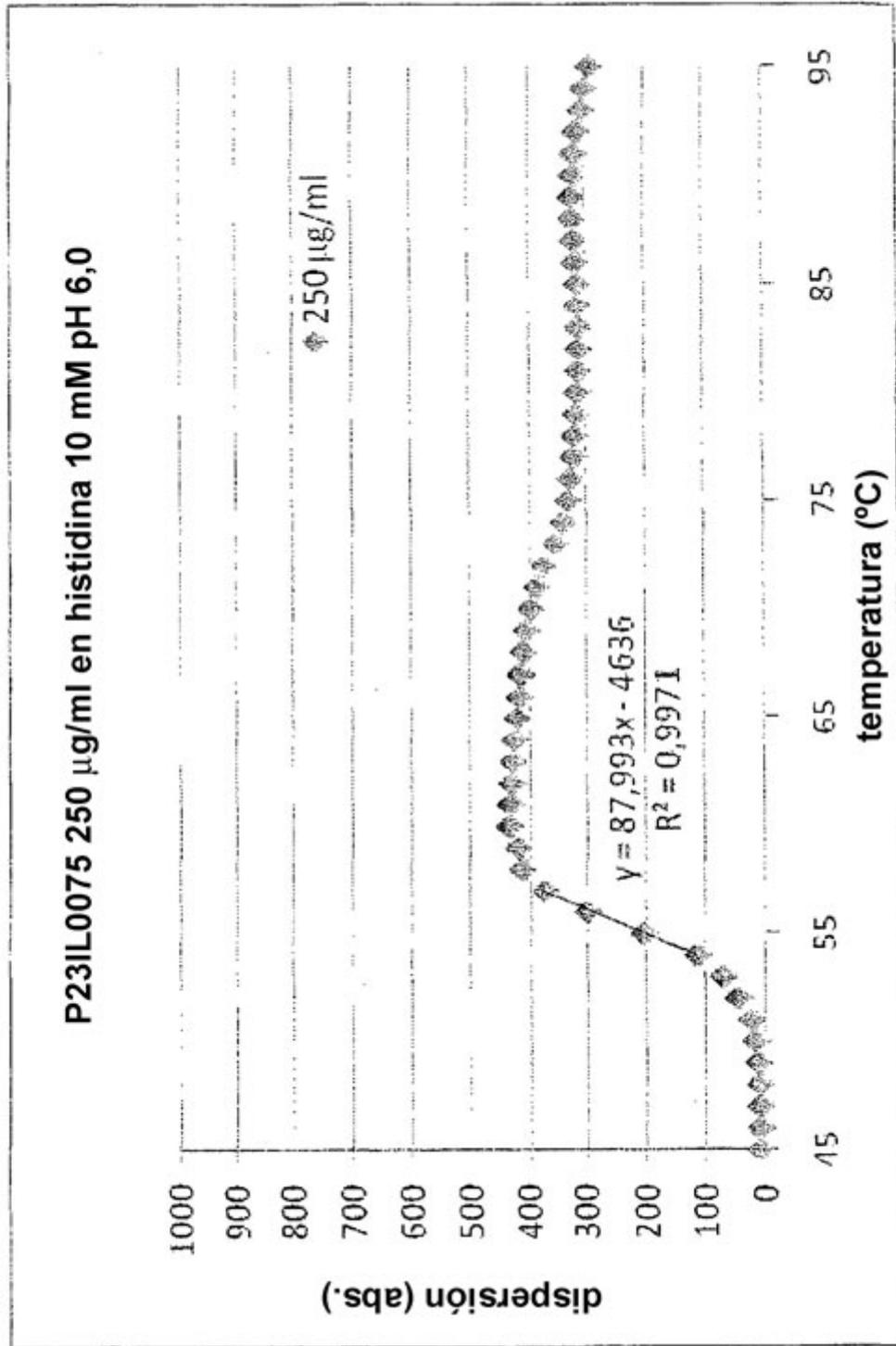


Figura 47(A)

Medición de DO a 500 nm tras 10 x C/D
(a 10 mg/ml)

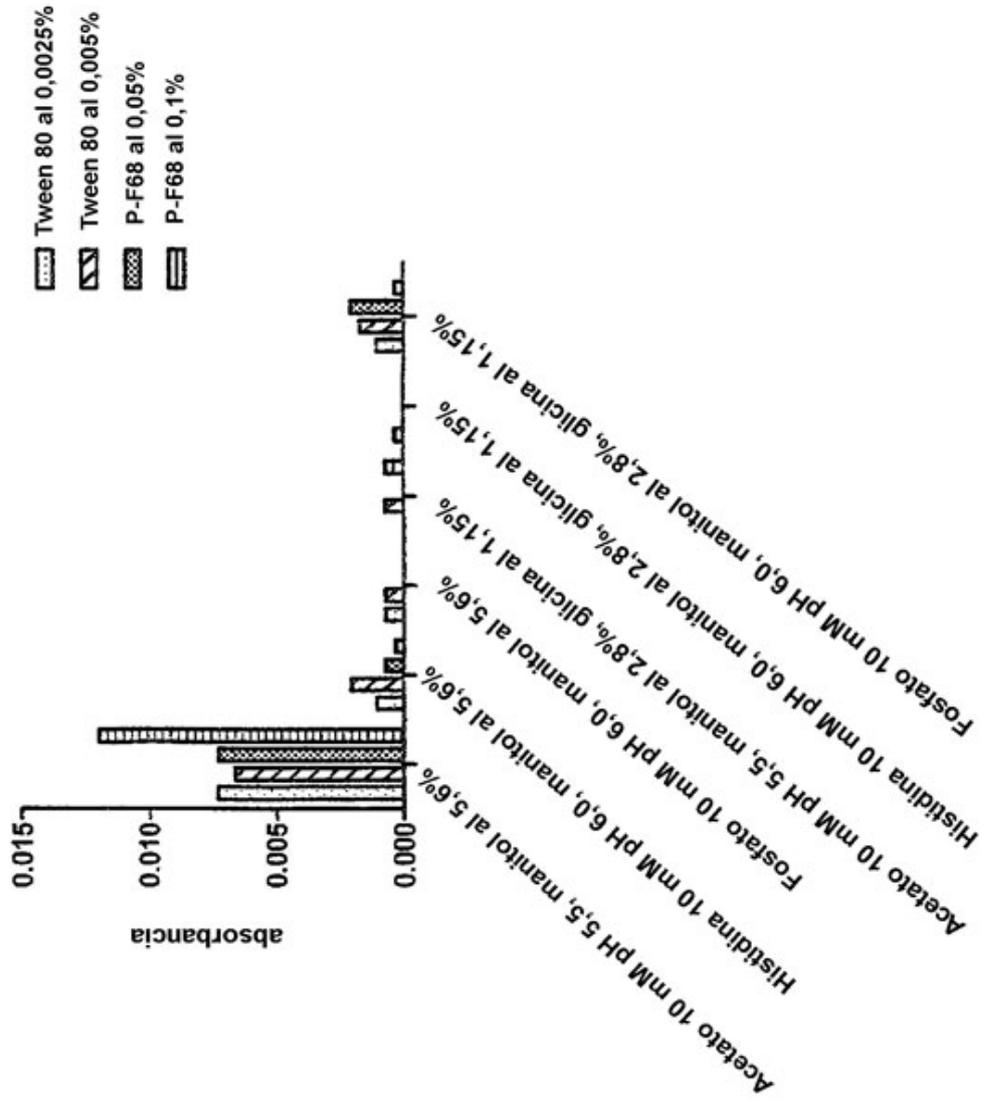


Figura 47(B)

% de área de pico previo de SEC a 280 nm tras 10x CD (-20°C)
(a 10 mg/ml)

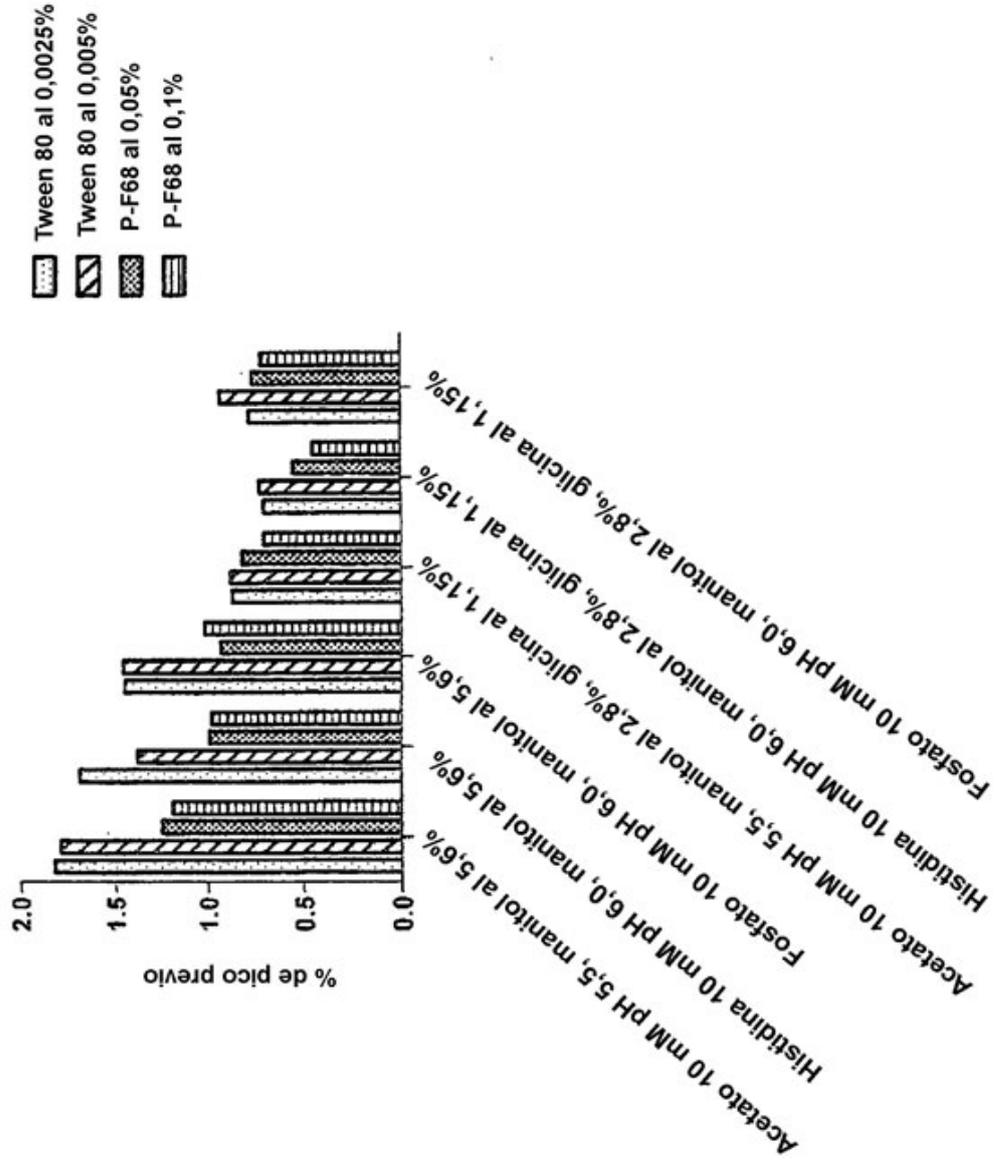


Figura 48(A)

Medición de DO a 500 nm tras 4 h de agitación a 4°C
(a 10 mg/ml)

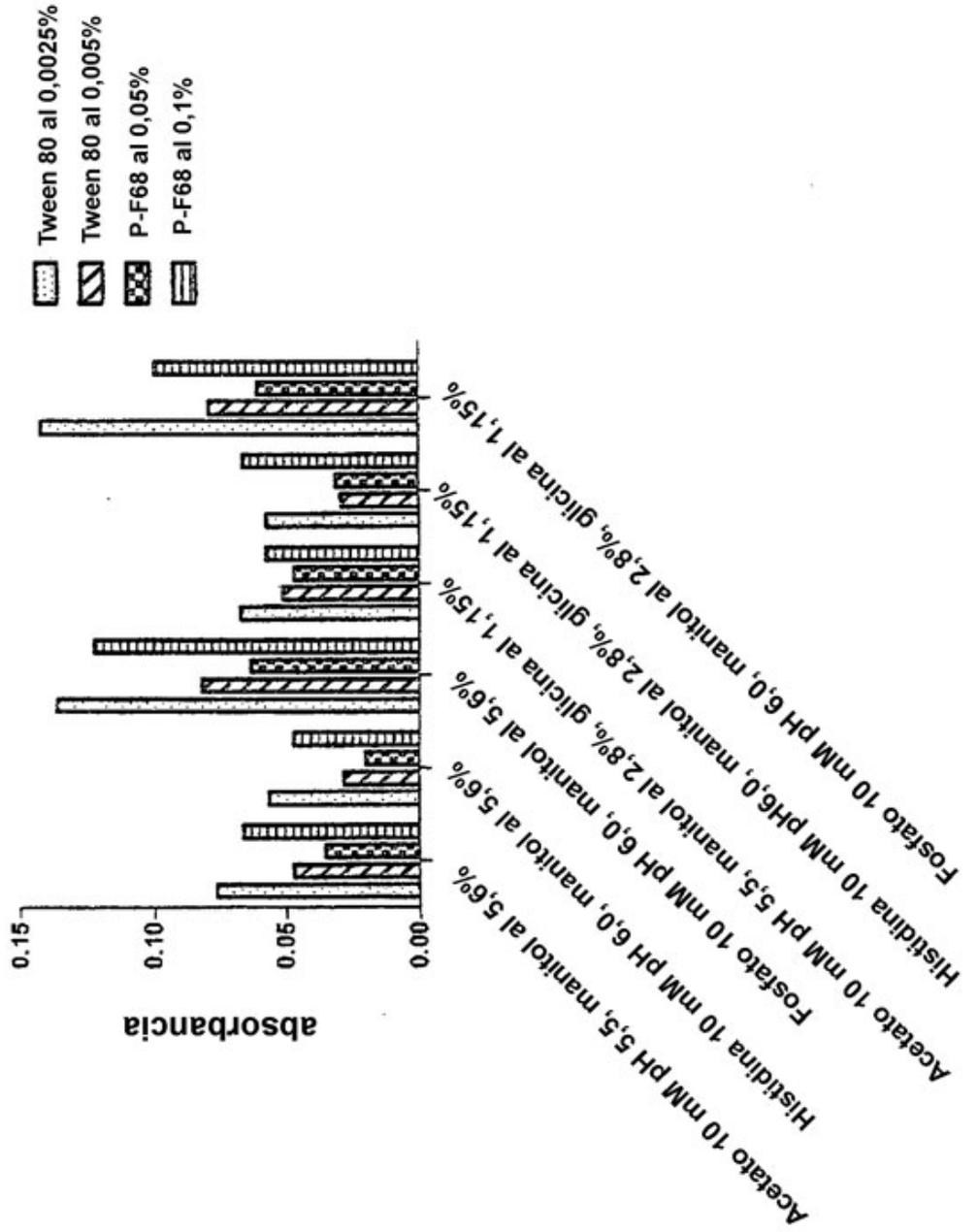


Figura 48(B)

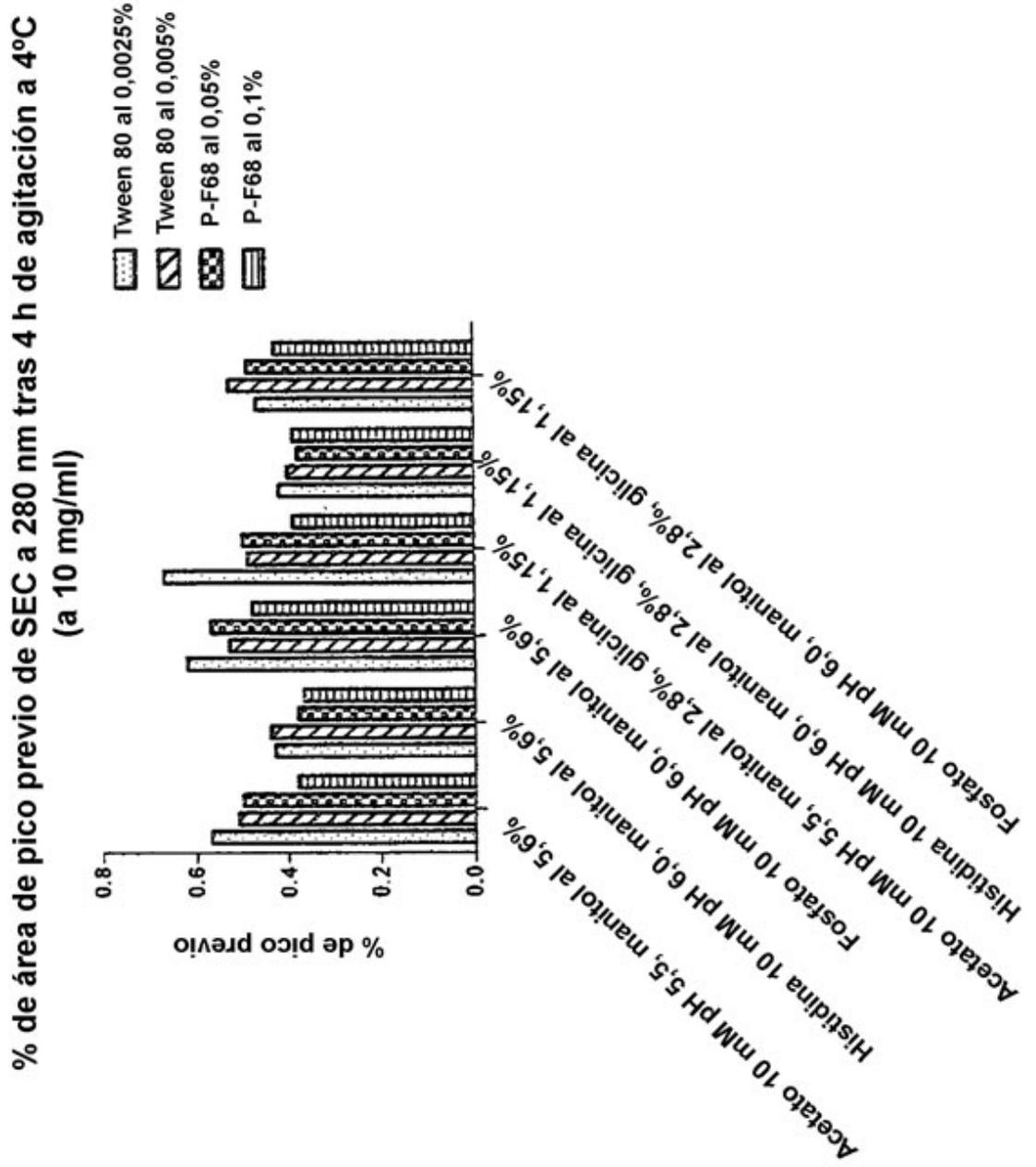


Figura 49(A)

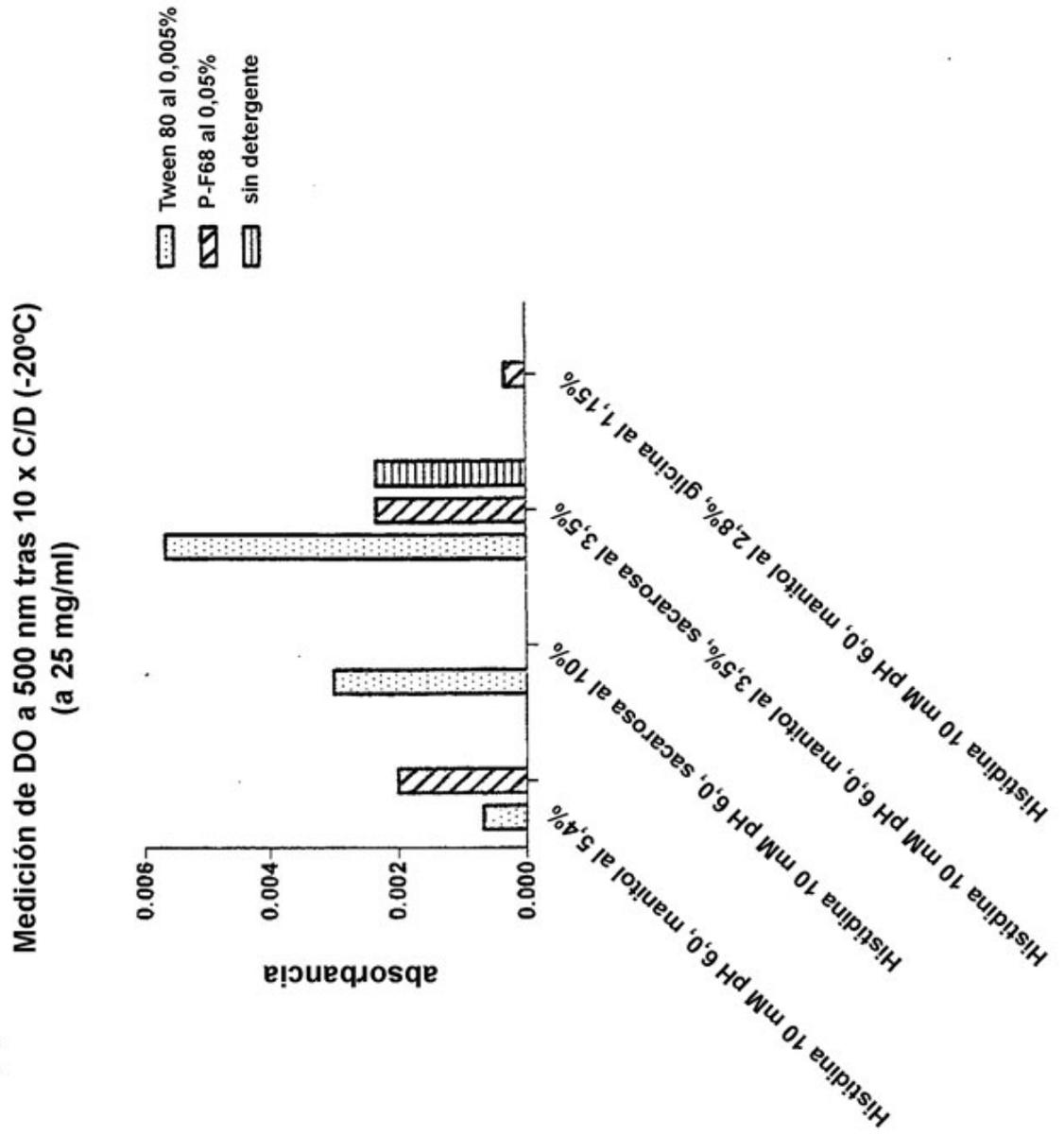


Figura 49(B)

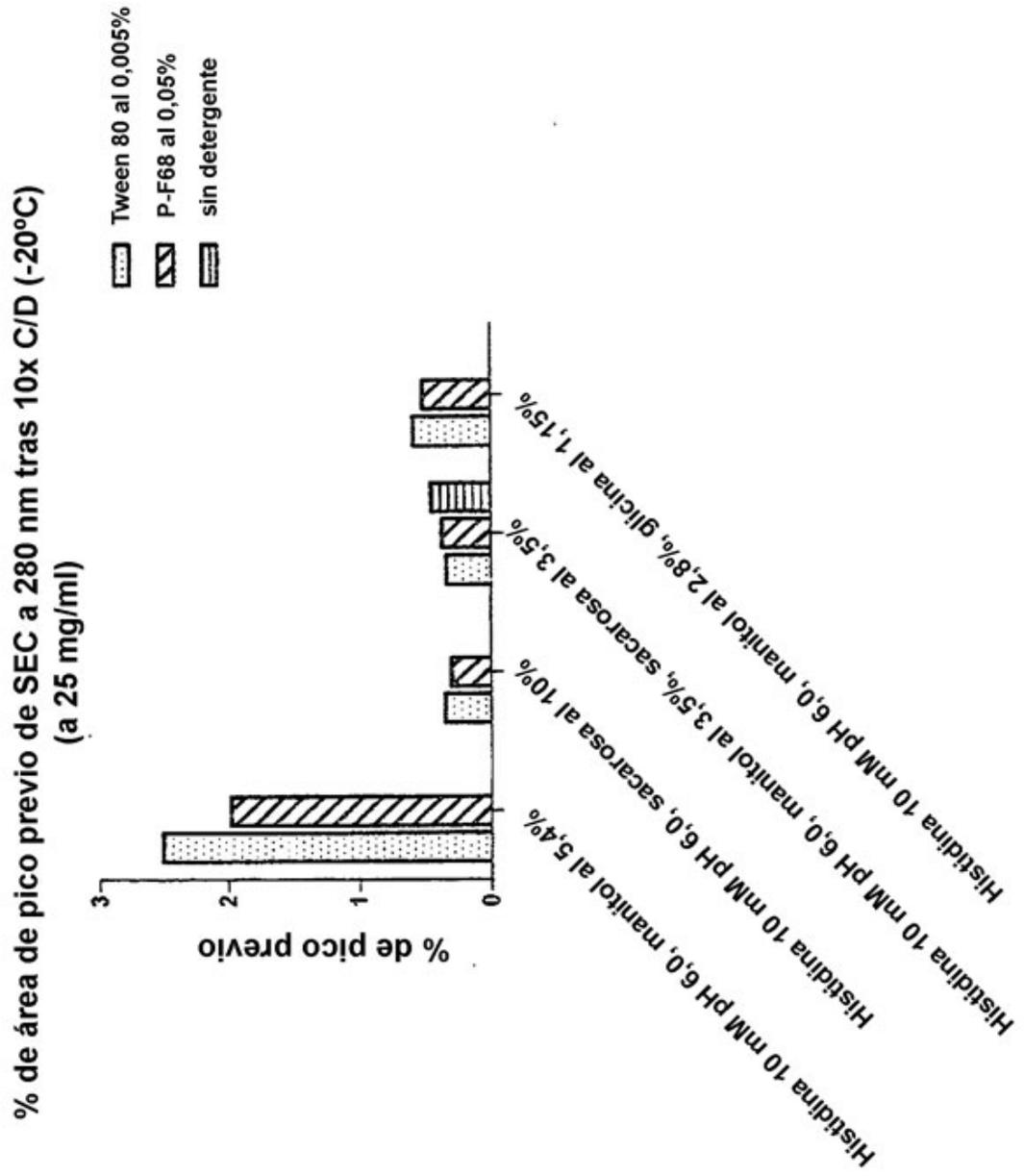


Figura 50(A)

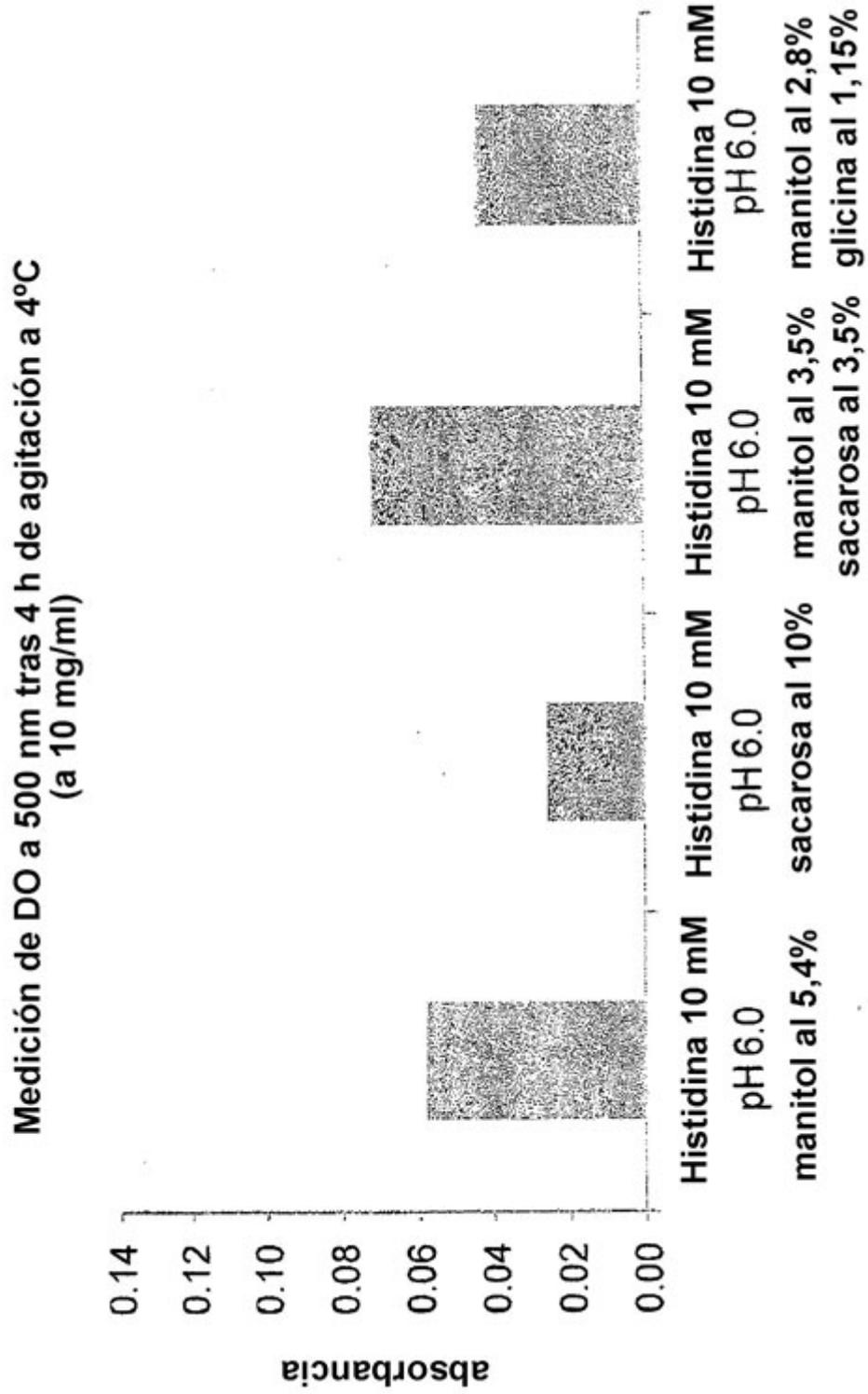


Figura 50(B)

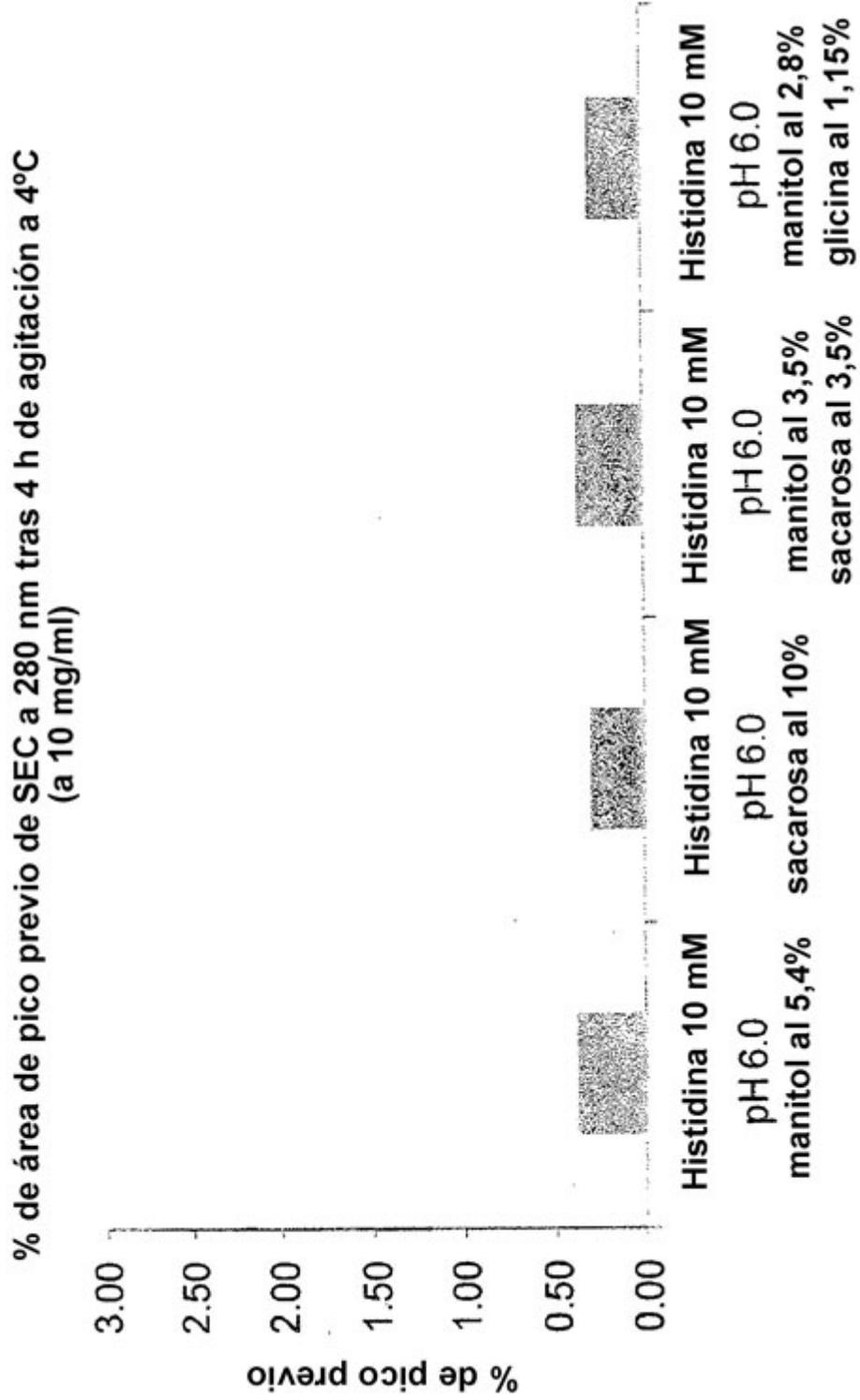


Figura 50(C)

Biacore: % de actividad (unión sobre albúmina (HSA) en comparación con la referencia tras 4 h de agitación a 4°C (a 10 mg/ml)

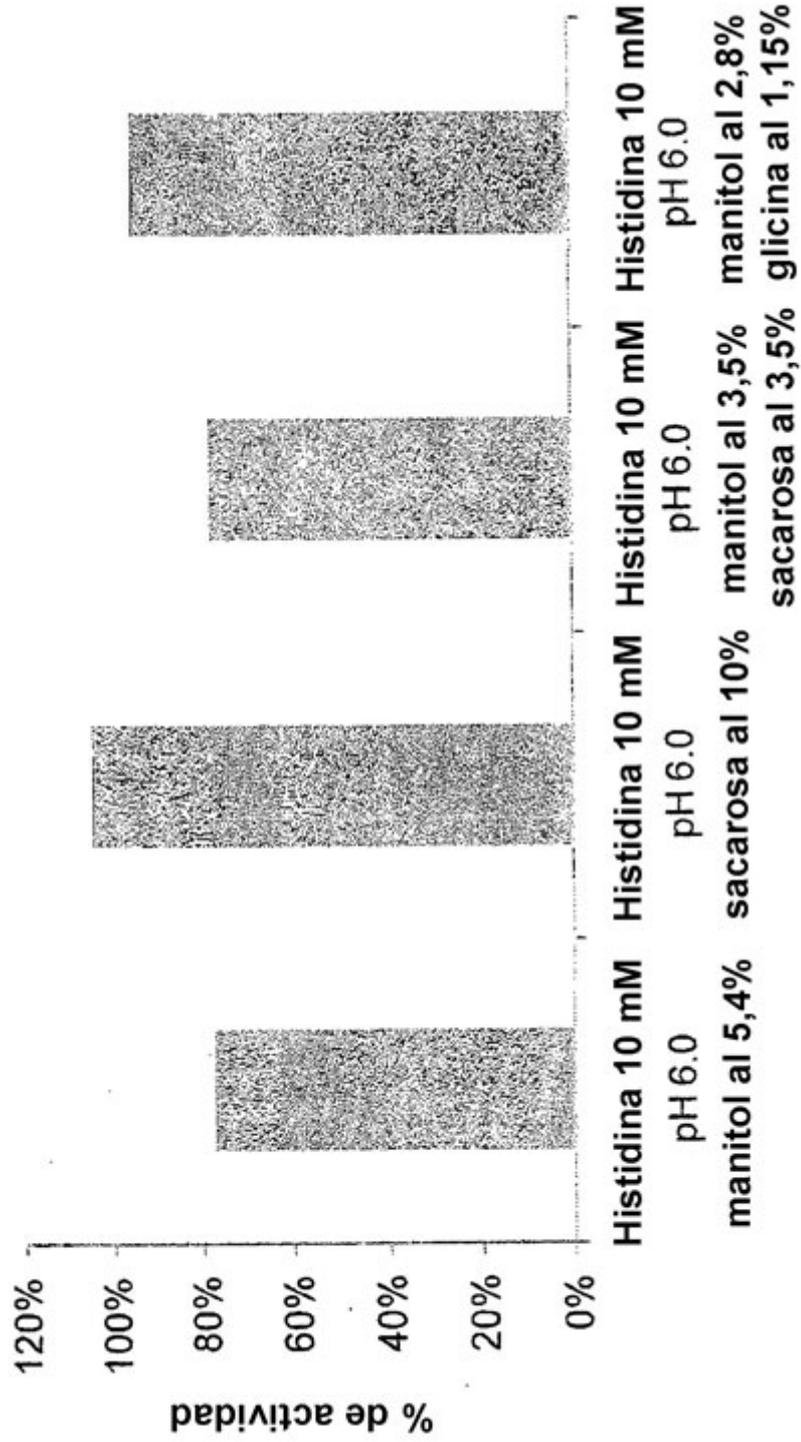


Figura 51

