

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 180**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24	(2006.01)
C07K 16/26	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
A61K 9/00	(2006.01)
A61K 47/02	(2006.01)
A61K 47/14	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.09.2010 PCT/EP2010/062972**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **10.03.2011 WO2011026945**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.09.2010 E 10747895 (0)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.11.2016 EP 2473527**

54 Título: **Formulaciones estables de polipéptidos y uso 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:
15.06.2017

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

BRIGE, ANN;
LABEUR, CHRISTINE y
LAUWEREYS, MARC JOZEF

74 Agente/Representante:

FÚSTER OLAGUIBEL, Gustavo Nicolás

ES 2 617 180 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 INVENCÓN**

La presente invención se refiere a formulaciones de dominios variables individuales. Más específicamente la presente invención proporciona formulaciones que contienen dominios variables individuales a una concentración elevada y que todavía pueden transportarse y/o almacenarse durante periodos de tiempo más largos. Las formulaciones de la invención con la concentración elevada de dominios variables individuales son adecuadas para la administración subcutánea.

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

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

20 TÉCNICA ANTERIOR

A menudo proteínas tales como anticuerpos terapéuticos se transportan y/o se almacenan para un uso posterior. Es importante que dichas 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 previas han mostrado cortos periodos de validez y pérdida de la actividad biológica de los anticuerpos debido a 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 los anticuerpos. Entre estas, se sabe que la agregación, la desamidación y la oxidación son las causas más comunes de la degradación de anticuerpos (Cleland *et al.*, 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10: pág. 307-377).

Los nanocuerpos (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. Los nanocuerpos contra RANKL que pueden inhibir la formación de osteoclastos y que podrían ser candidatos para el desarrollo de fármacos adicional se describen en el documento WO 08/142164. Recientemente se ha descubierto el sistema OPG/RANKL/RANK como factores reguladores fundamentales en la patogenia de enfermedades y trastornos óseos como por ejemplo la osteoporosis.

Hasta ahora, la mayoría de los dominios variables individuales se han administrado por vía intravenosa. Sin embargo, las inyecciones intravenosas (e intramusculares) las administra generalmente el médico o el personal médico profesional. Por tanto, el paciente debe acudir a un consultorio o un hospital con regularidad para recibir tratamiento. Aparte del malestar creado, el tiempo requerido por este tipo de aplicación a menudo da lugar a un cumplimiento insatisfactorio por el paciente, particularmente cuando el tratamiento se prolonga durante varios meses. La inyección subcutánea ofrece al paciente la posibilidad de autoadministrarse el fármaco y por consiguiente mejorar la cooperación y el cumplimiento de los pacientes. Estas ventajas son aún más evidentes en el caso de un tratamiento a largo plazo, tal como el tratamiento de enfermedades y trastornos óseos. Otra ventaja de la administración subcutánea se encuentra en una tasa de complicaciones sustancialmente menor debido a posibles efectos secundarios, tales como formación de abscesos y lesiones en los nervios.

Sin embargo, el volumen de formulación farmacéutica que puede administrarse a un paciente por vía subcutánea, está más restringido. Por tanto, con el fin de poder administrar una dosis suficiente de principio activo al paciente, para la administración subcutánea, se requiere una mayor concentración de sustancia farmacéutica en la formulación farmacéutica, de modo que todavía pueda obtenerse el efecto biológico requerido. Sin embargo, la formulación a una concentración elevada de proteínas va unida a diversos desafíos y riesgos, siendo el mayor riesgo la formación de agregados. Por tanto, entender el comportamiento fisicoquímico del dominio variable individual a una concentración elevada de proteínas es de una importancia clave antes de definir la formulación final del compuesto farmacéutico.

60 RESUMEN DE LA INVENCÓN

La presente invención proporciona formulaciones de dominios variables individuales (también denominadas "formulación/formulaciones de la invención") que son adecuadas para la administración subcutánea a un sujeto. Las formulaciones de la invención comprenden el dominio variable individual a concentraciones de 30 mg/ml o mayores (tales como, por ejemplo, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o incluso

100 mg/ml o mayores) y todavía presentan una buena estabilidad, niveles de agregación de bajos a indetectables, niveles de fragmentación/degradación de dominios variables individuales de bajos a indetectables y de muy poca a ninguna pérdida de las actividades biológicas de los dominios variables individuales, incluso durante el transporte y/o periodos de almacenamiento prolongados.

5 La presente invención proporciona datos de estabilidad para formulaciones con polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales (también denominados "*polipéptidos de la invención*") a una concentración de proteínas que es suficientemente elevada para ser compatible con la administración subcutánea. La invención demuestra además que dichas formulaciones pueden transportarse y tienen un periodo de validez prolongado aplicando condiciones de estrés mecánico y mediante el almacenamiento en diversas condiciones de estrés tales como en forma liofilizada, a 2 °C-8 °C, en un estado congelado a -20 °C±5 °C o por debajo de -64 °C (tal como por ejemplo a -80 °C) y a temperatura elevada.

15 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 el control de una o más enfermedades. En un aspecto específico, el polipéptido tiene tres dominios variables individuales. En otro aspecto específico, el polipéptido es útil en enfermedades y/o trastornos asociados con pérdida ósea. Preferentemente, el polipéptido se dirige contra RANKL y/o HSA y/o se une específicamente a ellos. Más preferentemente, el polipéptido se dirige contra RANKL y HSA y/o se une específicamente a ellos. En otro aspecto específico, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra RANKL. En otro aspecto, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra HSA. En aún otro aspecto, el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual contra RANKL y al menos un dominio variable individual contra HSA. El dominio o los dominios variables individuales usados en el polipéptido de la invención se seleccionan del documento WO 08/142164. El polipéptido de la invención es un polipéptido trivalente que comprende dos dominios variables individuales contra RANKL y un dominio variable individual contra HSA, es decir, SEQ ID NO: 1.

25 Las formulaciones de la presente invención comprenden un polipéptido de ese tipo de la invención a una concentración elevada (es decir, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, preferentemente al menos 60 mg/ml, al menos 65 mg/ml o al menos 70 mg/ml, más preferentemente al menos 80 mg/ml o al menos 90 mg/ml, lo más preferentemente al menos 100 mg/ml o más) y todavía presentan estabilidad en una o más de las siguientes condiciones de estrés:

- múltiples (hasta 10) ciclos de congelación/descongelación;
- 35 - almacenamiento a una temperatura de -20 °C±5 °C hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);
- almacenamiento a una temperatura de 2 °C-8 °C hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 11 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);
- 40 - almacenamiento a una temperatura de 25 °C±5 °C hasta al menos 6 semanas;
- almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más); y/o
- 45 - estrés mecánico.

50 El estrés mecánico 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 quedar limitado, el estrés mecánico aplicado a la disolución puede ser estrés por cizalladura, estrés por agitación, estrés por remoción, estrés por rotación, etc. Preferentemente 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;
- 55 - empujar la formulación a través de una aguja (25 G, preferentemente 26 G, más preferentemente 27 G, incluso más preferentemente 28 G, lo más preferentemente 29 G 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);
- 60 - rotar durante dos días a 10 rpm; y/o
- agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y/o 2 días a 4 °C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

65 Preferentemente, las formulaciones de la presente invención son estables en más de una (como dos, tres, cuatro,

cinco, seis, siete u ocho) de las condiciones de estrés anteriores, lo más preferentemente en todas las condiciones de estrés anteriores.

5 Por consiguiente, el polipéptido de la invención presente en la formulación de la invención a una concentración elevada (es decir, al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml, preferentemente al menos 60 mg/ml, al menos 65 mg/ml o al menos 70 mg/ml, más preferentemente al menos 80 mg/ml o al menos 90 mg/ml, lo más preferentemente al menos 100 mg/ml o más):

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

15 - es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), determinándose dicha estabilidad mediante medición de OD320/OD280, SE-HPLC, IEX-HPLC, RP-HPLC, ensayo de potencia (como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

20 - es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $2\text{ }^{\circ}\text{C}-8\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 11 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), determinándose dicha estabilidad mediante medición de OD320/OD280, SE-HPLC, IEX-HPLC, RP-HPLC, ensayo de potencia (como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

25 - es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 6 semanas, determinándose dicha estabilidad mediante medición de OD320/OD280, SE-HPLC, IEX-HPLC, RP-HPLC, ensayo de potencia (como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

30 - es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más), determinándose dicha estabilidad mediante medición de OD320/OD280, SE-HPLC, IEX-HPLC, RP-HPLC, ensayo de potencia (como Biacore o ELISA) y/o SDS-PAGE;

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

35 - es estable cuando se empuja la formulación a través de una aguja (25 G, preferentemente 26 G, más preferentemente 27 G, incluso más preferentemente 28 G, lo más preferentemente 29 G 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);

40 - 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 2 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

45 En otro aspecto, el polipéptido presente en la formulación de la invención tiene un perfil de temperatura de fusión bifásico en el que una T_{m1} es de al menos $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más, preferentemente al menos $61\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más, más preferentemente al menos $62\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más y la T_{m2} es de al menos $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más, preferentemente al menos $66\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más, más preferentemente al menos $67\text{ }^{\circ}\text{C}$ o más, tal como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC).

50 La estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse por el hecho de que menos de un 10 % de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) y/o menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. Preferentemente menos de un 10 % de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) y menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. Más preferentemente menos de un 15 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

60 En un aspecto específico, menos de un 10 % de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). En otro aspecto específico, menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas

(preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). En un aspecto específico, menos de un 10 % de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) y menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). Preferentemente menos de un 15 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más).

Aparte de esto y/o además, la estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse mediante el hecho de que solo muestra niveles de bajos a indetectables de agregación (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, medición de la proporción 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 solo muestran niveles de agregación de bajos a indetectables (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, medición de la proporción DO320/DO280 y/o dispersión elástica de la luz) a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más).

Aparte de esto y/o además, la estabilidad de las formulaciones de la presente invención puede demostrarse mediante el hecho de que solo muestra niveles de bajos a indetectables de fragmentación y/o degradación de los polipéptidos (por ejemplo, como se evalúa mediante SDS-PAGE, SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC) incluso durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. En un aspecto específico, las formulaciones de la presente invención solo muestran niveles de bajos a indetectables de fragmentación y/o degradación de los polipéptidos (por ejemplo, como se evalúa mediante SDS-PAGE, SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC) a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más).

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 (por ejemplo, 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 (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más).

Más específicamente, en las formulaciones de la presente invención al menos un 80 % (preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %) de los polipéptidos preferentemente conserva su actividad de unión a RANKL (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) después del almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores, en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

Además, en las formulaciones de la presente invención al menos un 80 % (preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %) de los polipéptidos preferentemente conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a HSA después del almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores, en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. En un aspecto preferente, al menos un 80 % (preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %) de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a RANKL y HSA después del almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores, en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

En un aspecto específico, al menos un 80 % (preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a RANKL después del almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más), en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. En otro aspecto específico, al menos un 80 % (preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a HSA tras el almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más), en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. Preferentemente, al menos un 80 % (preferentemente al menos un 90 %, más

preferentemente al menos un 95 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a RANKL y HSA después del almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más), en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

5 En consecuencia, la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden dos dominios variables individuales que se unen a RANKL y un dominio variable individual que se une a HSA, es decir, SEQ ID NO: 1 a una concentración elevada (como se define en el presente documento), en las que

10 - menos de un 10 % de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RPHPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);

15 - menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);

20 - al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una de sus (preferentemente a todas sus) dianas después del almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más), en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento; y/o

25 - el polipéptido es estable bajo estrés mecánico.

30 En un aspecto específico de la invención, dichas formulaciones son homogéneas. En otro aspecto, las formulaciones de la invención son estériles. Además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente), las formulaciones de la presente invención comprenden al menos un vehículo acuoso (por ejemplo, agua destilada, agua MilliQ o API) y un tampón. La formulación de la invención comprende un tampón fosfato (es decir, hidrogenofosfato de disodio / Na_2HPO_4) pH 7,0 a una concentración de 10 mM.

35 En consecuencia, la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales, comprendiendo dichas formulaciones un vehículo acuoso, el polipéptido a una concentración desde aproximadamente 30-150 mg/ml, tal como al menos 30 mg/ml, al menos 40 mg/ml, al menos 50 mg/ml o al menos 60 mg/ml, preferentemente al menos 65 mg/ml o al menos 70 mg/ml, más preferentemente al menos 80 mg/ml o al menos 90 mg/ml, incluso más preferentemente al menos 100 mg/ml o más, y un tampón tal como un tampón fosfato o acetato a una concentración de aproximadamente 10-20 mM y con un pH que varía entre 5,5 y 7,0. Por supuesto, es evidente que la misma disolución tampón también puede contener menores concentraciones del polipéptido (no reivindicado) de la invención, tales como por ejemplo desde 1 hasta 10 mg/ml o desde 1 hasta 20 mg/ml, tal como 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml o 20 mg/ml, cuyas concentraciones pueden, por ejemplo, ser útiles en otras formas de administración, tales como otras formas de administración parenteral (tal como, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intracraneal, etc.).

45 Preferentemente, la formulación de la invención es isotónica o ligeramente hipotónica y/o tiene una osmolalidad de aproximadamente $290 \pm 60\text{ mOsm/kg}$, como aproximadamente 240 o mayor, 250 o mayor o 260 o mayor. En consecuencia, la formulación de la invención puede comprender además una sal, tal como, por ejemplo, NaCl, a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 200 mM, preferentemente de 100 mM a 150 mM, como aproximadamente 115 mM.

50 En otro aspecto específico, las formulaciones de la invención comprenden tensioactivos (por ejemplo, Tween20 o Tween80) a una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 0,1 % (v:v), tal como por ejemplo un 0,01 % (v:v).

55 En consecuencia, una formulación preferente de la invención puede comprender:

- 30-150 mg/ml de SEQ ID NO: 1;
- 60 - 10 mM de hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4);
- 100-150 mM de cloruro de sodio (NaCl);
- Tween80 al 0-0,1 % (v:v), tal como, por ejemplo, Tween80 al 0,01 % (v:v).

65

Un ejemplo y formulación preferente de la invención comprende 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1, 10 mM de hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4), 115 mM de cloruro de sodio (NaCl) y Tween80 al 0,01 % (v:v).

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

La presente invención proporciona además procedimientos para preparar las formulaciones estables de la invención. Los procedimientos de la invención pueden comprender las etapas de concentración de un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales y de intercambiarlo con el tampón preferente.

La invención también se refiere a la liofilización y al secado por pulverización de las formulaciones de la invención y a la formulación liofilizada y secada por pulverización obtenida como tal.

También se proporcionan recipientes, kits y dosificaciones unitarias farmacéuticas que comprenden las formulaciones de la invención para su uso, por ejemplo, por un profesional sanitario. En modos específicos de realización, los kits o las dosificaciones unitarias farmacéuticas que comprenden las formulaciones estables de la invención se formulan para administración parenteral (por ejemplo, por vía intradérmica, por vía intramuscular, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa y por vía subcutánea) del polipéptido de la invención a un sujeto humano. Preferentemente, los kits y/o dosificaciones unitarias farmacéuticas se formulan para administración subcutánea del polipéptido de la invención a un sujeto humano.

Las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y/o los kits pueden usarse en profilaxis y/o tratamiento. En un aspecto específico, las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y/o los kits se usan para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y/o trastornos óseos, tales como osteoporosis, osteopatías relacionadas con cáncer y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección vírica.

LEYENDAS DE LAS FIGURAS

Figura 1. Superposición de los perfiles obtenidos mediante SE-HPLC a A280 nm de RANKL008a P#110708 después de 3 meses a 5 °C en PBS (A), tampón fosfato (B) y tampón acetato (C). Recuadro, ampliación a 214 nm sobre el pico principal y los picos secundarios.

Figura 2. Superposición de los perfiles obtenidos mediante RP-HPLC a A280 nm de RANKL008a P#110708 después de 3 meses a 5 °C en PBS (A), tampón fosfato (B) y tampón acetato (C). Recuadro, ampliación sobre el pico principal y los picos secundarios.

Figura 3. Superposición de los perfiles obtenidos mediante SE-HPLC del marcador de filtración en gel y RANKL008a (63 mg/ml) después de 8 semanas a 37 °C en PBS (como se describe en el ejemplo 4.1).

Figura 4. Superposición y ampliación de los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC a A280 nm de RANKL008a incubado hasta 8 semanas a 37 °C en tampón PBS. Aumento dependiente del tiempo del área de superficie del pico previo (sem = semanas).

Figura 5. Superposición y ampliación de los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC a A280 nm de RANKL008a (30 mg/ml y 63 mg/ml) incubado durante 6 semanas en tampón PBS (con y sin Tween80) a 37 °C. La formación de dímeros es dependiente de la concentración.

Figura 6. Gráfico que ilustra el aumento, dependiente del tiempo y de la concentración, de la formación de dímeros como se observa durante el análisis mediante SE-HPLC de las muestras de estabilidad almacenadas a 37 °C.

Figura 7. Superposición y ampliación de los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC a A280 nm de RANKL008a incubado a 37 °C. Los datos para las muestras de 63 mg/ml almacenadas durante 8 semanas se dan en tampones sin Tween80 (A) y tampones con Tween80 al 0,02 % (v:v) (B).

Figura 8. Aumento dependiente del tiempo del área de superficie del pico de piroglutamato (línea continua) y el descenso del área de superficie del pico principal (línea de puntos) para las diferentes muestras de RANKL008a almacenadas hasta 8 semanas a 37 °C. Los valores se representan como un % del área de superficie integrada total. Obsérvese que el piroglutamato se forma mucho más lentamente en acetato que en PBS y fosfato.

Figura 9. Superposición de los cromatogramas obtenidos mediante IEX-HPLC de RANKL008a incubado durante 8 semanas a 37 °C a 63 mg/ml (A) o 30 mg/ml (B). El área de superficie del pico posterior fue menor en tampón acetato y algo mayor a mayor concentración de proteínas.

Figura 10. Análisis mediante Biacore de las muestras de RANKL008a sometidas a estrés a 63 mg/ml (A) y 30 mg/ml (B). Se muestra el % de actividad en relación con las muestras no sometidas a estrés (0 semanas). Lo más probable es que el aumento aparente de actividad para algunas muestras se deba a la evaporación de la muestra durante la

incubación a 37 °C.

Figura 11. Análisis mediante SDS-PAGE y tinción IR de Krypton de las diferentes muestras de RANKL008a sometidas a estrés. Carril 1: Marcador de PM (Bio-Rad n.º 161-0374), carriles 2-9: RANKL008a sometido a un ciclo de congelación/descongelación (C/D) y almacenado durante 0-8 semanas (sem) a 37 °C. Las condiciones del tampón se indican en los gráficos. R: condiciones reductoras, NR: condiciones no reductoras.

Figura 12. Visión esquemática de los estudios de congelación/descongelación que se realizaron con RANKL008a a 60 mg/ml. El nanocuerpo se formuló en cuatro tampones diferentes y se sometió a dos estrategias de congelación/descongelación diferentes, con el primer ciclo de congelación/descongelación (CD) a -20 °C o a -80 °C. Cada recuadro representa el estado en el que se realizó el análisis mediante RP-HPLC, SE-HPLC y IEX-HPLC. El análisis de Biacore y el ensayo de potencia se realizaron en las muestras finales indicadas con *.

Figura 13. Superposición de los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC de RANKL008a liofilizado, (A) directamente tras la reconstitución (0 semanas a 37 °C) y tras el almacenamiento durante (B) 2 y (C) 4 semanas a 37 °C.

Figura 14. Superposición de los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC de RANKL008a liofilizado almacenado a 37 °C. Esta figura muestra la formación dependiente del tiempo de dímeros en muestras liofilizadas de RANKL008a sometidas a estrés, formuladas en tampón acetato o tampón fosfato. No puede verse un efecto aparente de la adición de Tween80.

Figura 15. Superposición de los cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC de RANKL008a liofilizado, (A) directamente tras la reconstitución y (B) tras el almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas.

Figura 16. Actividad de unión a RANKL y HSA de RANKL008a liofilizado y reconstituido en relación con las actividades antes de la liofilización.

Figura 17. Cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC a A280 nm de RANKL008a liofilizado en 10 mM de fosfato, pH 7 + 100 mM de NaCl o 10 mM de fosfato, pH 7 + manitol al 5 %, después de la incubación durante 0 y 5 semanas a 37 °C. Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

Figura 18. El análisis mediante SE-HPLC de RANKL008a formulado en diferentes tampones y almacenado durante varias semanas a 37 °C mostró un descenso dependiente del tiempo del área de superficie del pico principal (A) que está acompañado por un incremento en el % del pico previo (dímeros, B).

Figura 19. Cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC a A280 nm de RANKL008a liofilizado en 10 mM de fosfato, pH 7 + 100 mM de NaCl o 10 mM de fosfato, pH 7 + manitol al 5 %, después de la incubación durante 0 y 5 semanas a 37 °C. Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

Figura 20. Cromatogramas obtenidos mediante IEX-HPLC a A280 nm de RANKL008a liofilizado en 10 mM de fosfato, pH 7 + 100 mM de NaCl o 10 mM de fosfato, pH 7 + manitol al 5 %, después de la incubación durante 0 y 5 semanas a 37 °C. Se muestra una ampliación sobre el pico principal como recuadro.

Figura 21. Ejemplo de una curva de fluorescencia (superior) y un primer diagrama derivado negativo (inferior) obtenido en el ensayo de desplazamiento térmico como se describe en el ejemplo 11.

Figura 22. Fotografía y observación visual de los viales después de remover. La muestra de RANKL008a, diluida (hasta 5 mg/ml) y sin diluir con o sin Tween 80 al 0,01 % (v:v) se removió con fuerza (10 s – 1 min).

Figura 23. Resumen de las diluciones y etapas realizadas en estudio de jeringabilidad tal como se describe en el ejemplo 13. Tampón de formulación = Na₂HPO₄ 10 mM, 115 mM de NaCl (pH 7,0).

Figura 24. Proporciones de 320/278 y 350/278 (*n* = 3) después del paso/almacenamiento de RANKL008a en jeringuillas con diferentes diluyentes como se describe en el ejemplo 13.

Figura 25. Funcionalidad relativa de RANKL008a con respecto a HSA y RANKL después de dilución en diferentes diluyentes y paso/almacenamiento en jeringuillas como se describe en el ejemplo 13. Biacore: *n* = 1; referencia = P#090409nr1.

Figura 26. Visión general de estudio de diluyentes que compara la dilución de etapa única (tubo de poliestireno) con la dilución en serie (vial con cierre de seguridad) como se describe en el ejemplo 14. Placebo = 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl, Tween80 al 0,01 % (v:v) (pH 7,0).

Figura 27. Resumen del estudio del tamaño de aguja/calibre con RANKL008a diluido como se describe en el ejemplo 15.

Figura 28. Resumen del estudio adicional del tamaño de aguja/calibre con RANKL008a diluido y sin diluir como se describe en el ejemplo 15.

5 **Figura 29.** Cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC de RANKL008a a 156 mg/ml, formulado en PBS o PBS + Tween80 al 0,02 % (v:v). Recuadro, ampliación sobre el pico principal.

Figura 30. Superposición de los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC de RANKL008a a 156 mg/ml después de 6 semanas a 25 °C. Recuadros, ampliación sobre el pico principal para demostrar la formación y el aumento dependientes del tiempo del pico previo y posterior.

Figura 31. Superposición de los perfiles obtenidos mediante SE-HPLC del marcador de filtración en gel y RANKL008a (156 mg/ml) después de 6 semanas a 25 °C en PBS.

15 **Figura 32.** Cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC de RANKL008a a 156 mg/ml, formulado en PBS o PBS + Tween80 al 0,02 % (v:v). Recuadro, ampliación sobre el pico principal.

Figura 33. Panel izquierdo: cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC de RANKL008a a 156 mg/ml después del almacenamiento durante 6 semanas a 25 °C. Panel derecho: ampliación sobre el pico principal y picos previo/posterior.

Figura 34. Número de partículas subvisibles en muestras sometidas y no sometidas a estrés de RANKL008a a 156 mg/ml como se mide mediante PAMAS.

25 **Figura 35.** Superposición de cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC de muestras de fosfato (Tween80 al $\pm 0,02$ % (v:v)) después del almacenamiento durante 11 meses a 5 °C ($\lambda = 280$ nm).

Figura 36. Superposición de cromatogramas obtenidos mediante RP-HPLC de muestras en diferentes tampones: comparación entre 11 meses a 5 °C y -20 °C a 63 mg/ml (lado izquierdo) y 30 mg/ml (lado derecho). PBS (A), fosfato (B) y acetato (C).

Figura 37. Curva de despliegue de calorimetría diferencial de barrido de RANKL008a. Se aplicó un modelo con varias etapas intermedias al barrido de la DSC correspondiente a RANKL008a.

35 **Figura 38.** Curva de despliegue de calorimetría diferencial de barrido de Alb8. La muestra se sometió a barrido hasta 80 °C (1) y se volvió a realizar un barrido de la misma muestra (2). Se observó una T_m de 62,8 °C.

Descripción detallada

40 A menos que se indique o se defina lo contrario, todos los términos usados tienen su significado habitual en la técnica, que estará claro para el experto. Por ejemplo, se hace referencia a los manuales convencionales, tales como Sambrook et al., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2.ª 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.,
45 "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2.ª edición, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6.ª ed.), Mosby/Elsevier, Edimburgo (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10.ª ed. Blackwell Publishing, RU (2001); y Janeway et al., "Immunobiology" (6.ª ed.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, Nueva York (2005), así como la técnica anterior general citada en el presente documento.

50 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 tejidos de la 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
55 polipéptido en las que el polipéptido se separa de componentes celulares de las células 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 un 30 %, un 20 %, un 10 % o un 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
60 libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente un 20 %, un 10 % o un 5 % del volumen de la preparación del polipéptido. Cuando el polipéptido se produce mediante síntesis química, está de manera preferente 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. En consecuencia, dichas preparaciones de un polipéptido tienen menos de aproximadamente un 30 %,
65 un 20 %, un 10 %, un 5 % (en peso seco) de precursores químicos o compuestos distintos del polipéptido de interés. En un modo específico de realización, un polipéptido "aislado" se purifica mediante un procedimiento de purificación

en 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 y concentración de tampón en modo de ultrafiltración/diafiltración.

5 Como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se usan de manera intercambiable. Como se usan en el presente documento, los términos “sujeto” y “sujetos” se refieren a un animal, preferentemente un mamífero, incluido un animal 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, como un mono *cynomolgus*, un chimpancé, un babuino y un ser humano), y más preferentemente un ser humano. En cierto modo de realización, el sujeto es un mamífero,
10 preferentemente un ser humano, con una enfermedad o trastorno asociado con una pérdida ósea excesiva y/o caracterizado por una expresión y/o actividad anómalas de RANKL, tal como por ejemplo osteoporosis, osteopatías relacionadas con cáncer, y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección vírica. En otro modo de realización, el sujeto es un mamífero, preferentemente un ser humano, con riesgo de desarrollar una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por pérdida ósea excesiva y/o expresión y/o actividad anómalas de RANKL,
15 tal como por ejemplo osteoporosis, osteopatías relacionadas con cáncer, y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección vírica.

Los términos “estabilidad” y “estable” 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 la agregación, la formación de productos de degradación y/o la formación de productos de fragmentación en unas 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 (como se miden por ejemplo mediante SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, etc.), y/o mediante el % de actividad biológica (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 -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, dando la formulación de referencia de manera regular un pico individual mediante SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC y/o manteniendo su actividad biológica en Biacore y/o ELISA.
20
25
30

La “solubilidad” se describe a menudo como la concentración máxima alcanzable de proteínas por medio de la cual todas las proteínas permanecen en disolución. A esta concentración las proteínas todavía deben ser monoméricas y estar libre de agregados. Para determinar la solubilidad de las proteínas solo 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 proteínas del sobrenadante. Pueden usarse dispositivos de concentración centrífuga tales como, por ejemplo, concentradores Vivaspin con un valor de corte del peso molecular de 5 kDa, pero requieren cantidades razonables de proteínas. También puede realizarse un seguimiento de la solubilidad usando una macromolécula inerte tal como polietilenglicol (PEG; Mr > 6000), que precipita proteínas principalmente a través de un efecto de volumen excluido, un procedimiento que puede entenderse de manera general en términos de una separación de la fase coloidal simple. Puede obtenerse una relación lineal logarítmica entre solubilidad de las proteínas y el porcentaje en peso de polietilenglicol, y a partir de esta representación gráfica la intersección proporciona el valor de la solubilidad.
35
40
45

La expresión “niveles de agregación de bajos a indetectables” como se usa en el presente documento se refiere a muestras que contienen no más de un 5 %, no más de un 4 %, no más de un 3 %, no más de un 2 %, no más de un 1 % o no más de un 0,5 % de agregación en peso de proteínas como se mide mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (SE-HPLC), recuento de partículas subvisibles, ultracentrifugación analítica (AUC), 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), dicroísmo circular (CD), técnicas de desplegamiento de proteínas inducido por urea, fluorescencia intrínseca de triptófano y/o técnicas de calorimetría diferencial de barrido. La agregación 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 a los 44 kDa aparentes observados en el análisis mediante SE-HPLC para dímeros en comparación con marcadores de peso molecular. La agregación puede evaluarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Sin quedar limitados, los ejemplos incluyen SE-HPLC, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, recuento de partículas subvisibles y/o los procedimientos mencionados anteriormente.
50
55
60

El término “niveles de fragmentación y/o degradación de bajos a indetectables” como se usa en el presente documento se refiere a muestras que contienen igual a o más de un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 %, un 98 % o un 99 % de las proteínas totales, por ejemplo, en un pico individual 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 de un 5 %, más de un 4 %, más de un 3 %, más de un 2 %, más de un 1 %, o más de un 0,5 % de las proteínas
65

totales en cada uno.

El término “de muy poca a ninguna pérdida de las actividades biológicas” 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 un antígeno de interés (preferentemente RANKL y/o HSA) como se mide mediante diversos ensayos inmunológicos, incluyendo, pero sin limitarse a, ELISA y/o mediante resonancia de plasmón de superficie (Biacore). En un modo de realización, los dominios variables individuales de las formulaciones de la invención conservan al menos un 50 %, preferentemente al menos un 55 %, un 60 %, un 65 %, un 70 %, un 75 %, un 80 %, un 85 %, un 90 %, un 95 % o un 98 % de la capacidad para unirse específicamente a un antígeno en comparación con una formulación de referencia, 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, 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” como se usa en el presente documento se refiere a una formulación que está congelada a una temperatura de $-20 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ o a una temperatura por debajo de $-64 \text{ }^\circ\text{C}$ (tal como, por ejemplo, a $-80 \text{ }^\circ\text{C}$), 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, dando la formulación de referencia regularmente un pico individual mediante SE-HPLC, RP-HPLC y/o IEX-HPLC y/o manteniendo su actividad biológica en Biacore y/o ELISA.

La expresión “farmacéuticamente aceptable” 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 ingredientes de la formulación y no producir un efecto prejudicial inaceptable en el sujeto.

Según la farmacopea europea, una disolución se considera isotónica si tiene una osmolalidad de $290 \pm 30 \text{ mOsm/kg}$. Por tanto, se realizaron mediciones de la osmolalidad en las diferentes formulaciones usadas en los estudios de estabilidad.

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 enfermedad o trastorno, por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con pérdida ósea excesiva y/o una enfermedad o trastorno asociado con una expresión y/o actividad anómala de RANKL, por ejemplo osteoporosis, osteopatías relacionadas con cáncer, y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección vírica.

Como se usan 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 el control de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por una expresión y/o actividad anómala de una diana determinada, tal como, por ejemplo, RANKL. En el contexto de la presente invención, el término “agente terapéutico” se refiere a un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales (de los que SEQ ID NO: 1 es un ejemplo preferente). En algunos otros modos de realización, el término “agente terapéutico” se refiere a un agente distinto del polipéptido de la invención que podría usarse en la formulación.

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 tales como, por ejemplo, SEQ ID NO: 1), que es suficiente para reducir la gravedad de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, una enfermedad o trastorno asociado con o caracterizado por una expresión y/o actividad anómala de una diana determinada, tal como, por ejemplo, RANKL.

El término “excipiente” como se usa en el presente documento se refiere a una sustancia inerte que se usa comúnmente como diluyente, vehículo, conservante, aglutinante o agente estabilizante para fármacos que confiere una propiedad física beneficiosa a una formulación, tal como aumento de la estabilidad de las proteínas, aumento de la solubilidad de las proteínas y 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, Tween20, Tween80, 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, sulfonatos de alquilo y caprilato). Para información adicional sobre excipientes, véase Remington’s Pharmaceutical Sciences (de Joseph P. Remington, 18.ª 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 inmunoglobulina que es parcial o completamente responsable de la unión al 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

las 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. Típicamente, en las 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 del 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, los dominios variables individuales serán secuencias de aminoácidos que consisten esencialmente en 4 regiones estructurales (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 aminoácidos que forman al menos una de las CDR). Dichos dominios variables individuales y fragmentos son lo más preferentemente 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 funcional de unión a antígeno que consista esencialmente en el dominio variable individual, de manera que el dominio de unión a antígeno individual no necesite interaccionar con otro dominio variable para formar una unidad funcional de unión a antígeno, tal como sucede, por ejemplo, en los dominios variables que están presentes, por ejemplo, en 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 funcional de unión a antígeno).

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 dAb (o una secuencia de aminoácidos que es adecuada para su uso como dAb) o un Nanobody® (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 preferentes 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, la secuencia de aminoácidos de la invención puede ser un nanocuerpo o un fragmento adecuado del mismo. 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 técnica anterior general: los documentos WO 94/04678, WO 95/04079 y WO 96/34103 de la Vrije Universiteit Brussel; los documentos WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1 134 231 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 Vlaams Instituut voor Biotechnologie (VIB); los documentos WO 03/050531 de Algonomics N.V. y Ablynx N.V.; el documento WO 01/90190 del National Research Council de Canadá; el documento WO 03/025020 (= EP 1433 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 adicionales 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. Como se describe en estas referencias, los nanocuerpos (en particular secuencias VHH y nanocuerpos parcialmente humanizados) pueden caracterizarse en particular por la presencia de uno o más “residuos distintivos” en una o más de las secuencias estructurales. Una descripción adicional de los nanocuerpos, incluidas humanización y/o camelización de nanocuerpos, así como otras

modificaciones, partes o fragmentos, derivados o “fusiones de nanocuerpos”, constructos multivalentes (incluidos algunos ejemplos no limitativos de secuencias de enlazadores) 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.

5 El número total de residuos de aminoácidos en un nanocuerpo puede ser del orden de 110-120, es preferentemente de 112-115 y es lo más preferentemente de 113. Sin embargo, debe observarse que partes, fragmentos, análogos o derivados (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 dichas partes, fragmentos, análogos o derivados cumplan los requisitos adicionales esbozados en el presente documento y también sean preferentemente adecuados para los fines descritos en el presente documento.

15 Por tanto, en el significado de la presente invención, el término “dominio variable individual” comprende polipéptidos que se derivan de una fuente no humana, preferentemente un camélido, preferentemente un anticuerpo de cadena pesada de camélido. Pueden estar humanizados, 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”, como se describió anteriormente.

20 El término “dominio variable individual” también abarca dominios variables de diferente origen, que comprenden 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 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, que forman un constructo multivalente y/o multiespecífico (para polipéptidos multivalentes y multiespecíficos 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, por ejemplo, a los documentos WO 96/34103 y WO 99/23221).

30 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 el anticuerpo de tamaño completo, las cadenas individuales del mismo, así como todas las partes, dominios o fragmentos del mismo (incluidos, 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.

40 Los dominios variables individuales proporcionados por la invención están preferentemente en forma esencialmente aislada (como se define en el presente documento), o forman parte de un polipéptido de la invención (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 enlazadas opcionalmente mediante uno o más enlazadores adecuados). Por ejemplo, y sin limitación, 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 multiespecífico de la invención, respectivamente, como se describe, por ejemplo, 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 puede estar esencialmente en forma aislada (como se define en el presente documento) y los procedimientos 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.

55 De acuerdo con 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, como se bosquejó anteriormente. Por ejemplo, dos (o más) dominios variables con la misma o diferente especificidad por el antígeno pueden enlazarse para formar, por ejemplo, un constructo bivalente, trivalente o multivalente. Combinando dominios variables de dos o más especificidades (bienespecíficos, triespecíficos etc.) pueden formarse constructos. Por ejemplo, un dominio variable de acuerdo con la invención puede comprender dos dominios variables dirigidos contra la diana A y un dominio variable contra la diana B. Dichos constructos y modificaciones de los mismos, que el experto puede prever fácilmente, están todos abarcados por el término dominio variable como se usa en el presente documento y también se denominan “*polipéptido de la invención*” o “*polipéptidos de la invención*”.

65 Las formulaciones estables de la presente invención comprenden polipéptidos de la invención a una concentración elevada (como se define adicionalmente) y que todavía presentan poca o ninguna agregación y alta estabilidad durante el transporte y/o periodos prolongados de almacenamiento. Además del polipéptido de la invención, las formulaciones de la presente invención comprenden al menos un vehículo acuoso y un tampón.

Una "concentración elevada de polipéptido", un "polipéptido a una concentración elevada" como se usa en la presente invención significa que la concentración del polipéptido de la invención es 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. En otras palabras, la concentración del polipéptido es de 0,7 mM o mayor, 0,8 mM o mayor, 0,9 mM o mayor, 1,0 mM o mayor, 1,1 mM o mayor, 1,2 mM o mayor, 1,3 mM o mayor, 1,4 mM o mayor, 1,5 mM o mayor, 1,6 mM o mayor, 1,7 mM o mayor, 1,8 mM o mayor, 1,9 mM o mayor, 2,0 mM o mayor, 2,1 mM o mayor, 2,2 mM o mayor, 2,3 mM o mayor, 2,4 mM o mayor, 2,5 mM o mayor, 2,6 mM o mayor, 2,7 mM o mayor, 2,8 mM o mayor, 2,9 mM o mayor, 3,0 mM o mayor, 3,2 mM o mayor, 3,4 mM o mayor, 3,6 mM o mayor. En un aspecto específico, la concentración del polipéptido es de aproximadamente 0,7 mM, aproximadamente 0,8 mM, aproximadamente 0,9 mM, aproximadamente 1,0 mM, aproximadamente 1,1 mM, aproximadamente 1,2 mM, aproximadamente 1,3 mM, aproximadamente 1,4 mM, aproximadamente 1,5 mM, aproximadamente 1,6 mM, aproximadamente 1,7 mM, aproximadamente 1,8 mM, aproximadamente 1,9 mM, aproximadamente 2,0 mM, aproximadamente 2,1 mM, aproximadamente 2,2 mM, aproximadamente 2,3 mM, aproximadamente 2,4 mM, aproximadamente 2,5 mM, aproximadamente 2,6 mM, aproximadamente 2,7 mM, aproximadamente 2,8 mM, aproximadamente 2,9 mM, aproximadamente 3,0 mM, aproximadamente 3,2 mM, aproximadamente 3,4 mM, aproximadamente 3,6 mM. En otro aspecto específico, la concentración del polipéptido está entre 0,7 y 3,6 mM, entre 0,8 y 3,6 mM, entre 0,9 y 3,6 mM, entre 1,0 y 3,6 mM, entre 1,2 y 3,6 mM, entre 1,3 y 3,6 mM, entre 1,4 y 3,6 mM, entre 1,5 y 3,6 mM, entre 1,5 y 2,5 mM, entre 1,5 y 2,2 mM, entre 1,5 y 2,0 mM, entre 1,5 y 1,8 mM. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende aproximadamente 1,6 mM de polipéptido de la invención.

Una "concentración elevada de polipéptido", un "polipéptido a una concentración elevada" como se usa en la presente invención también significa que la concentración del polipéptido de la invención es de 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. En otras palabras, la concentración del polipéptido es de 30 mg/ml o mayor, 40 mg/ml o mayor, 50 mg/ml o mayor, 60 mg/ml o mayor, 65 mg/ml o mayor, 70 mg/ml o mayor, 80 mg/ml o mayor, 90 mg/ml o mayor, 100 mg/ml o mayor, 110 mg/ml o mayor, 120 mg/ml o mayor, 130 mg/ml o mayor, 140 mg/ml o mayor, 150 mg/ml o mayor. En otro aspecto específico, la concentración del polipéptido está entre 30 y 150 mg/ml, entre 40 y 150 mg/ml, entre 50 y 150 mg/ml, entre 60 y 150 mg/ml, entre 65 y 150 mg/ml, entre 65 y 100 mg/ml, entre 65 y 90 mg/ml, entre 65 y 80 mg/ml, entre 65 y 70 mg/ml. En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende aproximadamente 65 mg/ml de polipéptido de la invención.

Sin embargo, resultará evidente para un experto en la técnica que la formulación de la divulgación (no reivindicada) también puede usarse a concentraciones menores de polipéptido tales como, por ejemplo, de 1 a 10 mg/ml o de 1 a 20 mg/ml, tal como 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml o 20 mg/ml. En consecuencia, la misma disolución tampón puede contener concentraciones menores del polipéptido de la invención, como, por ejemplo, de 1 a 10 mg/ml o de 1 a 20 mg/ml, tal como 1 mg/ml, 2 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml, 15 mg/ml o 20 mg/ml, y dichas concentraciones pueden, por ejemplo, ser útiles en otras formas de administración, tales como otras formas de administración parenteral (es decir, administración no subcutánea tal como, por ejemplo, intravenosa, intramuscular, intracraneal, etc.).

El vehículo usado en la formulación de la invención debe ser un vehículo líquido. Preferentemente, el vehículo es un vehículo acuoso como, por ejemplo, agua destilada, agua MilliQ o agua para inyectables (API).

La formulación se tampona con fosfato. La concentración de fosfato es de 10 mM. Se usa hidrogenofosfato de sodio (Na_2HPO_4). La pureza del fosfato debe ser de al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,5 %. Como se usa en el presente documento, el término "pureza" en el contexto de fosfato se refiere a pureza química del fosfato como se entiende en la técnica, por ejemplo, como se describe en *The Merck Index*, 13.^a ed., O'Neil *et al.* ed. (Merck & Co., 2001). En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende 10 mM de tampón fosfato, tal como 10 mM de hidrogenofosfato de sodio.

Además de fosfato, pueden usarse tampones acetato en las formulaciones de la presente invención a intervalos de concentración de 1 mM a 100 mM, de 1 mM a 75 mM, de 5 mM a 75 mM, de 5 mM a 50 mM, de 10 mM a 50 mM, de 10 mM a 25 mM, de 10 mM a 20 mM. En un aspecto específico, la concentración de acetato que se incluye en las formulaciones de la invención es de 1 mM, 2 mM, 5 mM, 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM o 100 mM. Cualquier forma de acetato puede usarse de manera adecuada para la formulación y administración parenteral. La pureza del acetato debe ser de al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,5 %. Como se usa en el presente documento, el término "pureza" en el contexto de acetato se refiere a pureza química del acetato como se entiende en la técnica, por ejemplo, como se describe en *The Merck Index*, 13.^a ed., O'Neil *et al.* ed. (Merck & Co., 2001). En un aspecto específico, una formulación de la invención comprende 10 mM de tampón acetato.

El pH de la formulación es de 7,0.

Un experto en la técnica entenderá que las formulaciones de la invención pueden ser isotónicas o ligeramente hipotónicas con la sangre humana, es decir, las formulaciones de la invención tienen esencialmente la misma presión osmótica o ligeramente menor que la sangre humana. Dichas formulaciones isotónicas o ligeramente hipotónicas tienen generalmente una presión osmótica de aproximadamente 240 mOSm/kg a aproximadamente 320 mOSm/kg, 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 aquellas sustancias inertes farmacéuticamente aceptables que pueden añadirse a la formulación para proporcionar una isotonicidad de la formulación. Modificadores de la tonicidad preferentes en la formulación de la invención son las sales.

En consecuencia, la formulación de la invención también puede comprender una sal. Sin quedarse limitado, la sal puede seleccionarse de entre el grupo que consiste en: NaCl, KCl, CaCl₂, y MgCl₂. En un aspecto específico, la sal es NaCl. En otro aspecto específico, la sal no es KCl. La concentración de sal (preferentemente NaCl) que puede incluirse en las formulaciones de la invención puede variar entre 10 mM y 200 mM, 10 mM y 150 mM, 50 mM y 150 mM, 100 mM y 150 mM o 100 mM y 120 mM. En un aspecto específico, la concentración de sal (preferentemente NaCl) que puede incluirse en las formulaciones de la invención puede ser de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 150 mM o aproximadamente 200 mM. En un modo específico de realización, la concentración de sal (preferentemente NaCl) incluida en las formulaciones de la invención puede ser de aproximadamente 115 mM. La pureza del NaCl puede ser de al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,5 %. Como se usa en el presente documento, el término “pureza” en el contexto de NaCl se refiere a pureza química del NaCl como se entiende en la técnica, por ejemplo, como se describe en The Merck Index, 13.^a ed., O’Neil *et al.* ed. (Merck & Co., 2001).

Las formulaciones de la presente invención pueden comprender además otros excipientes, tales como sacáridos (por ejemplo, sacarosa, manosa, trehalosa, etc.), polioles (por ejemplo, manitol, sorbitol, etc.) y tensioactivos (por ejemplo, Tween20 o Tween80). En un aspecto preferente, la formulación de la invención comprende un tensioactivo. En un aspecto específico, el tensioactivo es Tween20 o Tween80, que está a una concentración que varía entre aproximadamente un 0 % y aproximadamente un 0,1 % (v:v), un 0,001 % (v:v) y aproximadamente un 0,1 % (v:v), o aproximadamente un 0,01 % (v:v) y aproximadamente un 0,1 % (v:v) de la formulación. En un modo específico de realización, el tensioactivo es Tween20 o Tween80, que está a una concentración de un 0,001 % (v:v), un 0,005 % (v:v), un 0,01 % (v:v), un 0,02 % (v:v), un 0,05 % (v:v), un 0,08 % (v:v), un 0,1 % (v:v), un 0,5 % (v:v) o un 1 % (v:v) de la formulación, preferentemente un 0,01 % (v:v).

En ciertos modos de realización, una formulación de la invención puede comprender entre aproximadamente 30 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml de SEQ ID NO: 1, 10 mM de hidrogenofosfato de disodio/Na₂HPO₄, entre aproximadamente 50 mM y aproximadamente 150 mM de NaCl y tiene un pH de 7,0. En un modo adicional de realización, una formulación de la invención puede comprender aproximadamente 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1, 10 mM de hidrogenofosfato de sodio, aproximadamente 115 mM de NaCl y tiene un pH de 7,0. En otro modo específico de realización, una formulación de la invención comprende aproximadamente 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1, 10 mM de hidrogenofosfato de disodio; Na₂HPO₄, aproximadamente 115 mM de NaCl y Tween80 a aproximadamente el 0,01 %, y tiene un pH de 7,0.

Las formulaciones de la presente invención presentan 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 -20 °C±5 °C hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);
- almacenamiento a una temperatura de 2 °C-8 °C hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 11 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más);
- almacenamiento a una temperatura de 25 °C±5 °C hasta al menos 6 semanas;
- almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);
- estrés mecánico.

Preferentemente 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;

5 - empujar la formulación a través de una aguja (25 G, preferentemente 26 G, más preferentemente 27 G, incluso más preferentemente 28 G, lo más preferentemente 29 G 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

10 - agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y 2 días a 4 °C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

15 Un "ciclo de congelación/descongelación" o "ciclo de C/D" se define como la congelación de una muestra en un congelador (-20 °C±5 °C) o ultracongelador (por debajo de -64 °C [tal como, por ejemplo, a -80 °C]) hasta que la muestra 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, tales como, por ejemplo, 10 ciclos a -20 °C, 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.

25 En otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en almacenamiento a una temperatura de -20 °C±5 °C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad en almacenamiento a una temperatura de -20 °C±5 °C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, hasta 3 meses y más (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más).

30 En aún otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en almacenamiento a una temperatura de 2 °C-8 °C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad en almacenamiento a una temperatura de 2 °C-8 °C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 2 meses, hasta 3 meses, 6 meses, 9 meses, 11 meses, 1 año, 1,5 años o incluso 2 años y más.

35 En aún otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en almacenamiento a una temperatura de 25 °C±5 °C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad en almacenamiento a una temperatura de 25 °C±5 °C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, hasta 6 semanas y más.

En aún otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C. La formulación de la invención puede presentar estabilidad en almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 6 semanas, hasta 8 semanas y más.

40 Como es conocido por un experto en la técnica, las temperaturas indicadas en este texto pueden someterse a variaciones normales.

45 En aún otro aspecto, la formulación de la invención presenta estabilidad en una o más formas de estrés mecánico y/o por cizalladura. El estrés mecánico 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 quedarse limitado, 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. Preferentemente, la aguja tiene un tamaño de 25 G (tal como 26 G, 27 G, 28 G, 29 G, 30 G) o más. Más preferentemente, el tamaño de las agujas es de 27 G o más. 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 de 1 a 55 2 días o más a 2 °C-8 °C. La velocidad de agitación es, preferentemente, superior a 10 rpm, como por ejemplo 50 rpm, 100 rpm o más.

60 Preferentemente, las formulaciones de la presente invención son estables 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, al menos ocho o, lo más preferentemente, en todas las condiciones de estrés anteriores.

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

SDS-PAGE permite la visualización de los polipéptidos en una muestra dada mediante tinción directa. SDS-PAGE se usa para separar las proteínas de acuerdo con su tamaño. Pueden realizarse análisis de SDS-PAGE tanto en condiciones reductoras como no reductoras.

5 La distribución de tamaño molecular y las cantidades relativas de polipéptido de la invención e impurezas de proteínas pueden determinarse mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC). La cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como % del área, puede calcularse dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza proteica entre el área integrada total. Los procedimientos de SE-HPLC son conocidos por el experto en la técnica y también se describen en la sección de ejemplos.

10 La cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase reversa (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 % del área, puede calcularse dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza proteica entre el área integrada total. Los procedimientos de RP-HPLC son conocidos por el experto en la técnica y también se describen en la sección de ejemplos.

15 Pueden separarse polipéptidos de la invención y sus variantes de carga mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio iónico (IEX-HPLC). También pueden detectarse posibles impurezas con este procedimiento. La cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como % del área, puede calcularse dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza proteica entre el área integrada total. Los procedimientos de IEX-HPLC son conocidos por el experto en la técnica y también se describen en la sección de ejemplos.

20 Los polipéptidos presentes en las formulaciones de la invención preferentemente 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: 1 después del almacenamiento durante 8 semanas a una temperatura de 37 °C mostró la formación de piroglutamato como un pico separado a los 18-19 minutos. Preferentemente en la formulación de la invención, menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos forman piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

25 Los polipéptidos presentes en las formulaciones de la invención preferentemente 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: 1 después de su almacenamiento durante 8 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 representa una forma dimérica de SEQ ID NO: 1. Preferentemente en la formulación de la invención, menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

30 Preferentemente en la formulación de la invención, menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) y menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

35 Aparte de esto y/o además, las formulaciones de la presente invención muestran solo niveles de bajos a indetectables de agregación incluso durante el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores. Por ejemplo, en la formulación de la invención, no más de un 5 %, no más de un 4 %, no más de un 3 %, no más de un 2 %, no más de un 1 %, y lo más preferentemente no más de un 0,5 % del polipéptido forma un agregado después del almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

40 La agregación 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 el análisis mediante SE-HPLC de más de/superior a los 44 kDa. Como se describe anteriormente, 44 kDa es el peso molecular aparente observado en el análisis mediante SE-HPLC para dímeros. La agregación puede evaluarse mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica. Sin quedarse limitados, los ejemplos incluyen SE-HPLC, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz y/o recuento de partículas subvisibles.

45 En una ultracentrifuga analítica, puede realizarse el seguimiento de 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 en la 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 tiene como objetivo interpretar toda la evolución temporal 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: pág. 301-318. Humana Press Inc, Totowa, NJ, EE. UU.). La resolución de tamaño de este procedimiento se escala aproximadamente con el cuadrado de los radios de partícula, y ajustando la velocidad del rotor del experimento pueden cubrirse intervalos de tamaño de 100 Da a 10 GDa. Los experimentos de velocidad de sedimentación también pueden usarse para estudiar equilibrios químicos reversibles entre especies macromoleculares, bien siguiendo el número y la masa molar de complejos macromoleculares, reuniendo información sobre la composición de complejo a partir de análisis de múltiples señales que aprovechan las diferencias en cada señal espectroscópica de los componentes, o bien siguiendo la dependencia que tienen de la composición las tasas de sedimentación del sistema macromolecular, como se describe en la teoría de Gilbert-Jenkins.

Los experimentos de equilibrio de sedimentación se centran solo en el estado estacionario final del experimento, en el que la sedimentación está equilibrada mediante difusión frente a los gradientes de concentración, lo que da 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.

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 las constantes de la constante de equilibrio. (Véase también Scott D.J., Harding S.E. y Rowe A.J. Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods, RSC Publishing)

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 de mayor tamaño (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.

Estas fluctuaciones se derivan 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 que la fluctuación de la intensidad tiene del tiempo 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)

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*:

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

La proporción DO320/DO280 también es una medida de la turbidez o la presencia de materiales particulados en la

muestra. En un aspecto preferente, la proporción DO320/DO280 de la formulación de la invención debe ser de 0,05 o menor, preferentemente de 0,01 o menor, tal como de 0,005 o menor.

La tendencia para la formación de agregados 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 la temperatura como se mide, por ejemplo, a un ángulo de 90°. Preferentemente, la dispersión máxima permanecerá dentro del límite de detección de la absorción. La dispersión debe ser de 1000 abs o menor, preferentemente de 750 abs o menor, como de 500 abs o menor.

Aparte de esto y/o además, las formulaciones de la presente invención muestran solo niveles de bajos a indetectables de fragmentación y/o degradación incluso durante el 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: 1 después del almacenamiento durante 8 semanas a una temperatura de 37 °C mostró la formación de algunos picos posteriores menores, que representaban productos de degradación de SEQ ID NO: 1. Por ejemplo, el análisis mediante RP-HPLC de una formulación que contiene SEQ ID NO: 1 después del almacenamiento durante 8 semanas a una temperatura de 37 °C mostró la formación de algunos picos menores a los 8-9 minutos, que representaban productos de degradación. Preferentemente en la formulación de la invención, no más de un 5 %, no más de un 4 %, no más de un 3 %, no más de un 2 %, no más de un 1 %, no más de un 0,5 %, no más de un 0,1 %, no más de un 0,05 %, y lo más preferentemente no más de un 0,01 % de los polipéptidos muestra degradación y/o fragmentación después del almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores.

Preferentemente, 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 y/o 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.

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, calorimetría diferencial de barrido (DSC) y/o unión de proteínas a ácido 1-anilino-8-naftalenosulfónico (ANS) también pueden usarse para evaluar las propiedades físicas y la estabilidad de los polipéptidos.

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

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, incluido 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 por competición (AlphaScreen[®], Perkin Elmer, Massachusetts, EE. UU.; FMAT); ensayo TRAP (ensayo de diferenciación de osteoclastos; Rissanen et al. 2005, J. Bone Miner. Res. 20, suppl. 1: 5256); ensayo de genes indicadores de NF-kappaB (Mizukami et al. 2002, Mol. Cell. Biol. 22: 992-1000). Por ejemplo, SEQ ID NO: 1 interacciona con RANKL y bloquea la interacción de este ligando con RANK, impidiendo de ese modo la señalización a través de este receptor. La potencia de SEQ ID NO: 1 para bloquear la interacción de RANKL con RANK puede determinarse, por ejemplo, mediante ELISA, Biacore, AlphaScreen[®].

Por ejemplo, en un modo de realización, el análisis cinético de Biacore usa la tecnología de resonancia de plasmón de superficie (SPR) para realizar un seguimiento de las interacciones macromoleculares en tiempo real y se usa para determinar las velocidades de asociación y disociación de los polipéptidos de las formulaciones 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 Tween20 al 0,005 % sobre la superficie de un chip sensor, sobre la que se ha inmovilizado el antígeno. En el sistema Biacore 3000, los ligandos se inmovilizan en dextrano carboximetilado sobre una superficie de oro, mientras que la segunda pareja (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 procedimientos de medición de la afinidad en que mide velocidades de asociación (k_a) y velocidades de disociación (k_d). También son viables experimentos de determinación de la concentración.

Las formulaciones de la presente invención apenas presentan pérdida en las actividades biológicas del polipéptido durante el almacenamiento prolongado en la condición descrita anteriormente, como se evalúa mediante diversos ensayos inmunológicos, incluidos, por ejemplo, ensayo de inmunoabsorción enzimática (ELISA) y resonancia de plasmón de superficie para medir la capacidad del polipéptido para unirse específicamente a un antígeno. Los polipéptidos presentes en las formulaciones de la presente invención conservan después del almacenamiento durante los periodos definidos anteriormente más de un 80 %, más de un 85 %, más de un 90 %, más de un 95 %, más de un 98 %, más de un 99 %, o más de un 99,5 % de las actividades biológicas iniciales (por ejemplo, la capacidad de unirse a RANKL y/o HSA) de los polipéptidos antes del almacenamiento. En algunos modos de realización, los polipéptidos en las formulaciones de la invención conservan después del almacenamiento durante los periodos definidos anteriormente al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 % de la actividad biológica (por ejemplo, la capacidad de unirse a RANKL y/o HSA) en comparación con una formulación de referencia antes del almacenamiento.

En las formulaciones de la presente invención, al menos un 80 % (preferentemente al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 % o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conservan su actividad de unión a RANKL después del almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. Sin quedar limitado, la unión de los polipéptidos a RANKL puede determinarse, por ejemplo, mediante ELISA y/o Biacore. En otro aspecto, en las formulaciones de la presente invención al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión a HSA tras el almacenamiento en una o más de las condiciones de estrés anteriores en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. En un aspecto preferente, al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, un menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos presentes en la formulación de la invención conserva su actividad de unión a RANKL y HSA después del 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, por ejemplo, incluyen modelo de ratón (SCID)/ARH-77 (Sordillo y Pearse 2003, *Cancer* 97 (3 Suppl): 802-812), modelo de ratón SCID-hu de MM humano (Sordillo y Pearse 2003, *Cancer* 97 (3 Suppl): 802-812; Tassone *et al.* 2005, *Blood* 106: 713-716), ratones transgénicos que sobreexpresan OPG bajo el control del promotor del gen apoE y potenciador asociado (Simonet *et al.* 1997, *Cell* 89: 309-319), modelo de ratón de destrucción ósea inducida por sarcoma (Honore *et al.* 2000, *Nat. Med.* 6: 521-528), modelos animales sometidos a ovariectomía tales como, por ejemplo, monos sometidos a ovariectomía (Jerome *et al.* 1995, *Bone* 17: 403S-408S), ratones sometidos a ovariectomía (Roggia *et al.* 2001, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20: 13960-13965) o ratas y monos *cynomolgus* sometidos a ovariectomía (Simonet *et al.* 1997, *Cell* 89: 309-319; Høegh-Andersen *et al.* 2004, *Arthritis Res. Ther.* 6: R169-R180), modelos de rata (animales) para artritis (Bendele *et al.* 1999, *Toxicologic Pathology* 27: 134-142; Romas *et al.* 2002, *Am. J. Pathol.* 161: 1419-1427; Mori *et al.* 2002, *Histochemistry and Cell Biology* 117: 283-292) tal como modelos de artritis inducida por colágeno o modelos de artritis inducida por adyuvante, modelos animales de hipercalcemia inducida por PTHrP derivada de tumor (Morony *et al.* 1999, *J. Bone Miner. Res.* 14: 1478-1485; Capparelli *et al.* 2000, *Cancer Res.* 60: 783-778), modelo murino de mieloma múltiple (Vanderkerken *et al.* 2003, *Cancer Res.* 63: 287-289), modelo de enfermedad inflamatoria intestinal en ratones (Byrne *et al.* 2005, *Gut* 54: 78-86), ratones transgénicos que sobreexpresan MIF (Onodera *et al.* 2006, *J. Bone Miner. Res.* 21: 876-885), ratones transgénicos que sobreexpresan el factor de diferenciación de osteoclastos soluble (sODF) (Mizuno *et al.* 2002, 20: 337-44), ratones transgénicos que sobreexpresan CSF-1 bajo el control del promotor de CSF-1R/impulsador del primer intrón [ratones con el transgen TgN(Csf1r-Csf1)Ers (TgRC)] (Wei *et al.* 2006, *J. Leukoc. Biol.* 80: 1445-1453), ratones transgénicos que sobreexpresan el factor de unión al núcleo alfa 1 (Cbfa1) (Geoffroy *et al.* *Mol. Cell Biol.* 22: 6222-6233), ratones transgénicos que sobreexpresan el receptor señuelo 3 (DcR3) (Tang *et al.* 2007, *J. Biol. Chem.* 282: 2346-2354), así como los ensayos usados en la parte experimental a continuación y en la técnica anterior citada en el presente documento.

En consecuencia, la presente invención proporciona formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales (preferentemente que comprende tres dominios variables individuales, más preferentemente que comprende dos dominios variables individuales que se unen a RANKL y un dominio variable individual que se une a HSA, tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 1) a una concentración elevada (como se define anteriormente), en las que

- menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) del polipéptido forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal

(por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento en condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);

5 - menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) del polipéptido forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en condiciones de estrés, tales como por ejemplo, a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);

10 - al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una de sus (preferentemente a todas sus) dianas después del almacenamiento en condiciones de estrés, tales como por ejemplo a $37\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento; y/o

15 - el polipéptido es estable bajo estrés mecánico.

20 En otro aspecto, el polipéptido presente en la formulación de la invención tiene un perfil de temperatura de fusión bifásico en el que una T_m1 es de al menos 60 °C o más, preferentemente al menos 61 °C o más, más preferentemente al menos 62 °C o más y la T_m2 es de al menos 65 °C o más, preferentemente al menos 66 °C o más, más preferentemente al menos 67 °C o más, como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC). Sin quedar limitado, 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 después de unirse a los parches hidrófobos de una proteína desplegada se observa un aumento repentino del rendimiento de fluorescencia de la sonda. El desplegamiento inducido por temperatura es típicamente 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, requiriéndose solo cantidades pequeñas de proteína.

25 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 a cero la diferencia de temperatura entre una referencia y la célula de muestra 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 procedimiento de desplegamiento dependiente de temperatura es reversible, pueden determinarse otros parámetros termodinámicos tales como la entalpía de desplegamiento ($\Delta H_{\text{desplegamiento}}$).

30 En consecuencia, la presente invención también se refiere a formulaciones estables de polipéptidos que comprenden uno o más dominios variables individuales (preferentemente que comprenden tres dominios variables individuales, más preferentemente que comprende dos dominios variables individuales que se unen a RANKL y un dominio variable individual que se une a HSA, tal como por ejemplo SEQ ID NO: 1) a una concentración elevada (como se define anteriormente), en las que

35 - menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento en condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);

40 - menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) del polipéptido forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento en condiciones de estrés, tales como por ejemplo a una temperatura de $37\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);

65

- 5 - al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una de sus (preferentemente a todas sus) dianas después del almacenamiento en condiciones de estrés, tales como por ejemplo a 37 °C±5 °C hasta 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento;
- 10 - el polipéptido es estable bajo estrés mecánico; y/o
- 10 - el polipéptido tiene un perfil de temperatura de fusión bifásico en el que una Tm1 es de al menos 60 °C o más, preferentemente al menos 61 °C o más, más preferentemente al menos 62 °C o más y la Tm2 es de al menos 65 °C o más, preferentemente al menos 66 °C o más, más preferentemente al menos 67 °C o más, como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC).
- 15 En un aspecto específico, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente) y el vehículo acuoso, la formulación de la invención tiene un pH de pH 7,0, y se caracteriza adicionalmente porque menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos presentes en dicha formulación forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). Preferentemente, la formulación de la invención comprende un tampón fosfato (preferentemente hidrogenofosfato de sodio / Na₂HPO₄) a pH 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos presentes en dicha formulación forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). Preferentemente, la concentración del tampón fosfato es de aproximadamente 10 mM.
- 20
- 25
- 30 En aún otro aspecto específico, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente) y el vehículo acuoso, la formulación de la invención tiene un pH de 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). Preferentemente, la formulación de la invención comprende un tampón fosfato (preferentemente hidrogenofosfato de sodio / Na₂HPO₄) a pH 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). Preferentemente, la concentración del tampón fosfato es de aproximadamente 10 mM.
- 35
- 40
- 45
- 50 En aún otro aspecto específico, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente) y el vehículo acuoso, la formulación de la invención tiene un pH de 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos presentes en dicha formulación forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) y menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo tal como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más). Preferentemente, la formulación de la invención comprende un tampón fosfato (preferentemente hidrogenofosfato de sodio / Na₂HPO₄) a pH 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) de los polipéptidos presentes en dicha formulación forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (por ejemplo, como se evalúa mediante RP-HPLC) y menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) de los polipéptidos forma dímeros (por ejemplo, como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más).
- 55
- 60
- 65

más). Preferentemente, la concentración del tampón fosfato es de 10 mM.

En aún otro aspecto específico, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente) y el vehículo acuoso, la formulación de la invención tiene un pH de 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a RANKL durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

En un aspecto preferente, la formulación de la invención comprende un tampón fosfato a pH 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (por ejemplo, como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a RANKL durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. Preferentemente, la concentración del tampón fosfato es de aproximadamente 10 mM.

En aún otro aspecto específico, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente) y el vehículo acuoso, la formulación de la invención tiene un pH de 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a HSA durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento.

En un aspecto preferente, la formulación de la invención comprende un tampón fosfato a pH 7,0, y se caracteriza adicionalmente porque al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a HSA durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. Preferentemente, la concentración del tampón fosfato es de aproximadamente 10 mM.

En aún otro aspecto específico y el más preferente, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente) y el vehículo acuoso, la formulación de la invención tiene un pH de 7,0, y se caracteriza adicionalmente por que al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a RANKL y a HSA durante el almacenamiento a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento. Preferentemente, la concentración del tampón fosfato es de aproximadamente 10 mM.

En otro aspecto específico, además del polipéptido de la invención a una concentración elevada (como se define anteriormente), el vehículo acuoso y el tampón, la formulación de la invención comprende un tensioactivo, y se caracteriza adicionalmente por que los polipéptidos presentes en la formulación son estables bajo estrés mecánico. En un aspecto específico, la formulación de la invención comprende Tween20 o Tween80 (a una concentración que varía entre aproximadamente un 0 % y aproximadamente un 0,1 % (v:v), aproximadamente un 0,001 % (v:v) y aproximadamente un 0,1 % (v:v), o aproximadamente un 0,01 % (v:v) y aproximadamente un 0,1 % (v:v) tal como un 0,001 % (v:v), un 0,005 % (v:v), un 0,01 % (v:v), un 0,02 % (v:v), un 0,05 % (v:v), un 0,08 % (v:v), un 0,1 % (v:v), un 0,5 % (v:v) o un 1 % (v:v) de la formulación, preferentemente un 0,01 % (v:v)) y se caracteriza por que los polipéptidos presentes en la formulación son estables bajo estrés mecánico.

En un aspecto preferente, la formulación de la invención comprende Tween80 (a una concentración de un 0,001 % (v:v), un 0,005 % (v:v), un 0,01 % (v:v), un 0,02 % (v:v), un 0,05 % (v:v), un 0,08 % (v:v), un 0,1 % (v:v), un 0,5 % (v:v), o un 1 % (v:v) de la formulación, preferentemente un 0,01 % (v:v)) y se caracteriza por que los polipéptidos presentes en la formulación de la invención son estables cuando se agita la formulación durante al menos 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s hasta 1 minuto o más. En otro aspecto preferente, la formulación de la invención comprende Tween80 (a una concentración de un 0,001 % (v:v), un 0,005 % (v:v), un 0,01 % (v:v), un 0,02 % (v:v), un 0,05 % (v:v), un 0,08 % (v:v), un 0,1 % (v:v), un 0,5 % (v:v) o un 1 % (v:v) de la formulación, preferentemente un 0,01 %

(v:v) y se caracteriza por que 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 25 G o más (tal como 26 G, 27 G, 28 G, 29 G, 30 G o más, preferentemente 27 G o más) una vez, dos veces, tres veces, cuatro veces, cinco veces hasta 10 veces o más. En otro aspecto preferente, la formulación de la invención comprende Tween80 (a una concentración de un 0,001 % (v:v), un 0,005 % (v:v), un 0,01 % (v:v), un 0,02 % (v:v), un 0,05 % (v:v), un 0,08 % (v:v), un 0,1 % (v:v), un 0,5 % (v:v) o un 1 % (v:v) de la formulación, preferentemente un 0,01 % (v:v)) y se caracteriza por que 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 preferente, la formulación de la invención comprende Tween80 (a una concentración de un 0,001 % (v:v), un 0,005 % (v:v), un 0,01 % (v:v), un 0,02 % (v:v), un 0,05 % (v:v), un 0,08 % (v:v), un 0,1 % (v:v), un 0,5 % (v:v) o un 1 % (v:v) de la formulación, preferentemente un 0,01 % (v:v)) y se caracteriza por que los polipéptidos presentes en la formulación de la invención son estables cuando se agita la formulación durante 1 hora a temperatura ambiente y de 1 a 2 días o más a 2 °C-8 °C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

En consecuencia, en un aspecto específico, la formulación de la invención comprende:

- 30-150 mg/ml de SEQ ID NO: 1;
- 10 mM de hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4);
- 100-150 mM de cloruro de sodio (NaCl);
- Tween80 al 0,01 % (v:v);

y se caracteriza adicionalmente por que:

- menos de un 10 % (más preferentemente menos de un 5 %, incluso más preferentemente menos de un 3 %, lo más preferentemente menos de un 1 %) del polipéptido forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal (como se evalúa mediante RP-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);
- menos de un 25 % (más preferentemente menos de un 20 %, incluso más preferentemente menos de un 15 % o menos de un 10 %, lo más preferentemente un 5 % o menos, tal como un 3 %, un 1 % o incluso menos de un 1 %) del polipéptido forma dímeros (como se evalúa mediante SE-HPLC) durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más);
- al menos un 80 % (al menos un 85 %, al menos un 90 %, al menos un 95 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, o al menos un 99,5 %) de los polipéptidos conserva su actividad de unión (como se evalúa mediante ELISA y/o Biacore) a al menos una de sus dianas tras el almacenamiento a 37 °C±5 °C hasta 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, más preferentemente al menos 6 semanas, lo más preferentemente al menos 8 semanas o más) en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento; y/o
- el polipéptido es estable en una o más de las siguientes condiciones de estrés mecánico:
 - o remover la formulación durante de 10 s a 1 min;
 - o empujar la formulación a través de una aguja (25 G, preferentemente 26 G, más preferentemente 27 G, incluso más preferentemente 28 G, lo más preferentemente 29 G 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 2 días a 4 °C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).

Un ejemplo de una formulación preferente de la invención con estas características comprende 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1, 10 mM de hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4), 115 mM de cloruro de sodio (NaCl) y Tween80 al 0,01 % (v:v).

El experto conoce procedimientos generales para producir los dominios variables individuales y/o polipéptidos presentes en las formulaciones 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 procariotas entre los que está *E. coli* o huéspedes eucariotas, por ejemplo un huésped eucariota seleccionado de entre 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*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryosclerotium*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, preferentemente *Pichia pastoris*. La producción de nanocuerpos en huéspedes procariotas 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 y procedimientos de cultivo 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 procedimientos 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 procedimiento 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 (como se define en el presente documento) en condiciones tales que dicho huésped o célula huésped se multiplicará;
- b) mantener dicho huésped o célula huésped en condiciones 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 (pertinente). 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 seleccionar todos por el experto. De nuevo, en dichas condiciones, las secuencias de aminoácidos de la invención pueden expresarse de manera constitutiva, de manera transitoria o solo cuando se inducen de manera adecuada.

Entonces el polipéptido de la invención puede aislarse 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 aclarado. Los polipéptidos de la invención pueden purificarse del sobrenadante de cultivo mediante procedimientos convencionales. Los procedimientos convencionales incluyen, pero no se limitan a, procedimientos cromatográficos, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de afinidad. Estos procedimientos pueden realizarse solos o en combinación con otros procedimientos de purificación, por ejemplo precipitación o electroforesis en gel. El experto puede concebir combinaciones adecuadas de procedimientos 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 un modo de realización 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 por tamaño. La referencia a cualquier "etapa de purificación" incluye, pero no se limita a, estos procedimientos particulares.

Más específicamente, los polipéptidos de la invención pueden purificarse a partir de sobrenadante de cultivo usando un procedimiento en el que el sobrenadante aclarado (obtenido por centrifugación) se captura en cualquier combinación de columnas seleccionadas de entre (sin limitarse a) resina de cromatografía de afinidad tal como resina de proteína A, cromatografía de intercambio catiónico (CIEC) o 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 por tamaño (SE-HPLC) usando, por ejemplo, Superdex 75 o Superdex 200 (GE Healthcare), cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) usando, por ejemplo, octilo, butilo 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 procedimientos para preparar las formulaciones estables de la invención que comprenden los polipéptidos de la invención. Más particularmente, la presente invención proporciona procedimientos para preparar formulaciones estables de dichos polipéptidos, comprendiendo dichos procedimientos concentrar una fracción que contiene el polipéptido purificado hasta una concentración de polipéptido final de más de 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 150 mg/ml, tal como por ejemplo 65 mg/ml, usando, por ejemplo, una membrana semipermeable con un valor de corte para el peso molecular (PM) apropiado (por ejemplo, un valor de corte de 5 kD para dominios variables individuales; un valor de corte de 10 kD para polipéptidos bivalentes que comprenden dos dominios variables individuales; o un valor 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 la formulación usando la misma membrana. Como se describió de manera extensa anteriormente, el tampón de formulación de la presente invención puede comprender además:

- tampón hidrogenofosfato de sodio a una concentración de 10 mM;

- una sal tal como NaCl a una concentración en el intervalo de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 200 mM, preferentemente de 100 mM a 150 mM, tal como aproximadamente 115 mM.

El pH de la formulación es de 7,0.

El tensioactivo (por ejemplo, Tween20 o Tween80) se añadirá después de la etapa de diafiltración/ultrafiltración final a una concentración en el intervalo de aproximadamente un 0 % a aproximadamente un 0,1 % (v:v), tal como, por ejemplo, un 0,01 % (v:v).

Las formulaciones de la presente invención pueden esterilizarse mediante diversos procedimientos de esterilización, incluyendo filtración estéril, radiación, etc. En un modo específico de realización, la formulación de polipéptido se esteriliza mediante filtro con un filtro de 0,2 micrómetros preesterilizado.

Las formulaciones de la invención pueden liofilizarse (secarse por congelación) si se desea. En consecuencia, la invención también abarca formas liofilizadas de las formulaciones de la invención. Preferentemente, el contenido final en agua residual de la formulación liofilizada es extremadamente bajo, aproximadamente de un 1 % a un 4 %.

El secado por congelación actúa congelando el material y reduciendo después la presión circundante y añadiendo suficiente calor para permitir que el agua congelada en el material se sublime directamente de fase sólida a gas. En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento para el secado por congelación de la formulación de la invención. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de:

- a) congelar la formulación de la invención a una temperatura de entre -50 °C y -80 °C;

- b) disminuir la presión (hasta el intervalo de unos pocos milibares) y suministrar suficiente calor para que el agua se sublime.

La presente invención, por tanto, también se refiere a una formulación que se produce mediante el secado por congelación de la formulación de la invención.

Las formulaciones de la invención también pueden secarse por pulverización si se desea. En consecuencia, la invención también abarca formas secadas por pulverización de las formulaciones de la invención. Preferentemente, el contenido final en agua residual de la formulación secada es extremadamente bajo, aproximadamente de un 1 % a un 4 %.

El secado por pulverización es un procedimiento para producir un polvo seco a partir de un líquido o suspensión

secándolo rápidamente con un gas caliente. El secado por pulverización actúa dispersando la formulación líquida en un pulverizador de tamaño de gota controlado y pasando aire caliente como medios de secado calentado. En consecuencia, la presente invención también se refiere a un procedimiento para el secado por pulverización de la formulación de la invención. Más específicamente, la presente invención se refiere a un procedimiento que comprende las etapas de:

a) dispersar la formulación líquida en un pulverizador de tamaño de gota controlado (pueden lograrse tamaños de gota de 10 hasta 500 micrómetros, tales como, por ejemplo, en el intervalo de diámetros de 100 a 200 micrómetros) usando un atomizador o boquilla de pulverización (tal como, por ejemplo, boquillas giratorias, boquillas de remolino de presión de fluido único, dos fluidos o boquilla ultrasónica);

b) pasar al pulverizador un gas de secado caliente como un flujo con la corriente o contracorriente.

La presente invención, por tanto, también se refiere a una formulación que se produce mediante el secado por pulverización de la formulación de la invención.

Preferentemente, la formulación líquida, liofilizada o secada por pulverización de la presente invención se suministra en un recipiente sellado herméticamente. Las formulaciones líquidas pueden comprender una cantidad de entre 1 ml y 20 ml, de forma preferente 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.

Las formulaciones líquidas, liofilizadas o secadas por pulverización de la presente invención pueden prepararse como formas de dosificación unitaria preparando un vial que contiene una alícuota de la formulación líquida, liofilizada o secada por pulverización para un único 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 farmacéutica 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 un aspecto preferente, la forma de dosificación unitaria farmacéutica es adecuada para la administración subcutánea a un sujeto. En otro aspecto preferente, el sujeto es un ser humano. En un modo específico de realización, las formulaciones líquidas de la presente invención se formulan en viales de dosis únicas como un líquido estéril que contiene 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1, 10 mM de tampón fosfato a pH 7,0, 115 mM de cloruro de sodio y Tween80 al 0,01 % (v:v).

La cantidad de una formulación de la presente invención que será eficaz en la prevención, el tratamiento y/o el control 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 se emplee 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 las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba *in vitro* o en modelos animales. Para formulaciones del polipéptido, abarcadas por la invención, 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. Para la administración subcutánea de una formulación de la invención que comprende 65 mg/ml de polipéptido (tal como por ejemplo SEQ ID NO: 1) se prevé una dosificación de, por ejemplo, 1-3 mg/kg de peso corporal.

El volumen requerido (en ml) para administración 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 del polipéptido de la invención. Por ejemplo, para la administración subcutánea de una formulación de la invención que comprende 65 mg/ml de polipéptido (tal como por ejemplo SEQ ID NO: 1) se prevé que el volumen requerido sea de aproximadamente 1-3 ml para una dosis de 1-3 mg/kg.

La presente invención también abarca un producto farmacéutico acondicionado 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 un modo de realización, la forma de dosificación unitaria es adecuada para administración intravenosa, intramuscular, intranasal, oral, tópica o subcutánea. Por tanto, la invención abarca formulaciones, preferentemente estériles, adecuadas para cada vía de administración. En el caso de formas de dosificación adecuadas para administración parenteral (tal como, por ejemplo, administración subcutánea), el principio activo, por ejemplo, el polipéptido de la invención (tal como, por ejemplo, SEQ ID NO: 1), es estéril y adecuado para administración como disolución libre de material particulado. En otras palabras, la invención abarca tanto disoluciones parenterales como polvos liofilizados o secados por pulverización, siendo todos ellos estériles, y siendo el último adecuado para su reconstitución antes de la inyección.

5 Como con cualquier producto farmacéutico, el material de acondicionamiento y el recipiente están diseñados 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, incluidos, pero sin limitarse a, dosis reales, procedimientos de seguimiento y otra información de seguimiento.

10 Específicamente, la invención proporciona un artículo de fabricación que comprende material de acondicionamiento, tal como una caja, un frasco, 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 de dosificación unitaria de un agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de acondicionamiento, en el que dicho agente farmacéutico comprende la formulación que contiene el polipéptido. El material de acondicionamiento incluye medios de instrucción que indican que dicho polipéptido puede usarse para prevenir, tratar y/o controlar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno administrando dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos como se describe en el presente documento.

15 La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de acondicionamiento, tal como una caja, un frasco, 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 de dosificación unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de acondicionamiento, en el que un agente farmacéutico comprende una formulación que contiene el polipéptido de interés, y en el que dicho material de acondicionamiento incluye medios de instrucción que indican que dichos agentes pueden usarse para prevenir, tratar y/o controlar la enfermedad o el trastorno administrando dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos como se describe en el presente documento.

20 La invención también proporciona un artículo de fabricación que comprende material de acondicionamiento, tal como una caja, un frasco, 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 de dosificación unitaria de cada agente farmacéutico contenido dentro de dicho material de acondicionamiento, en el que un agente farmacéutico comprende una formulación que contiene el polipéptido, y en el que dicho material de acondicionamiento incluye medios de instrucción que indican que dichos agentes pueden usarse para prevenir, tratar y/o controlar uno o más síntomas asociados con la enfermedad o el trastorno administrando dosis específicas y usando regímenes de dosificación específicos como se describe en el presente documento.

25 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 controlar 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 controlar una enfermedad y/o un trastorno asociados con o caracterizados por la expresión y/o actividad anómalas de una diana determinada o uno o más 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 controlar una enfermedad y/o un trastorno asociados con o caracterizados por la expresión y/o actividad anómalas de RANKL o uno o más síntomas de los mismos.

30 Las enfermedades y los trastornos asociados con la expresión y/o actividad anómalas 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 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 da lugar a pérdida ósea; hipercalcemia (Anandarajah y Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232), incluyendo, pero sin limitarse a, hipercalcemia resultante 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 hepatopatías y nefropatías crónicas; osteonecrosis, es decir, muerte de células óseas, incluyendo, pero sin limitarse

5 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 otra enfermedad; 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: 97: 226-232); osteopatía relacionada con cáncer (McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33); pérdida ósea relacionada asociada con tratamiento con inhibidores de la aromataasa (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050); pérdida ósea asociada con tratamiento de privación de andrógenos (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050); pérdida ósea asociada con metástasis ósea; pérdida ósea asociada con enfermedades con afectación del sistema inmunitario, tales como leucemias en adultos y en la infancia, metástasis, autoinmunidad y diversas infecciones víricas (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 por el 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 óseas lítica en múltiples tipos de cáncer tales como cáncer de mama (Coleman 1998, Curr. Opin. Oncol. 10 (supl. 1): 7-13); cáncer de próstata; osteopatía por mieloma (Anandarajah y Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); infecciones periodontales (Anandarajah y Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); hiperfosfatasa ósea 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).

30 También se engloban dentro del alcance de la presente invención 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. Dichas enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan a, osteoporosis, enfermedades inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, 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); vasculopatías (Anandarajah y Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232) y enfermedades cardiovasculares (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050).

40 También se engloban dentro del alcance de la presente invención 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.

45 Las formulaciones, los recipientes, las dosificaciones unitarias farmacéuticas y los kits de la presente invención también pueden utilizarse de forma ventajosa en combinación con uno o más tratamientos diferentes (por ejemplo, uno o más de otros agentes profilácticos o terapéuticos), preferentemente tratamientos útiles en la prevención, el tratamiento y/o el control de la (misma u otra) enfermedad o trastorno. Cuando se usan uno o más tratamientos distintos (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 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 tratamiento (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 el control 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.

55 Una formulación de la invención puede administrarse a un mamífero, preferentemente un ser humano, simultáneamente con uno o más tratamientos distintos (por ejemplo, uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos). El término "simultáneamente" no se limita a la administración de agentes/tratamientos profilácticos o terapéuticos exactamente al mismo tiempo, sino que más bien quiere decir que la formulación de la invención y el otro agente/el otro tratamiento 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/el otro tratamiento para proporcionar un mayor beneficio que si se administrara de otra manera. Por ejemplo, la formulación de la invención y uno o más agentes profilácticos o terapéuticos distintos pueden administrarse al mismo tiempo o secuencialmente en cualquier orden en diferentes momentos; 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.

5 Cuando se usan en combinación con otros tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos y/o terapéuticos), las formulaciones de la invención y el otro tratamiento pueden actuar de manera aditiva o sinérgica. La invención contempla la administración de una formulación de la invención en combinación con otros tratamientos (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) mediante la misma vía o vías diferentes de administración, por ejemplo, oral y parenteral.

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

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

ASPECTOS PREFERENTES (NO REIVINDICADOS)

20 1. Una formulación, como una formulación farmacéutica, que comprende un vehículo acuoso, un tampón y un polipéptido que comprende uno o más dominios variables individuales, estando formulada dicha formulación para administración a un sujeto humano, en la que el polipéptido tiene una concentración de al menos 30 mg/ml.

25 2. La formulación del aspecto 1, en la que el polipéptido tiene una concentración de al menos 60 mg/ml.

3. La formulación del aspecto 2, en la que el polipéptido tiene una concentración de al menos 80 mg/ml.

4. La formulación del aspecto 3, en la que el polipéptido tiene una concentración de al menos 100 mg/ml.

30 5. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 4, en la que el polipéptido comprende tres dominios variables individuales.

35 6. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 5, en la que el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual que se dirige contra y/o se une específicamente a RANKL.

7. La formulación de cualquiera de los aspectos 1 a 6, en la que el polipéptido comprende al menos un dominio variable individual que se dirige contra y/o se une específicamente a HSA.

40 8. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 7, en la que el polipéptido comprende dos dominios variables individuales dirigidos contra y/o que se unen específicamente a RANKL y un dominio variable individual dirigido contra y/o que se une específicamente a HSA.

9. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 8, en la que el polipéptido es SEQ ID NO: 1.

45 10. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 9, en la que el polipéptido tiene un perfil de temperatura de fusión bifásico en el que una T_m1 es de al menos 60 °C o más, preferentemente al menos 61 °C o más, más preferentemente al menos 62 °C o más y T_m2 es de al menos 65 °C o más, preferentemente al menos 66 °C o más, más preferentemente al menos 67 °C o más, como se mide mediante el ensayo de desplazamiento térmico y/o calorimetría diferencial de barrido (DSC).

50 11. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 10, en la que el polipéptido es estable después de múltiples (hasta 10) ciclos de congelación/descongelación, determinándose dicha estabilidad mediante SE-HPLC, IEX-HPLC, RP-HPLC, análisis de Biacore y/o ensayo de potencia.

55 12. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 11, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $-20\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), determinándose dicha estabilidad mediante SE-HPLC y/o RP-HPLC.

60 13. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 12, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $2\text{ °C} - 8\text{ °C}$ hasta al menos 3 meses (preferentemente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 11 meses, al menos 1 año, 1,5 años o incluso 2 años o más), determinándose dicha estabilidad mediante SE-HPLC, RP-HPLC y/o ensayo de potencia.

65 14. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 13, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $25\text{ °C} \pm 5\text{ °C}$ hasta al menos 6 semanas, determinándose dicha estabilidad

mediante SE-HPLC, RP-HPLC, ensayo de potencia y/o SDSPAGE.

- 5 15. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 14, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 2 semanas, determinándose dicha estabilidad mediante SE-HPLC, RP-HPLC, ensayo de potencia y/o SDSPAGE.
- 10 16. La formulación del aspecto 15, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 4 semanas.
- 15 17. La formulación del aspecto 16, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 6 semanas.
18. La formulación del aspecto 17, en la que el polipéptido es estable durante el almacenamiento a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta al menos 8 semanas.
- 20 19. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 11 a 18, en la que menos de un 10 % de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal durante el almacenamiento, midiéndose el % de piroglutamato mediante RP-HPLC.
- 25 20. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 15 a 19, en la que menos de un 10 % de los polipéptidos forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal durante el almacenamiento a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, midiéndose el % de piroglutamato mediante RP-HPLC.
21. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 11 a 18, en la que menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros durante el almacenamiento, midiéndose el % de dímeros mediante SE-HPLC
- 30 22. La formulación del aspecto 21, en la que menos de un 15 % de los polipéptidos forma dímeros.
23. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 15 a 18 y/o 21 a 22, en la que menos de un 25 % de los polipéptidos forma dímeros durante el almacenamiento a una temperatura de $37 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$, midiéndose el % de dímeros mediante SE-HPLC.
- 35 24. La formulación del aspecto 23, en la que menos de un 15 % de los polipéptidos forma dímeros.
- 40 25. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 24, que no muestra la formación de agregados, como se mide mediante ultracentrifugación analítica y/o dispersión dinámica de la luz.
26. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 25, en la que al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL tras el almacenamiento en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 45 27. La formulación del aspecto 26, en la que al menos un 90 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL tras el almacenamiento en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 50 28. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 25, en la que al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a HSA tras el almacenamiento en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 55 29. La formulación del aspecto 28, en la que al menos un 90 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a HSA tras el almacenamiento en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 60 30. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 29, en la que al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL y HSA tras el almacenamiento en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
31. La formulación del aspecto 30, en la que al menos un 90 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL y HSA tras el almacenamiento en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 65 32. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 15 a 18 y/o 26 a 31, en la que al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL tras el almacenamiento a $37 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.

33. La formulación del aspecto 32, en la que al menos un 90 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL tras el almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 5 34. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 15 a 18 y/o 26 a 33, en la que al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a HSA tras el almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 10 35. La formulación del aspecto 34, en la que al menos un 90 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a HSA tras el almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 15 36. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 15 a 18 y/o 26 a 35, en la que al menos un 80 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL y HSA tras el almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 20 37. La formulación del aspecto 36, en la que al menos un 90 % de los polipéptidos conserva su actividad de unión a RANKL y HSA tras el almacenamiento a $37\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore.
- 25 38. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 37, en la que el dominio variable individual es estable bajo estrés mecánico.
- 30 39. La formulación del aspecto 38, en la que el estrés mecánico se selecciona entre remover durante de 10 s a 1 min, empujar a través de una aguja (25 G, preferentemente 26 G, más preferentemente 27 G, incluso más preferentemente 28 G, lo más preferentemente 29 G o más) con una jeringuilla, hacer rotar durante dos días a 10 rpm, y agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y 2 días a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o más).
40. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 39, que tiene un pH en el intervalo de 5,5-7,0.
41. La formulación del aspecto 40, en la que el tampón es un tampón fosfato o un tampón acetato.
- 35 42. La formulación del aspecto 41, en la que el tampón está a una concentración de 10 mM.
43. La formulación del aspecto 40 a 42, que tiene un pH de aproximadamente 5,5.
44. La formulación del aspecto 43, en la que el tampón es un tampón acetato a una concentración de 10 mM.
- 40 45. La formulación del aspecto 40 a 42, que tiene un pH de aproximadamente 7,0.
46. La formulación del aspecto 45, en la que el tampón es un tampón fosfato a una concentración de 10 mM.
- 45 47. La formulación de cualquiera de los aspectos 19 ó 20, que tiene un pH de 5,5 o 7,0.
48. La formulación del aspecto 47, en la que el tampón es acetato o fosfato a una concentración de 10 mM.
- 50 49. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 21 a 24, que tiene un pH de 5,5 o 7,0.
50. La formulación del aspecto 49, en la que el tampón es acetato o fosfato a una concentración de 10 mM.
51. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 26 a 37, que tiene un pH de 5,5 o 7,0.
- 55 52. La formulación del aspecto 51, en la que el tampón es acetato o fosfato a una concentración de 10 mM.
53. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 52, en la que el vehículo acuoso es agua destilada.
- 60 54. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 53, en la que el vehículo acuoso es agua de calidad MilliQ o agua para inyectables (API).
55. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 54, que es isotónica o ligeramente hipotónica.
- 65 56. La formulación del aspecto 55, que tiene una osmolalidad de $290 \pm 60\text{ mOsm/kg}$.

57. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 55 o 56, que comprende además una sal.
58. La formulación del aspecto 57, en la que la sal es NaCl.
- 5 59. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 57 o 58, en la que la sal está a una concentración de aproximadamente 100 mM.
60. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 57 o 58, en la que la sal está a una concentración de 115 mM.
- 10 61. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 60, que comprende además un tensioactivo.
62. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 38 o 39, que comprende un tensioactivo.
- 15 63. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 61 o 62, en la que el tensioactivo está a una concentración de hasta un 0,01 %.
64. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 61 a 63, en la que el tensioactivo es Tween20 o Tween80.
- 20 65. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 61 a 64, en la que el tensioactivo es Tween80 a una concentración de un 0,01 % (v:v).
66. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 65, en la que
- 25 - menos de un 10 % del polipéptido forma piroglutamato en el ácido glutámico N-terminal durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas, midiéndose el % de piroglutamato mediante RP-HPLC;
- 30 - menos de un 25 % del polipéptido forma dímeros durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas, midiéndose el % de dímeros mediante SE-HPLC;
- al menos un 80 % del polipéptido conserva su actividad de unión a al menos una de sus dianas después del almacenamiento a 37 °C±5 °C hasta 6 semanas en comparación con la actividad de unión antes del almacenamiento, midiéndose dicha actividad de unión mediante ELISA y/o Biacore; y/o
- 35 - el polipéptido es estable durante el estrés mecánico.
67. La formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 66, que comprende:
- 40 - 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1;
- 10 mM de hidrogenofosfato de disodio (Na₂H₂PO₄);
- 45 - 115 mM de cloruro de sodio (NaCl);
- Tween80 al 0,01 % (v:v).
68. Un procedimiento para la preparación de una formulación de uno cualquiera de los aspectos 1 a 67, que comprende la etapa de concentrar el polipéptido con SEQ ID NO: 1 e intercambiarlo con un tampón.
- 50 69. Una formulación que se produce liofilizando la formulación de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 67.
70. Procedimiento para la preparación de la formulación liofilizada de la reivindicación 69, que comprende la etapa de secar por congelación una disolución de uno cualquiera de los aspectos 1 a 67.
- 55 71. Una formulación que se produce secando por pulverización la formulación de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 67.
- 60 72. Procedimiento para la preparación de la formulación secada por pulverización de la reivindicación 71, que comprende la etapa de secar por pulverización una disolución de uno cualquiera de los aspectos 1 a 67.
73. Un recipiente sellado que contiene una formulación de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 67, 69 y/o 71.
- 65 74. Una forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral a un ser humano,

que comprende una formulación de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 67, 69 y/o 71 en un recipiente adecuado.

75. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 74, que es adecuada para la administración subcutánea.

76. Un kit que comprende uno o más de los recipientes sellados de acuerdo con el aspecto 73 y/o formas de dosificación unitaria farmacéutica de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 74 o 75, e instrucciones para el uso de la formulación.

77. La formulación, recipiente, dosificación unitaria farmacéutica o kit de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos anteriores para su uso en tratamiento.

78. Procedimiento para la prevención y/o tratamiento de una o más enfermedades y/o trastornos óseos, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una formulación de acuerdo con uno cualquiera de los aspectos 1 a 67, 69 o 71.

79. Procedimiento de la reivindicación 78 en la que la enfermedad y/o trastorno óseo es osteoporosis, osteopatías relacionadas con cáncer, y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección vírica.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Materiales y procedimientos usados en el estudio

1.1. Dominios variables individuales

RANKL008a (SEQ ID NO: 1; EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCLASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGRFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGLTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPNSLRSLRCLASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSLRQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGLRLSCLASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGRFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRPDTYLSRDYRKYDYWGQGLTVTVSS) se ha descrito como SEQ ID NO: 759 en el documento WO 2008/142164. RANKL008a es un nanocuerpo biespecífico 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 enlazador G/S en el siguiente formato: RANKL13H5-9GS-Alb8-9GS-RANKL13H5.

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 (GE Healthcare Life Sciences). La concentración del nanocuerpo y el cambio de tampón a PBS, 10 mM de fosfato + 100 mM de NaCl o 10 mM de fosfato + manitol al 5 % se realizaron mediante UF/DF (Sartorius Hidrosart Sartocon Slice 200, 10 kDa). Se llevó a cabo una filtración final a 0,22 µm. En la tabla 1 se facilita un resumen de los diferentes lotes.

Se usaron o bien el lote P#270308nr1 o bien las muestras no sometidas a estrés de los diferentes lotes facilitados en la tabla 1 como material de referencia a lo largo de los diferentes experimentos.

1.2. Otros reactivos críticos

En la tabla 2 se facilitan los reactivos usados en el estudio.

1.3. Equipo para las mediciones y ensayos analíticos

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 de 5 micrómetros, 4,6 × 150 mM (Agilent, n.º cat. 883995-909, n.º de serie USKD001612)
- SE-HPLC: TSKgel G2000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Japón); columna de guarda de TSKgel (SWXL n.º SWXN0676)
- IEX-HPLC: Columna Dionex ProPac WCX-10; columna de guarda ProPac WCX 10G

Se realizaron las mediciones de la cantidad de RANKL008a con un espectrofotómetro Uvikon 943 (Kontron Instruments) a 278 nm.

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

- 5 Para la medición de actividad de unión a HSA y RANKL se usó Biacore 3000 (GE Healthcare). Se determinó la potencia usando dos ensayos basados en ELISA.

Para la liofilización se usó el secador por congelación Epsilon 2-4 de Martin Christ (Osterode am Harz, Alemania).

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

Se llevó a cabo la ultracentrifugación analítica y la dispersión dinámica de la luz por Nanolytics GmbH (Potsdam, Alemania) como se describe adicionalmente.

- 15 1.4. ELISA de inhibición para la medición de la potencia de RANKL

- RANKL008a interacciona con el ligando del activador del receptor humano (soluble) del factor nuclear-kappa B (RANKL) y bloquea la interacción de este ligando con su activador del receptor humano del factor nuclear-kappa B (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 permitió evaluar la potencia relativa de los restos de unión a RANKL de un lote desconocido de RANKL008a en relación con un lote de referencia.

- 20 Para las muestras de referencia, control y problema, se prepararon diferentes diluciones de nanocuerpos. Se preincubaron estas diluciones con una cantidad constante de 5 ng/ml de RANKL soluble y una cantidad constante de 200 ng/ml de RANK-Fc. Posteriormente, se transfirió esta mezcla a una placa de microtitulación recubierta con un nanocuerpo PMP02 anti-Fc no bloqueante. Después de lavar, se detectó RANKL unido residual con un anticuerpo biotinilado anti-RANKL humano, seguido por detección con estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (HRP).

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

1.5. ELISA para la unión a HSA

- 35 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. Después de bloquear los sitios de unión en exceso en las placas con Superblock T20, se aplicó sobre la placa una serie de diluciones de las muestras de referencia, de control y problema. Se midieron los duplicados y cada duplicado se evaluó en una placa diferente. Posteriormente, se detectó el nanocuerpo unido usando un nanocuerpo antinancuerpo bivalente, directamente conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). En presencia de H₂O₂, esta peroxidasa cataliza una reacción química con el sustrato 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 formado a una longitud de onda de 450 nm en un espectrofotómetro de placa.

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

1.6. Ensayo de pureza de RANKL008a mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC)

- 50 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 A280 nm. Se expresó la cantidad relativa de impureza proteica específica como un % del área, y se calculó dividiendo el área de pico correspondiente a la proteína o impureza proteica específica entre el área integrada total.

1.7. Ensayo de pureza de RANKL008a mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase reversa (RP-HPLC)

- 60 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 eluían de la columna de RP-HPLC. Se confirmó la identidad del nanocuerpo RANKL008a comparando el tiempo de elución relativo a partir de la columna de RP-HPLC. Se calculó la cantidad relativa de una impureza proteica específica, expresada como un % del área, dividiendo el área de pico correspondiente a la impureza entre el área integrada total.

- 65

1.8. Ensayo de pureza de RANKL008a mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento 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 A280 nm. Después de 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, la variante o las impurezas específicas expresadas como un % 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.

1.9. Medición de la afinidad en Biacore

En primer lugar, se inmovilizó un chip con RANKL o HSA (acoplamiento de aminas usando el kit de acoplamiento de aminas Biacore). Después de 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 incluyó un control de calidad de los chips usando la muestra de referencia en el experimento para detectar cualquier pérdida de actividad o disminución de la respuesta (deterioro del chip). Se determinaron las pendientes usando el procedimiento 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 el RANKL008a de referencia.

1.10. Medición de la distribución de tamaño de partícula (recuento de partículas subvisibles)

Se analizaron las diferentes muestras usando un analizador de distribución de tamaño de partícula, el instrumento (SVSS)-C (sistema de jeringuilla de volumen pequeño-C) de PAMAS. Usa el principio de oscurecimiento de la luz para detectar partículas subvisibles en el intervalo de tamaño de 1 µm-200 µm.

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 2 primeras 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). Solo se presentan los datos acumulativos.

Ejemplo 2: Efecto de un ciclo de congelación/descongelación (C/D) sobre la estabilidad del nanocuerpo

Se formuló RANKL008a P#110708 en diferentes tampones (véase la visión general en la tabla 3) a o bien 63 mg/ml, una concentración que es compatible con la administración s.c. a 3 mg/kg, o 30 mg/ml. Se sometió la formulación a un ciclo de congelación (-20 °C) y descongelación (temperatura ambiente) y se analizó mediante SE-HPLC y RP-HPLC.

No hubo ningún efecto aparente de un ciclo de C/D sobre la estabilidad de RANKL008a en las diferentes condiciones de tampón: un C/D no provocó ninguna diferencia en el tiempo de retención, altura del pico, área de pico y aspecto del pico en los cromatogramas obtenidos mediante SE-HPLC y RPHPLC (datos no mostrados).

Ejemplo 3: Estudio de estabilidad a 5 °C

Se formuló RANKL008a en los mismos tampones tal como se resume en la tabla 3 y se almacenaron varias alícuotas a 5 °C para comparar la estabilidad a largo plazo de las diferentes formulaciones líquidas. Las muestras que se incubaron durante 2 semanas y 3 meses (12 semanas) se analizaron mediante SE-HPLC, RP-HPLC y ensayo de potencia. Los datos después de 3 meses de incubación se muestran en la figura 1 (SE-HPLC), figura 2 (RP-HPLC) y tabla 4 (potencia).

No hubo cambios significativos en los perfiles de potencia, SE-HPLC y RP-HPLC entre el material de referencia y todas las muestras almacenadas a 5 °C. En el análisis mediante SE-HPLC, se observó un descenso muy pequeño del área de superficie del pico principal en todos los tampones, mientras que hubo un aumento menor en las áreas de superficie del pico previo y del pico posterior 2. El área de superficie del pico previo en el perfil de la RP-HPLC estaba ligeramente aumentada en todos los tampones excepto en acetato, mientras que hubo un pequeño aumento en el pico posterior que corresponde a la variante de piroglutamato en todas las condiciones de tampón.

Ejemplo 4: Estudio de estabilidad a 37 °C

Se formuló RANKL008a en los mismos tampones como se resume en la tabla 3 y se almacenaron varias alícuotas a 37 °C para un estudio de estrés en condiciones aceleradas. Se analizaron muestras a intervalos de tiempo regulares mediante SE-HPLC, RP-HPLC, IEXHPLC, ensayos de potencia, Biacore y SDS-PAGE.

4.1. Análisis mediante SE-HPLC

Después de 2 semanas de almacenamiento, el análisis de las muestras mediante SE-HPLC mostró un hombro que apareció en el pico principal en todas las condiciones de tampón. El hombro fue más evidente en tampón PBS y a mayor concentración de proteína. Después de 3 semanas de incubación, el hombro se resolvió a partir del pico principal en un pico previo. El pico previo representaba con mayor probabilidad una forma dimérica/oligomérica de RANKL008a que se estaba formando tras el almacenamiento a temperatura elevada. La figura 3 muestra una superposición con el marcador de filtración en gel. La variante de alto peso molecular se eluyó a un PM aproximado de 44 kDa. Teniendo en cuenta la naturaleza "pegajosa" del RANKL008a nativo, esto podría corresponder a una forma dimérica de RANKL008a. Esta hipótesis se corroboró mediante los datos del AUC presentados en el ejemplo 8.

El área de superficie del pico del pico previo aumentó con el tiempo de almacenamiento (figura 4) y se acompañó de una disminución concomitante del área de superficie del pico principal. La formación de dímeros fue dependiente de la concentración y el área de superficie del pico previo fue mayor para RANKL008a a 63 mg/ml en comparación con 30 mg/ml en todos los tampones (figura 5). La cinética de formación de dímeros pareció ser similar en todas las condiciones del tampón. Sin embargo, la propensión a formar dímeros fue mayor en tampón PBS que en tampón fosfato o acetato (figuras 6 y 7). Tween80 no tiene efecto aparente en la prevención de la dimerización (figura 7).

Hubo dos picos posteriores menores que se formaron, que con mayor probabilidad representan productos de degradación de RANKL008a. El área de superficie de estos picos posteriores aumentó algo a lo largo del tiempo, manteniéndose en su valor más bajo en tampón acetato, pH 5,5. En total, solo hubo una degradación mínima de RANKL008a después de 8 semanas a 37 °C (véase también el análisis mediante SDS-PAGE en la sección 4.6).

4.2. Análisis mediante RP-HPLC

Los perfiles de RP-HPLC en el punto temporal a las 0 semanas incluyeron un pico principal y dos picos posteriores. El pico principal tenía un hombro que eluyó antes del material principal y su área de superficie permaneció sin cambios tras el almacenamiento. El pico posterior 1 correspondió a una variante que contenía piroglutamato de RANKL008a y comprendía aproximadamente un 2-3 % del área integrada total en RANKL008a no sometido a estrés. El pico posterior 2 representó la variante con un puente disulfuro ausente en el elemento estructural de unión a RANKL como se describe adicionalmente en la solicitud PCT PCT/EP2010/055916 presentada por Ablynx N.V. el 30 de abril de 2010 titulada "Method for the production of variable domains". Este pico posterior había desaparecido por completo en todas las condiciones de tampón después de 2 semanas a 37 °C (la oxidación procede más rápido a temperatura elevada).

El área de superficie del pico correspondiente al pico de piroglutamato aumentó con el tiempo de almacenamiento (figura 8) y se acompañó de una disminución concomitante del área de superficie del pico principal. El área total permaneció sin cambios.

Después de 2 semanas de almacenamiento, se formó un pico previo del pico principal en todas las condiciones de tampón. En este momento, la identidad de esta variante es desconocida. El área de superficie aumentó con un tiempo de incubación prolongado, fue máximo en PBS y tampón fosfato, y pareció ser independiente de la concentración.

También hubo un aumento dependiente del tiempo de algunos picos menores a Rt 8-9 min, que representaban los fragmentos de degradación. El área de superficie de estos picos fue mínimo en tampón acetato, pH 5,5 (consúltense. datos de SE-HPLC en 4.1).

En general, las cantidades relativas del pico previo y el pico de piroglutamato fueron mínimas en tampón acetato, pH 5,5.

4.3. Análisis mediante IEX-HPLC

El perfil de IEX-HPLC de RANKL008a en los diferentes tampones a las 0 semanas consistió en un único pico que contenía un hombro (elución tras el pico principal). En algunas ejecuciones de IEX-HPLC, el hombro no se resolvió bien y entonces fue visible como asimetría del pico principal. El área de superficie del hombro no pareció variar tras el almacenamiento a 37 °C (datos no mostrados).

Después de 2 semanas de almacenamiento, apareció un gran pico posterior en todas las condiciones de tampón. El área de superficie del pico posterior fue máxima en tampón PBS y aumentó con el tiempo de almacenamiento y concentración de proteína. El pico posterior en IEX-HPLC puede representar RANKL008a dimérico que tiende a estar cargado de manera diferente que la proteína monomérica.

Después de 8 semanas de almacenamiento, apareció un pequeño pico posterior en los diferentes tampones. El área

de superficie fue menor en tampón acetato y algo mayor a mayor concentración de proteína. La identidad de este pico aún se desconoce (figura 9).

4.4. Ensayos de potencia

Se determinó la potencia de las diferentes muestras en el ensayo de unión a HSA y el ensayo de inhibición de RANKL como se describe en el ejemplo 1. Las potencias relativas en comparación con el lote de referencia (P#270308) obtenidas para las diferentes muestras se muestran en la tabla 5.

En todas las muestras, se observó un descenso gradual en actividad de unión a HSA en función del tiempo de almacenamiento. La pérdida de actividad fue más pronunciada a mayor concentración de proteína. Después de 8 semanas de almacenamiento, pareció haber una pequeña pérdida de actividad de unión a RANKL en las muestras formuladas a 63 mg/ml.

4.5. Ensayo de Biacore

Para confirmar los resultados obtenidos mediante el ensayo de potencia, la funcionalidad de las muestras de estabilidad de RANKL008a se determinó usando un ensayo de IBR/funcionalidad en HSA y RANKL (Biacore). El % de actividad se calculó en relación con las muestras no sometidas a estrés (0 semanas). Todos los análisis se realizaron por triplicado y los resultados se muestran en la figura 10.

El experimento de Biacore confirmó los resultados del ensayo de potencia con respecto a la pérdida de actividad de unión a HSA. La caída en la actividad pareció ser mayor en tampón PBS y en las muestras a la mayor concentración (63 mg/ml). Por otra parte, la potencia de RANKL permaneció sin cambios según los datos de Biacore.

4.6. Análisis mediante SDS-PAGE

Se cargaron 5 µg de las diferentes muestras sometidas a estrés a 63 mg/ml y de las muestras sometidas a un ciclo de congelación-descongelación en SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras. Se tiñeron los geles con la tinción de proteína IR de Krypton durante 1 hora y se sometieron a barrido con el sistema de captura de imágenes en infrarrojo Odyssey (Li-Cor Inc.).

Los resultados se resumen en la figura 11. En general, la cantidad de productos de degradación aumentó con el tiempo de incubación y fue mínimo en tampón acetato < fosfato < PBS. Son visibles dímeros potenciales en los geles a partir de las muestras en PBS.

Ejemplo 5: Estudio de estabilidad a -20 °C

Se almacenaron muestras formuladas en los diferentes tampones (tabla 3) durante 3 meses a -20 °C y se analizaron mediante SE-HPLC y RP-HPLC. Los perfiles de HPLC fueron idénticos entre el lote de referencia y el material almacenado durante 3 meses. No estaban formándose nuevos picos (datos no mostrados).

Ejemplo 6: Estudio de estabilidad de congelación-descongelación (C/D)

Se realizó un estudio de estabilidad a la congelación-descongelación para determinar el efecto de la congelación y descongelación repetitivas sobre la recuperación, la estabilidad física y la estabilidad química de RANKL008a. Se realizaron dos estudios diferentes usando el lote P#040908nr1, que se formuló a 60 mg/ml en cuatro tampones diferentes (figura 12). En el primer estudio, se sometieron las diferentes muestras a 5 ciclos de C/D a -20 °C, seguido por otros 5 ciclos de C/D (10 ciclos de C/D en total). En el segundo estudio, se sometió el material a 2 ciclos a -80 °C seguido por 1 ciclo a -20 °C y, después, 5 ciclos a -20 °C (6 ciclos de C/D a -20 °C en total).

Se define un ciclo de congelación-descongelación (C/D) por la congelación de la muestra durante 1 hora en un congelador (-20 °C) o ultracongelador (-80 °C) seguido por la 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, RP-HPLC, IEX-HPLC, Biacore y el ensayo de potencia (tabla 6).

Someter RANKL008a a hasta 10 ciclos de C/D no tuvo un efecto visible sobre su estabilidad y potencia. No hubo diferencias evidentes en estabilidad y potencia entre los diferentes tampones.

Los perfiles de SE-HPLC, RP-HPLC e IEX-HPLC fueron idénticos 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 (datos no mostrados).

El análisis mediante Biacore y el ensayo de potencia no indicaron pérdida de actividad después de la congelación y descongelación repetitivas.

Ejemplo 7: Liofilización de las diferentes formulaciones de nanocuerpos

Se realizaron experimentos de liofilización con RANKL008a a ~60 mg/ml en 6 formulaciones diferentes (tabla 7). Se secaron por congelación 300 μ l de cada muestra usando el programa como se muestra en la tabla 8. Se obtuvieron tortas de liofilización sólidas y uniformes en todas las condiciones de tampón. Se reconstituyó RANKL008a liofilizado en 300 μ l de agua MilliQ y se analizó mediante A278 SE-HPLC (figuras 13 y 14), RP-HPLC (figura 15), Biacore (figura 16) y ensayo de potencia (tabla 9). También se puso una alícuota de 100 μ l en almacenamiento a 37 °C para los ensayos de estabilidad del producto liofilizado y se analizó mediante SE-HPLC y RP-HPLC en los puntos temporales a las 2 y 4 semanas.

Después de 2 semanas de almacenamiento a 37 °C, el análisis mediante SE-HPLC mostró un pico previo que con mayor probabilidad representaba RANKL008a dimérico. Este pico fue más evidente en tampón acetato (figura 13) y aumentó a lo largo del tiempo en todas las condiciones de tampón (figura 14). Un pico previo adicional estaba presente con un tiempo de retención de 34,4 minutos, que puede corresponder a agregados de mayor peso molecular de RANKL008a. Estos agregados aún no se han observado en muestras de RANKL008a sometidas a estrés que no se liofilizaron. Parece no haber un efecto evidente de Tween80 en la prevención de la formación de agregados (figura 14).

Hubo dos picos posteriores menores que se formaron, que con mayor probabilidad representan productos de degradación de RANKL008a. El área de superficie de estos picos posteriores aumentó algo a lo largo del tiempo, manteniéndose en su menor valor en tampón acetato, pH 5,5. En total, solo hubo una degradación mínima de RANKL008a después de 4 semanas a 37 °C.

En el análisis mediante RP-HPLC el área de superficie del pico de piroglutamato aumentó con el tiempo de almacenamiento y fue mayor en tampón fosfato que en tampón acetato (figura 15). Después de 2 semanas de almacenamiento a 37 °C, se formó un pequeño pico previo del pico principal en todas las condiciones de tampón (datos no mostrados). En este momento se desconoce la identidad de esta variante. A las 4 semanas de almacenamiento a 37 °C, hubo un ligero aumento de algunos picos menores a Rt 8-9 min, que representa fragmentos de degradación.

Las diferentes muestras de RANKL008a liofilizado se disolvieron de manera muy eficaz en el tampón de reconstitución (MQ).

No se observaron diferencias significativas en concentración de proteína tras la reconstitución. Esto también se confirmó mediante las recuperaciones en RP-HPLC y SE-HPLC. No hubo o solo hubo modificaciones o cambios muy pequeños en la potencia (figura 16, tabla 9), incluso en ausencia de Tween80.

No hubo partículas visibles ni precipitación en los productos reconstituidos. El almacenamiento a temperatura elevada indujo la formación de dímeros, que también se observaron para RANKL008a no liofilizado, así como muy pequeñas cantidades de agregados de mayor peso molecular.

Ejemplo 8: Mediciones de agregados usando procedimientos hidrodinámicos y termodinámicos

Se verificó la presencia de agregados potenciales en muestras no sometidas a estrés y sometidas a estrés (37 C) a >60 mg/ml y en ausencia de Tween80 mediante ultracentrifugación analítica (AUC) y dispersión dinámica de la luz (DLS). Más específicamente, el objetivo del estudio era detectar la presencia de cualquier autoasociación reversible y/o agregados irreversibles.

Se llevó a cabo el estudio por Nanolytics GmbH (Potsdam, Alemania). Se examinó el comportamiento de agregación de muestras de RANKL008a mediante mediciones de la velocidad de sedimentación. Se realizaron experimentos iniciales con las muestras sin diluir (63 mg/ml). Debido a la no idealidad observada en esta concentración se diluyeron muestras hasta 1 mg/ml en cada tampón de formulación que se comparó (PBS, frente a fosfato frente a tampón acetato) y se volvió a examinar. A estas concentraciones la influencia de la no idealidad era lo suficientemente pequeña como para ignorarla. Se realizaron experimentos a 20 °C en una ultracentrífuga analítica XL-I de Beckman Coulter usando las ópticas de interferencia (muestras a concentración elevada; medición a 675 nm) o las ópticas de absorción (A278 nm) para las muestras de menor concentración. Se llevaron 400 μ l muestras a piezas centrales de (12 o 1,5) mM de longitudes de camino óptico y se centrifugaron a 50 krpm. Para el cálculo de la distribución del coeficiente de sedimentación se trató la proporción de la fricción como parámetro de ajuste. Se realizó la cuantificación de los agregados en las muestras diluidas. Experimentos de equilibrio de sedimentación adicionales revelaron que el dímero es irreversible.

Se realizó la dispersión dinámica de la luz con un láser de luz roja (641 nm) a ángulos de dispersión de 30° y 90° o con un láser de luz azul (402 nm) a un ángulo de dispersión de 20°. Se supuso que el volumen específico parcial de la proteína era de 0,72 ml/g.

Las conclusiones principales del estudio fueron que una preparación purificada de RANKL008a no sometida a estrés

es pura y monomérica, y que la disolución es monodispersa:

- Experimentos de velocidad de sedimentación mostraron que no estaban presentes cantidades significativas de agregados o productos de degradación en la muestra. Estos resultados concordaron con datos de SE-HPLC descritos en el ejemplo 4;

- No se encontraron pruebas de autoasociación reversible ni indicios de la presencia de agregados irreversibles en experimentos de equilibrio de sedimentación;

- La dispersión dinámica de la luz demostró que la muestra mostró una distribución monomodal del tamaño de partícula. No se detectó ninguna señal en el radio de partícula >10 nm, confirmando la ausencia de agregados irreversibles.

Se realizó un estudio de seguimiento con muestras sometidas a estrés por temperatura (0, 2, 4 y 8 semanas a 37 °C) a 60 mg/ml en PBS, 10 mM de acetato, pH 5,5 + 50 mM de NaCl y 10 mM de fosfato, pH 7 + 50 mM de NaCl.

En primer lugar, los resultados a partir de los experimentos de la velocidad de sedimentación mostraron que todas las muestras eran cualitativamente similares. En el primer punto temporal, se observó un único componente, que sedimenta a aproximadamente 2,3 S. Para las muestras tomadas a las 2, 4 y 8 semanas, fue detectable una pequeña señal a aproximadamente 4,3 S. Basándose en consideraciones hidrodinámicas, el segundo componente a aproximadamente 4,5 S puede corresponder a un dímero del componente a 2,9 S. Los resultados detallados obtenidos con ópticas de interferencia y las muestras diluidas se presentan en la tabla 10. Las diferencias en la concentración relativa del dímero de RANKL008a en los diferentes tampones se correlacionan bien con los datos de SE-HPLC descritos en el ejemplo 4.

En segundo lugar, la dispersión dinámica de la luz detectó un único pico dominante entre 3-5 nm para todas las muestras. Esta señal comprenderá tanto el monómero de RANKL008a como el dímero putativo, debido a la resolución limitada del procedimiento. Para muestras en tampón acetato y PBS, no se observaron otras señales a partir de proteína. En el caso de tampón fosfato, pueden observarse otros dos componentes a aproximadamente 40 nm y aproximadamente 300 nm en las muestras sometidas a estrés durante 2 y 4 semanas y se evaluaron como relevantes. Debido a su pequeña concentración en peso, estos componentes no serán detectables por velocidad de sedimentación. Para todas las muestras examinadas, se observó un segundo pico a diversos diámetros de partícula entre 50-200 nm para el punto temporal a las 8 semanas. Esto indicó una progresión de la agregación a partículas mayores.

Ejemplo 9: Medición de la osmolalidad de las diferentes formulaciones

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

- P#040908nr1 en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0/ 50 mM a 61 mg/ml de NaCl: 121 mOsm/kg

- P#040908nr1 en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0/ 50 mM a 89 mg/ml de NaCl: 123 mOsm/kg

- P#040908nr1 en 10 mM de tampón acetato pH 5,5/ 50 mM a 59 mg/ml de NaCl: 116 mOsm/kg

- P#040908nr1 en 10 mM de tampón acetato pH 5,5/ 50 mM a 91 mg/ml de NaCl: 123 mOsm/kg

Debido a que las formulaciones analizadas eran hipotónicas, se añadieron cantidades adicionales del agente de tonicidad NaCl para determinar a qué concentración se obtiene una disolución isotónica:

- P#040908nr1 en 10 mM de tampón fosfato pH 7,0/ 129 mM a 61 mg/ml de NaCl: 351 mOsm/kg

- P#040908nr1 en 10 mM de tampón acetato pH 5,5/ 100 mM a 59 mg/ml de NaCl: 272 mOsm/kg

Estos resultados indican que el tampón de formulación final debe contener NaCl al menos 100 mM como agente de tonicidad.

Finalmente se determinó la osmolalidad de un tampón fosfato con Tween80:

- NBJ0539-08-08 SB2 en 10 mM de fosfato pH 7,0/Tween80 al 0,01 % (v:v) / 100 mM de NaCl a 65,2 mg/ml: 227 mOsm/kg

- NBJ0539-08-08 SB2 en 10 mM de fosfato pH 7,0/Tween80 al 0,01 % (v:v) / 114,4 mM de NaCl a 65,2 mg/ml: 244 mOsm/kg

Ejemplo 10: Liofilización de la formulación de nanocuerpos

Se realizó la liofilización de RANKL008a P#151008nr1 (84,3 mg/ml) formulado en 10 mM de fosfato / 100 mM de NaCl y P#151008nr2 (70 mg/ml) en 10 mM de fosfato / manitol al 5 %. El manitol es un agente de carga ampliamente usado para la liofilización. Después de la reconstitución de RANKL008a liofilizado en agua estéril, los perfiles de RP-HPLC y SE-HPLC se compararon antes y después de la liofilización. Además, se verificó la estabilidad de RANKL008a liofilizado, reconstituido en un estudio de estrés acelerado a 37 °C. Se analizaron muestras de almacenamiento mediante SE-HPLC y RP-HPLC después de 1, 3 y 5 semanas de almacenamiento. También se analizaron las muestras de 5 semanas usando IEX-HPLC y Biacore.

Se secaron por congelación 300 µl de cada muestra usando el programa de la tabla 8. La liofilización dio como resultado tortas de liofilización uniformes (sólidas) para ambas muestras. La muestra en fosfato/NaCl 100 mM se disolvió fácilmente en tampón de reconstitución (300 µl de H₂O MilliQ). La muestra en fosfato/manitol al 5 % sólo se disolvió tras 3-4 horas a 4 °C. No hubo diferencias evidentes en los perfiles de SE-HPLC y RP-HPLC antes y después de la liofilización en 10 mM de fosfato + 100 mM de NaCl o bien 10 mM de fosfato + manitol al 5 % (datos no mostrados). No se observaron diferencias significativas en la concentración de proteína después de la reconstitución de RANKL008a liofilizado. Esto también se confirmó mediante las recuperaciones idénticas en RP-HPLC y SE-HPLC. No hubo partículas visibles, precipitación ni ninguna modificación detectable en los productos reconstituidos.

También se puso una alícuota en almacenamiento a 37 °C para ensayos de estabilidad del producto liofilizado. Se muestran datos de SE-HPLC y RPHPLC del punto temporal a las 5 semanas en las figuras 17-18 y la figura 19, respectivamente. Después de 1 semana de almacenamiento, se estaba formando un pico previo en SE-HPLC que representaba la forma dimerica de RANKL008a (figura 17). Este pico aumentó a lo largo del tiempo y fue más evidente en la formulación sin manitol al 5 % (figura 18).

En la RP-HPLC, el área de superficie del pico correspondiente al pico de piroglutamato aumentó con el tiempo de almacenamiento. Además, se estaba formando un pequeño pico previo enfrente del pico principal en ambos tampones. En este momento se desconoce la identidad de esta variante (figura 19). Durante el almacenamiento, también hubo un aumento de algunos picos menores a Rt 8-9 min, que con mayor probabilidad corresponden a fragmentos de degradación de RANKL008a.

En IEX-HPLC, además del pico principal observado de las muestras de control, estaban presentes dos picos nuevos en las muestras de estabilidad (figura 20). El área de superficie de ambos picos posteriores fue menor en las muestras que contienen manitol.

Se comparó la unión de RANKL008a a RANKL y HSA en las muestras de estabilidad almacenadas durante 5 semanas con la actividad del lote de referencia no sometido a estrés usando el análisis de Biacore. En la tabla 11 se facilitan las potencias relativas y se expresan como el % de actividad en comparación con el lote de referencia P#040908nr1. Como se observa para todas las demás muestras de estabilidad de RANKL008a, la actividad de unión a HSA había disminuido significativamente tras un almacenamiento prolongado a 37 °C. También, fue beneficiosa la adición de manitol para mantener una mayor actividad de unión a HSA en condiciones de estrés.

RANKL008a liofilizado en 10 mM de fosfato, pH 7 + 100 mM de NaCl se disolvió más fácilmente en el tampón de reconstitución (MilliQ) que RANKL008a en 10 mM de fosfato, pH 7 + manitol al 5 %. No hubo partículas visibles ni precipitación en los productos reconstituidos.

El almacenamiento a temperatura elevada indujo la formación de dímeros, que también se observaron para RANKL008a no liofilizado. No pueden detectarse agregados de mayor peso molecular en las muestras de almacenamiento. El grado de formación de dímeros se redujo significativamente en presencia de manitol.

Ejemplo 11: Determinación del punto de fusión de los nanocuerpos en los diferentes tampones

Se llevó a cabo la determinación del punto de fusión de RANKL008a (P#110708nr1) mediante el ensayo de desplazamiento térmico para i) determinar el pH al que se observan los mayores valores de T_m (pH de 4,0 a 5,5: 10 mM de tampón acetato y pH de 6,0 a 7,5: 10 mM de tampón fosfato) para las dos concentraciones de proteína, 0,1 y 0,2 mg/ml, y ii) evaluar la influencia de añadir NaCl a la mezcla de la formulación/ensayo. Las mezclas de ensayo finales contienen Sypro Orange 10x (tinción fluorescente). Un ejemplo típico de una curva de fluorescencia de TSA se da en la figura 21 y los resultados globales del ensayo se proporcionan en la tabla 12.

En general, las temperaturas de fusión de RANKL008a se situaron aproximadamente a 64 °C para la subunidad Alb8 y 71 °C para el resto R13h5. En ausencia de NaCl el pH más adecuado fue de 6,5 a 7,0, mientras que este disminuyó en una unidad de pH en presencia de sal. Para distinguir entre los dos tampones aplicados, el tampón fosfato con NaCl a 150 mM sería el más adecuado para la formulación a valores de pH de entre 6,0 y 7,0, mientras que debe preferirse un tampón acetato pH 5,5 con una cantidad igual de NaCl.

Ejemplo 12: Estabilidad de los nanocuerpos durante estrés mecánico

Se realizaron experimentos de estrés mecánico en el lote de RANKL008a NBJ0539-08-08 SB2 (62,2 mg/ml). Se diluyó la muestra de RANKL008a o estaba sin diluir con y sin Tween80 al 0,01 % (v:v). 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, 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 girar (10 rpm) 2 días a temperatura ambiente (no diluidas);

- se agitaron 1 hora a temperatura ambiente y durante 2 días a 5 °C (diluidas hasta 5 mg/ml).

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

Una agitación fuerte durante un tiempo corto (10 s) causó una fuerte espumación de las muestras sin Tween80. Incluso la muestra diluida se volvió muy opaca (figura 22). La muestra n.º 1 se volvió muy opaca incluso tras agitar el vial durante sólo 10 s.

Se empujó la muestra sin diluir de RANKL008a con y sin Tween80 (v:v) al 0,01 % 10 veces a través de una aguja (25 G) con una jeringuilla de 3 ml. Las observaciones visuales se describen en la tabla 13. La muestra sin Tween80 se volvió más opaca, también hubo formación de espuma y eran visibles diminutas burbujas de aire cuando se daban pequeños golpes al vial.

Se hizo rotar la muestra sin diluir de RANKL008a con o sin Tween80 al 0,01 % (1 ml en un tubo Eppendorf de 1,5 ml) durante 2 días a 10 rpm. Ambas muestras permanecieron transparentes.

Se agitó la muestra diluida (hasta 5 mg/ml) de RANKL008a con o sin Tween80 al 0,01 % (v:v) durante 1 hora a temperatura ambiente y adicionalmente durante 2 días a 5 °C. Las observaciones visuales se describen en la tabla 14. Tras agitar 1 hora a temperatura ambiente, la muestra sin Tween80 era ligeramente opaca, mientras que la muestra con Tween80 permaneció transparente. Después de 2 días de agitación a 5 °C, ambas muestras eran opacas pero la opacidad en la muestra sin Tween80 fue superior (tabla 14).

Con la adición de Tween80 al 0,01 % (v:v), la muestra de RANKL008a fue menos opaca o no era opaca tras el estrés mecánico y había menos formación de espuma. Esto indica que la muestra es menos susceptible a la desnaturalización si se añade Tween80.

Ejemplo 13: Inyectabilidad de las diferentes formulaciones de nanocuerpos

Se determinó el efecto del uso de diferentes diluyentes, es decir, solución salina, tampón fosfato sin Tween80 o tampón fosfato con Tween80 sobre el contenido, aspecto visual y funcionalidad de RANKL008a (NBJ0607-02) a baja concentración (0,28 mg/ml) tras su paso a través de jeringuillas. Se diluyó RANKL008a en diferentes diluyentes seguido por su paso o almacenamiento durante 24 h en jeringuillas (figura 23). La figura 23 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

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

-TW: tampón menos Tween 80

+TW: tampón + Tween 80

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

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

En la tabla 15 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 24 se facilitan datos sobre la medición de la turbidez. La funcionalidad relativa de RANKL008a con respecto a HSA y RANKL después de dilución en diferentes diluyentes y paso/almacenamiento en jeringuillas se muestra en la figura 25.

El paso a través de una jeringuilla aumentó ligeramente la turbidez cuando se usa 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de

NaCl (pH 7,0). La dilución en solución salina provocó una disminución de la actividad de unión a RANKL/HSA de un 18-34,0 %. Se observó un efecto similar usando 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl (pH 7,0) sin Tween80, es decir una disminución de un 15-27 %. En contraposición, la dilución en 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl (pH 7,0) con Tween80 no pareció tener un efecto drástico que confirmase el papel beneficioso de Tween80 en el tampón.

Ejemplo 14: Estabilidad de la formulación de nanocuerpos tras diluciones únicas o graduales

Se diluyó RANKL008a (NBj0607-02) en diferentes diluyentes en una etapa única o por medio de una dilución en serie (figura 26) con el fin de determinar si el último procedimiento reducía la turbidez de la muestra.

La inspección visual de RANKL008A tras la dilución única y gradual en diferentes diluyentes se muestra en la tabla 16. Se observó turbidez de la muestra y mayor formación de agregados cuando se usa NaCl al 0,9 % como diluyente.

La dilución tanto de etapa única como gradual de RANKL008a hasta 0,28 mg/ml usando NaCl al 0,9 % dio como resultado turbidez de la muestra y precipitación. A 16 mg/ml se observaron los primeros agregados. En contraposición, la dilución de etapa única o gradual en 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl, Tween80 al 0,01 % (v:v), (pH 7,0) no dio como resultado la formación de precipitados.

Ejemplo 15: Estabilidad de formulaciones de nanocuerpos durante el paso por jeringuillas con diferente tamaño de aguja

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 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl, Tween80 al 0,01 % (v:v), (pH 7,0) hasta una concentración final de 0,28 mg/ml seguido por un paso individual a través de una jeringuilla de BD de 1 ml equipada con diferente agujas (es decir Terumo 18 G, 23 G, 27 G y 30 G) (figura 27). En esta figura y la tabla 17 se aplican los siguientes códigos:

+TW: tampón + Tween 80

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

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

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

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

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

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 proporción del valor obtenido con respecto a la absorción a A278 nm (principalmente 320/278 y 350/278). Una proporción de >0,05 se consideró significativa. En la tabla 17 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 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 27 G y 29 G) tanto no diluido (65 mg/ml) como diluido en 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl, Tween80 al 0,01 % (v:v), (pH 7,0) hasta una concentración final de 0,28 mg/ml (figura 28). Con el fin de reducir el uso de proteína, no se incluyeron agujas de 29 G y 30 G para los ensayos de DP. En la tabla 18 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 18 y la figura 28 se usan los siguientes códigos:

+TW: tampón + Tween 80

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

TUB: muestra almacenada en un tubo de poliestireno

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

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

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

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

Ejemplo 16: Solubilidad de RANKL008a a concentraciones aumentadas

10 Se realizó un estudio con lote de RANKL008a B2#170608nr1 a una concentración de 156 mg/ml y formulado en los siguientes tampones:

PBS

15 PBS + Tween80 al 0,02 % (v:v)

PBS + Tween80 al 0,05 % (v:v)

20 PBS + Tween80 al 0,1 % (v:v)

Se almacenaron las muestras a 25 °C y se realizaron análisis a intervalos de tiempo regulares. Se da una visión general en la tabla 19. También se sometieron las diferentes muestras a un ciclo de congelación/descongelación (-20 °C).

25 16.1. Análisis mediante SE-HPLC

Se muestran perfiles de SE-HPLC de las diferentes muestras en las figuras 29, 30 y 31. El almacenamiento prolongado a 25 °C dio como resultado la formación de un pico previo y un pico posterior (figura 30). El área de pico del pico previo aumentó significativamente a lo largo del tiempo. El pico previo representaba lo más probablemente una forma dimérica de RANKL008a.

35 La figura 31 muestra una superposición de los perfiles de SE-HPLC del marcador de filtración en gel y la muestra almacenada durante 6 semanas a 25 °C en PBS. El PM teórico de RANKL008a es de 40,994 Da, aunque el PM calculado basado en el tiempo de elución es de solo 26 kDa. Lo más probable es que esto se deba a la interacción de RANKL008a con la matriz de la columna ("pegajosidad" de la molécula de RANKL008a). El pico previo observado en las muestras sometidas a estrés tenía aproximadamente el mismo tiempo de elución que el componente de 44 kDa del marcador de filtración en gel y, por tanto, puede corresponder a una forma dimérica de RANKL008a.

40 El pico posterior correspondía probablemente a productos de degradación (debido a la actividad proteolítica restante en la muestra). El área relativa (%) de este pico en las muestras de 3 y 6 semanas fue idéntica, lo que implica que la degradación no progresaba a lo largo del tiempo.

45 Un ciclo de congelación/descongelación no tuvo efecto sobre el perfil de SE-HPLC de RANKL008a (datos no mostrados).

16.2. Análisis mediante RP-HPLC

Se muestran perfiles de RP-HPLC de las diferentes muestras en las figuras 32 y 33.

50 Los perfiles de RP-HPLC de RANKL008a a 156 mg/ml y el lote de RANKL008aPic P#270308 (15 % de pico posterior) fueron comparables. Tampoco hubo ninguna diferencia en los perfiles de RP-HPLC de las muestras sin o con Tween80.

55 Solo hubo diferencias menores entre los perfiles de RP-HPLC después de un tiempo de incubación aumentado, es decir, un ligero aumento del pico de piroglutamato y un pequeño descenso del pico posterior, es decir, la variante con un puente de S-S ausente. Ambos picos ya estaban presentes en las muestras no sometidas a estrés, con un área de superficie del pico de un 2,6 % y un 17,1 %, respectivamente.

Un ciclo de congelación/descongelación no tuvo efecto sobre el perfil de RP-HPLC de RANKL008a.

60 16.3. Determinación de partículas subvisibles (PAMAS)

65 Se analizaron las diferentes muestras usando el instrumento de PAMAS. El número total de partículas >10 µm y >25 µm se muestra en la figura 34. Parece haber un aumento dependiente del tiempo en el recuento de partículas y tamaño de partícula.

16.4. Determinación de la potencia

Las potencias relativas en comparación con el lote de referencia (B11#140208) obtenidas para las diferentes muestras se muestran en la tabla 20.

El procedimiento de ultrafiltración y la concentración hasta >150 mg/ml parece no tener un efecto sobre la actividad de RANKL008a. La congelación/descongelación no pareció afectar a la potencia relativa tanto del resto de unión a HSA como de los restos de unión a RANKL.

Ejemplo 17: Estabilidad de las formulaciones durante 11 meses a -20 °C y a 5 °C

Se dializó RANKL008a P#110708, 67 mg/ml, 1 % de pico posterior (cisteínas sin aparear) en 3 tampones diferentes (DPBS, fosfato y acetato que contenían 50 mM de NaCl) con o sin Tween80 al 0,02 % (tabla 3). Se pusieron las muestras en almacenamiento (5 °C y -20 °C) a 2 concentraciones diferentes (30 y 63 mg/ml) durante 11 meses.

Los perfiles de SE-HPLC se muestran en la figura 35. El almacenamiento a -20 °C o 5 °C durante 11 meses no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad física del nanocuerpo RANKL008a. Muestras formuladas en PBS y fosfato a 5 °C mostraron un pico previo menor, que lo más probablemente corresponde al dímero de RANKL008a, que no se vio en las muestras de 63 mg/ml de fosfato con Tween80 en 30 mg/ml de fosfato con Tween80. Añadir Tween80 al tampón fosfato (63 mg/ml) pareció prevenir la formación del dímero. A los 53-58 min se detectó un pico adicional en muestras de 30 mg/ml que se originaron a partir de los diferentes tampones de formulación. En comparación con la medición después del almacenamiento durante 3 meses, el almacenamiento durante 11 meses a 5 °C dio como resultado un ligero aumento del pico posterior, lo que sugería degradación de proteína. Este efecto fue más obvio en muestras formuladas en PBS.

Los perfiles de RP-HPLC se muestran en la figura 36. El almacenamiento a -20 °C y 5 °C durante 11 meses no tuvo un efecto significativo sobre la estabilidad química del nanocuerpo RANKL008a. En comparación con la medición después del almacenamiento durante 3 meses:

- se observó un ligero aumento del pico previo en muestras a 5 °C y más pronunciado en tampón PBS;
- el pico de piroglutamato fue relativamente estable en todos los tampones (áreas de superficie y % del área fueron comparables);
- se detectó un aumento del pico posterior en algunas condiciones.

Basándose en los resultados obtenidos para el análisis del contenido, SE-HPLC y RP-HPLC, puede concluirse que el nanocuerpo RANKL008a permanece estable a 5 °C y -20 °C durante 11 meses. Se observaron pequeños cambios en algunas de las muestras a 5 °C (es decir, pico previo/posterior en SE-HPLC y pico posterior en análisis de RP-HPLC).

Ejemplo 18: Determinación del punto de fusión mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se realizaron experimentos de DSC en un instrumento de DSC VP-Capillary de MicroCal. Se ajustó la concentración de la muestra durante el ensayo a 1 mg/ml en D-PBS. Para comprobar la temperatura de fusión (T_m), se sometieron a barrido las muestras a 200 °C/h usando un intervalo de temperatura de 20 °C a 100 °C, excepto si se indica lo contrario.

La curva de despliegue de DSC para RANKL008a (figura 37) indica que existen dos dominios de despliegue en RANKL008a, uno que tiene una T_m de 64,1 °C (Alb8) y el otro una T_m de 70,4 °C (R13h5). RANKL008a está compuesto por dos dominios R13h5 unidos entre sí por una unidad Alb8, una característica que puede deducirse hasta cierto punto a partir del termograma, es decir, la superficie de Alb8 corresponde a aproximadamente la mitad de la porción de R13h5.

El análisis de Alb8 mediante DSC (figura 38) reveló un valor de T_m de 62,8 °C. Tras el barrido se volvió a calentar la muestra; sin embargo, no se observó repetibilidad del pico. Lo más probable es que la constante de velocidad de la etapa irreversible completa sea alta a altas temperaturas y, por tanto, hace que sea imposible la repetibilidad del experimento.

Se confirmó la temperatura de fusión de 62,8 °C para Alb8 como se mide mediante calorimetría diferencial de barrido hasta un determinado grado en el análisis de RANKL008a. Se observó que R13h5, en el formato RANKL008a, tenía una T_m de 70,4 °C. Estos resultados corroboran los obtenidos mediante el ensayo de desplazamiento térmico basado en fluorescencia (véase el ejemplo 11).

Ejemplo 19: Estudio de estabilidad a largo plazo a -20 °C y +5 °C

Se almacenó el lote de RANKL008a NBJ0607-04, formulado en 10 mM de Na₂HPO₄, 115 mM de NaCl, Tween80 al 0,01 % (v:v) (pH7,0) a 62,5 mg/ml, durante 12 meses a -20 °C y +5 °C. Se analizaron muestras después de 3 y 12 meses de almacenamiento mediante inspección visual (aspecto), A278 (contenido), SE-HPLC, IEX-HPLC, RP-HPLC y ensayos de potencia (ensayo de inhibición de RANKL y ensayo de unión a HSA). Se resumen los resultados en la tabla 21 y tabla 22 para el almacenamiento a -20 °C y +5 °C, respectivamente.

No hubo cambios significativos en aspecto, contenido, potencia y perfiles de HPLC entre la muestra control (punto temporal a los 0 meses) y todas las muestras problema, lo que indica que RANKL008a es estable durante al menos 12 meses a -20 °C o 5 °C. Se observaron pequeñas diferencias con la muestra de control en la muestra almacenada durante 12 meses a +5 °C. El porcentaje del pico principal observado durante el análisis de IEX-HPLC fue menor en comparación con la muestra de control, lo que sugería una pureza algo menor. Durante el análisis de SE-HPLC, apareció un pico posterior menor que puede indicar la presencia de fragmentos de degradación.

Tablas

Tabla 1. Visión general de los lotes de RANKL008a usados en los estudios de estabilidad descritos en la sección de ejemplos.

N.º de lote	Tampón	Concentración	Observación	Condición de estrés aplicada
P #270308nr1	D-PBS	3,3 mg/ml	15 % del pico posterior* en RP-HPLC	Material de referencia
B2#170608nr1	D-PBS	156 mg/ml	15 % del pico posterior* en RP-HPLC	Almacenamiento a 25 °C
P#110708nr1	D-PBS	67 mg/ml	1,3 % del pico posterior* en RP-HPLC	Almacenamiento a -20 °C, 5 °C y 37 °C
P#040908nr1	D-PBS	143 mg/ml	Sin pico posterior en RP-HPLC	- Estudio de C/D - Experimentos de liofilización - Almacenamiento a 37 °C (para análisis de AUC y DLS solo) - Material de referencia
P#151008nr1	fosfato 10 mM + NaCl 100 mM	84,3 mg/ml	Sin pico posterior en RP-HPLC	Experimentos de liofilización
P#151008nr2	fosfato 10 mM + manitol al 5 %	70 mg/ml	Sin pico posterior en RP-HPLC	Experimentos de liofilización
NBJ0539-08-08 SB2	fosfato 10 mM + NaCl 100 mM	65,2 mg/ml	Sin pico posterior en RP-HPLC	Determinación de la osmolalidad
NBJ0607-02	Na ₂ HPO ₄ 10 mM, NaCl 115 mM, Tween80 al 0,01 % (v:v) (pH 7,0)	62,8 mg/ml	Sin pico posterior en RP-HPLC	Experimento de inyectabilidad, experimento de dilución

* corresponde a la variante que tiene un puente de cisteína sin aparear en uno de los elementos estructurales de RANKL13H5 (que eluye aproximadamente 2 minutos más tarde que el pico principal en el análisis de RP-HPLC) como se describe en la solicitud PCT PCT/EP2010/055916 publicada por Ablynx N.V. titulada "Method for the production of variable domains."

Tabla 2. Reactivos usados en la sección de ejemplos.

Reactivo	Distribuidor	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
D-PBS	Gibco	n.º de cat. 14190-094
Ácido cítrico, monohidratado	Merck	n.º de cat. 1.00244.0500
NaCl	Merck	n.º de cat. 1.06404.1000
Patrón de filtración en gel	Bio-Rad	n.º de cat. 151-1901
Tween80	Merck	n.º de cat. 8.17061.1000
Acetato de sodio	Merck	n.º de cat. 1.06268.1000
Dihidrogenfosfato de sodio	Merck	n.º de cat. 1.06345.1000
Hidrogenfosfato de disodio	Merck	n.º de cat. 1.06576.1000

RANKL	Peprotech	n.º de cat. 310-01
HSA	Sigma	n.º de cat. A3782
Tinción de proteína IR de Krypton	Pierce	n.º de cat. 53071
Marcador de PM (Precision Plus Protein Dual Color Standard)	Bio-Rad	n.º de cat. 161-0374
D-manitol	Fluka	n.º de cat. 17311
NaCl al 0,9 %	B. Braun	n.º de cat. 394496 (lote 7372A231)
filtro de 0,22 µm de Millex®-GV	Millipore	n.º de cat. SLGV004SL
jeringuilla de 1 ml (29 G x 1/2")	Becton-Dickinson	n.º de cat. 328411
jeringuilla de 1 ml (29 G x 1/2")	Terumo	n.º de cat. 14.BS-N1H2913
jeringuilla de 1 ml	Becton-Dickinson	n.º de cat. 300013
jeringuilla de 2 ml, Luer Lock	Becton-Dickinson	n.º de cat. 300185
Aguja Microlance (30 G x 1/2")	Becton-Dickinson	n.º de cat. 304000
jeringuilla de 2 ml, Luer Lock	Terumo	n.º de cat. SS02LZ1
aguja Neolus® (18 G x 2")	Terumo	n.º de cat. NN-1850R
aguja Neolus® (23 G x 1 1/4")	Terumo	n.º de cat. NN-2332R
aguja Neolus® (27 G x 3/4")	Terumo	n.º de cat. NN-2719R
aguja SurGuard® (30 G x 1/2")	Terumo	n.º de cat. SG2-3013
vidrio de borosilicato de 1-2 ml	Thüringer Pharmaglass	n.º de cat. 2R
cierre de seguridad de 2 ml	Eppendorf	n.º de cat. 0030 121.597
tubo de poliestireno de 15 ml	Greiner Bio-One	n.º de cat. 186161

Tabla 3. Visión general de las diferentes formulaciones de RANKL008a usadas en ensayos de estabilidad.

Concentración de RANKL008a	Tampón	[NaCl] adicional	% de Tween80 (v:v)
63 mg/ml	PBS	0	0
63 mg/ml	PBS	0	0,02
30 mg/ml	PBS	0	0
30 mg/ml	PBS	0	0,02
63 mg/ml	NaH ₂ PO ₄ 10 mM.2H ₂ O, pH 7	50 mM	0
63 mg/ml	NaH ₂ PO ₄ 10 mM.2H ₂ O, pH 7	50 mM	0,02
30 mg/ml	NaH ₂ PO ₄ 10 mM.2H ₂ O, pH 7	50 mM	0
30 mg/ml	NaH ₂ PO ₄ 10 mM.2H ₂ O, pH 7	50 mM	0,02
63 mg/ml	acetato de Na 10 mM, pH 5,5	50 mM	0
63 mg/ml	acetato de Na 10 mM, pH 5,5	50 mM	0,02
30 mg/ml	acetato de Na 10 mM, pH 5,5	50 mM	0
30 mg/ml	acetato de Na 10 mM, pH 5,5	50 mM	0,02

5 **Tabla 4.** Potencia relativa (con respecto a patrón de referencia) de RANKL008a tras el almacenamiento a 5 °C tal como se describe en el ejemplo 3.

Muestra	63 mg/ml				30 mg/ml			
	0 semanas		2 semanas		0 semanas		2 semanas	
	HSA	RANKL	HSA	RANKL	HSA	RANKL	HSA	RANKL
PBS	0,842	1,149	0,714	1,111	0,825	1,096; 1,096	0,96; 0,857	1,169
PBS + Tw80	0,901	1,114	0,701	1,063	0,796	1,049; 1,136	1,017; 0,933	1,173
Fosfato	0,794	0,862	0,65	0,981	0,836	1,073; 0,99	0,859; 0,934	0,996
Fosfato + Tw80	0,837	1,035	0,661	0,979	0,899	1,19; 1,085	0,917; 1,011	1,057
Acetato	0,818	1,057	0,643	0,992	0,836	1,202; 1,096	0,882; 0,935	1,079
Acetato + Tw80	0,904	1,046	0,71	1,048	0,899	1,155; 1,100	1,002; 1,034	1,084

10 **Tabla 5.** Las potencias relativas (con respecto a patrón de referencia) de restos de unión a HSA y RANKL de muestras de RANKL008a sometidas a estrés por temperatura.

	63 mg/ml de HSA							30 mg/ml de HSA						
	0 sem	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	6 sem	8 sem	0 sem	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	6 sem	8 sem
PBS	0,842	0,968	0,889	0,742	0,756	0,693	0,62	0,825	0,954	0,96	0,961	0,999	0,784	0,772

PBS + Tw80	0,901	1,049	0,882	0,765	0,859	0,673	0,629	0,796	0,99	0,984	0,954	1,097	0,821	0,822
Fosfato	0,794	0,891	0,774	0,754	0,724	0,611	0,583	0,836	0,908	0,837	0,837	0,943	0,722	0,688
Fosfato + Tw80	0,837	0,893	0,919	0,747	0,739	0,629	0,581	0,899	0,984	0,916	0,948	0,936	0,79	0,719
Acetato	0,818	0,89	0,791	0,758	0,72	0,645	0,631	0,836	0,949	0,905	0,869	0,992	0,778	0,798
Acetato + Tw80	0,904	1,107	0,884	0,773	0,822	0,714	0,598	0,899	1,053	1,013	0,941	1,051	0,773	0,81
	63 mg/ml de RANKL							30 mg/ml de RANKL						
	0 sem	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	6 sem	8 sem	0 sem	1 sem	2 sem	3 sem	4 sem	6 sem	8 sem
PBS	1,149	1,112	1,06	0,939	1,008	1,064	0,687	1,096 1,096	0,96 1,042	1,015	0,976	1,17	0,941	0,887
PBS + Tw80	1,114	1,069	1,063	0,979	1,11	0,924	0,9	1,049 1,136	1,009 1,151	1,09	1,115	1,216	0,836	0,898
Fosfato	0,862	1,012	0,95	0,917	0,99	0,848	0,799	1,073 0,99	0,763 0,971	0,852	0,931	1,035	0,786	0,805
Fosfato + Tw80	1,035	1,012	0,968	0,853	0,927	0,897	0,755	1,19 1,085	0,913 0,916	0,98	0,932	0,946	0,779	0,762
Acetato	1,057	0,985	1,023	0,948	1,049	1,011	0,801	1,202 1,096	0,857 0,935	0,969	1,021	1,158	0,967	0,936
Acetato + Tw80	1,046	1,148	1,078	0,863	1,123	0,875	0,897	1,155 1,100	0,814 0,954	0,867	1,039	1,14	0,803	0,829

Tabla 6. Potencias relativas (con respecto a patrón de referencia) de restos de unión a HSA y RANKL de muestras de RANKL008a después de diversos ciclos de congelación-descongelación.

Tampón	número de ciclos de congelación/descongelación	potencia relativa	
		RANKL	HSA
Fosfato	10 CD -20 °C	0,967	0,918
Fosfato	2 CD -80 °C + 6 CD -20 °C	0,866	0,900
Fosfato + Tween80 al 0,02 % (v:v)	10 CD -20 °C	0,845	0,817
Fosfato + Tween80 al 0,02 % (v:v)	2 CD -80 °C + 6 CD -20 °C	0,804	0,810
Acetato	10 CD -20 °C	0,921	0,890
Acetato	2 CD -80 °C + 6 CD -20 °C	0,827	0,893
Acetato + Tween80 al 0,02 % (v:v)	10 CD -20 °C	0,736	1,023
Acetato + Tween80 al 0,02 % (v:v)	2 CD -80 °C + 6 CD -20 °C	0,908	1,123

5

Tabla 7. Muestras usadas en el experimento de liofilización.

RANKL008a	% de Tween80 (v:v)		
fosfato 10 mM, pH 7 + NaCl 50 mM a 56 mg/ml	0	0,05	0,1
acetato 10 mM, pH 5,5 + NaCl 50 mM a 60 mg/ml	0	0,05	0,1 ₁₀

10

Tabla 8. Programa usado para la liofilización de las muestras de RANKL008a.

Fase	1	2	3	4	5	6	7
Sección	Carga	Congelación		Secado principal			
Tiempo de sección	/	1 h 30	1 h	4 h	10 h	3 h	3 h
Temp. de almacenamiento (°C)	20	-45	-40	-35	-20	-10	0
Vacío (mbar)	/	/	/	1,030	1,030	1,030	3,380
Presión de seguridad	apagado	apagado	apagado	apagado	1,650	6,110	6,110
dT de secado por congelación	apagado	apagado	apagado	apagado	apagado	apagado	apagado

Tabla 9. Potencias relativas (con respecto a patrón de referencia) de restos de unión a HSA y RANKL de muestras de RANKL008a tras la liofilización.

	RANKL	HSA
Fosfato	0,642; 1,127; 0,762*	0,626
Fosfato + Tween80 al 0,05 % (v:v)	1,190	0,970
Fosfato + Tween80 al 0,1 % (v:v)	1,030	0,925

Acetato	1,191	0,978
Acetato + Tween80 al 0,05 % (v:v)	0,761	0,672
Acetato + Tween80 al 0,1 % (v:v)	0,970	0,981

*Se realizaron tres mediciones.

Tabla 10. Resumen de los resultados de los experimentos de velocidad de sedimentación usando muestras sometidas a estrés y no sometidas a estrés de RANKL008a a una concentración elevada de proteína.

	Muestra	s* ₁ [S]	c ₁ [conc. rel.]	s* ₂ [S]	c ₂ [conc. rel.]
PBS	0 sem	2,91	0,99	NA	NA
	2 sem	2,90	0,82	4,17	0,18
	4 sem	2,96	0,73	4,51	0,27
	8 sem	2,90	0,60	4,23	0,32
fosfato 10 mM + NaCl 50 mM	0 sem	2,92	0,99	NA	NA
	2 sem	2,98	0,86	4,39	0,14
	4 sem	2,98	0,76	4,37	0,23
	8 sem	2,90	0,69	4,25	0,26
acetato 10 mM + NaCl 50 mM	0 sem	2,94	0,96	4,71	0,04
	2 sem	2,96	0,87	4,47	0,12
	4 sem	2,97	0,79	4,38	0,21
	8 sem	2,94	0,70	4,27	0,27

S*₁: coeficiente de sedimentación para el monómero de RANKL008a

S*₂: coeficiente de sedimentación para el dímero de RANKL008a

[S]: unidad Svedberg

5

Tabla 11. Potencias relativas (con respecto al patrón de referencia) de los restos de unión a HSA y RANKL de RANKL008a reconstituido, liofilizado tras 5 semanas a 37 °C.

Tampón	potencia relativa	
	RANKL	HSA
fosfato + NaCl 100 mM, pH	93,7	67,0
fosfato + manitol al 5 %, pH	90,3	80,9

10 **Tabla 12.** Temperatura de fusión (°C) para RANKL008a en acetato (pH de 4,0 a 5,5) y en fosfato (pH de 6,0 a 8,0).

		pH 4	pH 4,5	pH 5	pH5,5	pH 6	pH 6,5	pH 7	pH 7,5	pH 8
tampón sin NaCl	Tm1	-	-	-	-	-	64,43	64,50	64,37	-
	Tm2	70,01	70,74	71,53	70,34	70,67	71,80	71,20	70,47	69,01
tampón + NaCl 50 mM	Tm1	61,05	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tm2	67,62	69,67	70,47	70,67	72,26	71,66	71,07	70,2	-
tampón + NaCl 150 mM	Tm1	58,01	-	64,51	64,37	64,17	64,44	64,77	-	-
	Tm2	65,96	69,61	70,60	71,13	70,99	70,79	70,26	69,81	-
tampón + NaCl 500 mM	Tm1	54,81	59,26	61,36	62,43	63,10	63,04	63,10	62,77	-
	Tm2	63,11	65,43	68,68	69,61	69,87	69,87	69,74	69,14	-

Tabla 13. Observación visual tras el experimento con jeringuilla/aguja descrito en el ejemplo 12.

Sin Tween80	Tween80 al 0,01 % (v:v)
Más opaco	Opaco
Burbujas de aire	/
Espuma	/

15

Tabla 14. Observación visual tras el experimento de agitación descrito en el ejemplo 12.

	Sin Tween80	Tween80 al 0,01 % (v:v)
1 hora a temperatura ambiente	Ligeramente opalescente	Transparente
2 días a 5 °C	Más opaco	Opaco

20

Tabla 15. Inspección visual y determinación de contenido de RANKL008a tras dilución en diferentes diluyentes y paso/almacenamiento en jeringuillas.

muestra	inspección visual	contenido (mg/ml)
0028 SOLUCIÓN SALINA TUB	pequeños precipitados	0,265 (0,261-0,270)
0028 SOLUCIÓN SALINA SYR S25/0	pequeños precipitados	0,263 (0,261-0,265)

0028 SOLUCIÓN SALINA SYR S25/24	pequeños precipitados	0,259 (0,256-0,262)
0028 PLACEBO-TW TUB	pequeños precipitados	0,272 (0,271-0,273)
0028 PLACEBO-TW SYR S25/0	pequeños precipitados	0,268 (0,267-0,269)
0028 PLACEBO-TW SYR S25/24	pequeños precipitados	0,268 (0,259-0,276)
0028 PLACEBO+TW TUB	transparente	0,281 (0,281-0,281)
0028 PLACEBO+TW SYR S25/0	ligeramente turbia	0,280 (0,278-0,282)
0028 PLACEBO+TW SYR S25/24	ligeramente turbia	0,279 (0,277-0,281)

Tabla 16. Inspección visual de RANKL008a tras dilución en etapa única y en serie en diferentes diluyentes.

muestra	dilución	inspección visual	concentración estimada (mg/ml)
6500 DP ref.	1/1	transparente	65,0
6500 DP PL+TW 1STEP 256X	1/256	transparente	0,25
6500 DP PL+TW 1STEP 2X	1/2	transparente	32,5
6500 DP PL+TW 2STEP 4X	1/4	transparente	16,3
6500 DP PL+TW 3STEP 8X	1/8	transparente	8,13
6500 DP PL+TW 4STEP 16X	1/16	transparente	4,06
6500 DP PL+TW 5STEP 32X	1/32	transparente	2,03
6500 DP PL+TW 6STEP 64X	1/64	transparente	1,02
6500 DP PL+TW 7STEP 128X	1/128	transparente	0,51
6500 DP PL+TW 8STEP 256X	1/256	transparente	0,25
6500 DP SAL 1STEP 256X	1/256	precipitación pesada + turbia	0,25
6500 DP SAL 1STEP 2X	1/2	transparente	32,5
6500 DP SAL 2STEP 4X	1/4	precipitación	16,3
6500 DP SAL 3STEP 8X	1/8	precipitación	8,13
6500 DP SAL 4STEP 16X	1/16	precipitación	4,06
6500 DP SAL 5STEP 32X	1/32	precipitación más pesada	2,03
6500 DP SAL 6STEP 64X	1/64	precipitación pesada + ligeramente turbia	1,02
6500 DP SAL 7STEP 128X	1/128	precipitación pesada+ ligeramente turbia	0,51
6500 DP SAL 8STEP 256X	1/256	precipitación pesada + turbia	0,25

- 5 Tabla 17. Inspección visual, contenido y turbidez de RANKL008a antes (TUB) y después del paso a través de jeringuillas con diferentes tamaños de aguja como se describe en el ejemplo 15.

muestra	inspección visual	contenido (mg/ml)	razón 320/278	razón 350/278
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

- 10 Tabla 18. Inspección visual, contenido 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 15.

muestra	inspección visual	contenido (mg/ml)	razón 320/278	razón 350/278
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

ES 2 617 180 T3

Tabla 19. Visión general del análisis realizado usando las diferentes muestras de RANKL008a sometidas a estrés a 156 mg/ml (n.º de B2 170608nr1).

	PBS	PBS Tween80 al 0,02 % (v:v)	PBS Tween80 al 0,05 % (v:v)	PBS Tween80 al 0,1 % (v:v)
Control	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS ensayo de potencia	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS ensayo de potencia	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS ensayo de potencia	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS ensayo de potencia
11 días a 25 °C	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS
3 semanas a 25 °C	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS
6 semanas a 25 °C	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS
ciclo de C/D (- 20 °C)	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS ensayo de potencia	/	/	SE-HPLC RP-HPLC PAMAS ensayo de potencia

Tabla 20. Potencias relativas (con respecto al patrón de referencia) de restos de unión a HSA y RANKL de RANKL008a a 156 mg/ml.

	PBS	PBS Tween80 al 0,02 % (v:v)	PBS Tween80 al 0,05 % (v:v)	PBS Tween80 al 0,1 % (v:v)
Control RANKL HSA	0,856 0,896	0,87 0,965	0,962 0,932	0,84 1,023
ciclo de C/D (- 20 °C) RANKL HSA	1,141 1,066	/ /	/ /	1,061 1,116

Tabla 21. Datos de estabilidad de lote de RANKL008a NBJ0607-04, almacenado a -20 °C.

Procedimiento de prueba	Punto temporal (meses)			
	Inicial (0)	1	2	3
Aspecto	transparente, disolución ligeramente amarilla			
A278	62,5 ± 1,1 mg/ml	63,0 ± 0,4 mg/ml	65,4 ± 0,1 mg/ml	64,8 ± 0,7 mg/ml
SEC-HPLC	Pureza = 99,8 % Picos previos = 0,2 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,7 % Picos previos = 0,3 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,6 % Picos previos = 0,4 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,7 % Picos previos = 0,3 % Picos posteriores = 0,0 %
IEX-HPLC	Pureza = 95,0 % Pico previo 1 = 0,0 % Pico previo 2 = 1,0 % Pico previo 3 = 1,7 % Picos posteriores = 2,3 %	Pureza = 95,9 % Pico previo 1 = 0,0 % Pico previo 2 = 0,8 % Pico previo 3 = 1,7 % Picos posteriores = 1,6 %	Pureza = 95,1 % Pico previo 1 = 0,2 % Pico previo 2 = 1,0 % Pico previo 3 = 2,0 % Picos posteriores = 1,7 %	Pureza = 95,3 % Pico previo 1 = 0,3 % Pico previo 2 = 1,0 % Pico previo 3 = 2,0 % Picos posteriores = 1,4 %
RP-HPLC	Pureza = 87,8 % Picos previos = 7,8 % Pico posterior 1 = 2,7 %	Pureza = 87,8 % Picos previos = 7,7 % Pico posterior 1 = 3,0 %	Pureza = 87,8 % Picos previos = 7,9 % Pico posterior 1 = 3,0 %	Pureza = 87,5 % Picos previos = 8,2 % Pico posterior 1 = 2,8 %

ES 2 617 180 T3

	Pico posterior 2 = 1,7 %	Pico posterior 2 = 1,5 %	Pico posterior 2 = 1,3 %	Pico posterior 2 = 1,5 %
potencia (inhibición de RANKL)	1,098 ± 0,100	1,175 ± 0,099	0,920 ± 0,065	0,980 ± 0,092
potencia (unión a HSA)	0,966 ± 0,065	1,021 ± 0,135	0,812 ± 0,033	0,922 ± 0,038

Tabla 21. Continuación

Procedimiento de prueba	Punto de tiempo (meses)			
	Inicial (0)	6	9	12
Aspecto	transparente, disolución ligeramente amarilla			
A278	62,5 ± 1,1 mg/ml	66,4 ± 0,4 mg/ml	65,7 ± 0,3 mg/ml	64,7 ± 0,4 mg/ml
SEC-HPLC	Pureza = 99,8 % Picos previos = 0,2 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,8 % Picos previos = 0,2 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,8 % Picos previos = 0,2 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,7 % Picos previos = 0,1 % Picos posteriores = 0,2 %
IEX-HPLC	Pureza = 95,0 % Pico previo 1 = 0,0 % Pico previo 2 = 1,0 % Pico previo 3 = 1,7 % Picos posteriores = 2,3 %	Pureza = 95,0 % Pico previo 1 = 0,2 % Pico previo 2 = 1,1 % Pico previo 3 = 2,0 % Picos posteriores = 1,7 %	Pureza = 95,2 % Pico previo 1 = 0,2 % Pico previo 2 = 1,1 % Pico previo 3 = 2,0 % Picos posteriores = 1,5 %	Pureza = 94,1 % Pico previo 1 = 0,4 % Pico previo 2 = 1,2 % Pico previo 3 = 2,0 % Picos posteriores = 2,3 %
RP-HPLC	Pureza = 87,8 % Picos previos = 7,8 % Pico posterior 1 = 2,7 % Pico posterior 2 = 1,7 %	Pureza = 89,7 % Picos previos = 5,5 % Pico posterior 1 = 3,0 % Pico posterior 2 = 1,8 %	Pureza = 88,7 % Picos previos = 4,4 % Pico posterior 1 = 3,8 % Pico posterior 2 = 3,1 %	Pureza = 89,2 % Picos previos = 5,1 % Pico posterior 1 = 3,1 % Pico posterior 2 = 2,6 %
potencia (inhibición de RANKL)	1,098 ± 0,100	0,769 ± 0,055	0,808 ± 0,047	1,201 ± 0,048
potencia (unión a HSA)	0,966 ± 0,065	0,889 ± 0,069	0,939 ± 0,080	0,948 ± 0,061

Tabla 22. Datos de estabilidad de lote de RANKL008a NBJ0607-04, almacenado a +5 °C.

Procedimiento de prueba	Punto temporal (meses)			
	Inicial (0)	1	2	3
Aspecto	transparente, disolución ligeramente amarilla			
A278	62,5 ± 1,1 mg/ml	61,3 ± 2,0 mg/ml	65,3 ± 0,4 mg/ml	65,1 ± 0,6 mg/ml
SEC-HPLC	Pureza = 99,8 % Picos previos = 0,2 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,6 % Picos previos = 0,4 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,4 % Picos previos = 0,6 % Picos posteriores = 0,0 %	Pureza = 99,7 % Picos previos = 0,3 % Picos posteriores = 0,0 %
IEX-HPLC	Pureza = 95,0 % Pico previo 1 = 0,0 % Pico previo 2 = 1,0 %	Pureza = 95,7 % Pico previo 1 = 0,0 % Pico previo 2 = 1,0 %	Pureza = 95,3 % Pico previo 1 = 0,2 % Pico previo 2 = 1,0 %	Pureza = 95,5 % Pico previo 1 = 0,2 % Pico previo 2 = 1,0 %

ES 2 617 180 T3

	Pico previo 3 = 1,7 %	Pico previo 3 = 1,8 %	Pico previo 3 = 2,0 %	Pico previo 3 = 1,9 %
	Picos posteriores = 2,3 %	Picos posteriores = 1,5 %	Picos posteriores = 1,5 %	Picos posteriores = 1,4 %
RP-HPLC	Pureza = 87,8 %	Pureza = 88,1 %	Pureza = 87,9 %	Pureza = 87,5 %
	Picos previos = 7,8 %	Picos previos = 7,3 %	Picos previos = 7,6 %	Picos previos = 8,2 %
	Pico posterior 1 = 2,7 %	Pico posterior 1 = 3,0 %	Pico posterior 1 = 3,0 %	Pico posterior 1 = 2,8 %
	Pico posterior 2 = 1,7 %	Pico posterior 2 = 1,6 %	Pico posterior 2 = 1,5 %	Pico posterior 2 = 1,5 %
potencia (inhibición de RANKL)	1,098 ± 0,100	1,094 ± 0,090	1,026 ± 0,064	0,937 ± 0,079
potencia (unión a HSA)	0,966 ± 0,065	1,132 ± 0,127	0,917 ± 0,045	0,860 ± 0,042

Tabla 22. Continuación

Procedimiento de prueba	Inicial (0)	Punto temporal (meses)		
		6	9	12
Aspecto	transparente, disolución ligeramente amarilla	transparente, disolución ligeramente amarilla	transparente, disolución ligeramente amarilla	transparente, disolución ligeramente amarilla
A278	62,5 ± 1,1 mg/ml	66,8 ± 0,6 mg/ml	65,0 ± 0,4 mg/ml	64,7 ± 0,9 mg/ml
SEC-HPLC	Pureza = 99,8 %	Pureza = 99,6 %	Pureza = 99,3 %	Pureza = 99,1 %
	Picos previos = 0,2 %	Picos previos = 0,2 %	Picos previos = 0,3 %	Picos previos = 0,2 %
	Picos posteriores = 0,0 %	Picos posteriores = 0,2 %	Picos posteriores = 0,4 %	Picos posteriores = 0,7 %
IEX-HPLC	Pureza = 95,0 %	Pureza = 95,2 %	Pureza = 94,7 %	Pureza = 92,0 %
	Pico previo 1 = 0,0 %	Pico previo 1 = 0,3 %	Pico previo 1 = 0,3 %	Pico previo 1 = 0,3 %
	Pico previo 2 = 1,0 %	Pico previo 2 = 1,0 %	Pico previo 2 = 1,0 %	Pico previo 2 = 1,3 %
	Pico previo 3 = 1,7 %	Pico previo 3 = 2,0 %	Pico previo 3 = 2,1 %	Pico previo 3 = 2,2 %
	Picos posteriores = 2,3 %	Picos posteriores = 1,5 %	Picos posteriores = 1,9 %	Picos posteriores = 4,0 %
RP-HPLC	Pureza = 87,8 %	Pureza = 90,0 %	Pureza = 88,0 %	Pureza = 89,6 %
	Picos previos = 7,8 %	Picos previos = 5,2 %	Picos previos = 5,1 %	Picos previos = 4,7 %
	Pico posterior 1 = 2,7 %	Pico posterior 1 = 3,0 %	Pico posterior 1 = 4,0 %	Pico posterior 1 = 3,3 %
	Pico posterior 2 = 1,7 %	Pico posterior 2 = 1,8 %	Pico posterior 2 = 2,9 %	Pico posterior 2 = 2,4 %
potencia (inhibición de RANKL)	1,098 ± 0,100	0,911 ± 0,045	0,891 ± 0,032	1,106 ± 0,047
potencia (unión a HSA)	0,966 ± 0,065	0,851 ± 0,066	1,062 ± 0,065	1,023 ± 0,082

- 5 Los términos y expresiones que se han empleado se usan como términos de descripción y no de limitación, y no hay ninguna intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir ningún equivalente de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, reconociéndose que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n que comprende un veh3culo acuoso, un tamp3n y un polip3ptido con SEQ ID NO: 1, formul3ndose dicha formulaci3n para administraci3n a un sujeto humano, en la que el polip3ptido tiene una concentraci3n de al menos 30 mg/ml, en la que el tamp3n es hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4), pH 7,0 a una concentraci3n de 10 mM.
2. Formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que el polip3ptido tiene una concentraci3n de al menos 60 mg/ml.
3. Formulaci3n de la reivindicaci3n 2, en la que el polip3ptido tiene una concentraci3n de al menos 80 mg/ml.
4. Formulaci3n de la reivindicaci3n 1, en la que el polip3ptido tiene un perfil de temperatura de fusi3n bif3sico en el que una T_{m1} es de al menos 60 °C o m3s, preferentemente al menos 61 °C o m3s, m3s preferentemente al menos 62 °C o m3s y T_{m2} es de al menos 65 °C o m3s, preferentemente al menos 66 °C o m3s, m3s preferentemente al menos 67 °C o m3s, como se mide mediante el ensayo de desplazamiento t3rmico y/o calorimetr3a diferencial de barrido (DSC).
5. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el polip3ptido:
 - es estable durante el almacenamiento a una temperatura de 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, m3s preferentemente al menos 6 semanas, lo m3s preferentemente al menos 8 semanas o m3s), determin3ndose dicha estabilidad mediante el hecho de que menos del 25 % de los polip3ptidos forma d3meros como se eval3a mediante SE-HPLC.
6. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que no m3s de un 5 % de los polip3ptidos forma agregados como se mide mediante SE-HPLC, recuento de part3culas subvisibles, ultracentrifugaci3n anal3tica y/o dispersi3n din3mica de la luz.
7. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que
 - al menos un 80 % (preferentemente un 90 %) de los polip3ptidos conserva su actividad de uni3n a RANKL tras el almacenamiento a 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, m3s preferentemente al menos 6 semanas, lo m3s preferentemente al menos 8 semanas o m3s) en comparaci3n con la actividad de uni3n antes del almacenamiento, midi3ndose dicha actividad de uni3n mediante ELISA y/o Biacore; y/o
 - al menos un 80 % (preferentemente el 90 %) de los polip3ptidos conserva su actividad de uni3n a HSA tras el almacenamiento a 37 °C±5 °C hasta al menos 2 semanas (preferentemente al menos 4 semanas, m3s preferentemente al menos 6 semanas, lo m3s preferentemente al menos 8 semanas o m3s) en comparaci3n con la actividad de uni3n antes del almacenamiento, midi3ndose dicha actividad de uni3n mediante ELISA y/o Biacore.
8. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que tiene una osmolalidad de 290 ± 60 mOsm/kg.
9. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende adem3s una sal.
10. Formulaci3n de la reivindicaci3n 9, en la que la sal es NaCl a una concentraci3n de 115 mM.
11. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la formulaci3n comprende un tensoactivo seleccionado entre Tween20 o Tween80 a una concentraci3n de hasta un 0,01 % (v:v).
12. Formulaci3n de la reivindicaci3n 11, en la que SEQ ID NO: 1 es estable bajo estr3s mec3nico seleccionado entre:
 - agitaci3n durante de 10 s a 1 min
 - empuje a trav3s de una aguja (25 G, 26 G, 27 G, 28 G, 29 G o m3s) con una jeringuilla,
 - rotaci3n durante dos d3as a 10 rpm, y
 - agitar durante 1 hora a temperatura ambiente y 2 d3as a 4 °C a al menos 10 rpm (tal como 50 rpm, 100 rpm o m3s).
13. Formulaci3n de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que comprende

- 65 mg/ml de SEQ ID NO: 1;
 - 10 mM de hidrogenofosfato de disodio (Na_2HPO_4);
 - 5 - 115 mM de cloruro de sodio (NaCl);
 - Tween80 al 0,01 % (v:v).
- 10 14. Procedimiento para la preparación de una formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que comprende la etapa de concentrar el polipéptido con SEQ ID NO: 1 e intercambiarlo con un tampón.
- 15 15. Formulación que se produce mediante la liofilización o el secado por pulverización de la formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 15 16. Procedimiento para la preparación de la formulación liofilizada o secada por pulverización de la reivindicación 15, que comprende la etapa de liofilizar o secar por pulverización una disolución de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13.
- 20 17. Recipiente sellado que contiene una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o 15.
- 25 18. Forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral a un ser humano, que comprende una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13 o 15 en un recipiente adecuado.
- 30 19. La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 18, que es adecuada para la administración subcutánea.
- 30 20. Kit que comprende uno o más de los recipientes sellados de acuerdo con la reivindicación 17 y/o formas de dosificación unitaria farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 o 19, e instrucciones para el uso de la formulación.
- 35 21. Formulación, recipiente, dosificación unitaria farmacéutica o kit de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, 15 o 17 a 20, para su uso en tratamiento.
- 35 22. Formulación, recipiente, dosificación unitaria farmacéutica o kit de acuerdo con la reivindicación 21, en la que la enfermedad o trastorno es osteoporosis, osteopatías relacionadas con cáncer, y/o pérdida ósea asociada con autoinmunidad y/o infección vírica.

Figura 1 (A)

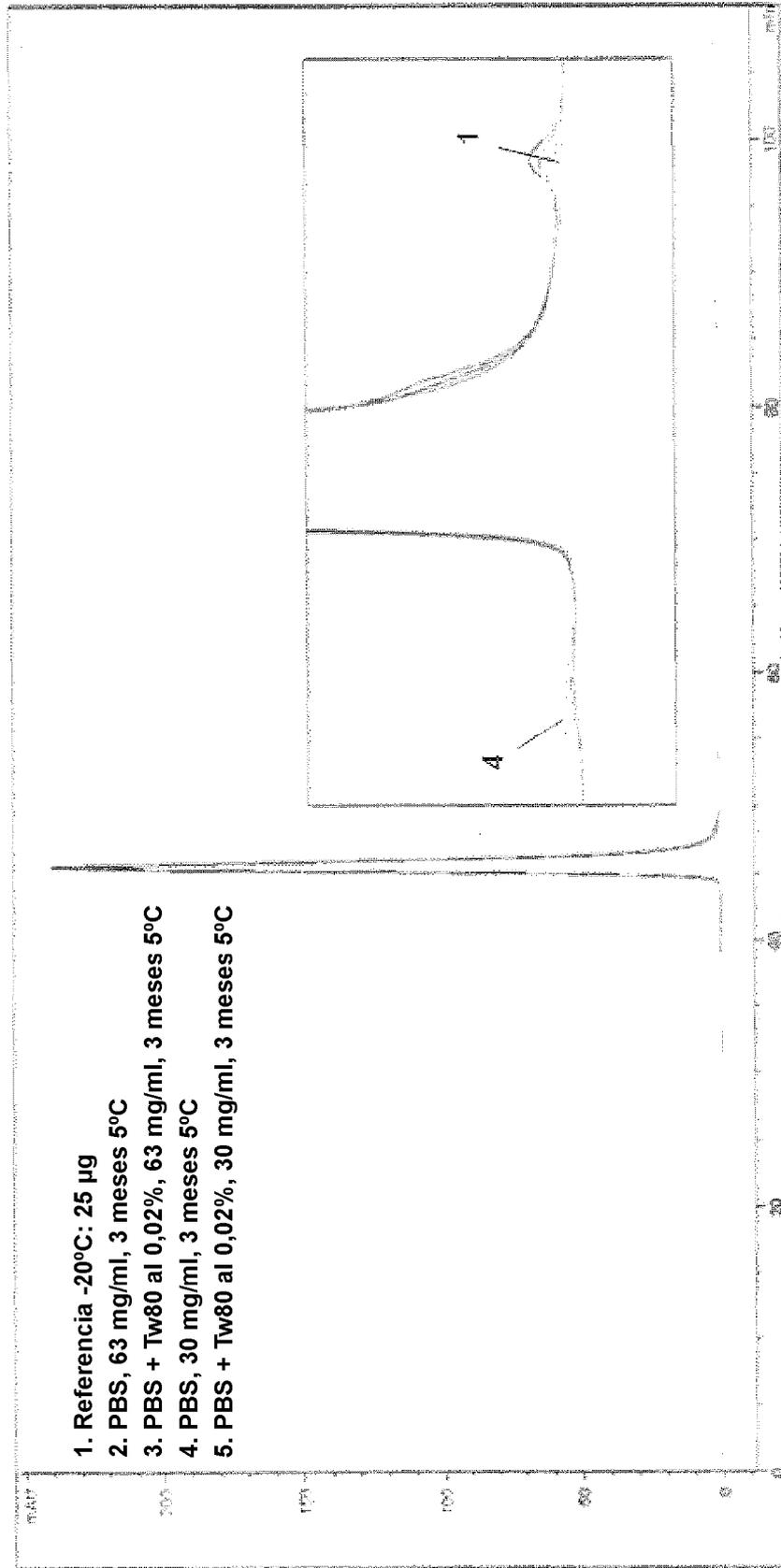


Figura 1 (B)

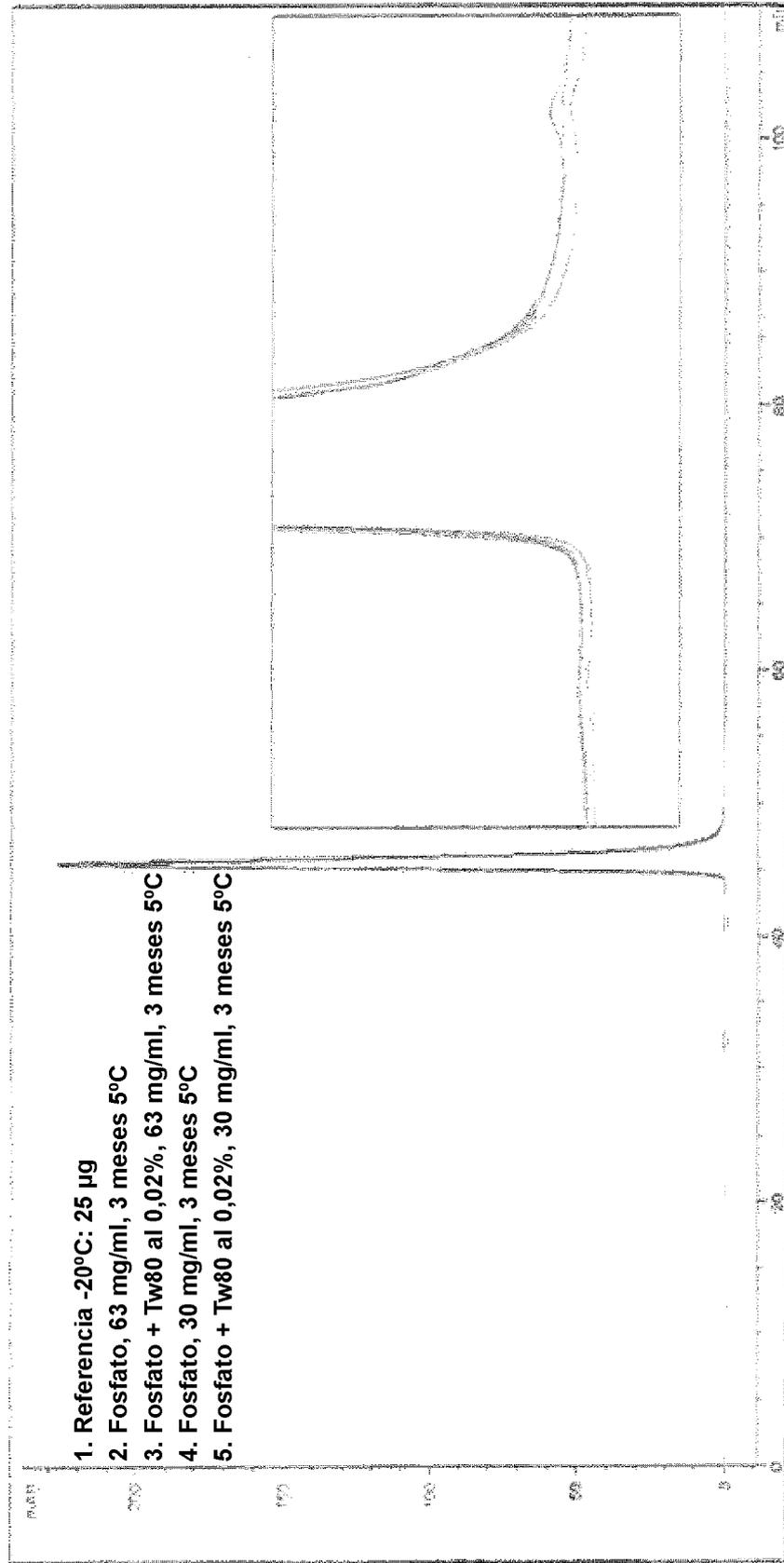


Figura 1 (C)

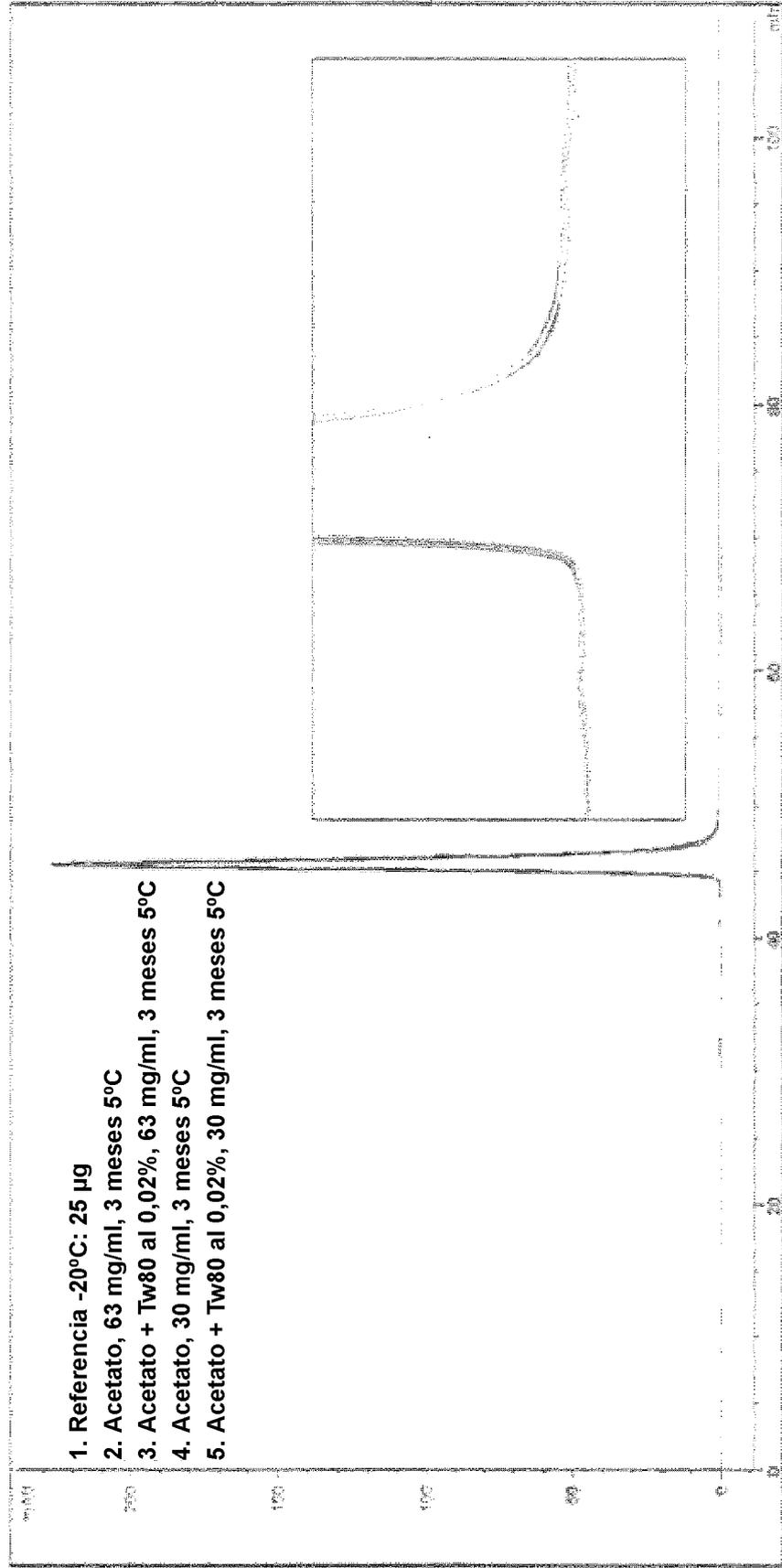


Figura 2 (A)

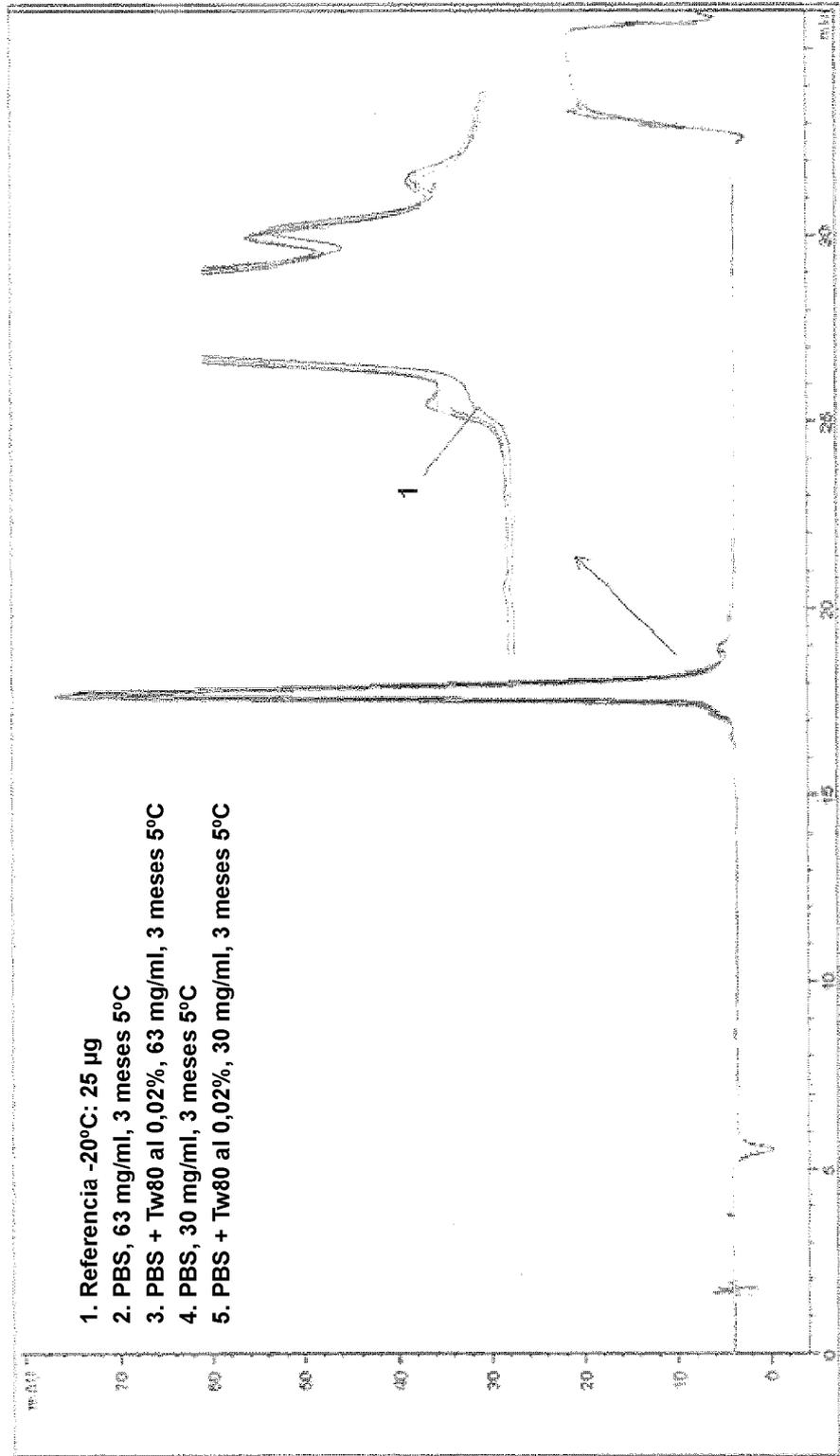


Figura 2 (B)

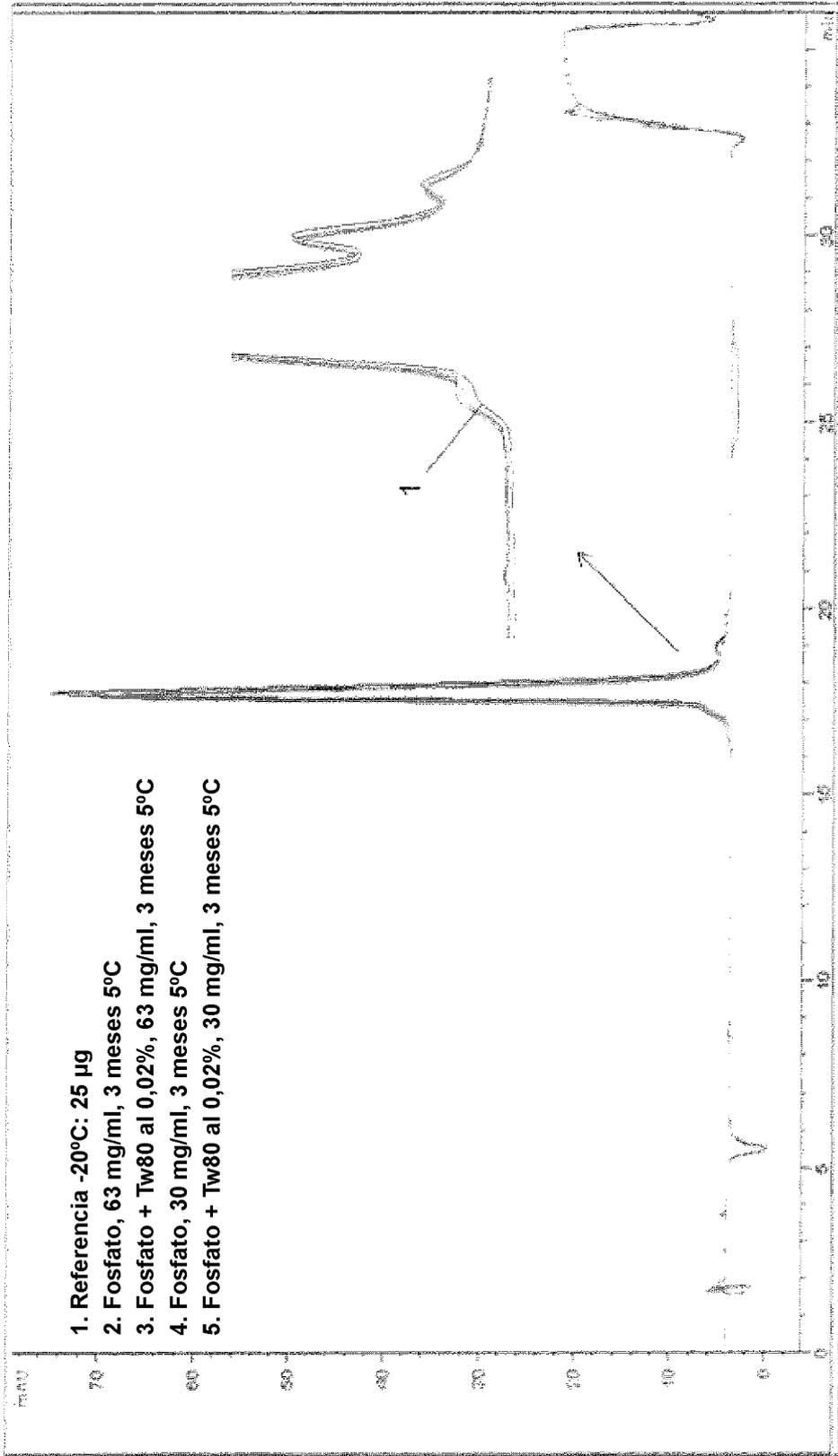


Figura 2 (C)

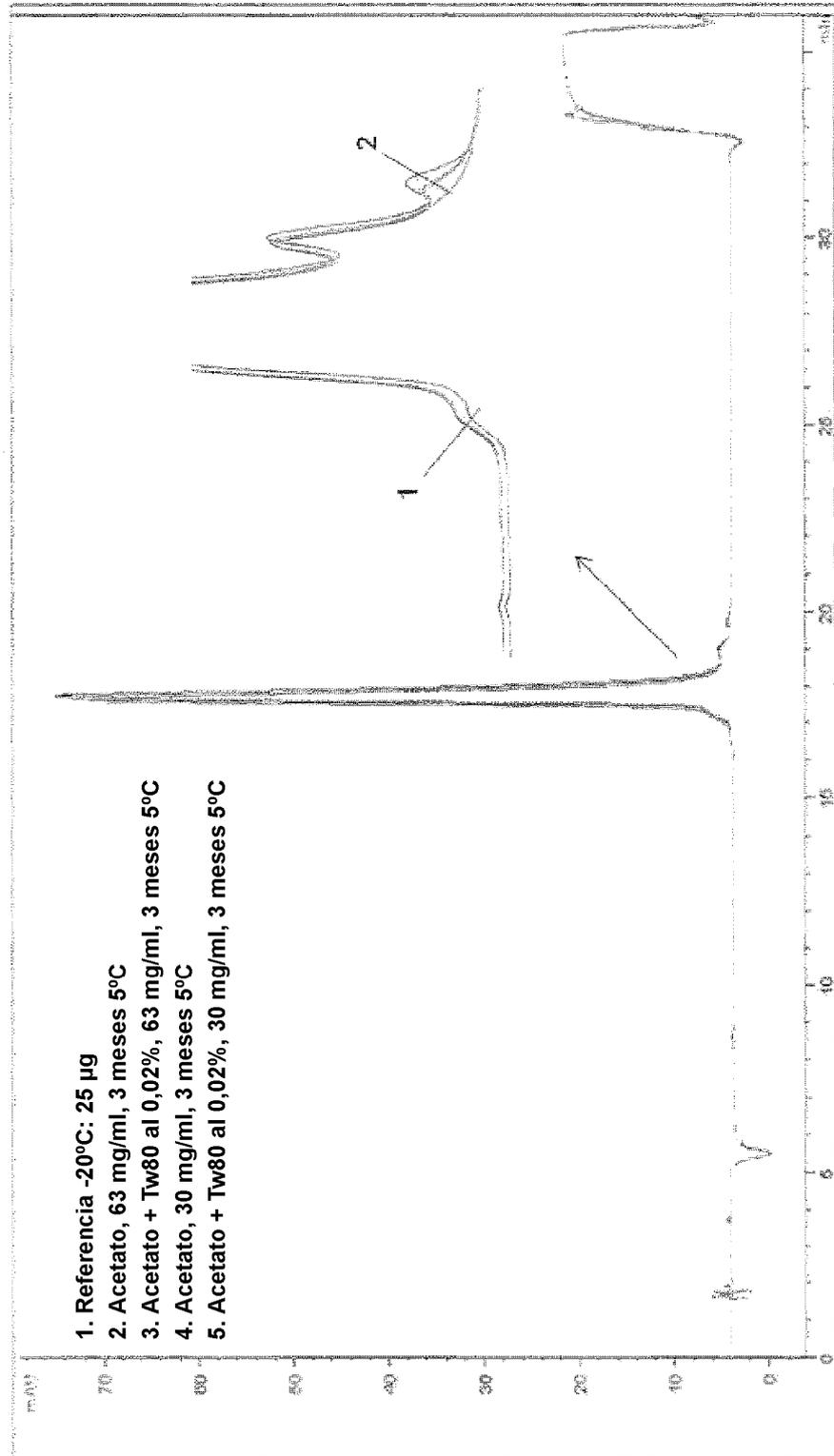


Figura 3

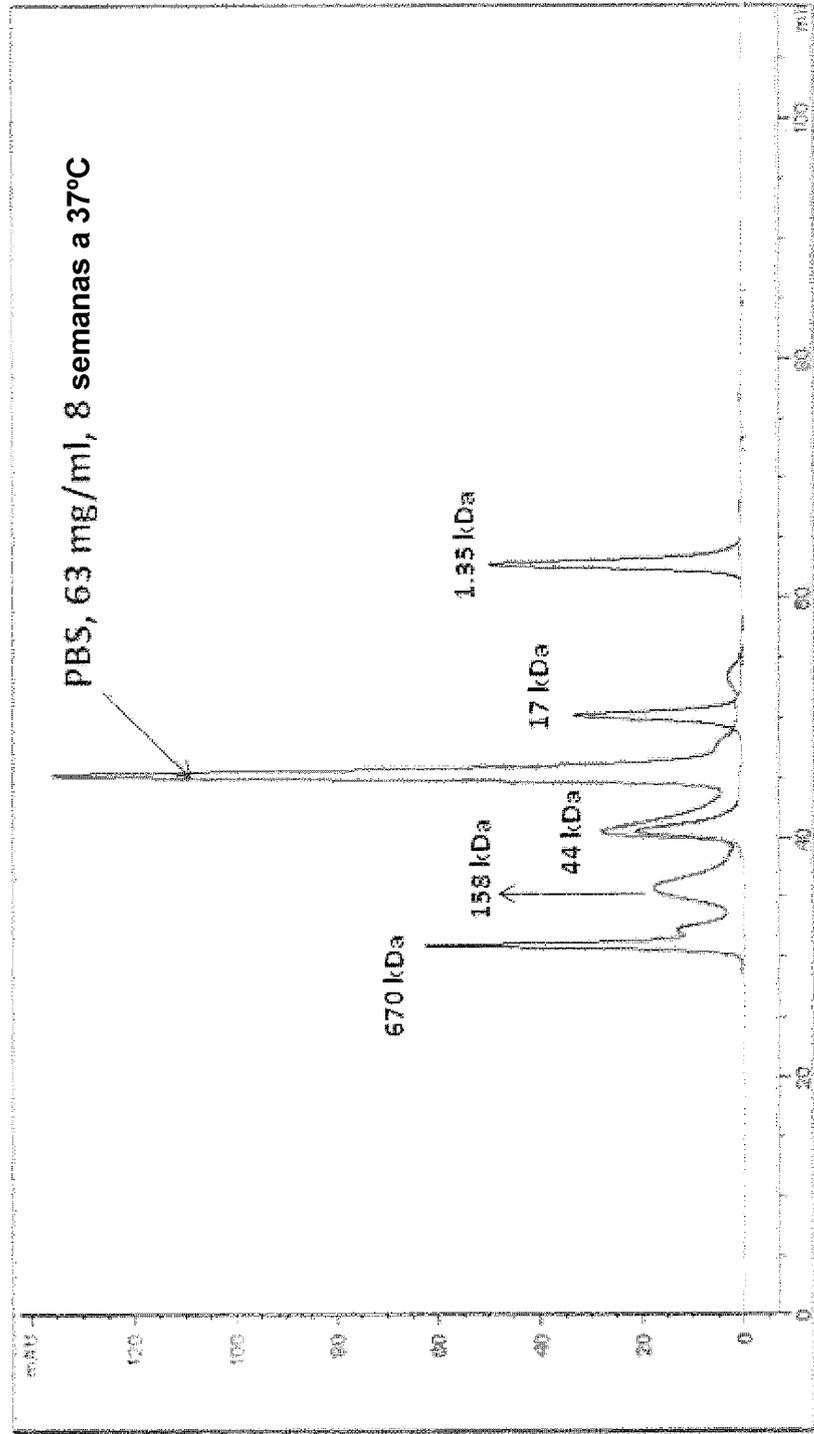


Figura 4

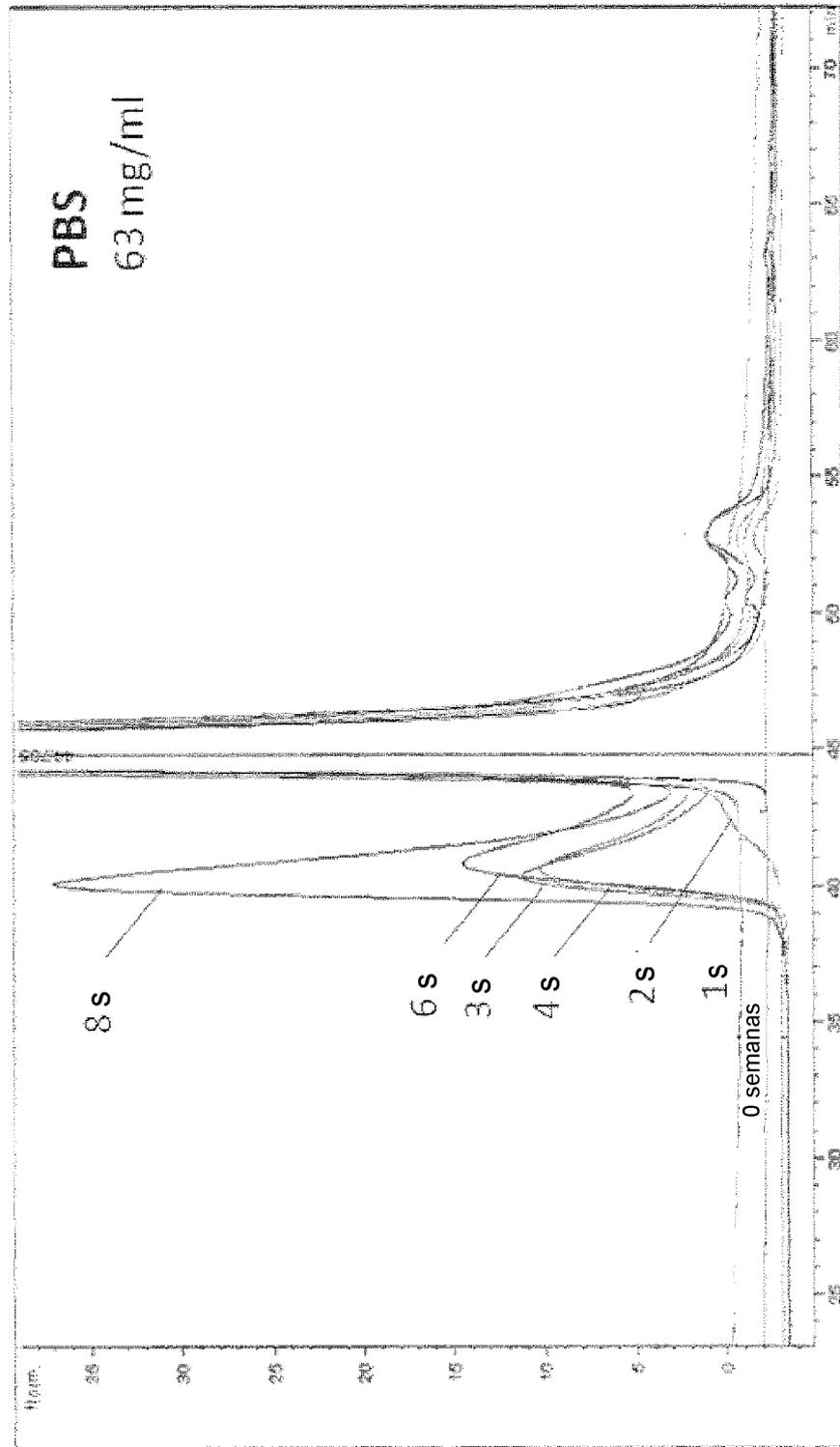


Figura 5

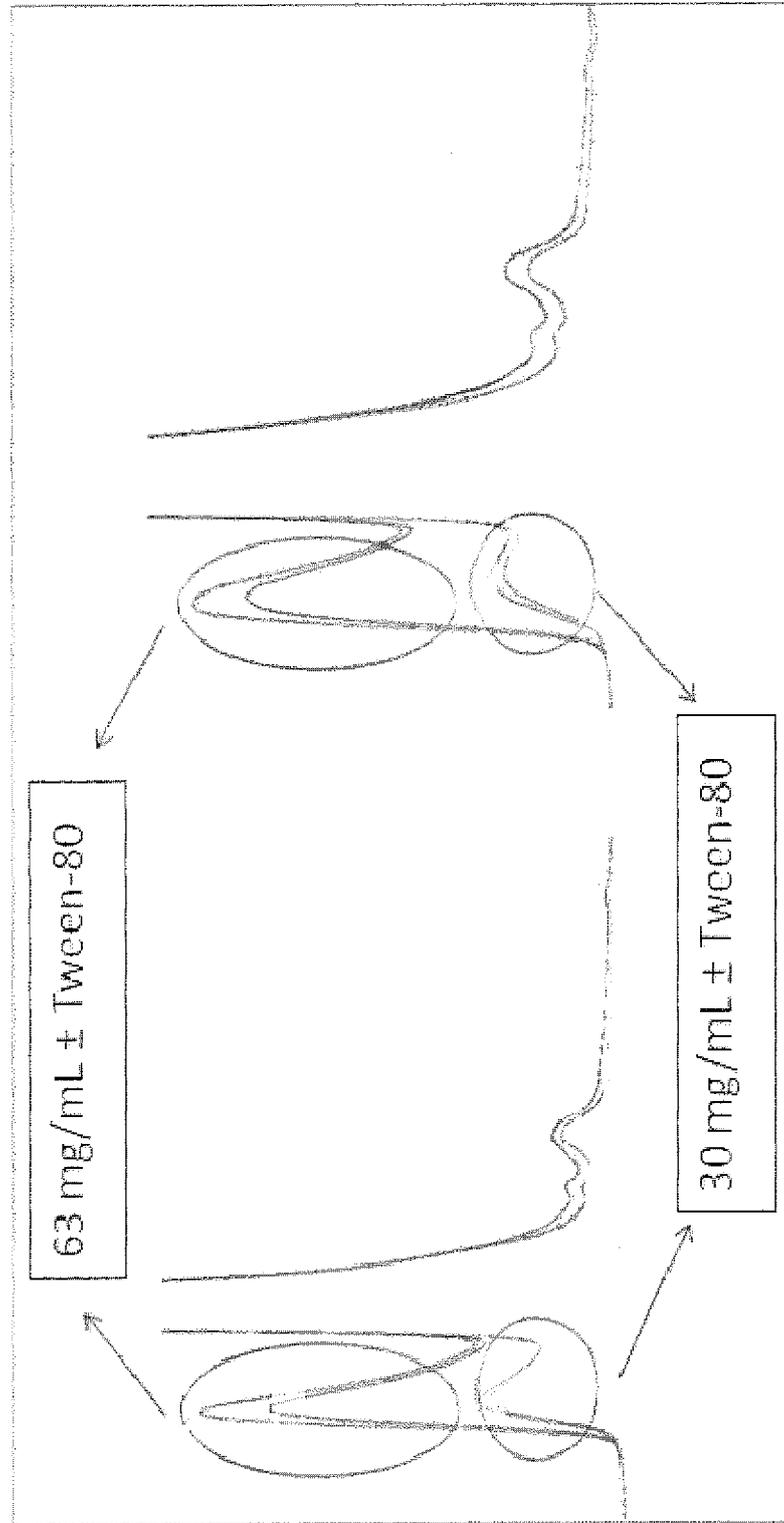
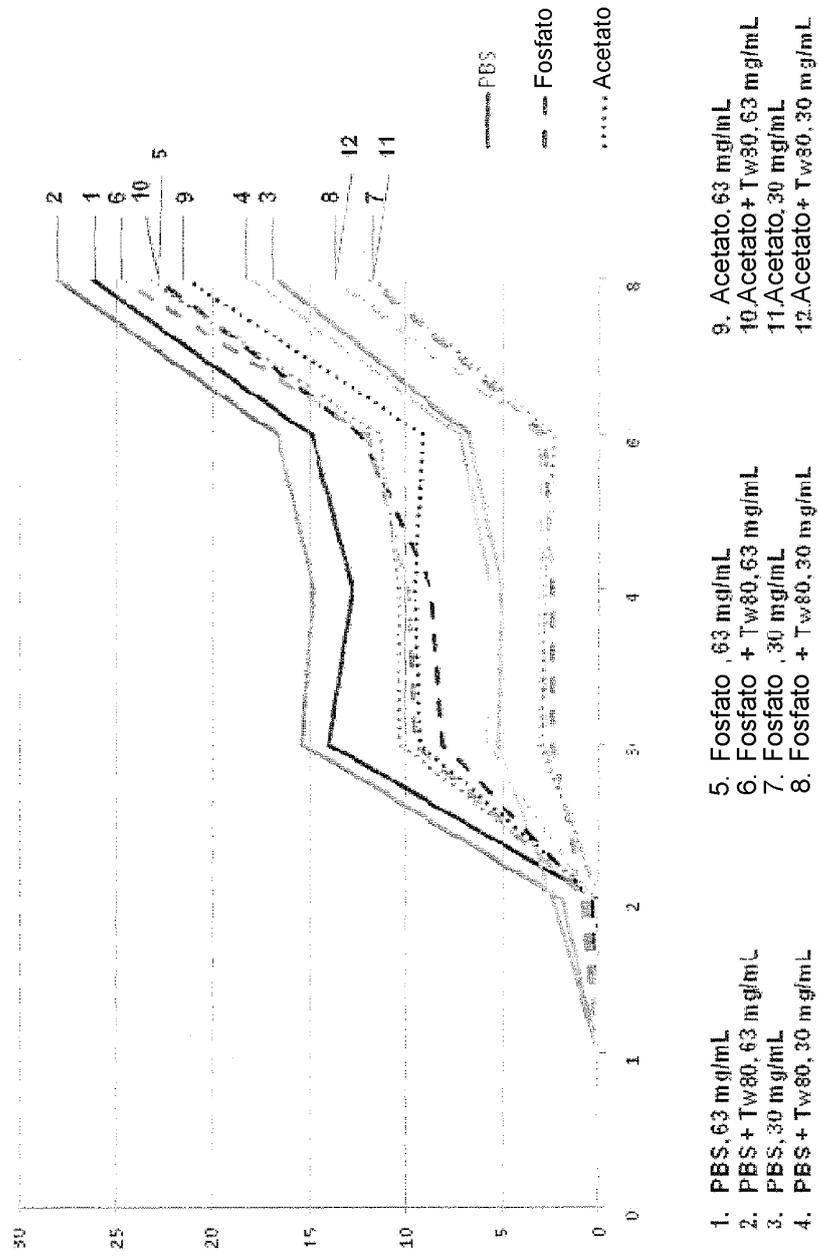


Figura 6

SEC: % de pico previo (dímeros) en diferentes tampones



- 1. PBS, 63 mg/mL
- 2. PBS + Tw80, 63 mg/mL
- 3. PBS, 30 mg/mL
- 4. PBS + Tw80, 30 mg/mL

- 5. Fosfato, 63 mg/mL
- 6. Fosfato + Tw80, 63 mg/mL
- 7. Fosfato, 30 mg/mL
- 8. Fosfato + Tw80, 30 mg/mL

- 9. Acetato, 63 mg/mL
- 10. Acetato + Tw80, 63 mg/mL
- 11. Acetato, 30 mg/mL
- 12. Acetato + Tw80, 30 mg/mL

Figura 7

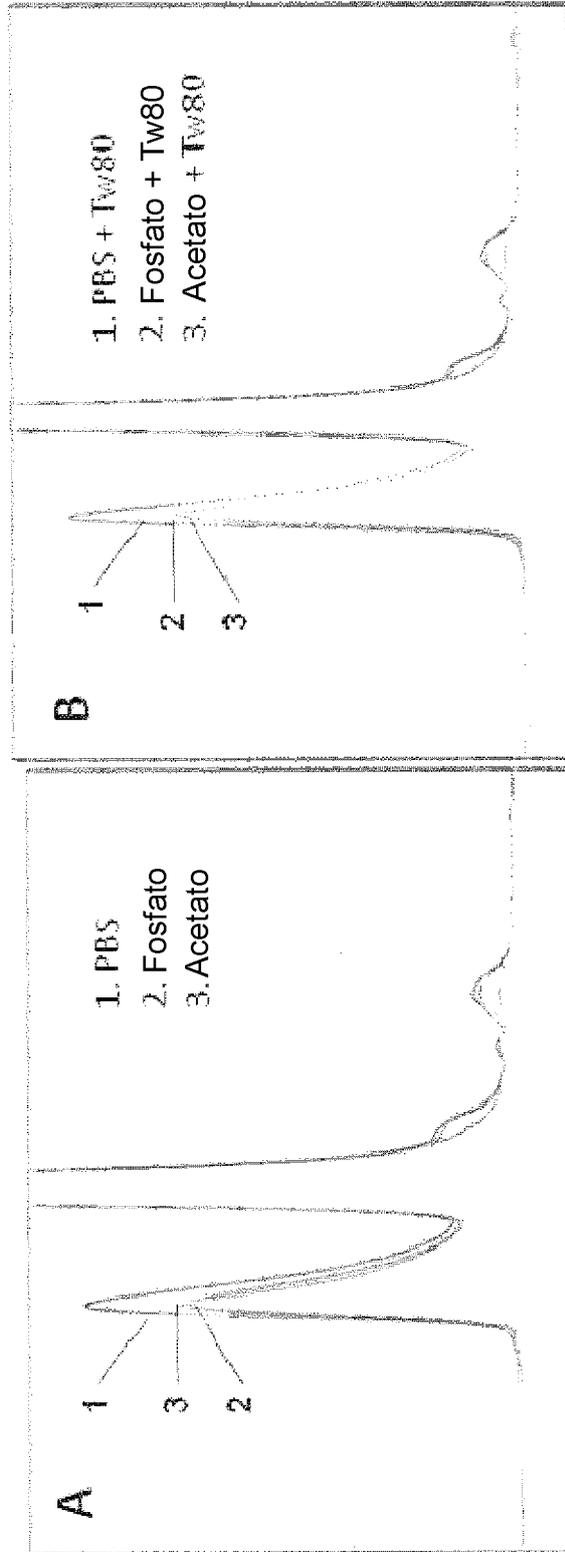
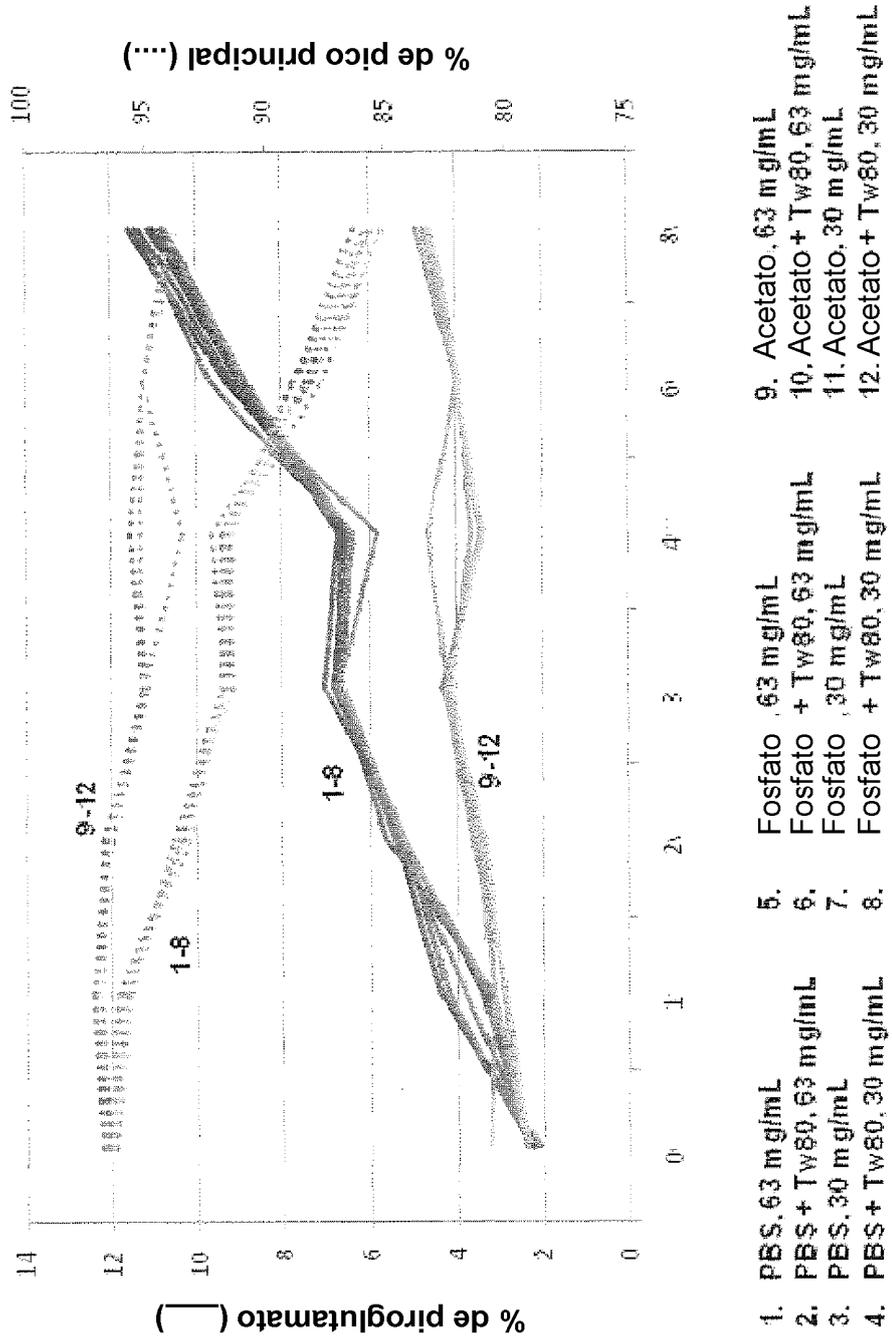


Figura 8



- 1. PBS, 63 mg/mL
- 2. PBS + Tw80, 63 mg/mL
- 3. PBS, 30 mg/mL
- 4. PBS + Tw80, 30 mg/mL
- 5. Fosfato, 63 mg/mL
- 6. Fosfato + Tw80, 63 mg/mL
- 7. Fosfato, 30 mg/mL
- 8. Fosfato + Tw80, 30 mg/mL
- 9. Acetato, 63 mg/mL
- 10. Acetato + Tw80, 63 mg/mL
- 11. Acetato, 30 mg/mL
- 12. Acetato + Tw80, 30 mg/mL

Figura 9 (A)

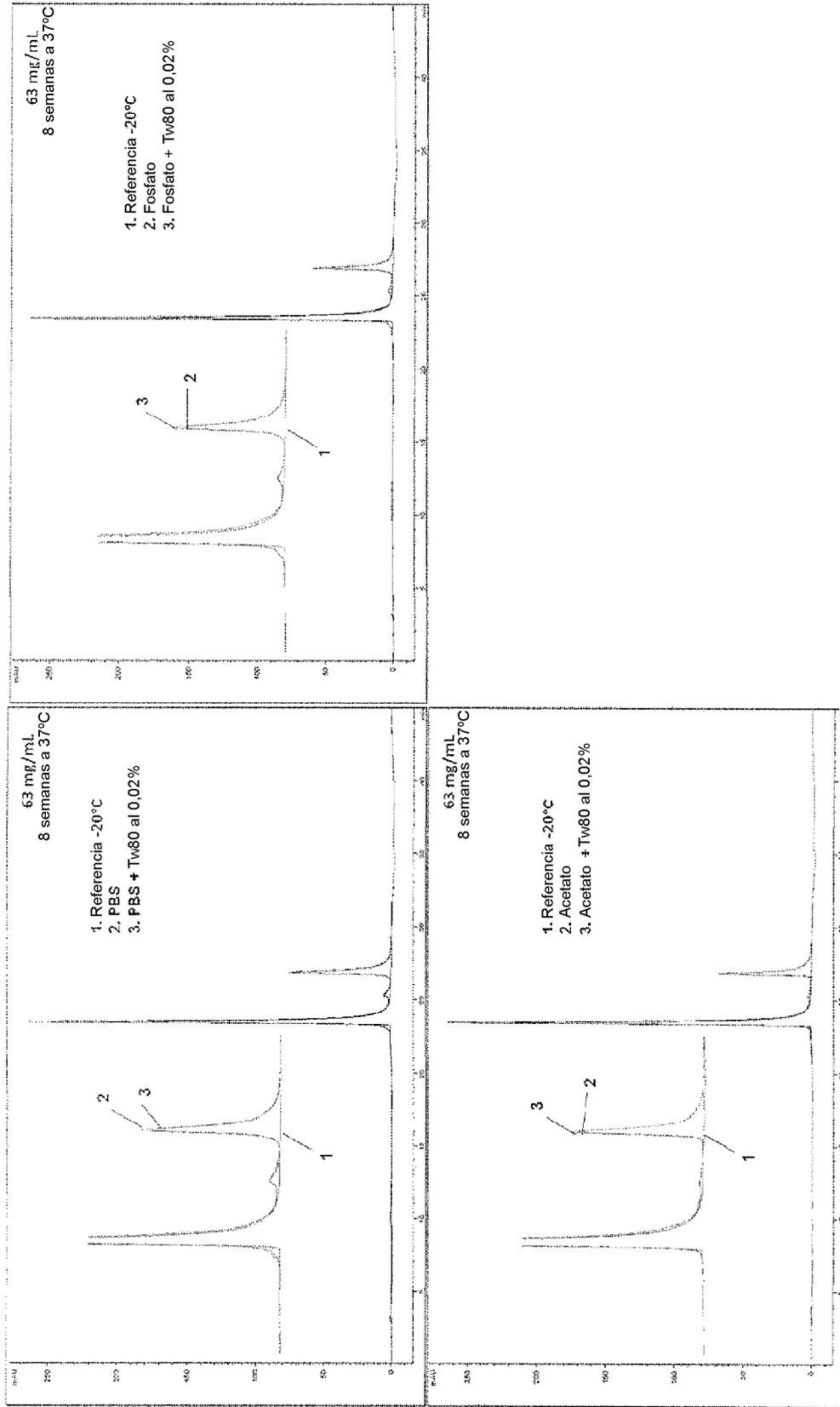


Figura 9 (B)

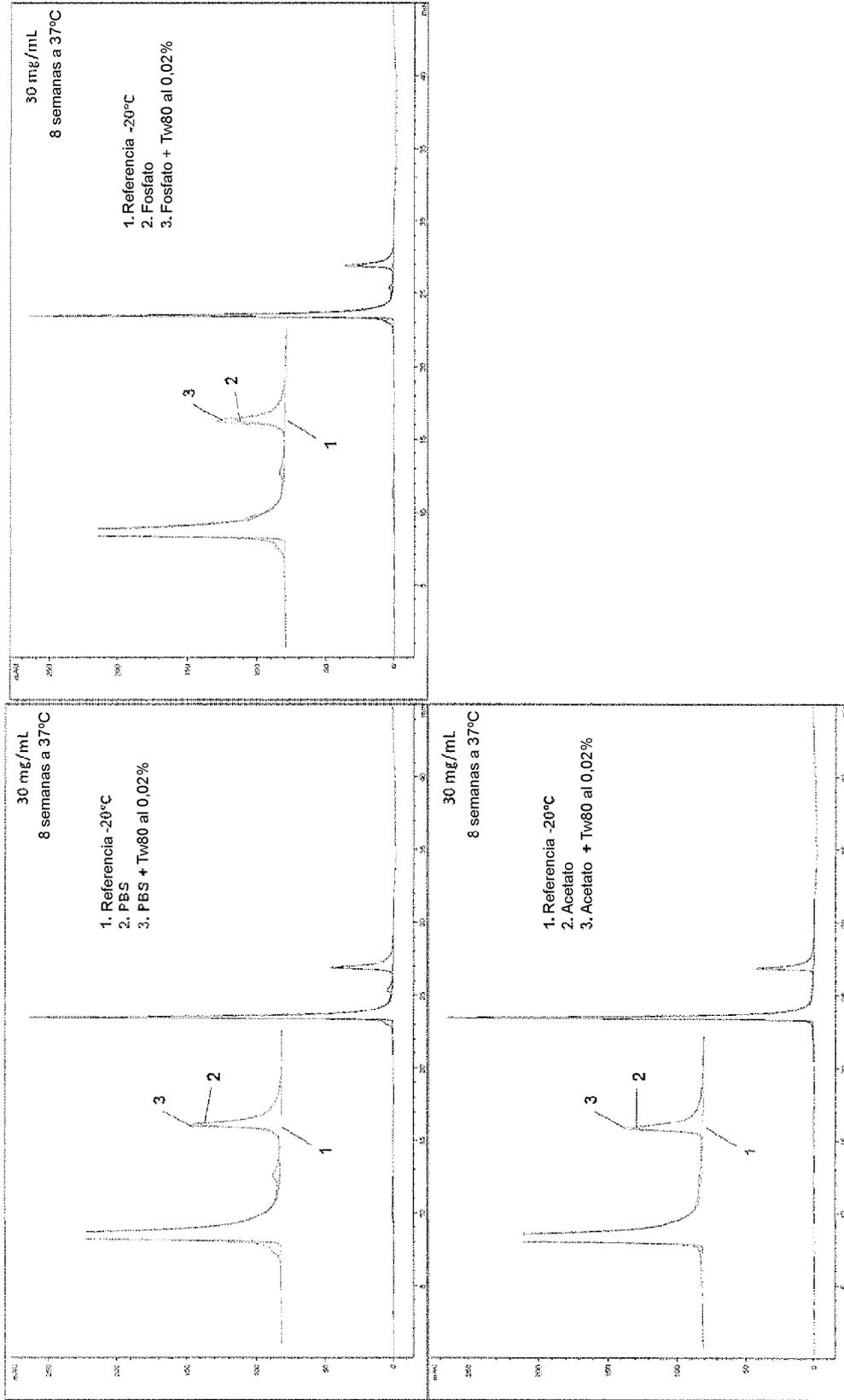


Figura 10 (A)

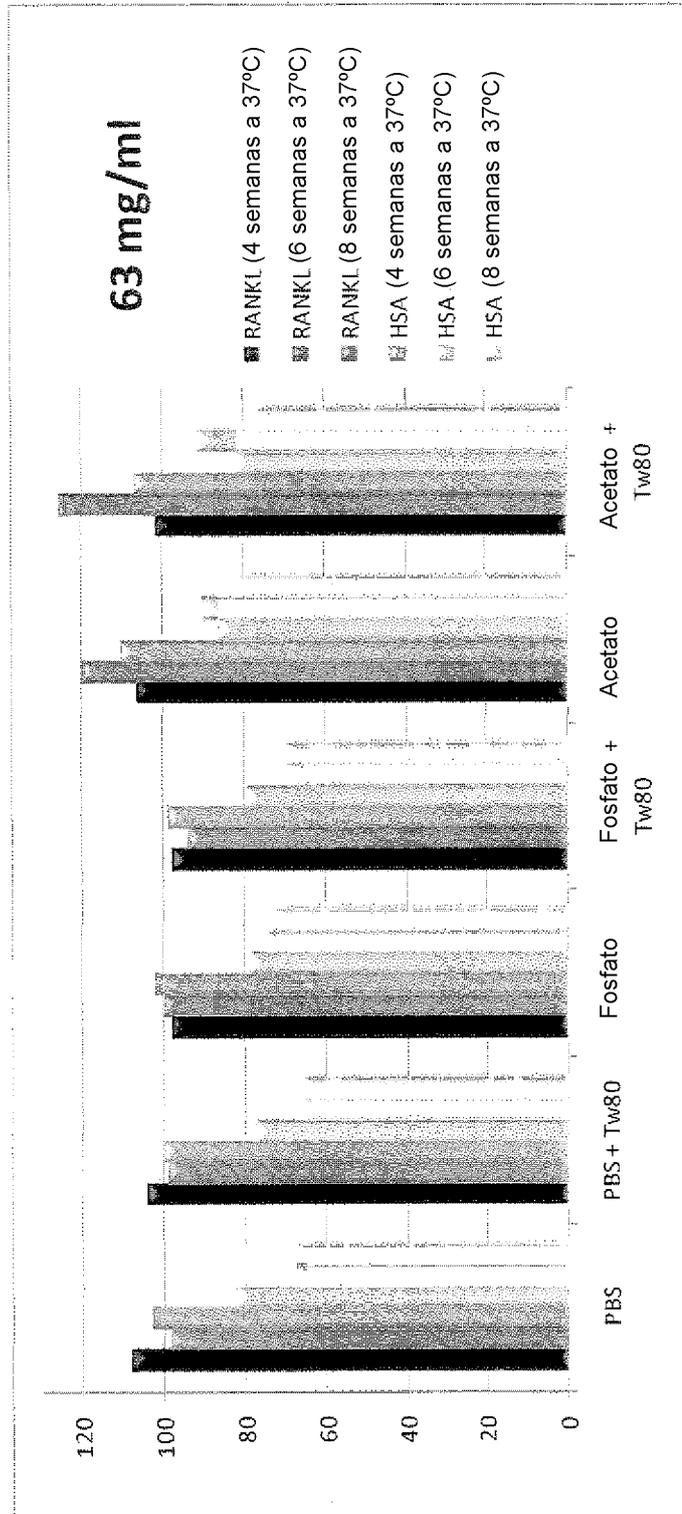


Figura 10 (B)

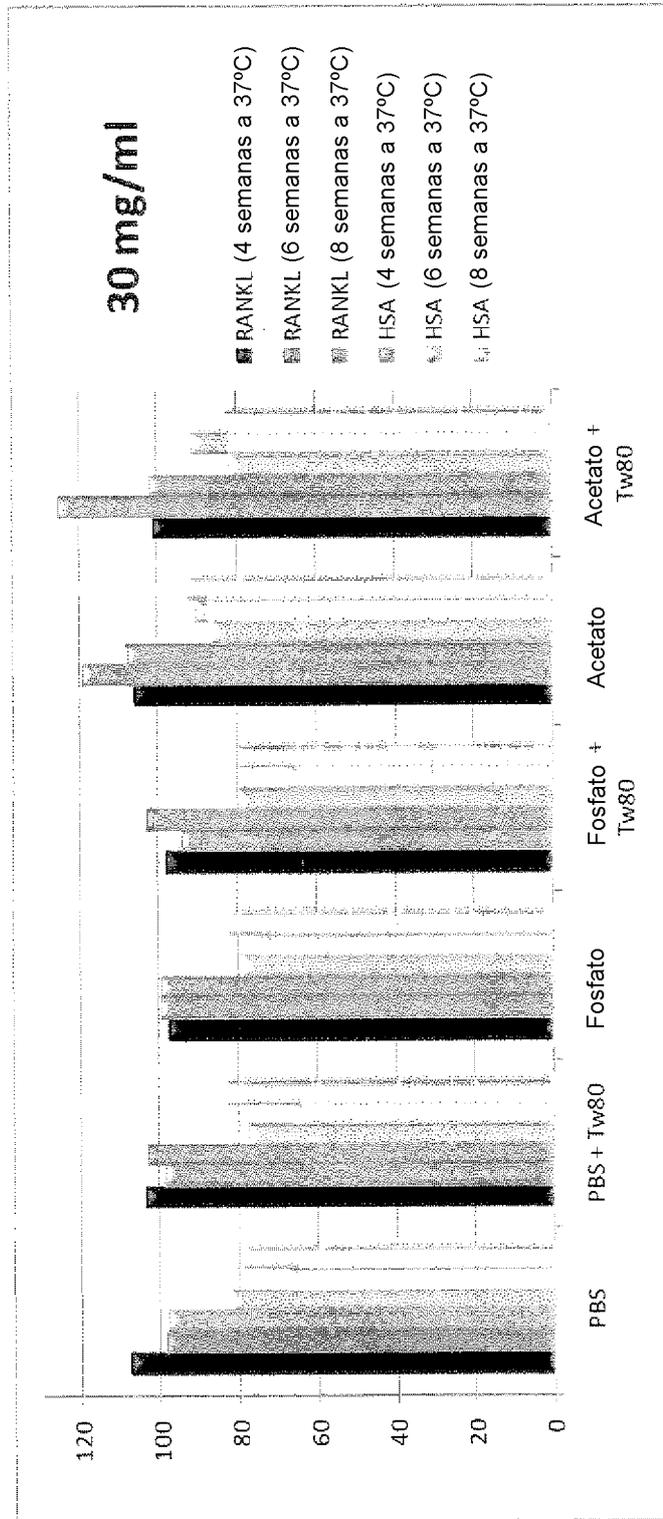


Figura 11

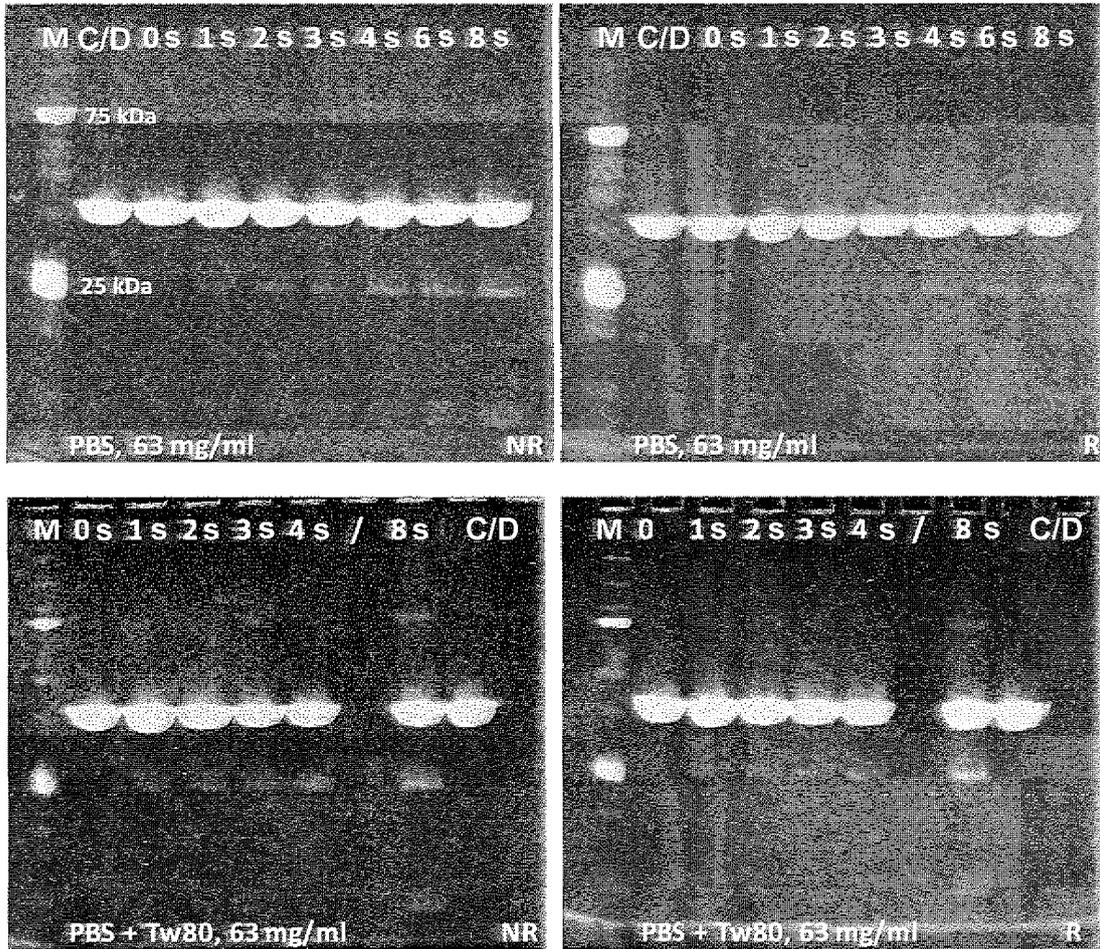


Figura 11: continuación

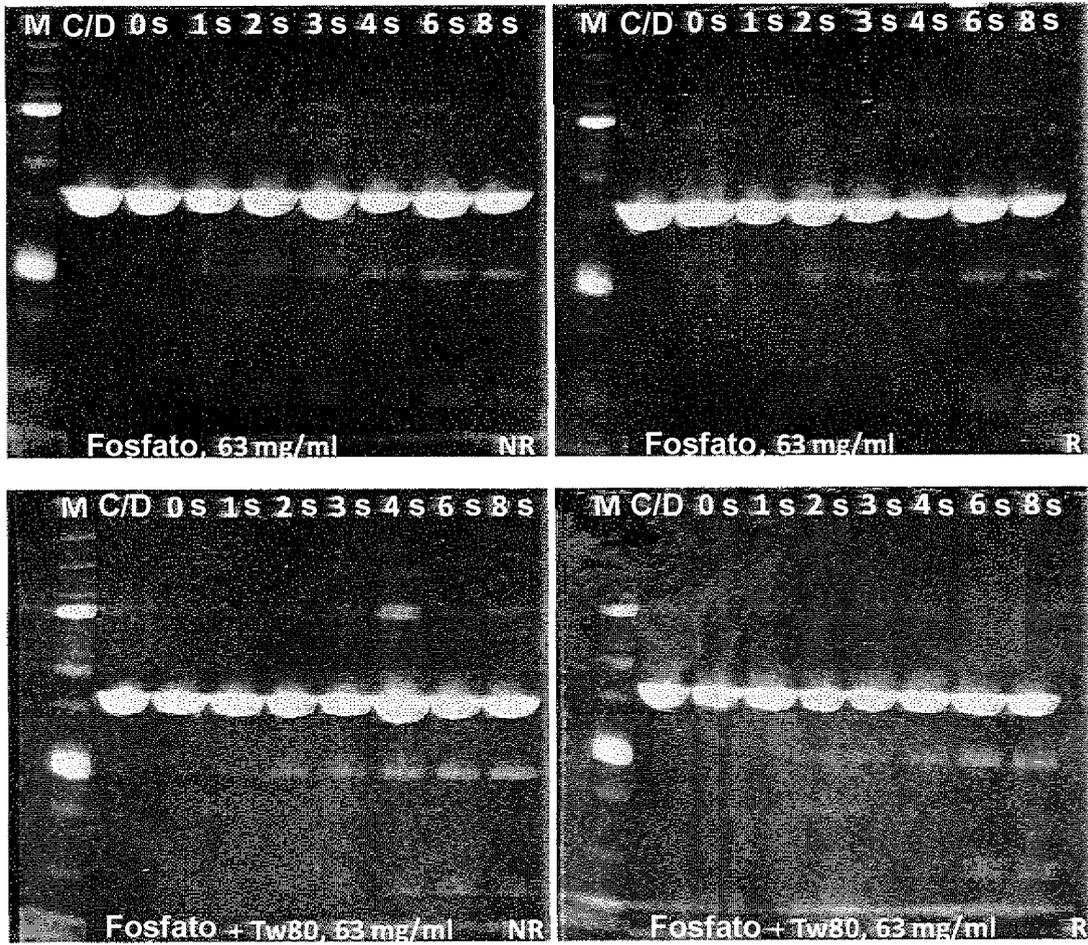


Figura 11: continuación

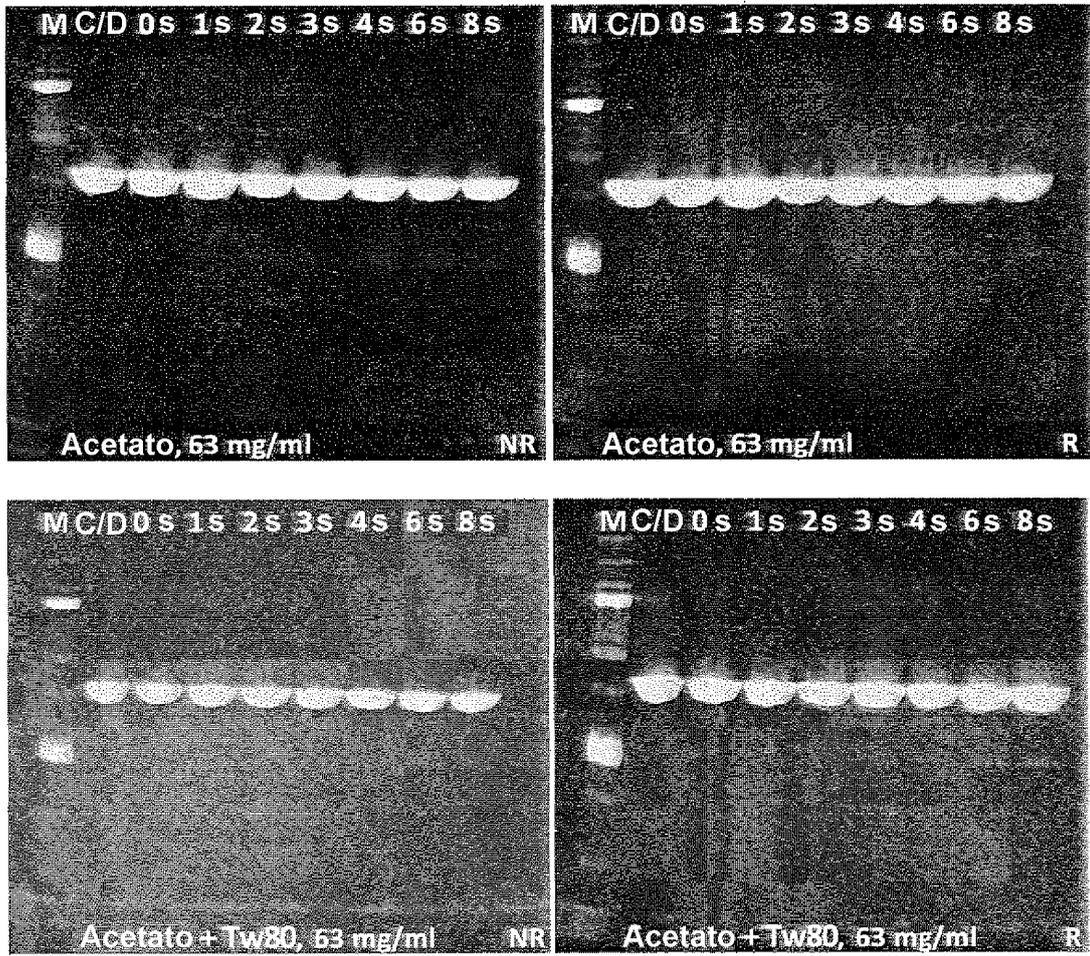


Figura 12

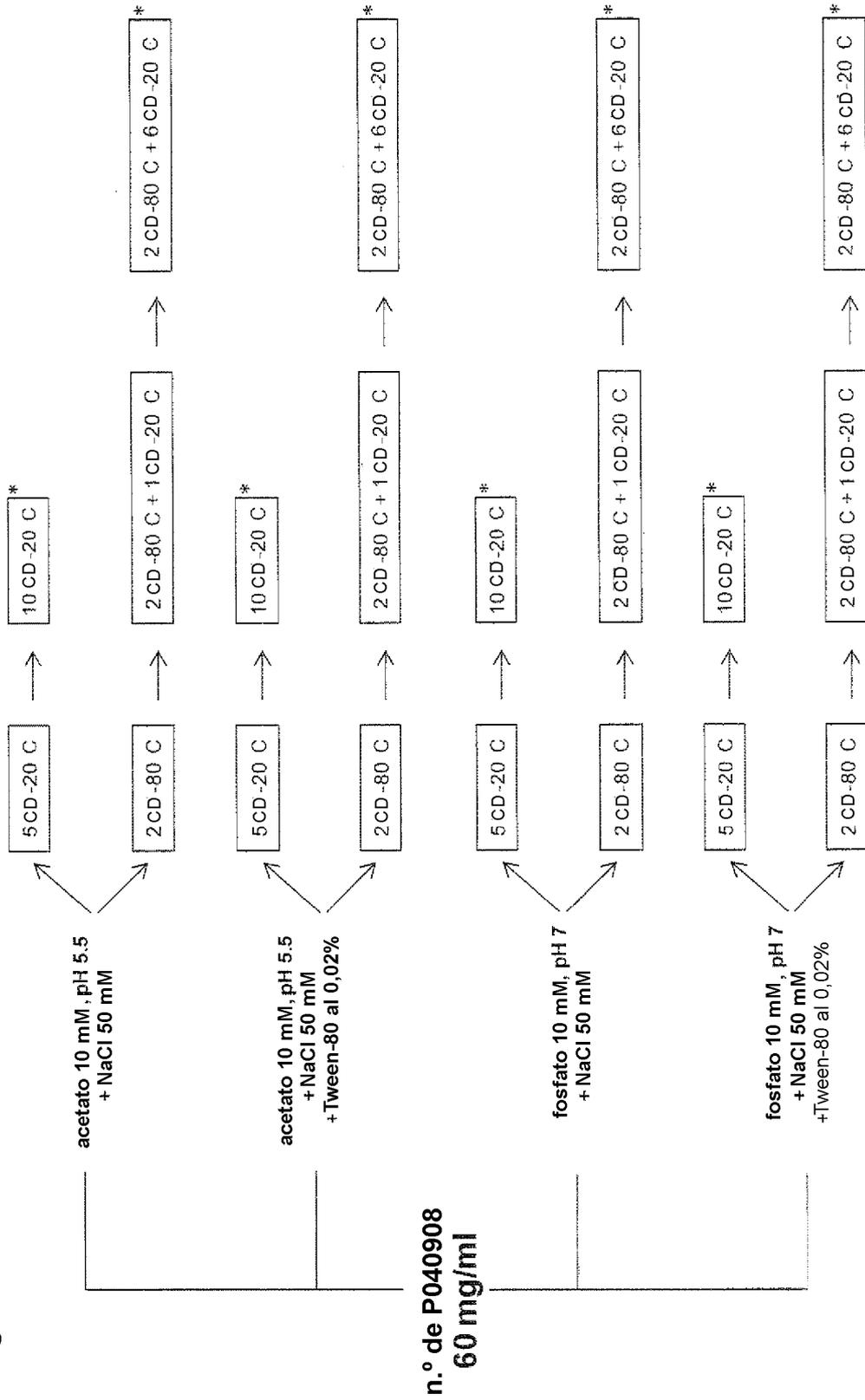


Figura 13 (A)

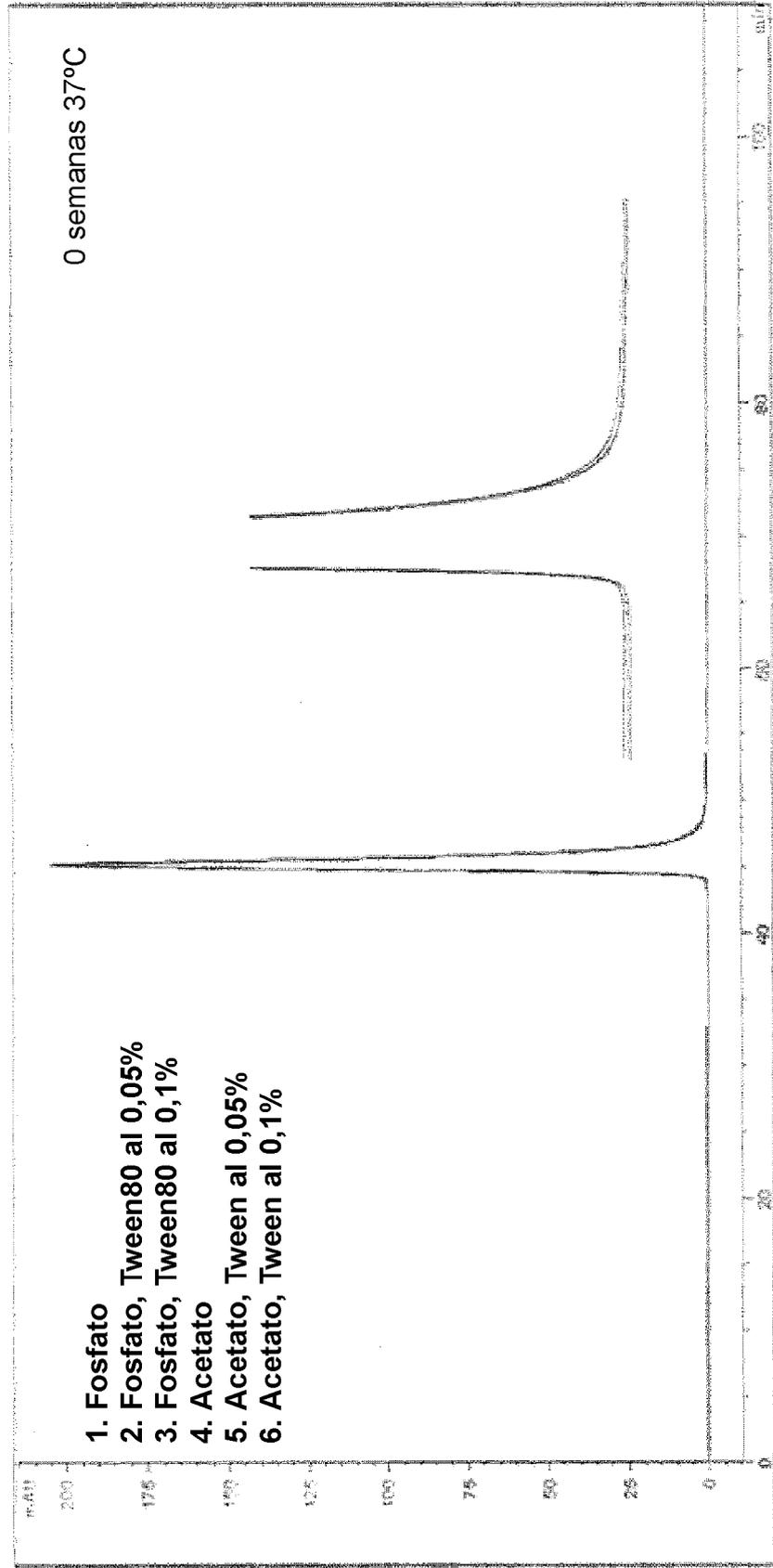


Figura 13 (B)

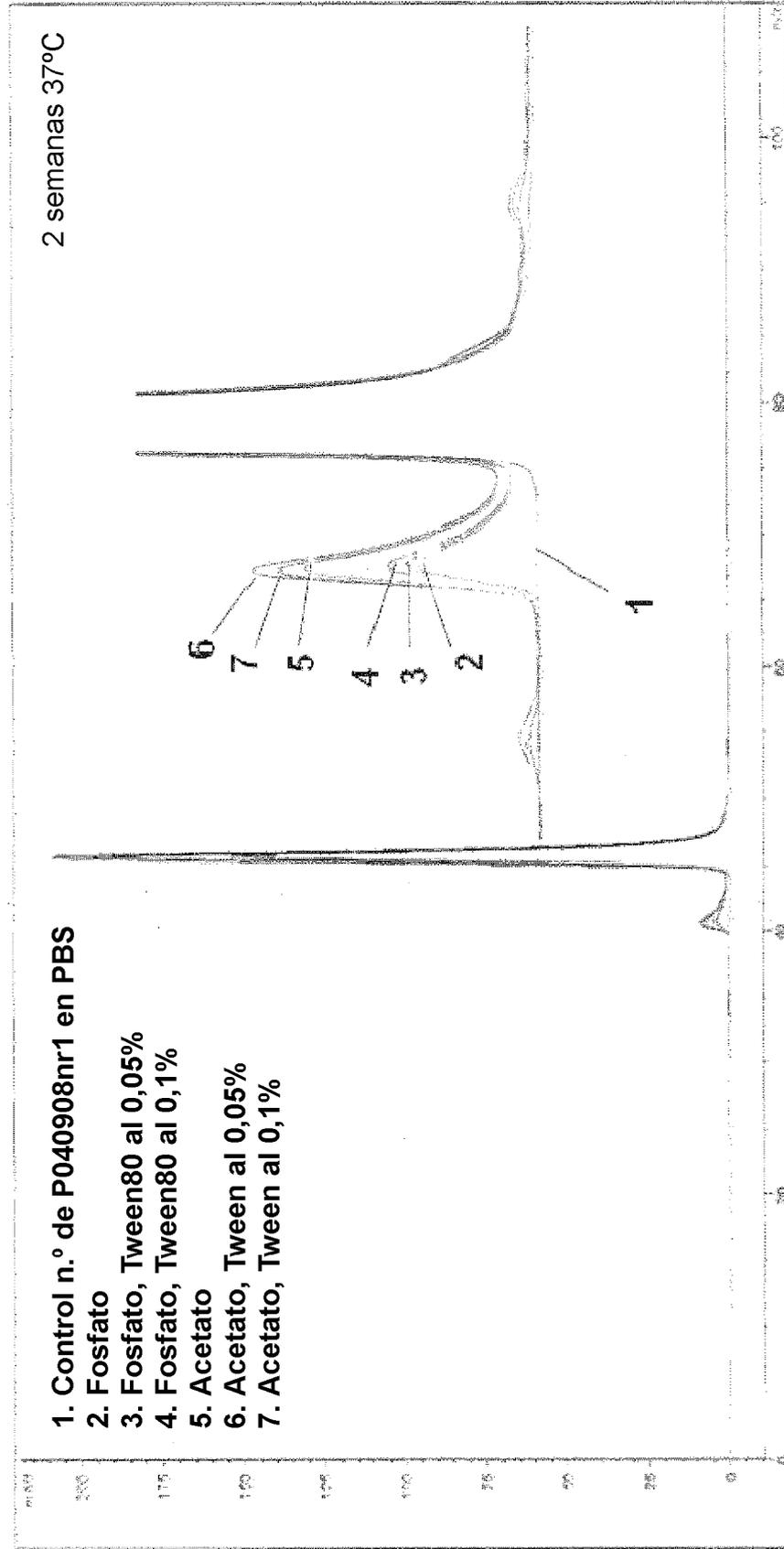


Figura 13 (C)

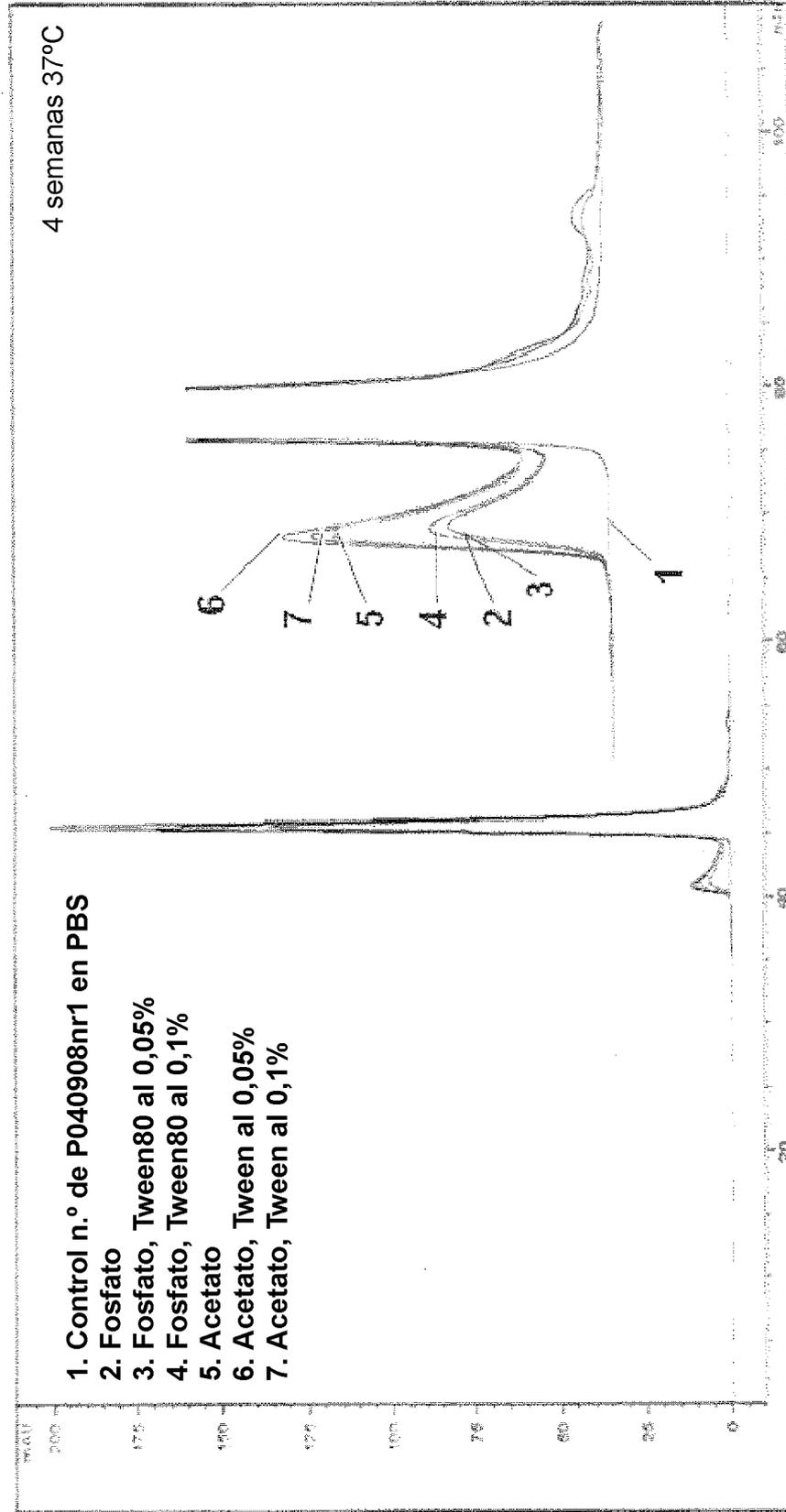


Figura 14

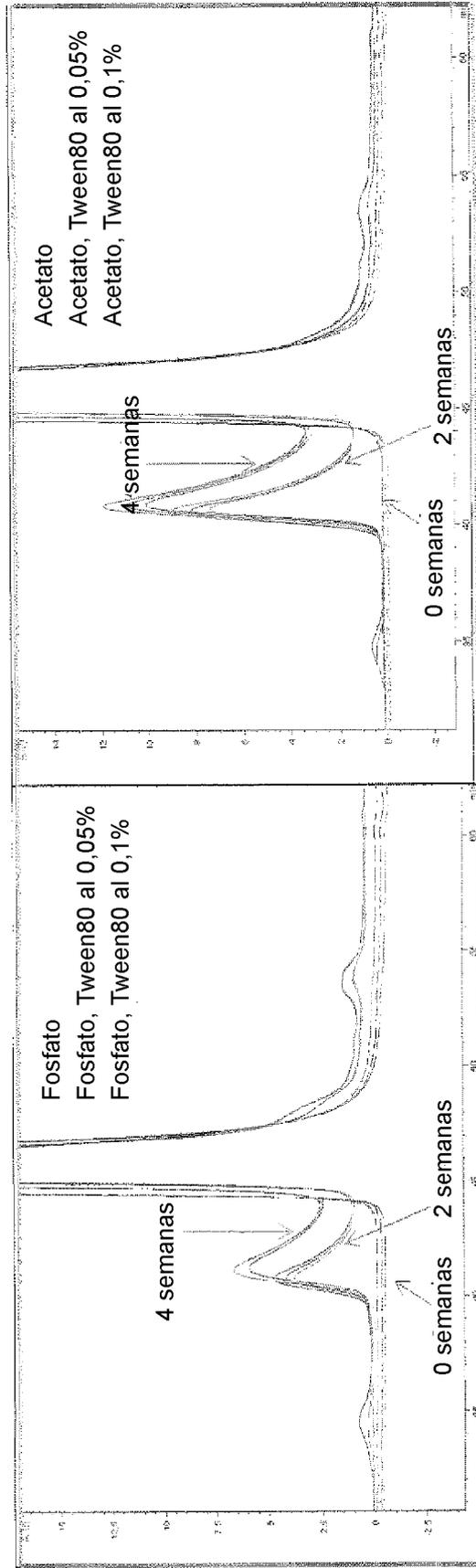


Figura 15 (A)

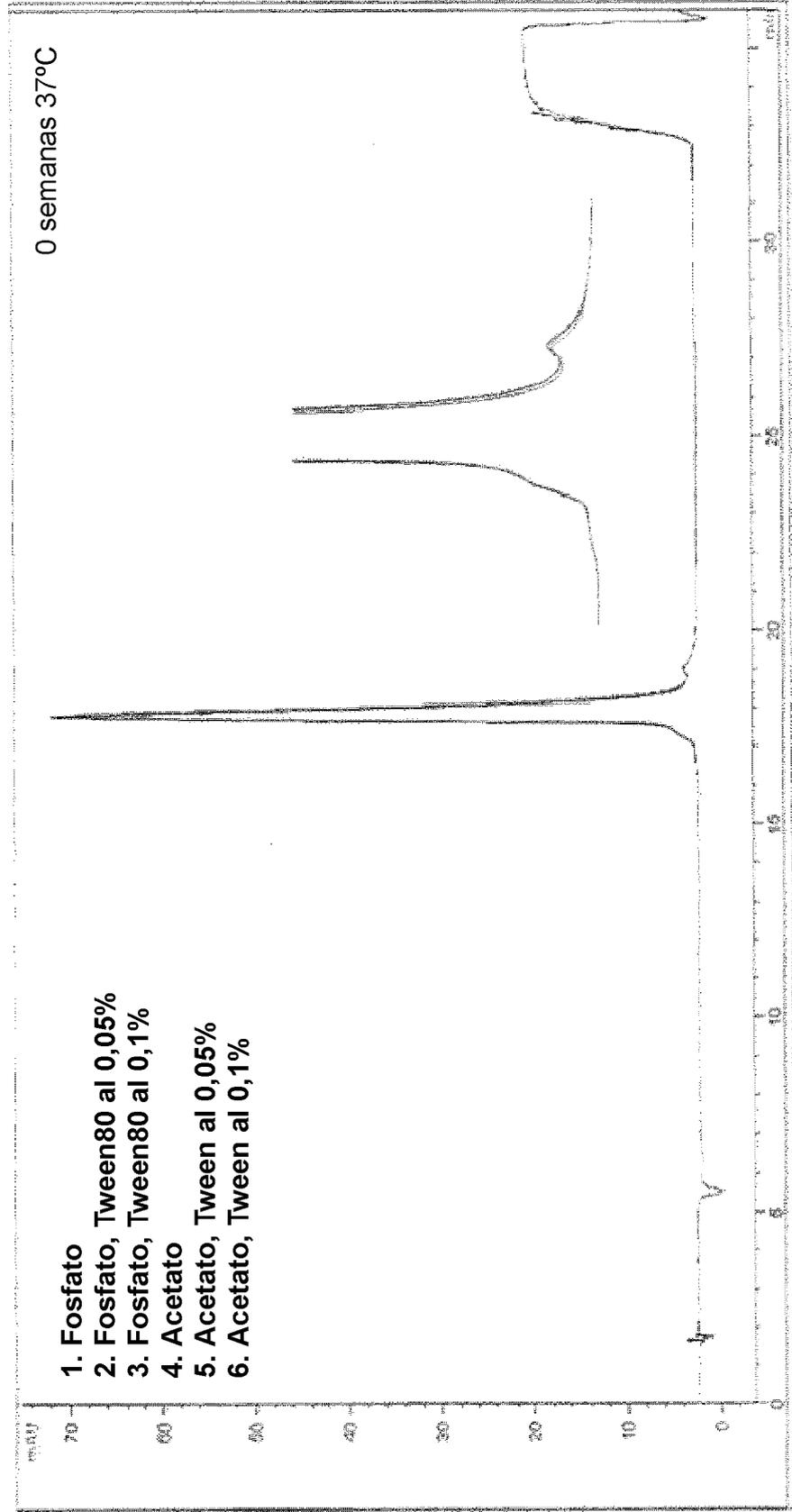


Figura 15 (B)

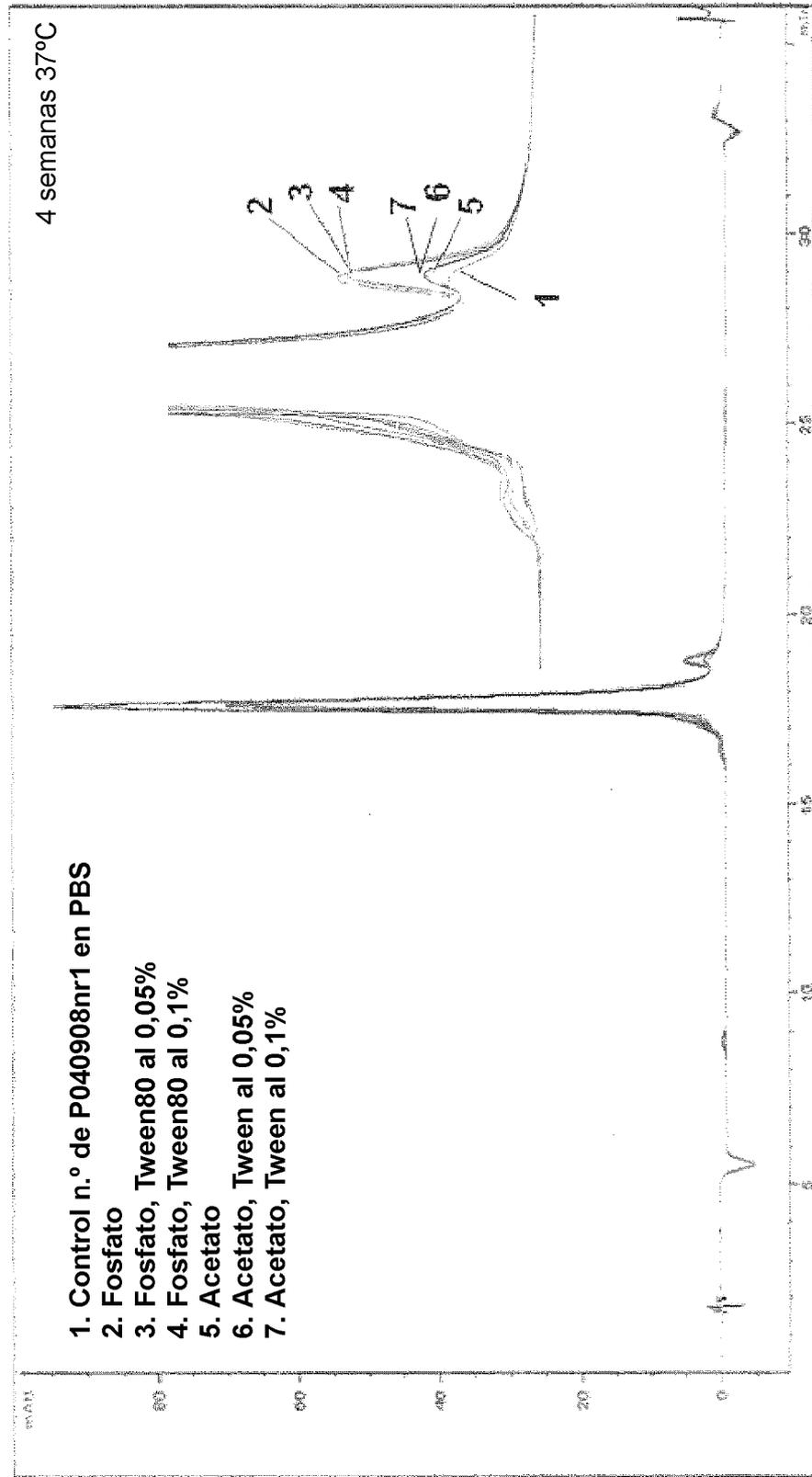


Figura 16

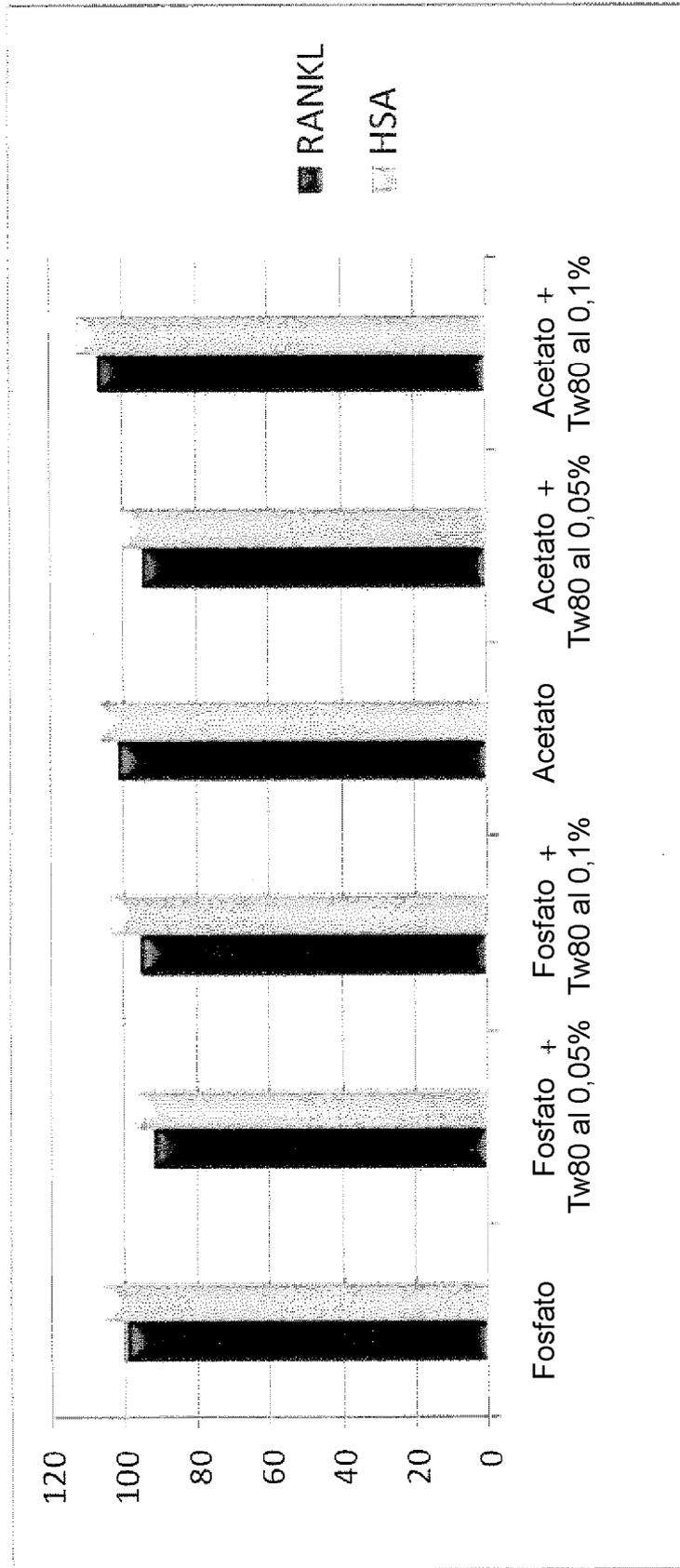


Figura 17

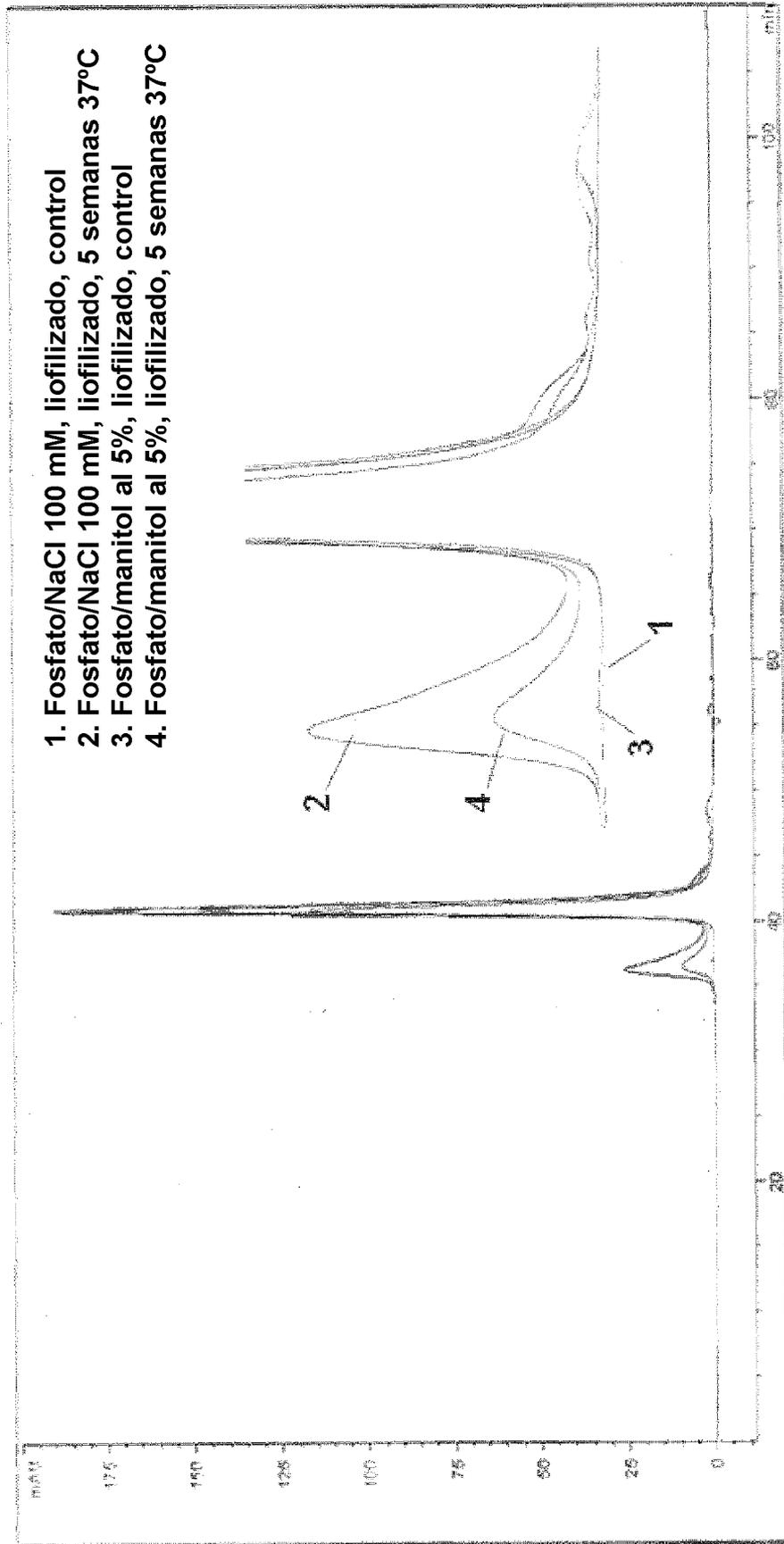


Figura 18(A)

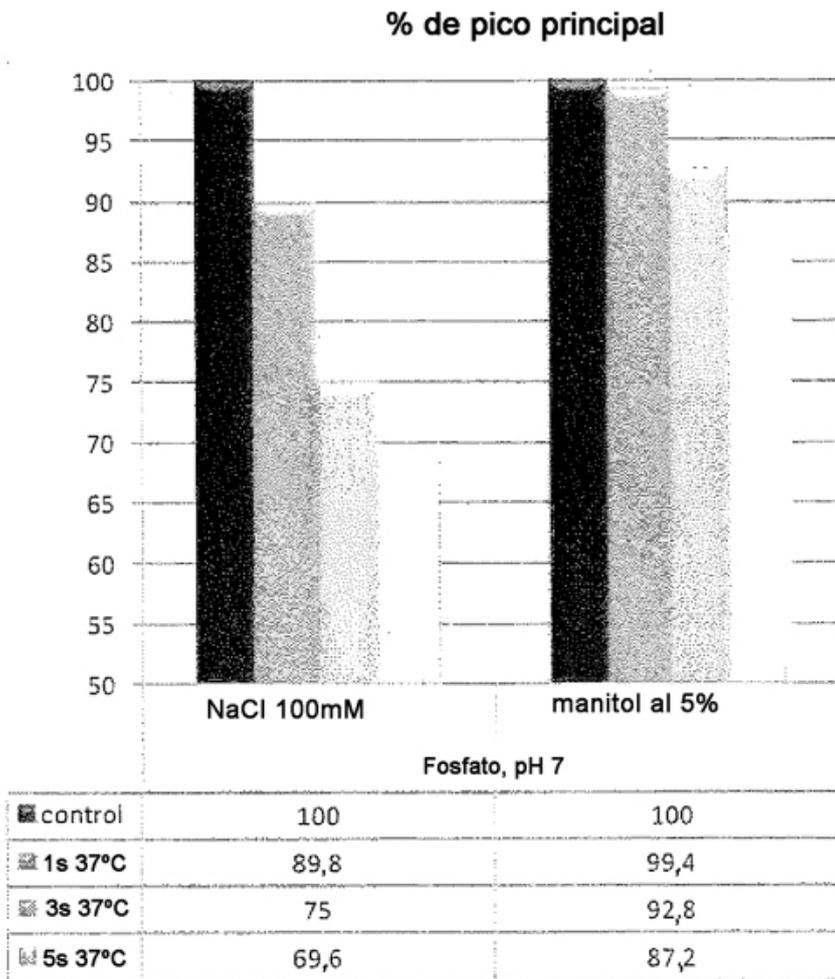


Figura 18(B)

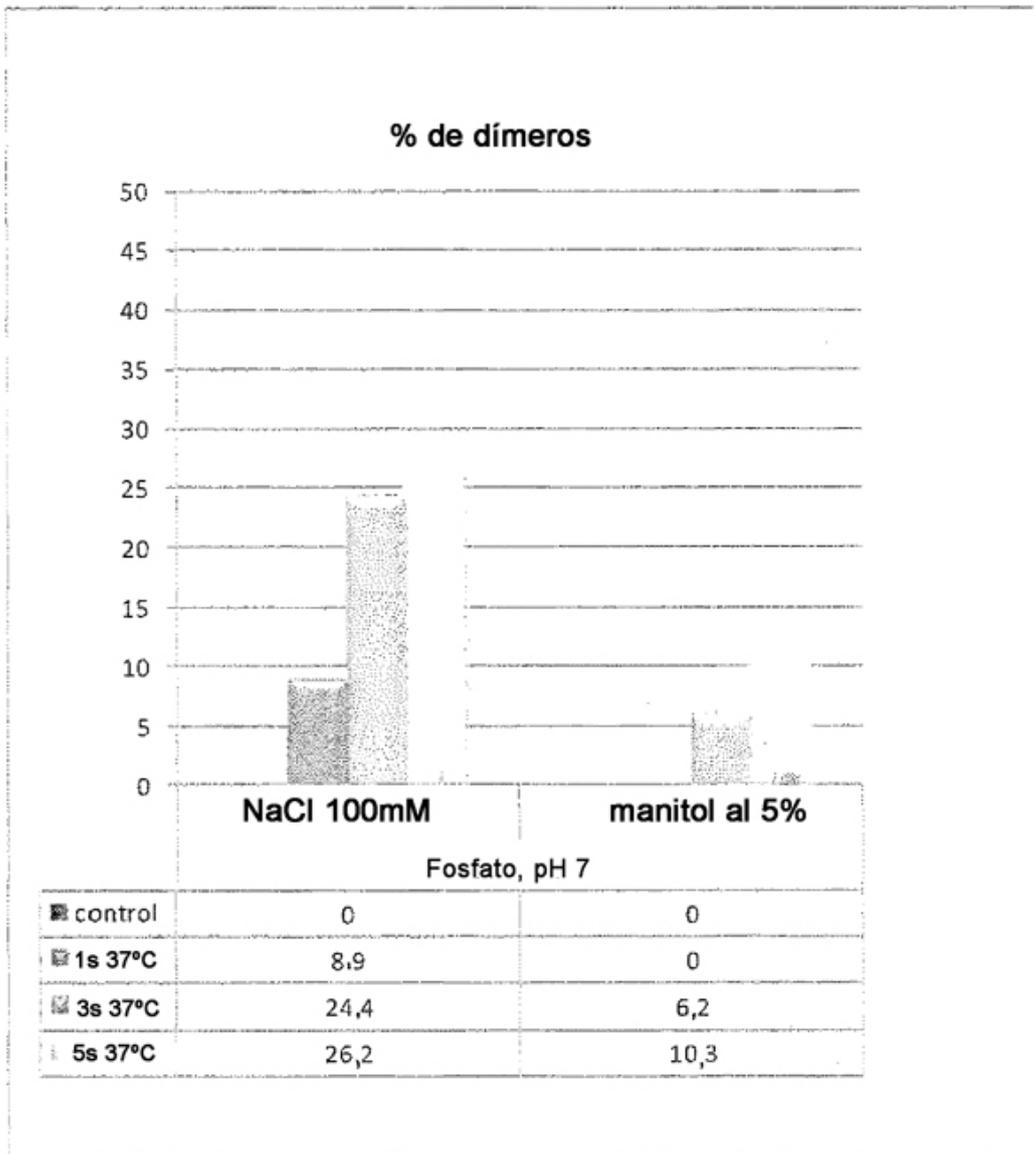


Figura 19

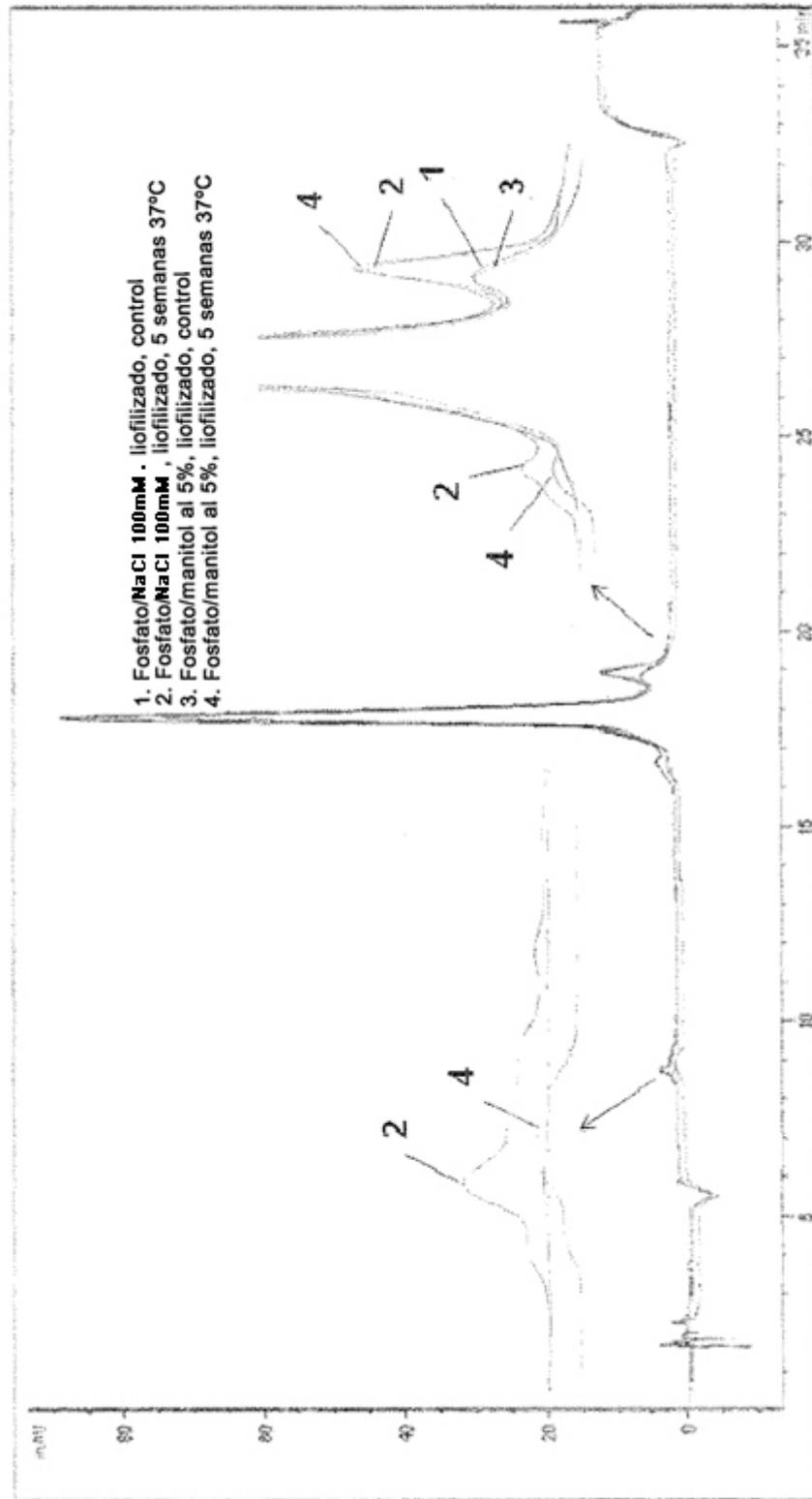


Figura 20

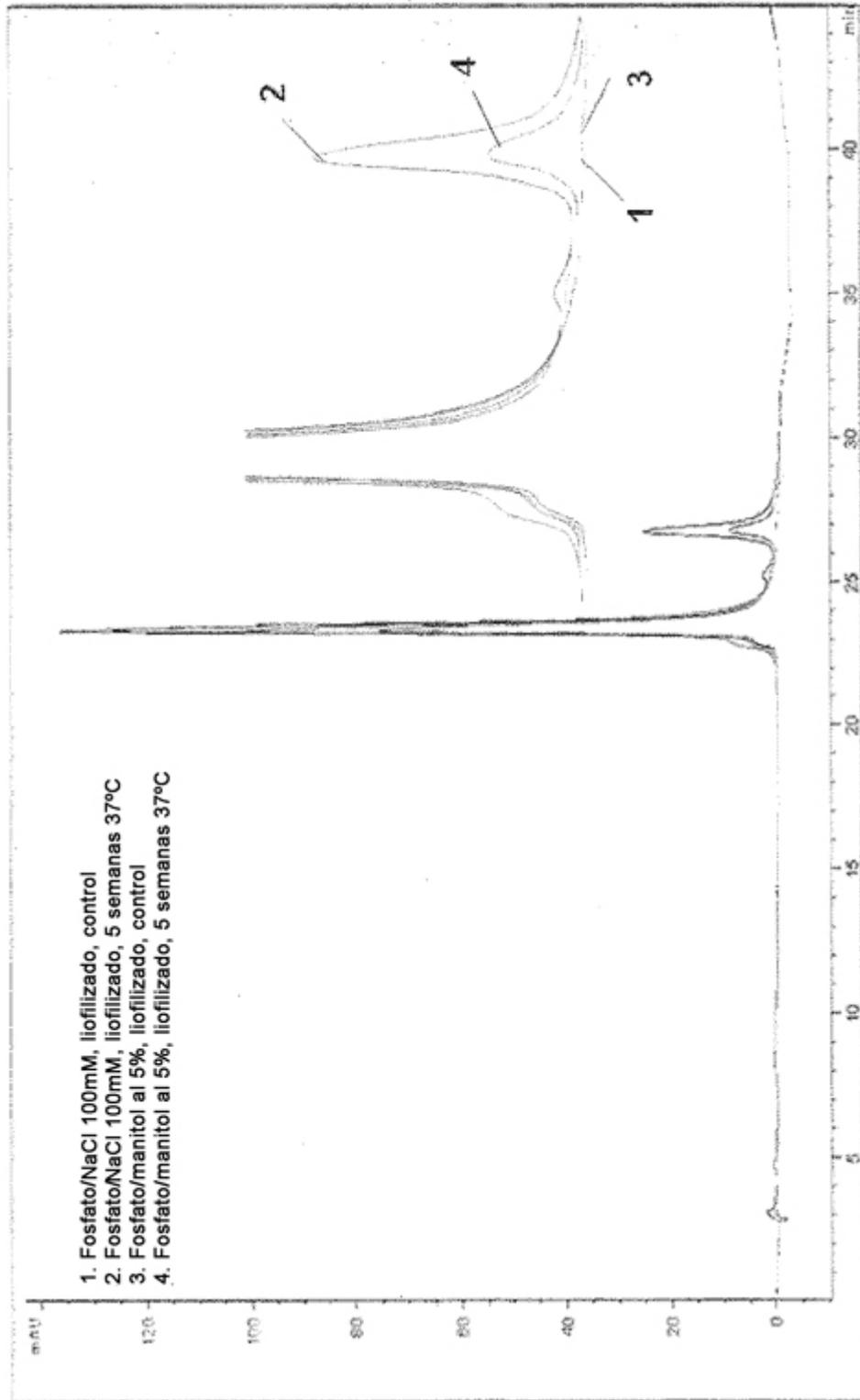


Figura 21

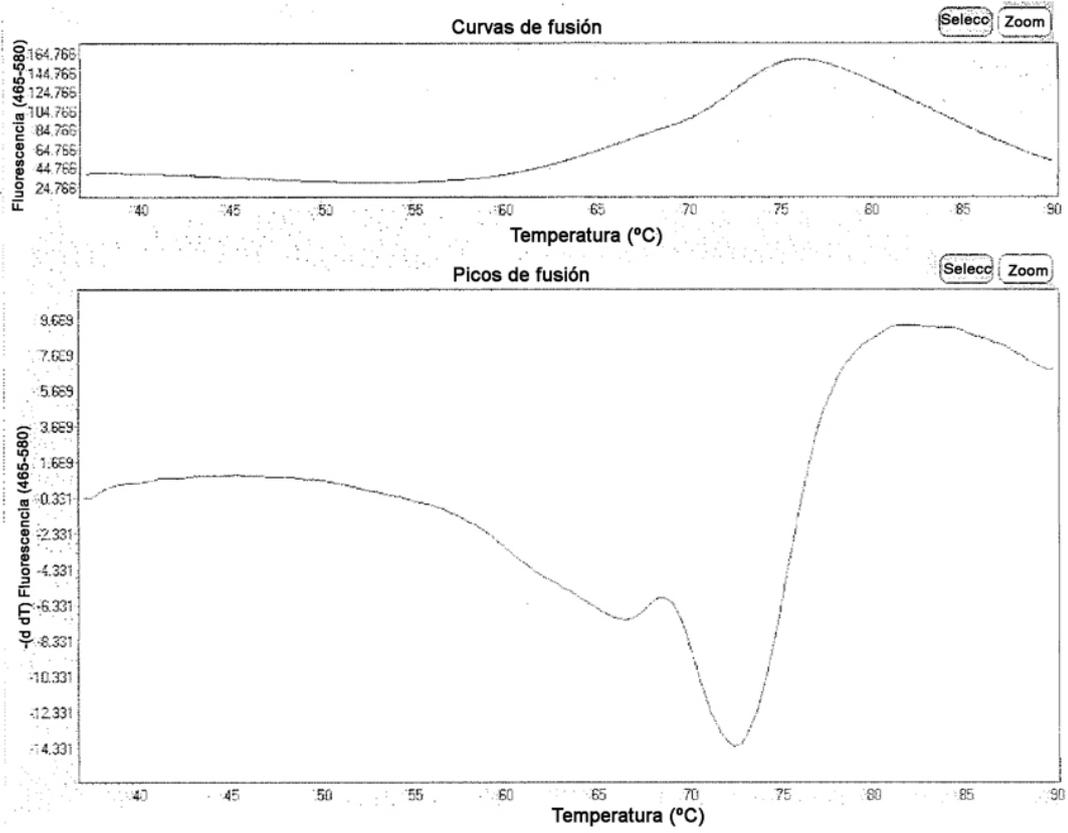
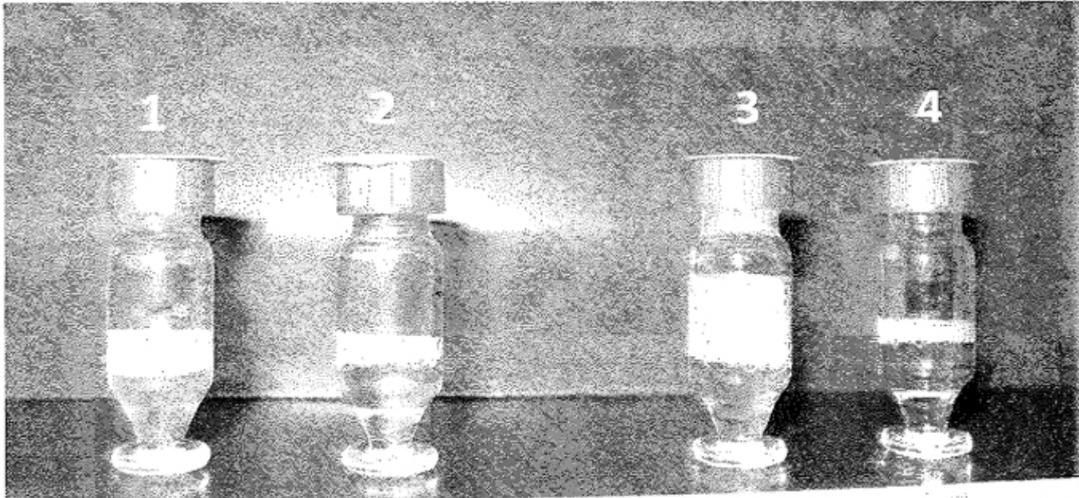


Figura 22



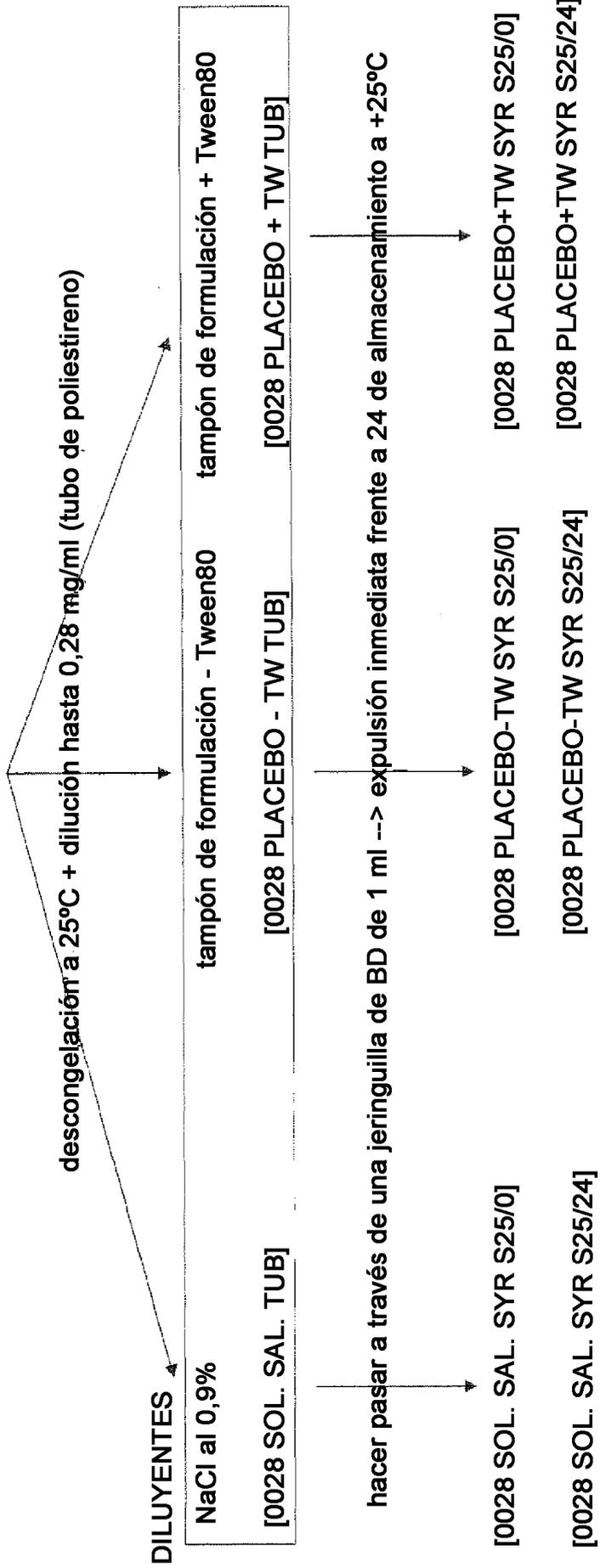
Muestras:

1. RANKL008 diluido hasta 5 mg/ml sin Tween-80
2. RANKL008 diluido hasta 5 mg/ml con Tween-80 al 0,01%
3. RANKL008 sin diluir sin Tween-80
4. RANKL008 sin diluir con Tween-80 al 0,01%

Diluido/sin diluir	Sin Tween-80	Tween-80 al 0,01%
Diluido hasta 5mg/ml	Opaco (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 23

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



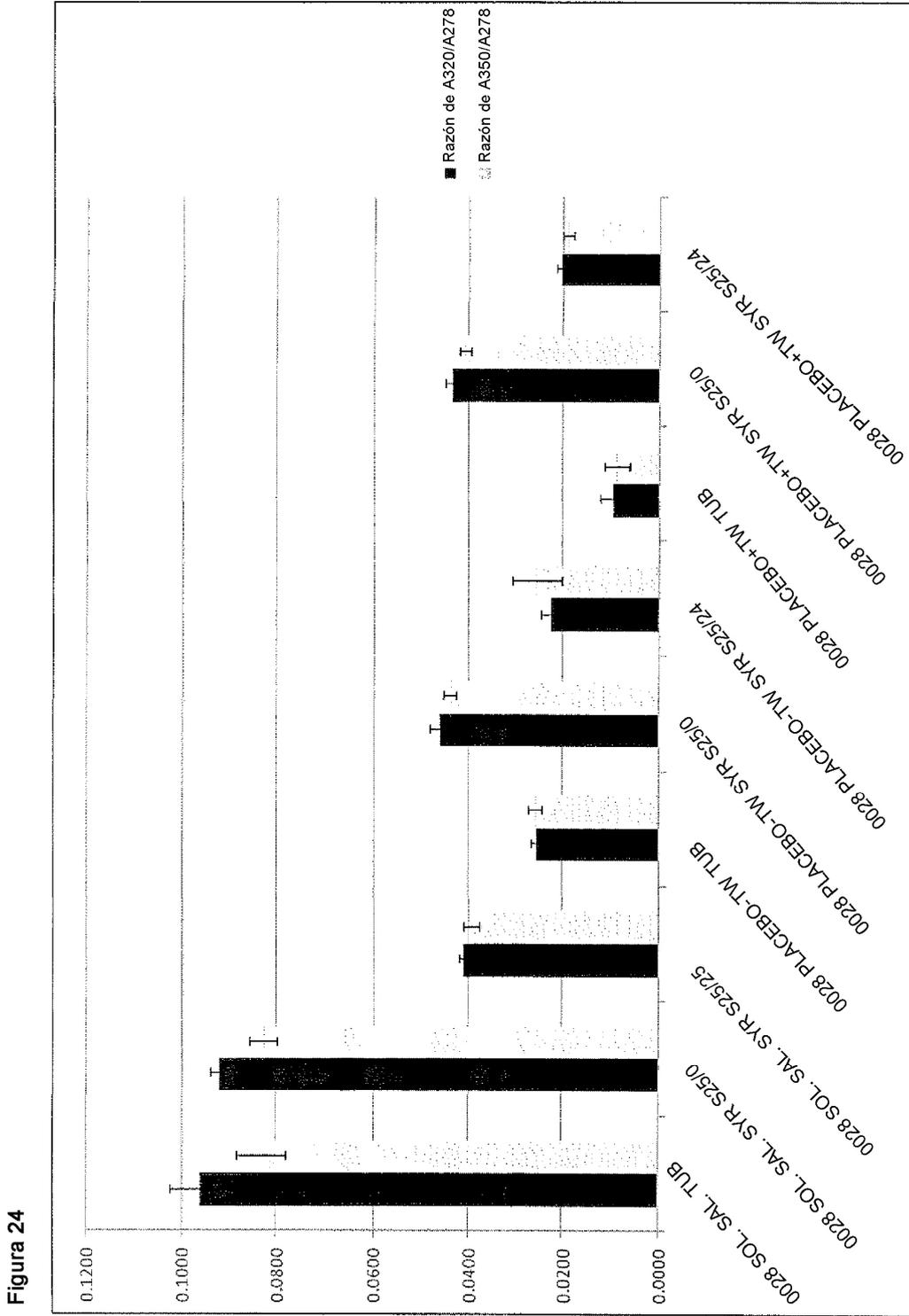


Figura 25

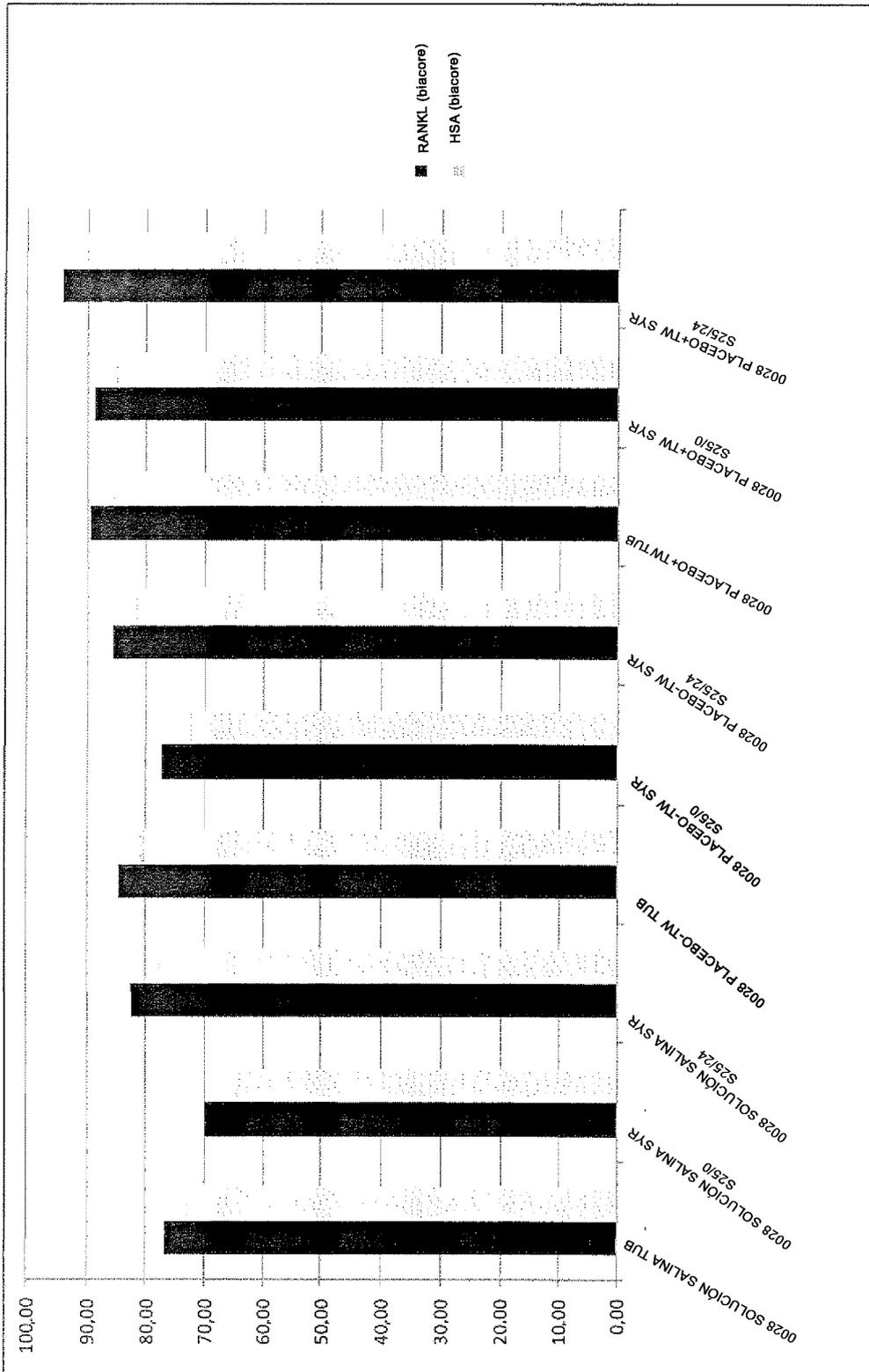


Figura 26

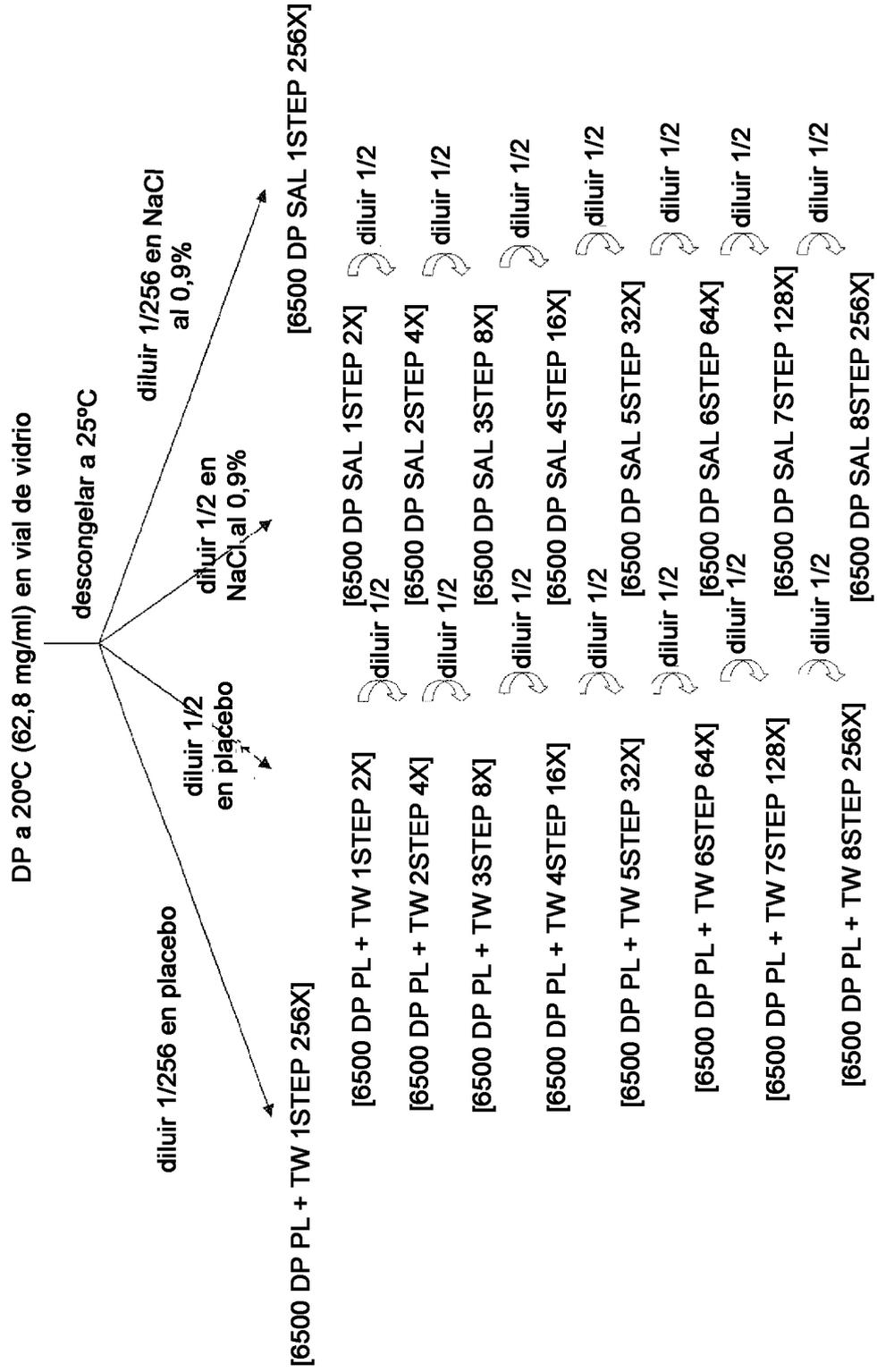


Figura 27

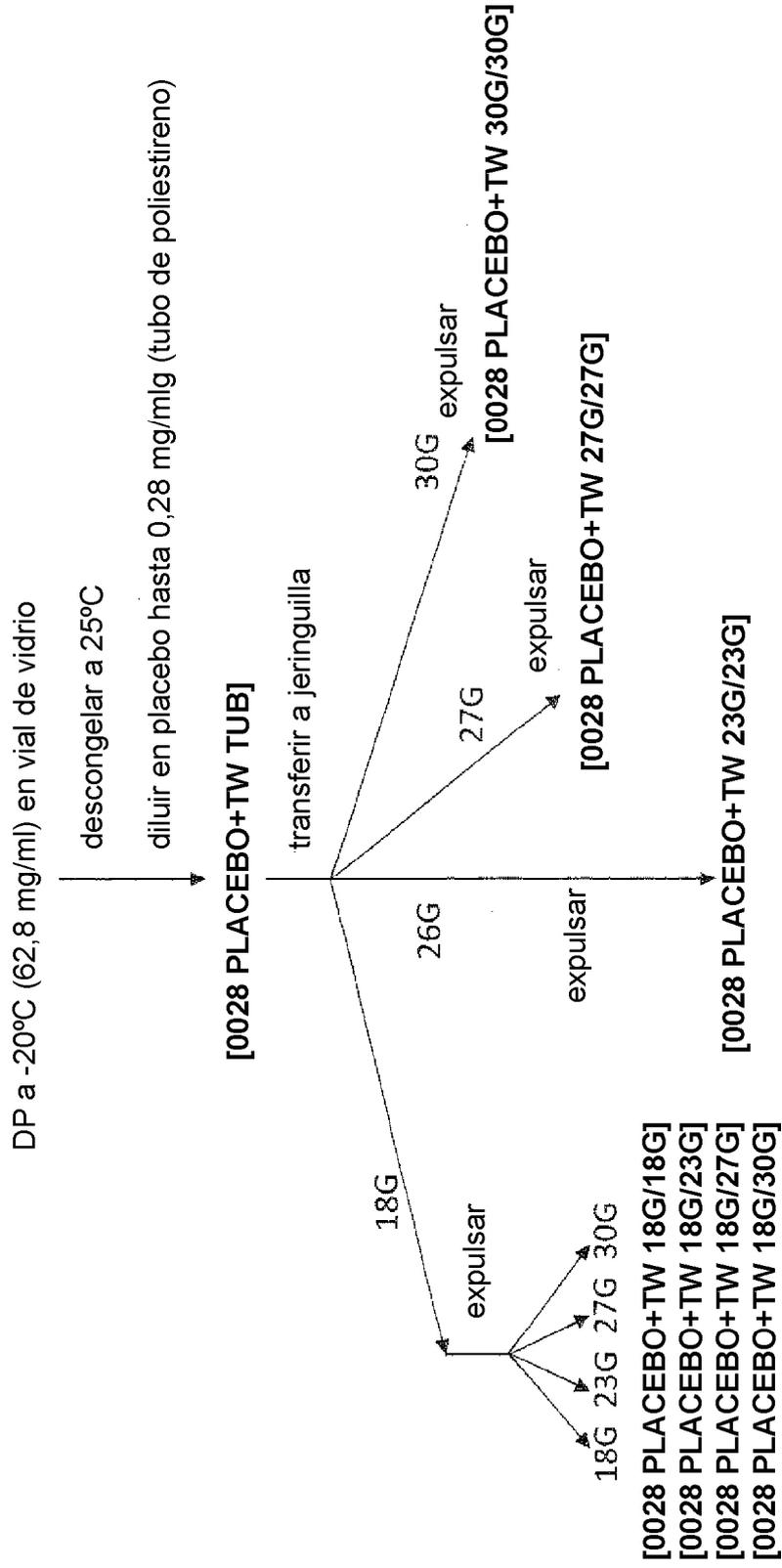


Figura 28

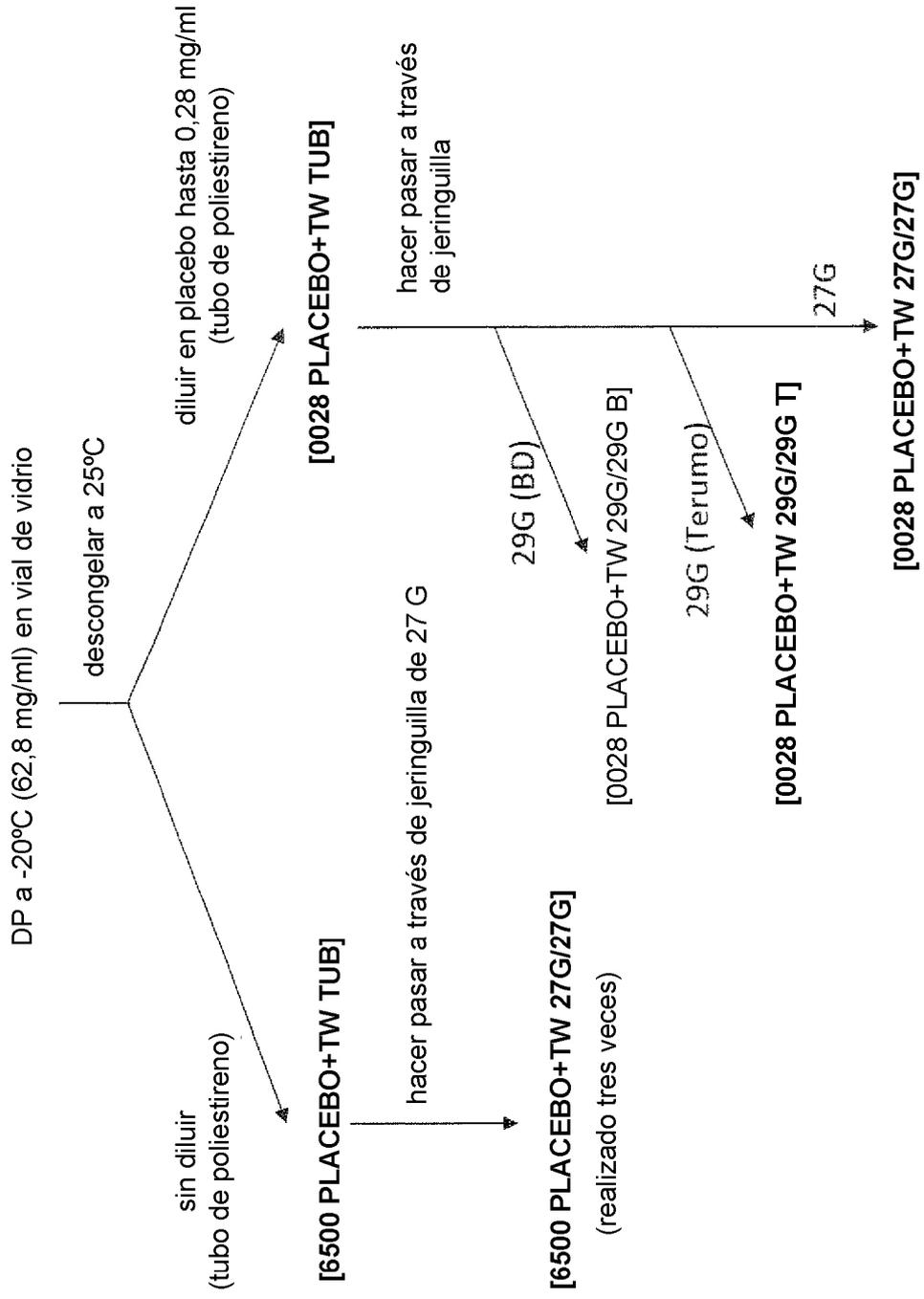
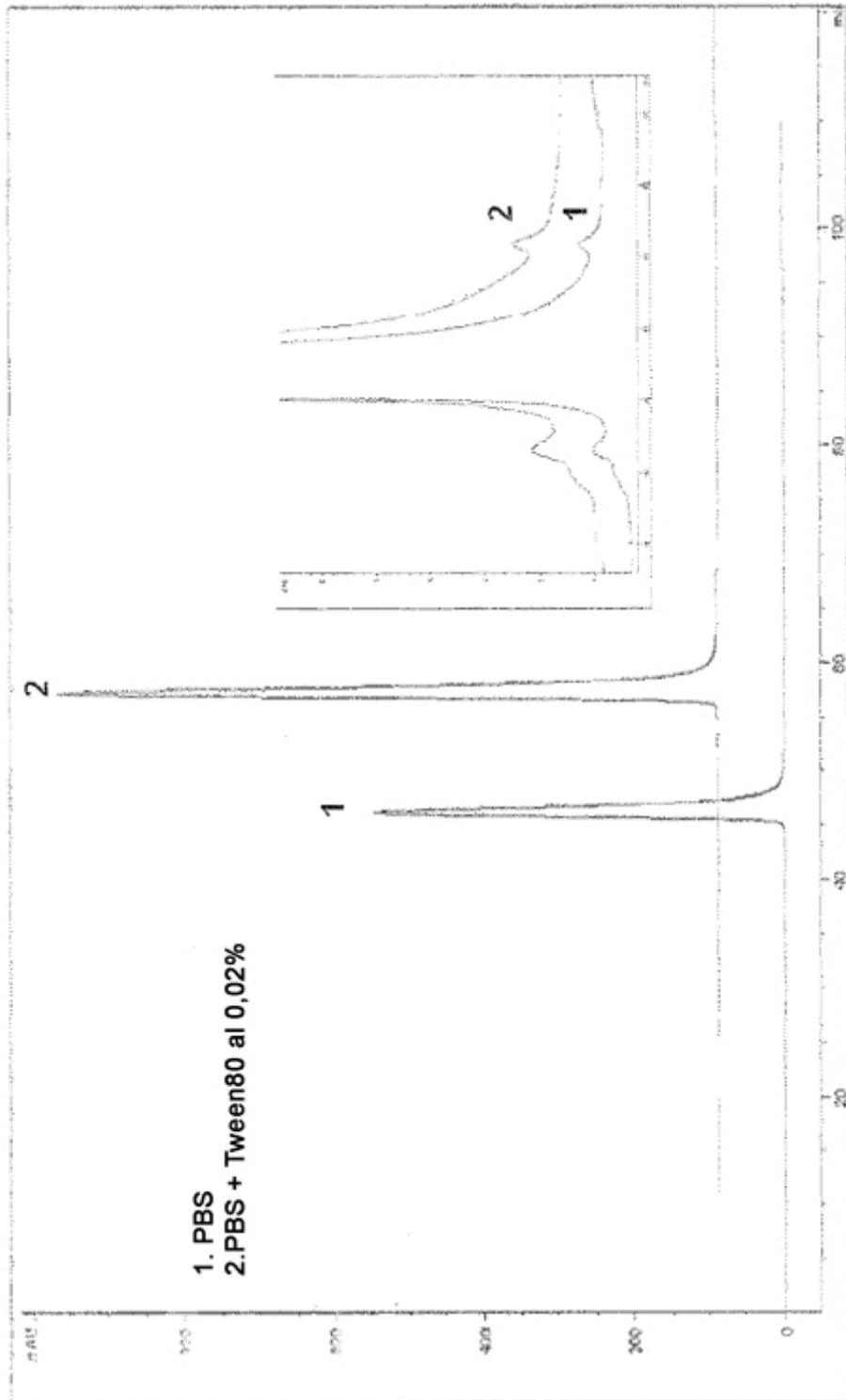


Figura 29



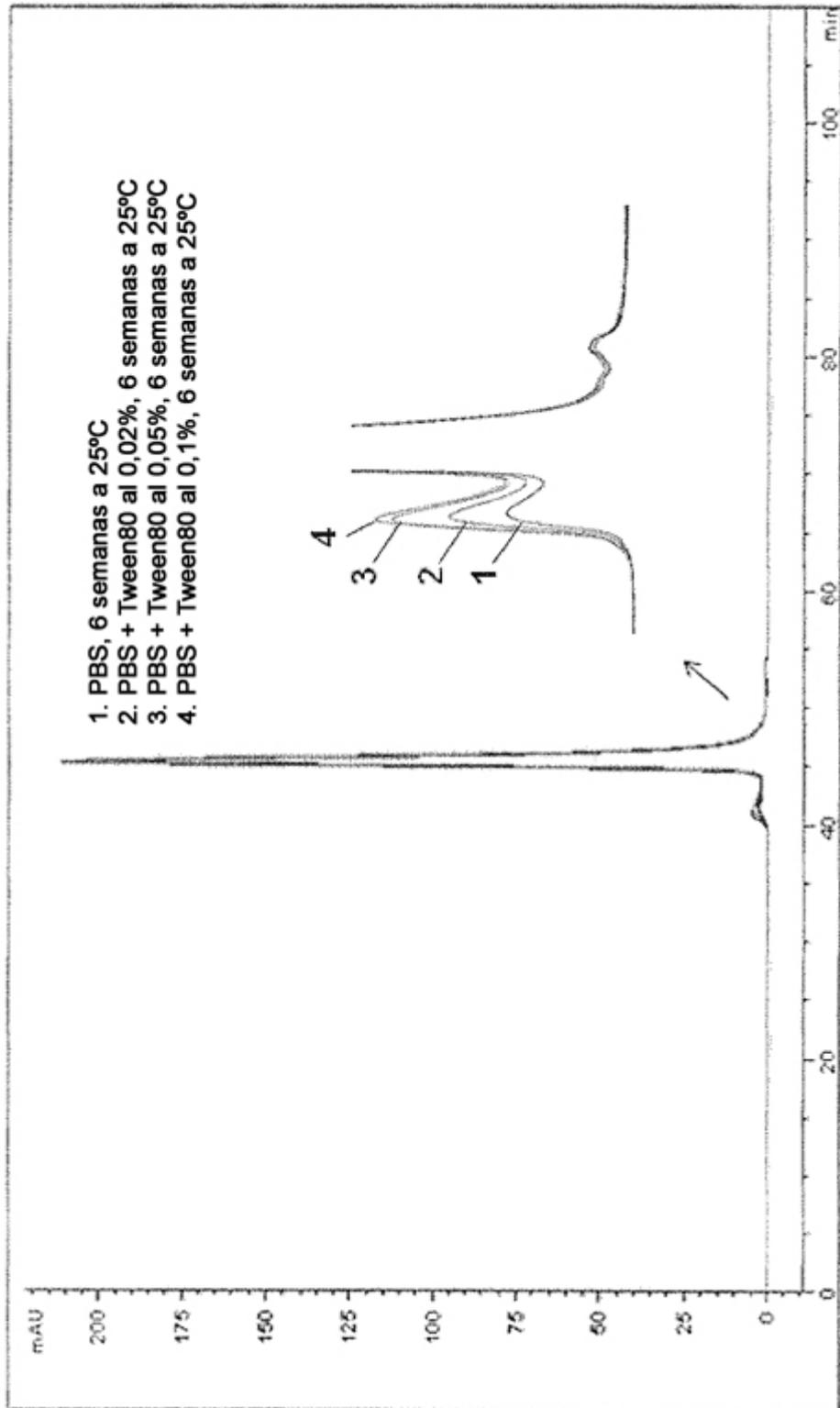


Figura 30

Figura 31

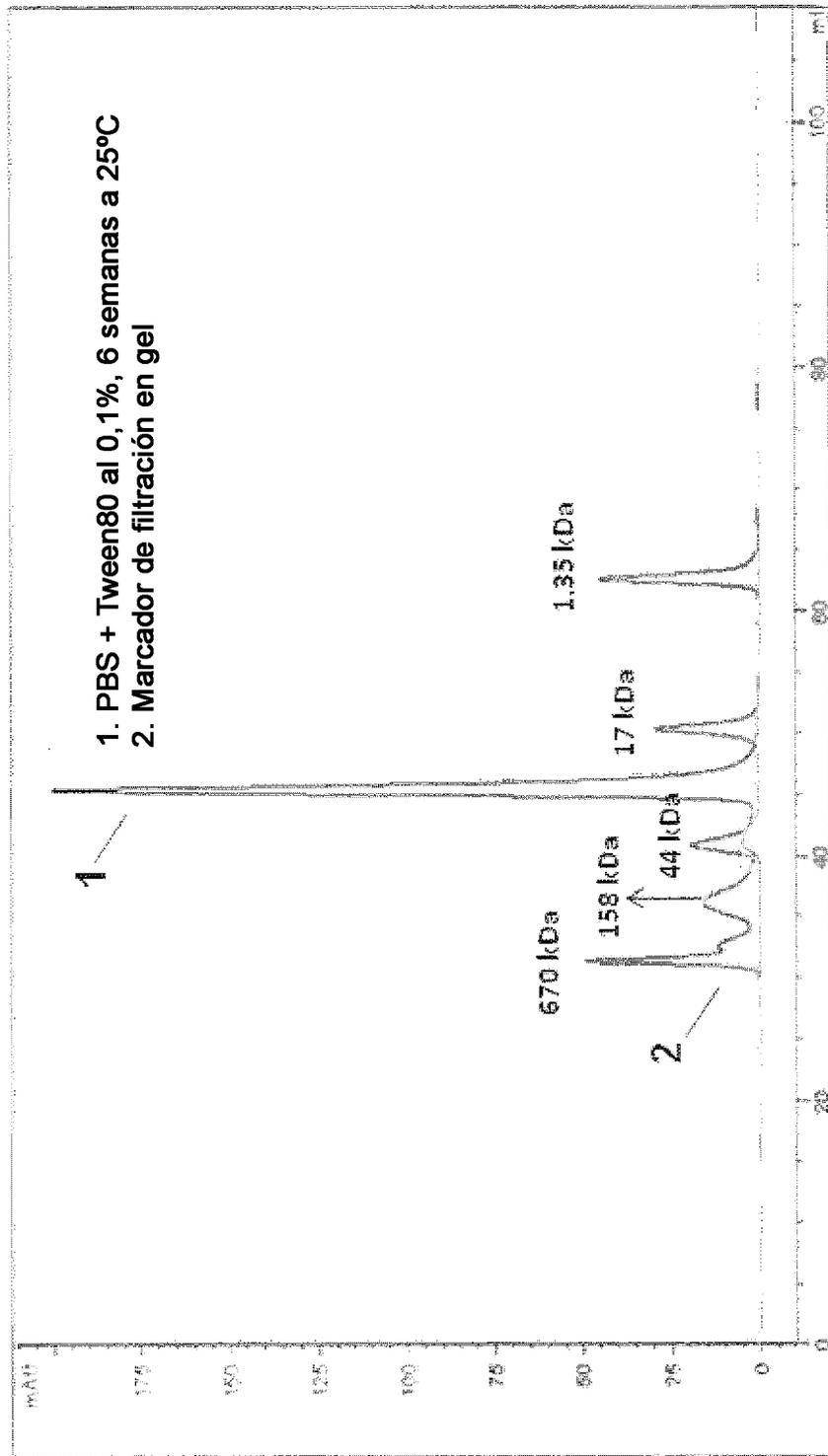


Figura 32

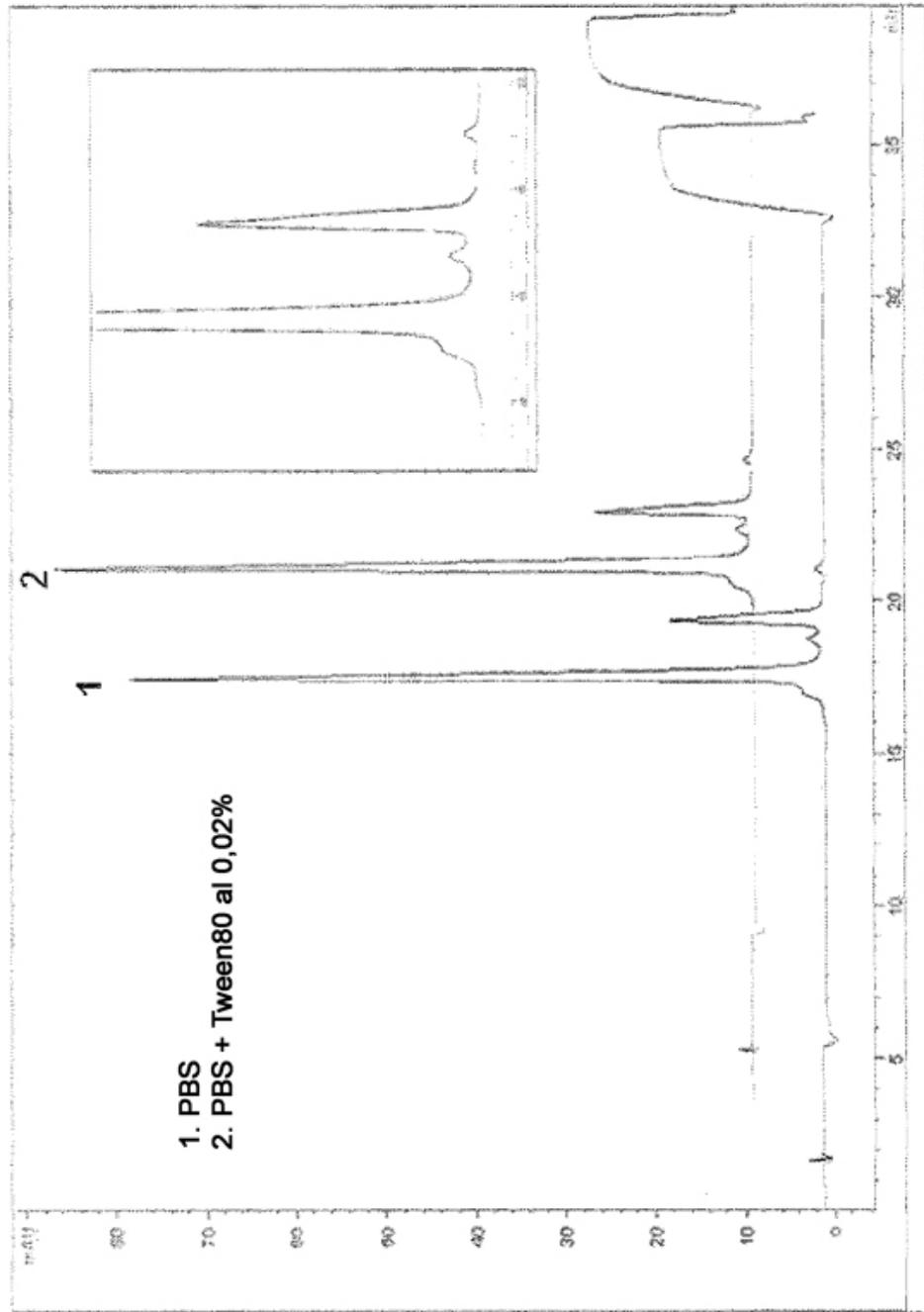


Figura 33

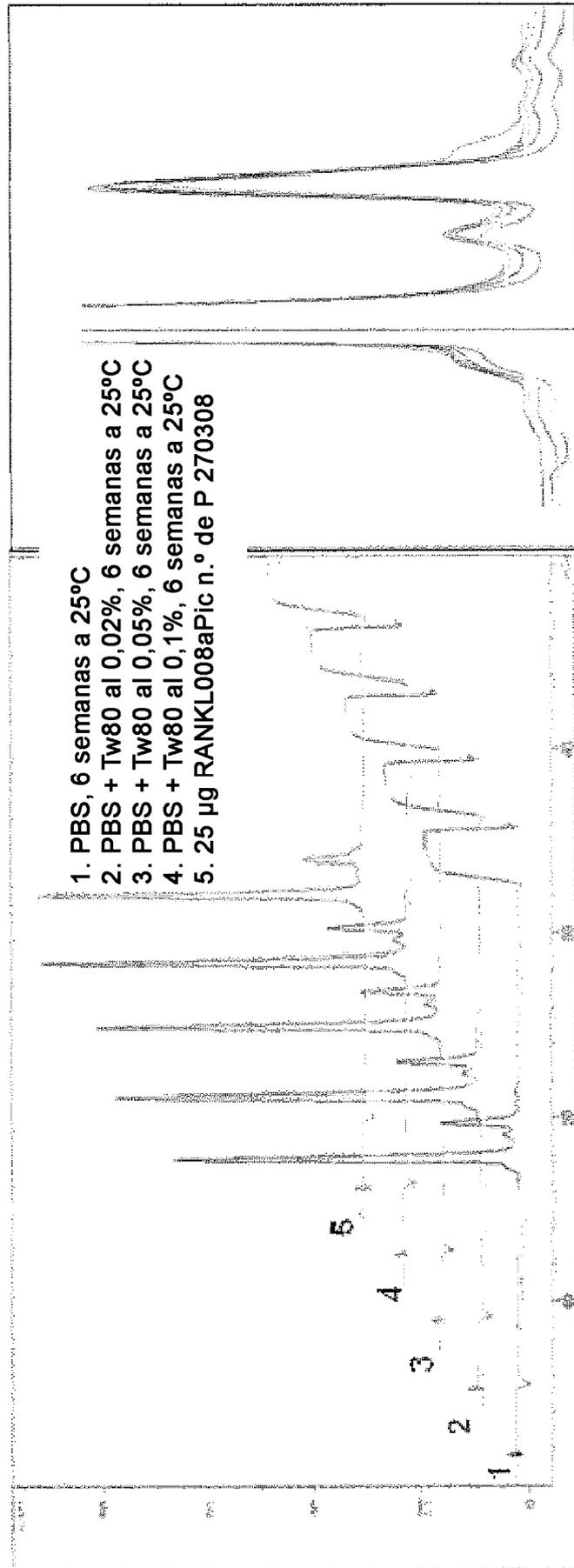


Figura 34

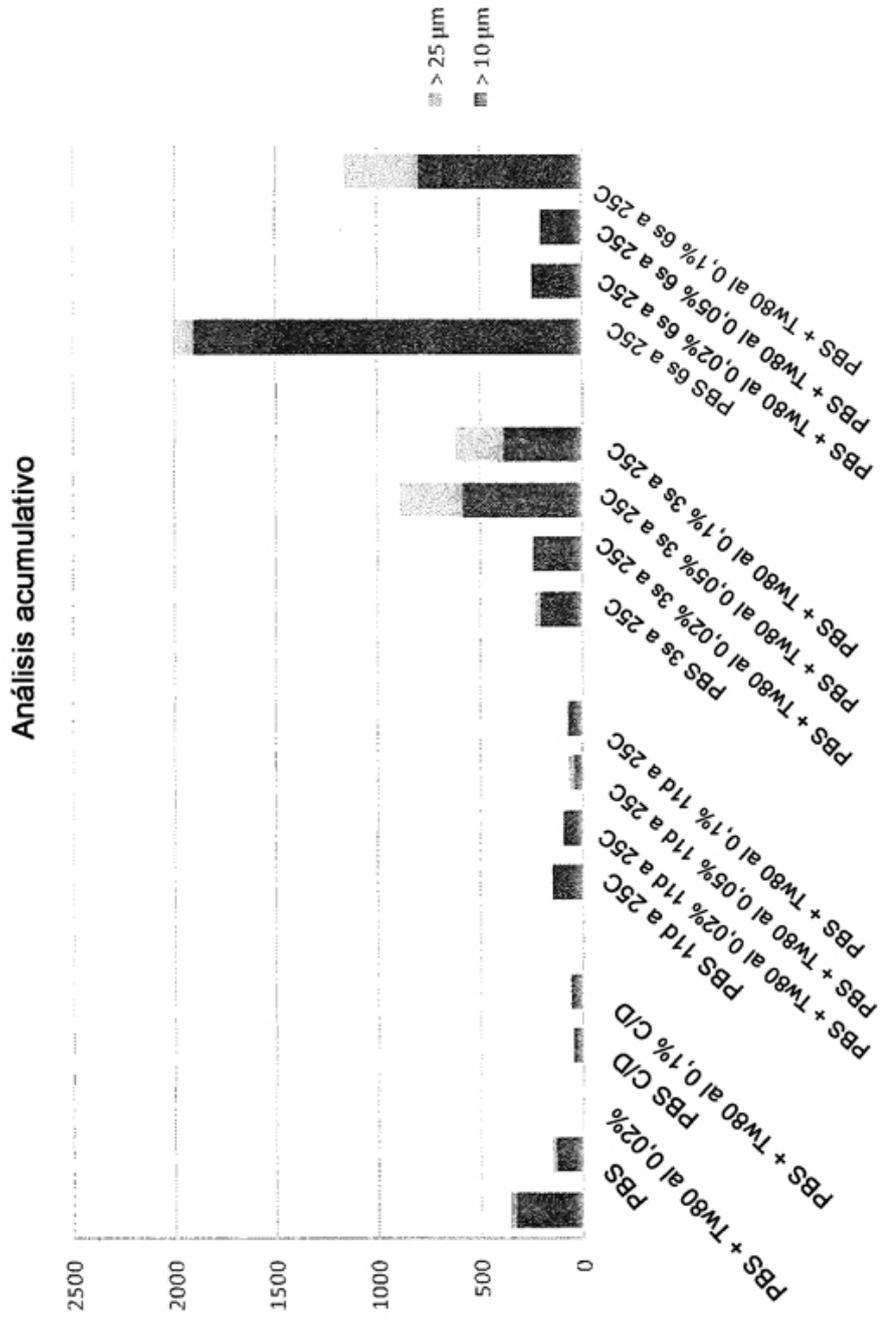


Figura 35

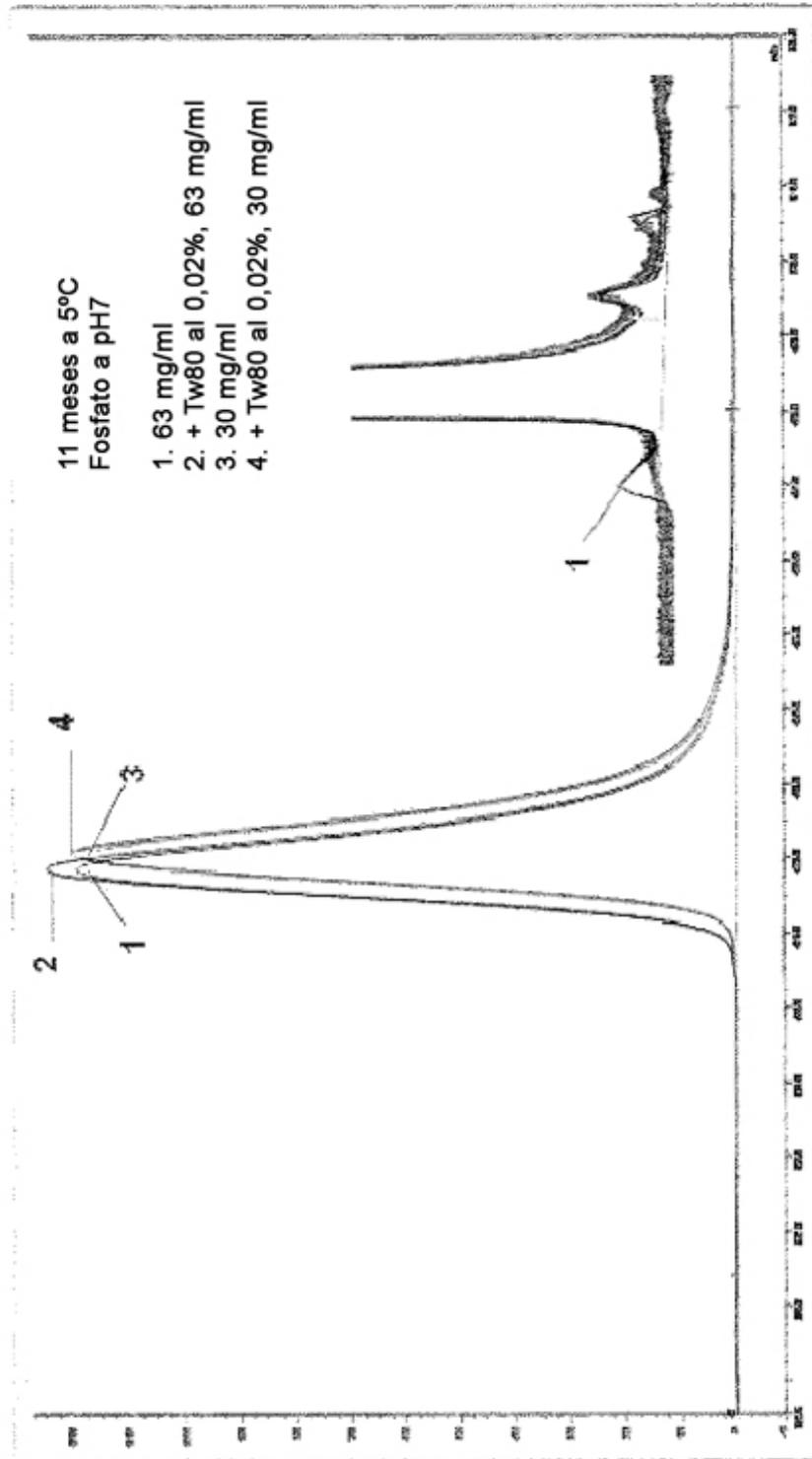
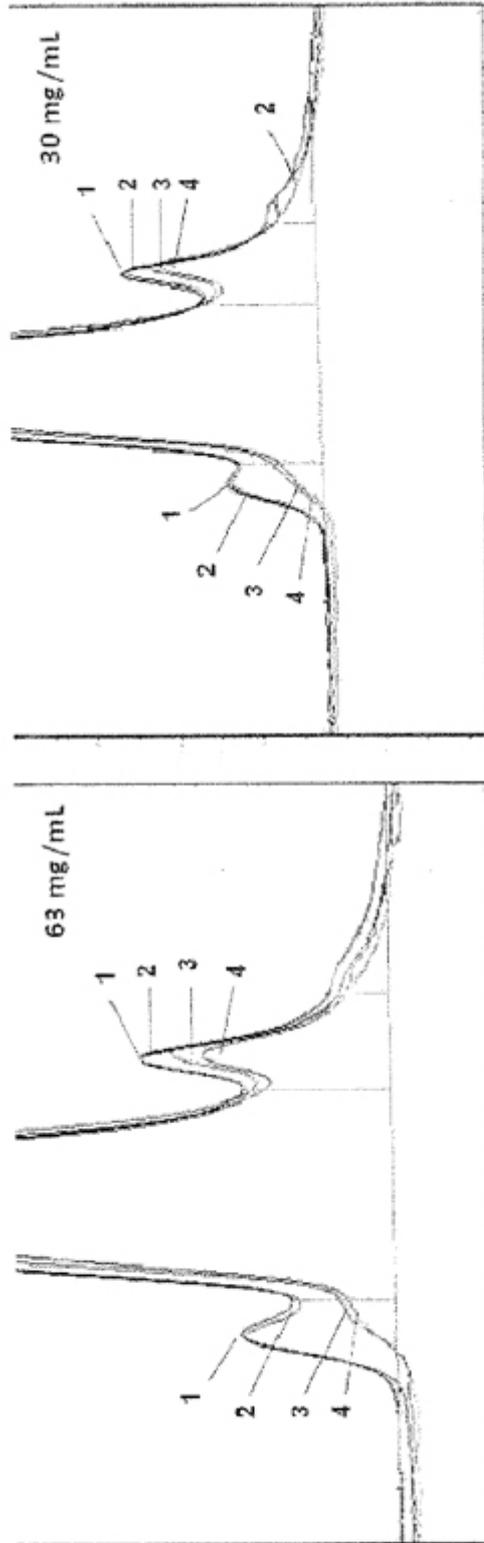
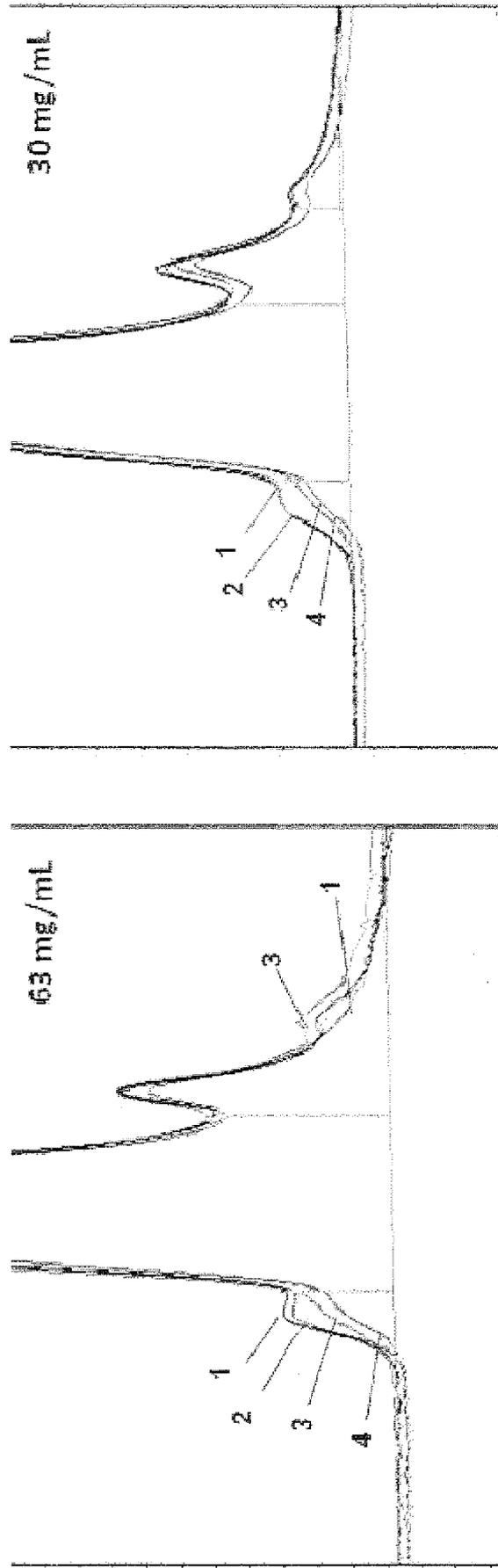


Figura 36 (A)



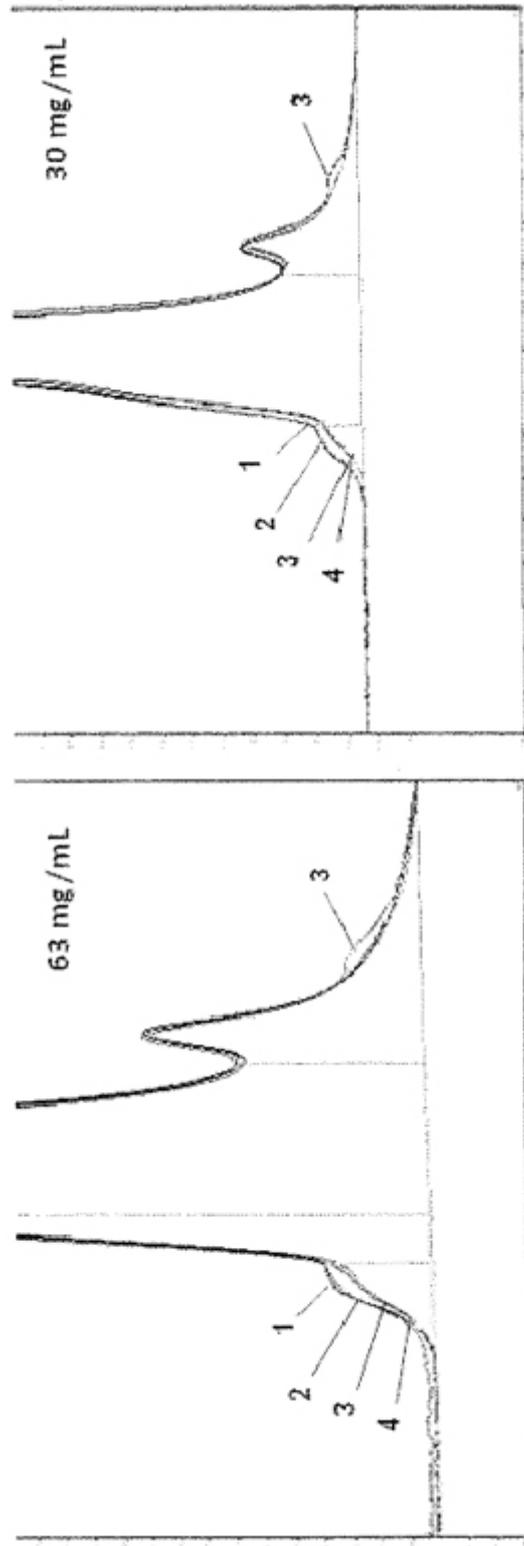
1. PBS + Tw80 al 0,02%, 11 meses a 5°C
2. PBS, 11 meses a 5°C
3. PBS + Tw80 al 0,02%, 11 meses a -20°C
4. PBS, 11 meses a -20°C

Figura 36 (B)



1. Fosfato + Tw80 al 0,02%, 11 meses a 5°C
2. Fosfato, 11 meses a 5°C
3. Fosfato + Tw80 al 0,02%, 11 meses a -20°C
4. Fosfato, 11 meses a -20°C

Figura 36 (C)



- 1. Acetato + Tw80 al 0,02%, 11 meses a 5°C
- 2. Acetato, 11 meses a 5°C
- 3. Acetato + Tw80 al 0,02%, 11 meses a -20°C
- 4. Acetato, 11 meses a -20°C

Figura 37

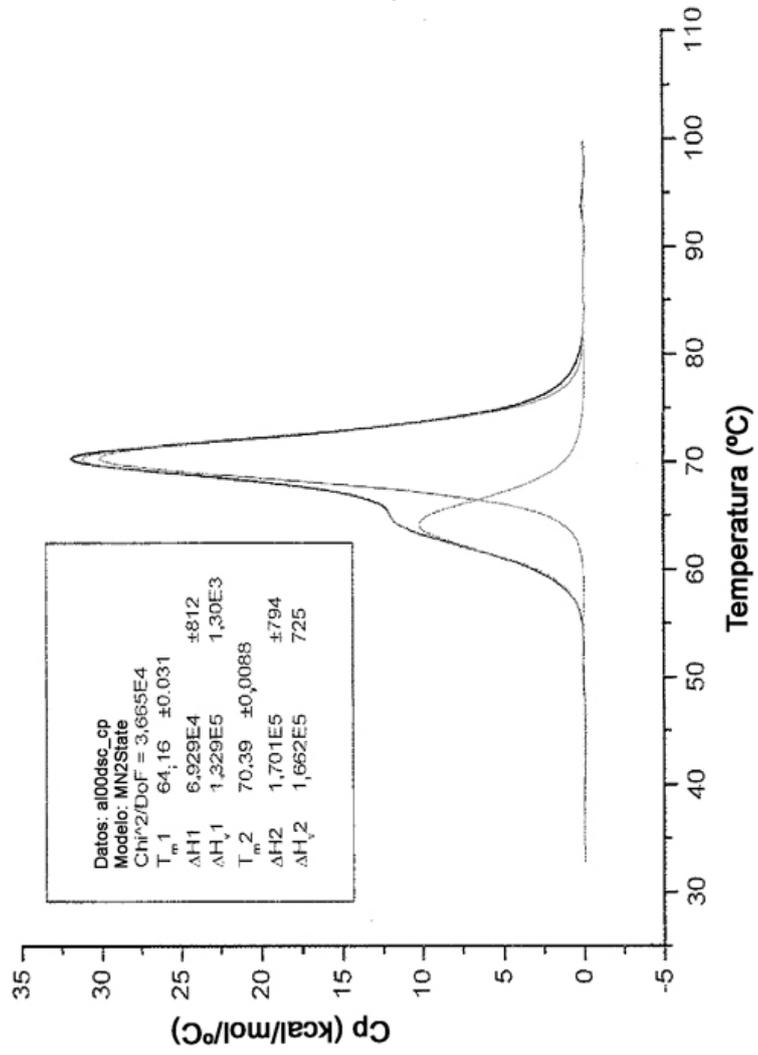


Figura 38

