

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 973 572**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.04.2018** **PCT/US2018/029728**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2018** **WO18200918**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.04.2018** **E 18724690 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.12.2023** **EP 3615066**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos humanos anti-RANKL, y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

28.04.2017 US 201762492056 P

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

20.06.2024

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**BRYCH, STEPHEN, ROBERT;
WONG, LYANNE, M.;
FALLON, JAYMILLE;
GOSS, MONICA, MICHELLE;
GU, JIAN, HUA y
GHATTYVENKATAKRISHNA, PAVAN, K.**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 973 572 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de anticuerpos humanos anti-RANKL, y métodos de uso de los mismos

5 ANTECEDENTES

Campo de la divulgación

10 La invención se refiere a anticuerpos monoclonales humanos anti-RANKL, que incluyen formulaciones acuosas de alta concentración de denosumab y biosimilares de los mismos.

Breve descripción de la tecnología relacionada

15 Denosumab está comercialmente disponible en formas de disolución en concentraciones de 60 mg/ml y 70 mg/ml.

Concentraciones crecientes de formulaciones de proteína pueden causar problemas con la estabilidad, por ejemplo, agregación que da como resultado la formación de especies de alto peso molecular (HMWS). Las HMWS, particularmente las que conservan la mayor parte de la configuración nativa del homólogo monomérico, pueden ser de particular preocupación en algunas formulaciones de proteína. La agregación también puede afectar posiblemente la biodisponibilidad subcutánea y farmacocinética de una proteína terapéutica.

20 Las operaciones de llenado y acabado, así como la administración, pueden implicar las etapas de hacer circular disoluciones de proteína a través de bombas de pistón, bombas peristálticas o agujas para inyección. Dichos procesos pueden conferir cizallamiento y estrés mecánico, que puede causar la desnaturalización de proteínas y dar como resultado la agregación. Este fenómeno puede ser agravado a medida que las disoluciones de proteína se vuelven más concentradas.

25 El documento de patente US 2011/0060290 se refiere a composiciones estabilizadas de agentes de unión específica a RANKL, agentes de unión específica a TNF y/o agentes de unión específica a IL-1R1 en recipientes.

30 SUMARIO

Según la presente invención se proporciona la divulgación por primera vez que demuestra que la adición de un inhibidor de la agregación de aminoácidos a una disolución acuosa que comprende una alta concentración de un anticuerpo anti-RANKL conduce a una cantidad reducida de agregados de anticuerpo formados con el tiempo, así como a una tasa de formación más lenta de dichos agregados. La presente divulgación también proporciona un efecto del pH sobre la formación de agregados en disoluciones acuosas concentradas de anticuerpo anti-RANKL, en donde la disminución de la formación de agregados se observa cuando el pH de las disoluciones acuosas está en el intervalo de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2. La divulgación presentada en el presente documento sugirió además que la estabilización del anticuerpo anti-RANKL ocurre a través de interacciones entre el inhibidor de la agregación de aminoácidos y el anticuerpo. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se contempla que las interacciones hidrófobas, así como otros tipos de interacciones intermoleculares, entre el inhibidor de la agregación de aminoácidos y el anticuerpo anti-RANKL tienen un efecto estabilizante sobre las disoluciones concentradas de anticuerpo. Por consiguiente, la divulgación de la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas acuosas estables que comprenden una alta concentración de un anticuerpo anti-RANKL, comprendiendo dichas formulaciones bajas cantidades (por ejemplo, inferiores a aproximadamente el 2 %) de agregados.

En una primera realización, la invención proporciona una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

- 50 • un anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración en un intervalo de 100 a 140 mg/ml;
- 1,0 % (p/p) al 5,0 % (p/p) de sorbitol;
- 55 • al menos 0,004 % (p/v) y menos del 0,15 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80;
- tampón acetato o glutamato 5 mM a 60 mM; y
- 60 • L-fenilalanina o L-triptófano 5 mM a 180 mM;

en donde la formulación farmacéutica acuosa tiene un pH en un intervalo de 5,0 a 5,4; y en donde el anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende (A) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende

la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; y (B) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

En una segunda realización, la invención proporciona la formulación farmacéutica acuosa de la invención para su uso en (a) el tratamiento o la prevención de un evento relacionado con el esqueleto (SRE) en un sujeto con metástasis óseas de tumores sólidos, (b) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto que es un adulto o un adolescente esqueléticamente maduro con tumor óseo de células gigantes de manera que sea inoperable o donde sea probable que la resección quirúrgica dé lugar como resultado una intensa morbilidad, (c) el tratamiento de hipercalcemia de tumor maligno resistente a la terapia con bisfosfonato en un sujeto, (d) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto con mieloma múltiple o con metástasis óseas de un tumor sólido, (e) el tratamiento de osteoporosis de mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fractura, (f) el tratamiento para aumentar la masa ósea en mujeres con alto riesgo de fractura que reciben terapia adyuvante con inhibidores de la aromatasas para el cáncer de mama, (g) el tratamiento para aumentar la masa ósea en hombres con alto riesgo de fractura que reciben una terapia de privación androgénica para cáncer de próstata no metastásico, (h) el tratamiento para aumentar la masa ósea en hombres con osteoporosis con alto riesgo de fractura, (i) la terapia con calcio o vitamina D, (j) el tratamiento de tumor óseo de células gigantes en un paciente en necesidad del mismo, (k) el tratamiento de hipercalcemia de tumor maligno en un paciente en necesidad del mismo, (l) el tratamiento de osteoporosis en un paciente en necesidad del mismo, o (m) el aumento de la masa ósea en un paciente en necesidad del mismo.

DIVULGACIÓN ADICIONAL

Una formulación farmacéutica acuosa puede comprender un anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo a una concentración superior a 70 mg/ml y que tiene un pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2.

Una formulación farmacéutica acuosa puede comprender una mezcla de un anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo y un inhibidor de la agregación de aminoácidos. El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede comprender un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada, un aminoácido aromático, o un aminoácido hidrófobo. El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada pueden ser un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva, tal como, por ejemplo, arginina y lisina. El aminoácido aromático puede comprender un fenilo o un indol. Opcionalmente, el aminoácido aromático comprende además una cadena de alquilo C₁-C₆ entre el carbono alfa y el fenilo o indol. Aminoácidos, que incluyen, por ejemplo, fenilalanina y triptófano, son inhibidores de la agregación de aminoácidos a modo de ejemplo. El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede ser un aminoácido hidrófobo que tiene una puntuación superior a aproximadamente 2,5 en la escala de hidrofobia de Kyte y Doolittle. Opcionalmente, el aminoácido hidrófobo es valina, leucina o isoleucina. Se contemplan inhibidores de la agregación de aminoácidos adicionales como se describe en el presente documento.

La formulación farmacéutica acuosa puede comprender además un modificador de la tonicidad, un tensioactivo, un tampón, o cualquier combinación de los mismos.

Se describe una presentación de la formulación para su almacenamiento o uso, por ejemplo, en un vial de un solo uso, jeringa de un solo uso, o recipiente primario de vidrio, revestido de vidrio o recubierto de vidrio. Un recipiente, opcionalmente, un vial, jeringa precargada (PFS) o recipiente de vidrio, puede comprender cualquiera de las formulaciones farmacéuticas acuosas descritas en el presente documento. El recipiente puede comprender aproximadamente 1 ml o menos (por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml) de la formulación farmacéutica acuosa.

Métodos de preparación de una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende un anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, pueden comprender la combinación del anticuerpo anti-RANKL monoclonal, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración superior a 70 mg/ml con un inhibidor de la agregación de aminoácidos, un tampón, un tensioactivo y, opcionalmente, un modificador de la tonicidad. Se describe la formulación farmacéutica acuosa estable preparada según uno cualquiera de los métodos de preparación de una formulación farmacéutica acuosa estable descrita en el presente documento.

Se describen métodos de uso de una formulación como se describe en el presente documento para prevenir o tratar una enfermedad sensible a un anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL o una porción de unión al antígeno del mismo. El uso puede englobar el tratamiento terapéutico de un sujeto que engloba el tratamiento o la prevención de un evento relacionado con el esqueleto (SRE), el tratamiento o la prevención de un tumor óseo de células gigantes, el tratamiento o la prevención de hipercalcemia de tumor maligno, el tratamiento o la prevención de osteoporosis, o el aumento de la masa ósea, en un sujeto. Por ejemplo, el tratamiento terapéutico engloba (a) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto con metástasis óseas de tumores sólidos, (b) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto que es un adulto o un adolescente esqueléticamente maduro con tumor óseo de células gigantes

manera que sea inoperable o donde es probable que la resección quirúrgica dé como resultado una intensa morbilidad, (c) el tratamiento de hipercalcemia de tumor maligno resistente a terapia con bisfosfonato en un sujeto, (d) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto con mieloma múltiple o con metástasis óseas de un tumor sólido, (e) el tratamiento de osteoporosis de mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fractura, (f) el tratamiento para aumentar la masa ósea en mujeres con alto riesgo de fractura que reciben terapia adyuvante con inhibidores de la aromatasa para cáncer de mama, (g) el tratamiento para aumentar la masa ósea en hombres con alto riesgo de fractura que reciben terapia de privación androgénica para cáncer de próstata no metastásico, (h) el tratamiento para aumentar la masa ósea en hombres con osteoporosis con alto riesgo de fractura, (i) terapia con calcio o vitamina D.

Se describe un método de prevención de un evento relacionado con el esqueleto (SRE) en un paciente en necesidad del mismo, un método de tratamiento de tumor óseo de células gigantes en un paciente en necesidad del mismo, un método de tratamiento de hipercalcemia de tumor maligno en un paciente en necesidad del mismo, un método de tratamiento de osteoporosis en un paciente en necesidad del mismo y un método de aumento de la masa ósea en un paciente en necesidad del mismo. Los métodos comprenden administrar al paciente una cantidad eficaz de una cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento. La formulación puede ser por vía subcutánea administrada al paciente.

Se describe el uso de denosumab, u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL o una porción de unión al antígeno del mismo, en la fabricación de un medicamento como se describe en el presente documento para tratar un paciente en necesidad de un anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL.

Un kit puede incluir una composición o artículo descrito en el presente documento junto con un prospecto, etiqueta para el envase, instrucciones, u otro etiquetado que se dirige a o que divulga cualquiera de los métodos o divulgaciones divulgadas en el presente documento.

Se describe un método de mejora de la estabilidad de una formulación farmacéutica acuosa que incluye un anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración superior a 70 mg/ml, que incluye la etapa de preparación de la formulación farmacéutica acuosa que incluye el anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo a un pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2, en donde la formulación farmacéutica acuosa demuestra estabilidad mejorada al pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2 en comparación con una formulación farmacéutica acuosa equivalente que no está a un pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2.

Se describe un método de mejora de la estabilidad de una formulación farmacéutica acuosa que incluye un anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo, que incluye la etapa de preparación de la formulación farmacéutica acuosa que comprende el anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo en mezcla con un inhibidor de la agregación de aminoácidos, en donde la formulación farmacéutica acuosa demuestra estabilidad mejorada con el inhibidor de la agregación de aminoácidos en comparación con una formulación farmacéutica acuosa equivalente sin el inhibidor de la agregación de aminoácidos.

Se describe un método de reducción del nivel de agregados de HMWS en una disolución de denosumab u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Las Figuras 1, 2 y 8 muestran el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C para diversas formulaciones de denosumab de alta concentración. La leyenda de la Figura 1 corresponde a la formulación que tiene la Abreviatura mostrada en la Tabla 1. La leyenda de la Figura 8 corresponde a la letra mostrada en la Tabla 5.

La Figura 3 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño para diversas formulaciones de denosumab de alta concentración tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes. La leyenda de la Figura 3 corresponde a la formulación que tiene la Abreviatura mostrada en la Tabla 2.

La Figura 4 es un gráfico del % de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo para cada formulación que tiene el F n.º correspondiente mostrado en la Tabla 3A.

La Figura 5 es un par de cromatogramas de exclusión por tamaño para las formulaciones enumeradas en la Tabla 3A. La leyenda de la Figura 5 corresponde con el Nombre de formulación indicado en la Tabla 3B.

La Figura 6 es un gráfico del % de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo de almacenamiento a 37 °C para cada formulación que tiene el F n.º correspondiente mostrado en la Tabla 4A.

La Figura 7A muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño para las formulaciones a pH 4,8 que tienen la concentración de denosumab enumerada en la Tabla 4A.

5 La Figura 7B muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño para las formulaciones a pH 5,1 que tienen la concentración de denosumab enumerada en la Tabla 4A.

La Figura 9 es un gráfico del % de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo de almacenamiento a 37 °C para cada formulación que tiene el F n.º correspondiente mostrado en la Tabla 6B.

10 La Figura 10 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño en función de la formulación tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes para las formulaciones que tienen el nombre indicado en la Tabla 6B.

15 La Figura 11A es un gráfico del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo a 37 °C para la formulación que tiene la letra indicada en la Tabla 7B.

La Figura 11B es un gráfico del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo a 40 °C para la formulación que tiene la letra indicada en la Tabla 7C.

20 La Figura 12A muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño para las formulaciones de la Tabla 7B.

La Figura 12B muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño para las formulaciones de la Tabla 7C.

25 Las Figuras 13, 14 y 15 son gráficos del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo de almacenamiento a 37 °C para cada formulación que tiene la letra de Formulación correspondiente mostrada en la Tabla 8A. Las Figuras 16, 17 y 18 son las superposiciones cromatográficas de las formulaciones enumeradas en la Tabla 8A tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes. Las Figuras 13 y 16 se refieren a formulaciones que comprenden aminoácidos aromáticos, las Figuras 14 y 17 se refieren a formulaciones que comprenden aminoácidos polares/cargados y las Figuras 15 y 18 se refieren a formulaciones que comprenden aminoácidos hidrófobos.

30 Las Figuras 19-24 son gráficos del % de incorporación de deuterio a 4 °C en función del tiempo (log (s)) para los aminoácidos de cadena ligera 28-33 (Figura 19), aminoácidos de cadena ligera 108-116 (Figura 20), aminoácidos de cadena ligera 125-132 (Figura 21), aminoácidos de cadena pesada 47-59 (Figura 22), aminoácidos de cadena pesada 243-253 (Figura 23) y aminoácidos de cadena pesada 392-399 (Figura 24) para cada una de las formulaciones 35-38.

35 Las Figuras 25-30 son gráficos del % de incorporación de deuterio a 37 °C en función del tiempo (log (s)) para los aminoácidos de cadena ligera 28-33 (Figura 25), aminoácidos de cadena ligera 108-117 (Figura 26), aminoácidos de cadena ligera 124-131 (Figura 27), aminoácidos de cadena pesada 47-59 (Figura 28), aminoácidos de cadena pesada 242-253 (Figura 29) y aminoácidos de cadena pesada 392-399 (Figura 30) para cada una de las formulaciones 35-38.

40 La Figura 31 es un gráfico del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con el nombre de Formulación indicado en la Tabla 10.

45 La Figura 32 es un gráfico del porcentaje de LMWS como se monitoriza por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con el nombre de Formulación indicado en la Tabla 11.

50 La Figura 33 es un gráfico del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con el nombre de Formulación indicado en la Tabla 12.

La Figura 34 es un gráfico del porcentaje de LMWS como se monitoriza por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con el nombre de Formulación indicado en la Tabla 13.

55 La Figura 35 es un gráfico del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con el nombre de Formulación indicado en la Tabla 14.

60 La Figura 36 es un gráfico del porcentaje de LMWS como se monitoriza por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con el nombre de Formulación indicado en la Tabla 15.

La Figura 37 son superposiciones de cromatogramas de exclusión por tamaño para cada formulación que tienen el nombre de Formulación indicado en la Tabla 10.

65 La Figura 38 son superposiciones de cromatogramas de exclusión por tamaño para cada formulación que tienen el nombre de Formulación indicado en la Tabla 12.

La Figura 39 son superposiciones de cromatogramas de exclusión por tamaño para cada formulación que tienen el nombre de Formulación indicado en la Tabla 14.

Las Figuras 40A y 40B son gráficos que contienen las curvas de desnaturalización química isotérmica de denosumab en ausencia de arginina, a pH 4,5, 4,8 y 5,0. La Figura 40A es un gráfico de la fracción de denosumab desnaturalizado en función de la concentración de desnaturalizante. La Figura 40B es un gráfico que representa $dF/d[\text{desnaturalizante}]$ en función de la concentración de desnaturalizante.

Las Figuras 41A y 41B son gráficos que contienen las curvas de desnaturalización química isotérmica de denosumab en presencia de HCl de arginina 75 mM a pH 4,5, 4,8 y 5,2. La Figura 41A es un gráfico de la fracción de denosumab desnaturalizado en función de la concentración de desnaturalizante. La Figura 41B es un gráfico que representa $dF/d[\text{desnaturalizante}]$ en función de la concentración de desnaturalizante.

Las Figuras 42 y 43 son gráficos del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo a 25 °C durante 3 meses y 37 °C durante 2 meses, respectivamente, para la formulación que tiene el nombre de formulación en la tabla 17.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Sería deseable proporcionar una disolución acuosa más concentrada de denosumab, y otros anticuerpos anti-RANKL humanos, y porciones de unión al antígeno de los mismos, que sean tan estables como, o más estables que, las disoluciones diluidas. La disolución más concentrada podría proporcionar conveniencia del paciente, por ejemplo, permitiendo la administración de un volumen más pequeño, tal como inyección de 1 ml, para administrar 120 mg de activo, tal como denosumab, en vez de una inyección de 1,7 ml o 2 ml de una formulación activa más diluida. Todavía además, permitiría un disolución de volumen de inyección incluso más pequeña para administrar una dosis más abaja de activo, por ejemplo, 0,5 ml de concentración de 120 mg/ml de denosumab para administrar una dosis de 60 mg. También sería deseable proporcionar disolución acuosa de denosumab, y otros anticuerpos anti-RANKL humanos, y porciones de unión al antígeno de los mismos, que son más estables que las disoluciones conocidas anteriormente. La formulación concentrada estable también tendrá otros beneficios, tales como permitir la manipulación y el envío de menores volúmenes de producto, y permitir semividas más largas de los productos.

Los agregados en productos biológicos pueden diferir en origen, tamaño y tipo. Los agregados que pueden afectar la eficacia o seguridad de un producto biológico son de particular preocupación, por ejemplo, agregados que pueden potenciar las respuestas inmunitarias y provocar efectos clínicos adversos. Los agregados de alto peso molecular, también conocidos como especies de alto peso molecular (HMWS), particularmente las que conservan la mayoría de la configuración nativa del homólogo monomérico, pueden ser de particular preocupación. La agregación también puede afectar posiblemente la biodisponibilidad subcutánea y farmacocinética de una proteína terapéutica.

La formación de agregados puede tener diversas causas. En general, la agregación de proteínas resulta de la inestabilidad conformacional, que es el resultado de cambios estructurales en las proteínas, e inestabilidad coloidal, que está dominada por fuerzas intermoleculares. En el caso en el que se requiera un evento de nucleación crítica para inducir la precipitación, la cinética de agregación de proteínas se puede caracterizar por la inclusión de una fase de tiempo de desfase.

La agregación debida a la inestabilidad conformacional implica las etapas de desplegamiento y asociación. El desplegamiento de la molécula de proteína expone residuos de aminoácidos hidrófobos. Los residuos hidrófobos de las moléculas no plegadas pueden someterse entonces a asociación, que conduce a la agregación (por ejemplo, como dímeros, trímeros, otros multímeros, y agregados de orden superior). Dichas asociaciones son dependientes de la concentración. Un aumento en la concentración de proteína en un disolvente acuoso aumenta, en general, la tasa y el grado de agregación, que incluye la agregación térmicamente inducida. Por lo tanto, los aditivos que afectan la energía libre de desplegamiento de proteínas en disolución puede afectar la estabilidad conformacional.

La inestabilidad coloidal da como resultado agregados a través de las fuerzas de asociación intramolecular proteína-proteína. Dichas fuerzas se pueden afectar por uno o más factores que incluyen la fuerza iónica, el pH de la disolución y los tipos de tampones.

Denosumab está comercialmente disponible en formas de disolución en concentraciones de 60 mg/ml y 70 mg/ml. Los intentos por formular disoluciones de denosumab de mayor concentración usando los mismos excipientes mostraron que la mayor concentración afectó la estabilidad del producto, a través de un aumento concomitante y proporcional en HMWS. Por ejemplo, una concentración de 120 mg/ml de denosumab tiene una concentración superior al 70 % superior a 70 mg/ml de denosumab, y es el doble de la concentración de 60 mg/ml.

Por consiguiente, una formulación acuosa estabilizada según la presente divulgación resistirá a la formación de agregados a un mayor grado que las formulaciones previamente conocidas. Se describe una formulación acuosa estabilizada caracterizada por un pH de 5,0 a menos de 5,2. Otra divulgación no excluyente es una formulación acuosa estabilizada que incluye un inhibidor de la agregación de aminoácidos. También se describen presentaciones de dosis

relacionadas, por ejemplo como viales de un solo uso, jeringas y recipientes de vidrio, y métodos de tratamiento relacionados. Los métodos de preparación de formulaciones farmacéuticas estables se describen adicionalmente.

5 Como se describe a continuación, el pH y el inhibidor de la agregación de aminoácidos (por ejemplo, arginina, dipéptido arginina-arginina, dipéptido arginina-fenilalanina) son dos elementos que se mostró que redujeron el nivel de HMWS y la tasa de formación de HMWS de denosumab a 120 mg/ml. Las HMWS se pueden describir como interacciones de proteína intermolecular que son o irreversibles (por ejemplo covalentes) o reversibles (por ejemplo, interacciones autoasociadas no covalentes). Existen cuatro causas bien aceptadas para las reacciones de autoasociación de proteínas que pueden conducir a aumentos en la viscosidad y HMWS; interacciones hidrófobas, cargadas, polares y de dipolo. Tanto el pH de la formulación como la arginina (un aminoácido básico altamente cargado a valores de pH de neutros a ácidos) puede interferir con las fuerzas intermoleculares de proteínas cargadas. Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, es concebible que la formación de HMWS de denosumab a 120 mg/ml se base en la carga de proteína, y estos cambios de formulación están alterando las fuerzas de carga implicadas en el mecanismo de la formación de HMWS. Además, sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, es concebible que también pudiera haber interacciones de autoasociación de proteínas hidrófobas en la formación de HMWS, puesto que la arginina contiene una cadena de hidrocarburos alifática corta en la cadena lateral. Esta cadena alifática puede alterar las interacciones hidrófobas entre proteínas. Esta idea es además respaldada por la inclusión de fenilalanina en la formulación para que tenga una reducción adicional en los niveles de HMWS. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, la arginina estabiliza el anticuerpo anti-RANKL de un modo diferente al de la fenilalanina, de forma que, si la arginina interactúa con el anticuerpo a través de interacciones hidrófobas, la arginina puede interactuar con el anticuerpo en una o varias de otras formas.

25 Otros excipientes que pueden tener un impacto potencialmente positivo sobre el nivel de reducción de HMWS y la tasa de formación pueden tener un grupo positivamente cargado similar a los valores de pH de neutro a ácido cuando se compara con arginina, y/o pueden ser de naturaleza hidrófoba similar a la fenilalanina. Los ejemplos de estos excipientes pueden incluir lisina, N-acetilarginina, N-acetil-lisina, tirosina, triptófano y leucina.

30 Se contemplan formulaciones, presentaciones de dosis y métodos para incluir cualquier combinación de uno o más de los elementos, características y etapas opcionales adicionales descritas a continuación (incluyendo los mostrados en las figuras), a menos que se establezca lo contrario.

35 En las jurisdicciones que prohíben patentar métodos que se ponen en práctica en el cuerpo humano, el significado de "administrar" una composición a un sujeto humano debe estar restringido a prescribir una sustancia controlada que se autoadministra a un sujeto humano por cualquier técnica (por ejemplo, por vía oral, inhalación, administración tópica, inyección, inserción, etc.). Está prevista la interpretación razonable más amplia que está de acuerdo con las leyes o reglamentaciones que definen la materia patentable. En jurisdicciones que no prohíben patentar métodos que se ponen en práctica en el cuerpo humano, "administrar" composiciones incluye tanto métodos puestos en práctica en el cuerpo humano como también las actividades anteriores.

40 Como se usa en el presente documento, el término "que comprende" indica la posible inclusión de otros agentes, elementos, etapas o características, además de las especificadas.

45 Se debe entender que cada limitación numérica máxima dada en toda esta memoria descriptiva incluye como aspectos alternativos intervalos formados con cada limitación numérica más baja correspondiente, como si dichos intervalos se escribieran explícitamente. Cada limitación numérica mínima dada en toda esta memoria descriptiva incluirá como aspectos alternativos intervalos formados con cada limitación numérica más alta, como si dichos intervalos se escribieran explícitamente. Cada intervalo numérico dado en toda esta memoria descriptiva incluirá cada intervalo numérico más estrecho que entra dentro de dicho intervalo numérico más ancho, como si dichos intervalos numéricos más estrechos se escribieran todos explícitamente en el presente documento. Se debe entender que las dimensiones y valores desvelados en el presente documento incluyen la divulgación de tanto el valor citado como el valor numérico exacto correspondiente, por ejemplo, se debe entender que un valor descrito como "aproximadamente 10 mM" incluye, como divulgación alternativa, "10 mM".

55 El término "cantidad terapéuticamente eficaz", como se usa en el presente documento, se refiere a una cantidad de un compuesto suficiente para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad o afección identificada, o para presentar un efecto terapéutico, profiláctico o inhibidor detectable. El efecto se puede detectar, por ejemplo, por una mejora en el estado clínico, o reducción en los síntomas. La cantidad eficaz precisa para un sujeto dependerá del peso corporal, el tamaño y la salud del sujeto; la naturaleza y el grado de la afección; y el terapéutico o combinación de terapéuticos seleccionados para administración. Si un fármaco ha sido autorizado por la Administración de Medicamentos y Alimentos (FDA) de los EE.UU., una "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a la dosis autorizada por la FDA o su agencia extranjera homóloga para el tratamiento de la enfermedad o afección identificada.

65 La presente divulgación proporciona formulaciones farmacéuticas acuosas estabilizadas (o estables) como se demuestra por las reducidas cantidades de agregados y/o reducidas tasas de formación de agregados tras el almacenamiento. Como se describe en el presente documento, la estabilidad de dichas formulaciones se muestra por las reducidas cantidades de HMWS y/o reducidas tasas de formación de HMWS tras el almacenamiento durante

periodos de tiempo variados y a temperaturas variadas. En general, formulaciones de mayor estabilidad están asociadas con menores cantidades de HMWS, menores tasa de formación de HMWS y/o mayores picos principales de anticuerpos a mayores temperaturas de almacenamiento, con respecto a menores temperaturas. Como se usa en el presente documento, el término "especies de alto peso molecular" o "HMWS" se refiere a agregados de orden superior del anticuerpo de las formulaciones, así como a agregados de orden inferior del anticuerpo de las formulaciones. Los agregados de orden inferior incluyen, por ejemplo, especies dímeras. Las cantidades y tasas de formación de agregados se pueden medir o monitorizar por técnicas, tales como, por ejemplo, SE-UHPLC. Los cromatogramas de SE-UHPLC del anticuerpo, en algunos casos, muestran un pico alrededor de 5,8 minutos que representa la cantidad de HMWS de la formulación farmacéutica acuosa, un pico alrededor de 6,7 minutos que representa las especies dímeras y un pico alrededor de 8,0 minutos que refleja la cantidad de formas no agregadas intactas del anticuerpo. Con respecto al almacenamiento a 4 °C, el almacenamiento a 37 °C permite la aceleración de un ensayo de estabilidad de forma que la estabilidad de una formulación particular se pueda determinar en un periodo de tiempo más corto, con respecto al periodo de tiempo de almacenamiento a 4 °C. Por ejemplo, el almacenamiento a 37 °C durante 1, 2 o 3 meses puede ser indicativo o predictivo del almacenamiento a 4 °C durante 36 meses.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede mostrar un grado y tasa reducida de formación de HMWS tras 3 meses de almacenamiento a 37 °C, en comparación con una formulación de control de concentración equivalente que consiste en acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 % (p/v) de polisorbato 20 como excipientes y que tiene un pH de disolución de 5,2.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento y que incluye un inhibidor de la agregación de aminoácidos puede mostrar un grado reducido de formación de HWMS tras 1 mes de almacenamiento a 37 °C, en comparación con una formulación de control equivalente sin el inhibidor de la agregación de aminoácidos. Por ejemplo, el grado de formación se puede reducir de forma que el % de cantidad de HMWS por SE-UPHLC sea inferior en al menos aproximadamente 0,1 %, o aproximadamente 0,2 %, o aproximadamente 0,3 %, o aproximadamente 0,4 %, o aproximadamente 0,5 %, o aproximadamente 0,6 %, o aproximadamente 0,7 %, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 2 %, o aproximadamente 0,1 % a aproximadamente 1 %, en comparación con la formulación de control tras 1 mes de almacenamiento a 37 °C.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede tener una baja cantidad de HMWS tras 1 mes de almacenamiento a 37 °C, por SE-UHPLC. Por ejemplo, la cantidad de HMWS puede ser no más del 2 %, o menos del 2 %, o no más del 1,9 %, o menos del 1,9 %, o no más del 1,8 %, o menos del 1,8 %, o no más del 1,7 %, o menos del 1,7 %, o no más del 1,6 %, o menos del 1,6 %, o no más del 1,5 %, o menos del 1,5 %, o no más del 1,4 %, o menos del 1,4 %, o no más del 1,3 %, o menos del 1,3 %, o no más del 1,2 %, o menos del 1,2 %, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,9 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,8 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,7 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,6 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,5 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,4 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,3 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,2 %. La cantidad de HMWS tras 1 mes almacenamiento a 37 °C, por SE-UHPLC, puede ser superior a 2 %, por ejemplo, superior a 2 % y hasta 3 %, mientras que la tasa reducida de agregación proporcionada por el inhibidor de la agregación de aminoácidos pueda permitir una estabilidad en almacén de producto adecuada, por ejemplo hasta tres años, o hasta dos años.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede tener una baja cantidad de HMWS tras 3 meses almacenamiento a 37 °C, por SE-UHPLC. Por ejemplo, la cantidad de HMWS puede ser no más del 2 %, o menos del 2 %, o no más del 1,9 %, o menos del 1,9 %, o no más del 1,8 %, o menos del 1,8 %, o no más del 1,7 %, o menos del 1,7 %, o no más del 1,6 %, o menos del 1,6 %, o no más del 1,5 %, o menos del 1,5 %, o no más del 1,4 %, o menos del 1,4 %, o no más del 1,3 %, o menos del 1,3 %, o no más del 1,2 %, o menos del 1,2 %, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,9 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,8 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,7 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,6 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,5 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,4 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,3 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,2 %.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede tener una baja cantidad de HMWS tras 36 meses almacenamiento a 4 °C, por SE-UHPLC. Por ejemplo, la cantidad de HMWS puede ser no más del 2 %, o menos del 2 %, o no más del 1,9 %, o menos del 1,9 %, o no más del 1,8 %, o menos del 1,8 %, o no más del 1,7 %, o menos del 1,7 %, o no más del 1,6 %, o menos del 1,6 %, o no más del 1,5 %, o menos del 1,5 %, o no más del 1,4 %, o menos del 1,4 %, o no más del 1,3 %, o menos del 1,3 %, o no más del 1,2 %, o menos del 1,2 %, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,9 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,8 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,7 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,6 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,5 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,4 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,3 %, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,2 %.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede tener una elevada cantidad del pico principal de denosumab u otro anticuerpo (o porción de unión al antígeno del mismo) tras 1 mes de almacenamiento a 37 °C, por SE-UHPLC. Por ejemplo, la cantidad del pico principal puede ser al menos del 95 %, o superior al 95 %, o al menos del 96 %, o superior al 96 %, o al menos del 97 %, o superior al 97 %, o al menos del 97,5 %, o superior al 97,5 %, o al menos del 98 %, o superior al 98 %, o al menos del 98,1 %, o superior al 98,1 %, o al menos del 98,2 %, o superior al 98,2 %, o al menos del 98,3 %, o superior al 98,3 %, o al menos del 98,4 %, o superior al 98,4 %, o al menos del 98,5 %, o superior al 98,5 %, o al menos del 98,6 %, o superior al 98,6 %, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 96 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 97 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 97,5 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,1 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,2 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,3 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,4 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,5 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,6 % a aproximadamente 99,9 %.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede tener una alta cantidad del pico principal de denosumab u otro anticuerpo (o porción de unión al antígeno del mismo) tras 3 meses de almacenamiento a 37 °C, por SE-UHPLC. Por ejemplo, la cantidad del pico principal puede ser al menos del 95 %, o superior al 95 %, o al menos del 96 %, o superior al 96 %, o al menos del 97 %, o superior al 97 %, o al menos del 97,5 %, o superior al 97,5 %, o al menos del 98 %, o superior al 98 %, o al menos del 98,1 %, o superior al 98,1 %, o al menos del 98,2 %, o superior al 98,2 %, o al menos del 98,3 %, o superior al 98,3 %, o al menos del 98,4 %, o superior al 98,4 %, o al menos del 98,5 %, o superior al 98,5 %, o al menos del 98,6 %, o superior al 98,6 %, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 96 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 97 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 97,5 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,1 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,2 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,3 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,4 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,5 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,6 % a aproximadamente 99,9 %.

Una formulación estabilizada como se describe en el presente documento puede tener una alta cantidad del pico principal de denosumab u otro anticuerpo (o porción de unión al antígeno del mismo) tras 36 meses de almacenamiento a 4 °C, por SE-UHPLC. Por ejemplo, la cantidad del pico principal puede ser al menos del 95 %, o superior al 95 %, o al menos del 96 %, o superior al 96 %, o al menos del 97 %, o superior al 97 %, o al menos del 97,5 %, o superior al 97,5 %, o al menos del 98 %, o superior al 98 %, o al menos del 98,1 %, o superior al 98,1 %, o al menos del 98,2 %, o superior al 98,2 %, o al menos del 98,3 %, o superior al 98,3 %, o al menos del 98,4 %, o superior al 98,4 %, o al menos del 98,5 %, o superior al 98,5 %, o al menos del 98,6 %, o superior al 98,6 %, por ejemplo, en un intervalo de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 96 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 97 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 97,5 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,1 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,2 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,3 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,4 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,5 % a aproximadamente 99,9 %, o aproximadamente 98,6 % a aproximadamente 99,9 %.

Se contempla que la formulación estabilizada pueda tener tanto una baja cantidad de HMWS como una alta cantidad de pico principal, según una memoria descriptiva descrita anteriormente, tras el almacenamiento.

Las formulaciones farmacéuticas acuosas pueden comprender no más de aproximadamente el 4 % de especies de alto peso molecular (HMWS) y/o pueden comprender más de aproximadamente el 96 % del pico principal de anticuerpo, como se mide por SE-UHPLC, tras el almacenamiento. Las formulaciones farmacéuticas acuosas pueden comprender no más de aproximadamente el 3 % de especies de alto peso molecular (HMWS) y/o pueden comprender más de aproximadamente el 97 % del pico principal de anticuerpo, como se mide por SE-UHPLC, tras el almacenamiento. Las formulaciones farmacéuticas acuosas pueden comprender menos de aproximadamente el 2 % de HMWS y/o superior a aproximadamente el 98 % del pico principal de anticuerpo, como se mide por SE-UHPLC, tras el almacenamiento. El almacenamiento puede ser a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C (por ejemplo, aproximadamente 2 °C, aproximadamente 3 °C, aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C, aproximadamente 7 °C, aproximadamente 8 °C) durante al menos 12 meses, 24 meses o 36 meses (por ejemplo, al menos o aproximadamente 12 meses, al menos o aproximadamente 16 meses, al menos o aproximadamente 20 meses, al menos o aproximadamente 24 meses, al menos o aproximadamente 28 meses, al menos o aproximadamente 32 meses, al menos o aproximadamente 36 meses, opcionalmente, más). El almacenamiento puede ser a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C (por ejemplo, aproximadamente 21 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 22 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 23 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 24 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 25 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 26 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 27 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 28 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 28 °C a aproximadamente 30 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 29 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 28 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 27 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 26 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C,

aproximadamente 20 °C a aproximadamente 24 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 23 °C, aproximadamente 20 °C a aproximadamente 22 °C) durante aproximadamente 1 mes (por ejemplo, aproximadamente 26 días, aproximadamente 27 días, aproximadamente 28 días, aproximadamente 29 días, aproximadamente 30 días, aproximadamente 31 días, aproximadamente 32 días, aproximadamente 33 días, aproximadamente 34 días, aproximadamente 35 días, aproximadamente 36 días). El almacenamiento puede comprender un primer almacenamiento seguido de un segundo almacenamiento, en donde el primer almacenamiento es de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante al menos 12 meses, 24 meses, o 36 meses y el segundo almacenamiento es de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C durante aproximadamente 1 mes. Las formulaciones farmacéuticas acuosas pueden comprender no más del 2 % de HMWS, o menos del 2 % de HMWS, o no más del 1,9 % de HMWS, o menos del 1,9 % de HMWS, o no más del 1,8 % de HMWS, o menos del 1,8 % de HMWS, o no más del 1,7 % de HMWS, o menos del 1,7 % de HMWS, o no más del 1,6 % de HMWS, o menos del 1,6 % de HMWS, o no más del 1,5 % de HMWS, o menos del 1,5 % de HMWS, o no más del 1,4 % de HMWS, o menos del 1,4 % de HMWS, o no más del 1,3 % de HMWS, o menos del 1,3 % de HMWS, o no más del 1,2 % de HMWS, o menos del 1,2 % de HMWS, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 2 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,9 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,8 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,7 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,6 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,5 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,4 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,3 % de HMWS, o aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 1,2 % de HMWS, opcionalmente, como se mide por SE-UHPLC. Las formulaciones farmacéuticas acuosas puede comprender más del 98 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 95 % del pico principal de anticuerpo, o más del 95 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 96 % del pico principal de anticuerpo, o más del 96 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 97 % del pico principal de anticuerpo, o más del 97 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 97,5 % del pico principal de anticuerpo, o más del 97,5 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98,1 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98,1 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98,2 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98,2 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98,3 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98,3 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98,4 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98,4 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98,5 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98,5 % del pico principal de anticuerpo, o al menos 98,6 % del pico principal de anticuerpo, o más del 98,6 % del pico principal de anticuerpo, por ejemplo en un intervalo de aproximadamente 95 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 96 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 97 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 97,5 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98,1 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98,2 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98,3 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98,4 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98,5 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, o aproximadamente 98,6 % a aproximadamente 99,9 % del pico principal de anticuerpo, opcionalmente, como se mide por SE-UHPLC.

Como se usa aquí, el término "anticuerpo" se refiere a una proteína que tiene un formato de inmunoglobulina convencional, que comprende cadenas pesadas y ligeras, y que comprende regiones variables y constantes. Por ejemplo, un anticuerpo puede ser una IgG que es una estructura "en forma de Y" de dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (que normalmente tiene un peso molecular de alrededor de 25 kDa) y una cadena "pesada" (que normalmente tiene un peso molecular de alrededor de 50-70 kDa). Un anticuerpo tiene una región variable y una región constante. En los formatos de IgG, la región variable generalmente tiene alrededor de 100-110 o más aminoácidos, comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR), es principalmente responsable del reconocimiento de antígenos, y varía sustancialmente entre otros anticuerpos que se unen a diferentes antígenos. Véase, por ejemplo, Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4.^a ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999).

Brevemente, en un armazón de anticuerpo, las CDR están incrustadas dentro de un marco en la región variable de la cadena pesada y ligera en la que constituyen las regiones en gran parte responsables de la unión y reconocimiento del antígeno. Una región variable comprende al menos tres CDR de cadena pesada o tres CDR de cadena ligera (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; véase también Chothia y Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883), dentro de una región estructural (regiones estructurales designadas 1-4, FR1, FR2, FR3 y FR4, por Kabat et al., 1991; véase también Chothia y Lesk, 1987, arriba).

Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa y lambda. Las cadenas pesadas se clasifican como mu, delta, gamma, alfa, o épsilon, y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, respectivamente. IgG tiene varias subclases, incluyendo, pero sin limitarse a, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM tiene subclases, que incluyen, pero no se limitan a, IgM1 e IgM2. Las divulgaciones descritas en el presente documento incluyen todas aquellas clases o isotipos de anticuerpos. La región constante de cadena ligera puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena ligera de tipo kappa o lambda, por ejemplo una región constante de cadena ligera de

5 tipo kappa o lambda humana. La región constante de cadena pesada puede ser, por ejemplo, una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma, o mu, por ejemplo una región constante de cadena pesada de tipo alfa, delta, épsilon, gamma o mu humana. Por consiguiente, el anticuerpo puede ser un anticuerpo de isotipo IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM, incluyendo uno cualquiera de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. El anticuerpo anti-RANKL puede ser un anticuerpo IgG1, IgG2 o IgG4.

10 El anticuerpo puede ser un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal. El anticuerpo puede comprender una secuencia que es sustancialmente similar a un anticuerpo que existe de forma natural producido por un mamífero, por ejemplo, ratón, rata, conejo, cabra, caballo, pollo, hámster, cerdo o humano. A este respecto, el anticuerpo se puede considerar un anticuerpo de mamífero, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, anticuerpo de rata, anticuerpo de conejo, anticuerpo de cabra, anticuerpo de caballo, anticuerpo de pollo, anticuerpo de hámster, anticuerpo de cerdo o anticuerpo humano. El anticuerpo anti-RANKL puede ser un anticuerpo monoclonal humano. La proteína recombinante puede ser un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado. El término "anticuerpo quimérico" se usa en el presente documento para referirse a un anticuerpo que contiene dominios constantes de una especie y los dominios variables de una segunda, o más, en general, que contiene tramos de secuencia de aminoácidos de al menos dos especies. El término "humanizado", cuando se usa con respecto a anticuerpos, se refiere a anticuerpos que tienen al menos regiones CDR de una fuente no humana que se manipulan para tener una estructura y una función inmunológica más similares a los anticuerpos humanos verdaderos que los anticuerpos de la fuente original. Por ejemplo, humanizar puede implicar injertar CDR de un anticuerpo no humano, tal como un anticuerpo de ratón, en un anticuerpo humano. Humanizar también puede implicar seleccionar sustituciones de aminoácidos para hacer que una secuencia no humana parezca más una secuencia humana.

25 Un anticuerpo se puede escindir en fragmentos por enzimas, tales como, por ejemplo, papaína y pepsina. La papaína escinde un anticuerpo para producir dos fragmentos Fab y un solo fragmento Fc. Pepsina escinde un anticuerpo para producir un fragmento $F(ab')_2$ y un fragmento pFc' . La formulación farmacéutica acuosa puede comprender un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un Fab, Fc, $F(ab')_2$ o pFc' , que retiene al menos un sitio de unión al antígeno (RANKL). Con respecto a las formulaciones farmacéuticas acuosas y los métodos de la presente divulgación, el anticuerpo puede carecer de ciertas porciones de un anticuerpo, y puede ser un fragmento de anticuerpo que se une a RANKL. El fragmento de anticuerpo puede ser una porción de unión al antígeno de un anticuerpo anti-RANKL.

30 Los productos de proteína de anticuerpo pueden ser un formato de unión al antígeno basado en fragmentos de anticuerpos, por ejemplo, scFv, Fab y VHH/VH, que retienen la capacidad completa de unión al antígeno. El fragmento de unión al antígeno más pequeño que retiene su sitio de unión al antígeno completo es el fragmento Fv, que consiste completamente en regiones variables (V). Un conector peptídico de aminoácidos soluble y flexible se usa para conectar las regiones V con un fragmento scFv (fragmento variable de una sola cadena) para la estabilización de la molécula, o los dominios constantes (C) se añaden a las regiones V para generar un fragmento Fab [fragmento, unión al antígeno). Tanto scFv como Fab son fragmentos ampliamente usados que pueden producirse fácilmente en hospedadores, por ejemplo, hospedadores procariontes. Otros productos de proteína de anticuerpo incluyen scFv estabilizado con enlaces de disulfuro (ds-scFv), Fab monocatenario (scFab), así como formatos de anticuerpos di- y multiméricos tales como di-, tria- y tetra-cuerpos, o minicuerpos (miniAb) que comprenden diferentes formatos que consisten en los scFv enlazados a dominios de oligomerización. Los fragmentos más pequeños son VHH/VH de los Ab de cadena pesada de camélidos, así como los Ab de un solo dominio (sdAb). El elemento estructural que se usa más frecuentemente para crear formatos novedosos de anticuerpo es el fragmento de anticuerpo (scFv) de dominio variable (V) de una sola cadena, que comprende dominios V de la cadena pesada y ligera (dominio VH y VL) unidos por un conector peptídico de ~15 residuos de aminoácidos. Una pepticuerpo o fusión péptido-Fc es aún otro producto de proteína de anticuerpo. La estructura de un pepticuerpo consiste en un péptido biológicamente activo injertado en un dominio Fc. Los pepticuerpos están bien descritos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shimamoto et al., mAbs 4(5): 586-591 (2012).

50 Otros productos de proteína de anticuerpo incluyen, por ejemplo, un anticuerpo monocatenario (SCA); un diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; y anticuerpos biespecíficos o triespecíficos. Los anticuerpos biespecíficos se pueden dividir en cinco clases principales: BslgG, IgG con apéndice, fragmentos de BsAb, proteínas de fusión biespecíficas, y conjugados de BsAb. Véase, por ejemplo, Spiess et al., Molecular Immunology 67(2) Parte A: 97-106 (2015).

55 El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en uno cualquiera de estos productos de proteína de anticuerpo (por ejemplo, scFv, Fab VHH/VH, fragmento Fv, ds-scFv, scFab, anticuerpo dimérico, anticuerpo multimérico (por ejemplo, un diacuerpo, triacuerpo, tetracuerpo), miniAb, pepticuerpo VHH/VH de anticuerpo de cadena pesada de camélido, sdAb, diacuerpo; un triacuerpo; un tetracuerpo; un anticuerpo biespecífico o triespecífico, BslgG, IgG unida, fragmento BsAb, proteína de fusión biespecífica y conjugado BsAb).

60 El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en un producto de proteína de anticuerpo en forma monomérica, o forma polimérica, oligomérica o multimérica. En ciertas divulgaciones en las que el anticuerpo comprende dos o más fragmentos de regiones de unión al antígeno distintas, el anticuerpo se considera biespecífico, triespecífico o multiespecífico, o bivalente, trivalente o multivalente, dependiendo del número de epítopos distintos que son reconocidos y unidos por el anticuerpo.

Un anticuerpo humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano o una porción de unión al antígeno del mismo para su uso en la formulación es un anticuerpo o una porción de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a la proteína RANKL humana o proteína osteoprotegrina (OPGL) humana de un fragmento del mismo e inhibe o neutraliza la actividad de RANKL o proteína OPGL y/o inhibe la vía de señalización de RANK/RANKL, y se denomina en el presente documento un anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL o una porción de unión al antígeno del mismo. Por ejemplo, las formulaciones descritas en el presente documento pueden comprender un anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL que se une específicamente a la secuencia de aminoácidos de RANKL humano (SEQ ID NO: 12) o una porción del mismo. La proteína RANKL humana es una proteína transmembranaria o soluble que está codificada por la secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 11, que se sabe que es esencial para la formación, función y supervivencia de osteoclastos. Por ejemplo, los anticuerpos anti-RANKL humanos inhiben la interacción de RANKL con su receptor RANK.

Un ejemplo de un anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL es denosumab, que se comercializa en forma comercial como Xgeva[®] y Prolia[®]. Xgeva[®] es una formulación de denosumab de 120 mg de dosis en 1,7 ml de disolución (70 mg/ml) en un vial de un solo uso, que contiene 120 mg de denosumab, acetato (18 mM), sorbitol (4,6 %), agua para inyectables (USP) e hidróxido sódico a un pH de 5,2. Prolia[®] está disponible como formulaciones de denosumab de 60 mg de dosis en 1 ml de disolución (60 mg/ml). Cada jeringa precargada de un solo uso de 1 ml de Prolia[®] contiene 60 mg de denosumab (60 mg/ml de disolución), 4,7 % de sorbitol, acetato 17 mM, 0,01 % de polisorbato 20, agua para inyectables (USP) e hidróxido sódico a un pH de 5,2. Se contemplan específicamente las formulaciones que se describen en el presente documento, y que incluyen denosumab o una porción del mismo. Denosumab es un anticuerpo monoclonal IgG2 completamente humano que se une a RANKL humano. Denosumab tiene un peso molecular aproximado de 147 kDa y se expresa en la estirpe celular de ovario de hámster chino (CHO). Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera variable (LC) y la cadena pesada variable (HC) de denosumab se exponen en SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente, y LC y HC de longitud completa se exponen como SEQ ID NO: 3 y 4; respectivamente. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (LC variable de denosumab) es, opcionalmente, un ácido nucleico de SEQ ID NO: 19. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (HC variable de denosumab) es, opcionalmente, un ácido nucleico de SEQ ID NO: 20. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 (LC de denosumab de longitud completa) es, opcionalmente, un ácido nucleico de SEQ ID NO: 21. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 (HC de denosumab de longitud completa) es, opcionalmente, un ácido nucleico de SEQ ID NO: 23. La forma madura de LC, que se representa como los aminoácidos 21-235 de LC de longitud completa, se expone como SEQ ID NO: 13, mientras que la forma madura de HC, que se representa como los aminoácidos 20-467 de HC de longitud completa, se expone como SEQ ID NO: 14. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13 (la forma madura de LC) es, opcionalmente, un ácido nucleico de SEQ ID NO: 22. Un ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 (la forma madura de HC) es, opcionalmente, un ácido nucleico de SEQ ID NO: 24. Además, CDR de LC de denosumab se exponen como SEQ ID NO: 5 (LC CDR1), SEQ ID NO: 6 (LC CDR2) y SEQ ID NO: 7 (LC CDR3). Las CDR de HC de denosumab se exponen como SEQ ID NO: 8 (HC CDR1), SEQ ID No: 9 (HC CDR2) y SEQ ID NO: 10 (HC CDR3). Denosumab se ha descrito y reivindica en la solicitud de patente internacional n.º WO 03/002713 y la patente de EE. UU. n.º 7.364.736.

Como se usa en el presente documento, el término "denosumab" incluye biosimilares de denosumab. Como se usa en el presente documento, "biosimilar" (de un producto de referencia/fármaco biológico autorizado, tal como una proteína terapéutico, anticuerpo, etc.) se refiere a un producto biológico que es similar al producto de referencia basándose en datos derivados de (a) estudios analíticos que demuestran que el producto biológico es altamente similar al producto de referencia a pesar de diferencias menores en componentes clínicamente inactivos; (b) estudios en animales (incluyendo la evaluación de toxicidad); y/o (c) un estudio o estudios clínicos (incluyendo la evaluación de inmunogenicidad y farmacocinética o farmacodinámica) que son suficientes para demostrar la seguridad, la pureza y la potencia en una o más condiciones apropiadas de uso para las que el producto de referencia tiene licencia y pretende ser usado y para el que se busca licencia para el producto biológico. El producto biológico biosimilar y producto de referencia pueden utilizar el mismo mecanismo o mecanismos de acción para la condición o condiciones de uso prescritas, recomendadas o sugeridas en el etiquetado propuesto, pero solo hasta el punto de que el mecanismo o mecanismos de acción sean conocidos para el producto de referencia. La condición o condiciones de uso prescritas, recomendadas o sugeridas en el etiquetado propuesto para el producto biológico pueden haber sido autorizadas previamente para el producto de referencia. La vía de administración, la forma farmacéutica y/o la concentración del producto biológico pueden ser las mismas que las del producto de referencia. La facilidad con la que el producto biológico se fabrica, procesa, envasa o mantiene puede cumplir los patrones diseñados para asegurar que el producto biológico siga siendo seguro, puro y potente. El producto de referencia puede estar autorizado en al menos uno de EE. UU., Europa o Japón. Un biosimilar puede ser, por ejemplo, un anticuerpo que tiene la misma secuencia de aminoácidos primaria como anticuerpo comercializado, pero se puede preparar en diferentes tipos de células o por diferentes métodos de producción, purificación o formulación.

Las formulaciones pueden comprender un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 1-4, 13, 14, o una porción del mismo. Las formulaciones pueden comprender un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una de las secuencias de aminoácidos de CDR expuestas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, o al menos dos de las secuencias de aminoácidos de CDR expuestas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, o al menos tres de las secuencias de aminoácidos de CDR expuestas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, o al menos cuatro de las secuencias de aminoácidos de CDR expuestas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, o al menos cinco de las secuencias de aminoácidos de CDR expuestas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10, o al menos seis de las secuencias de aminoácidos de CDR expuestas como SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o la SEQ ID NO: 10.

Las formulaciones pueden comprender un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 85 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 90 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 91 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 92 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 93 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 94 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 95 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 96 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 97 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 98 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK, o un anticuerpo anti-RANKL humano que comprende al menos una secuencia de aminoácidos que es al menos 99 % idéntica a una cualquiera de SEQ ID NO: 1-4, 13, y 14 e inhibe la interacción entre RANKL y su receptor, RANK.

La formulación farmacéutica acuosa puede comprender un anticuerpo anti-RANKL, o una porción de unión al antígeno del mismo, que incluye, un producto de proteína de anticuerpo, como se describe en el presente documento. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 5. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 6. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 10. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender a SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, y SEQ ID NO: 10. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR3 de cadena ligera secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO:7; (ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 8, opcionalmente, SEQ ID NO: 27; (iii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR2 de cadena pesada secuencia que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 9, o (iv) cualquier combinación de los mismos. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender (A) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; y (B) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (opcionalmente, SEQ ID NO: 27), un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender: (A) un dominio variable de la cadena ligera seleccionado del grupo que consiste en: (i) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos

que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 1; (ii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que comprende SEQ ID NO: 19; y (iii) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de un polinucleótido que consiste en SEQ ID NO: 19; o (B) el dominio variable de la cadena pesada seleccionado del grupo que consiste en: (i) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 2; (ii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos que comprende SEQ ID NO: 20, y (iii) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de un polinucleótido que consiste en SEQ ID NO: 20; o (C) un dominio variable de la cadena ligera de (A) y un dominio variable de la cadena pesada de (B). El anticuerpo anti-RANKL puede ser un anticuerpo completamente humano, un anticuerpo humanizado, o un anticuerpo quimérico. La porción de unión al antígeno puede ser un Fab, Fab', F(ab')₂, o un Fv monocatenario. El anticuerpo anti-RANKL puede ser un anticuerpo IgG₁, IgG₂ o IgG₄, opcionalmente, en donde el anticuerpo anti-RANKL comprende una secuencia de SEQ ID NO: 15. El anticuerpo anti-RANKL puede comprender una secuencia de SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 o SEQ ID NO: 18. El anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, puede comprender: (A) una cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en: (i) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 13; (ii) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 21 o 23; y (iii) una cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de un polinucleótido que consiste en SEQ ID NO: 21 o 23; o (B) una cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en: (i) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 % (por ejemplo, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 91 %, al menos 92 %, al menos 93 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 %) idéntica a SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 14; (ii) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de polinucleótidos de SEQ ID NO: 22 o 24, y (iii) una cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos codificada por un polinucleótido que se hibrida en condiciones rigurosas con el complemento de un polinucleótido que consiste en SEQ ID NO: 22 o 24; o (C) un dominio variable de la cadena ligera de (A) y un dominio variable de la cadena pesada de (B).

La concentración de denosumab u otro anticuerpo anti-RANKL humano, o porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación acuosa puede estar, en general, en cualquier intervalo útil, por ejemplo aproximadamente 0,1 a aproximadamente 200 mg/ml. A medida que aumenta la concentración, existe un aumento en la viscosidad, que puede impedir el procesamiento de la formulación en una presentación de dosis estéril para uso farmacéutico.

La estabilidad mejorada de la formulación por un inhibidor de la agregación de aminoácidos puede existir en cualquier concentración de denosumab u otro anticuerpo anti-RANKL humano, o porción de unión al antígeno del mismo, que incluye aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 140 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 110 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 140 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 110 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 80 mg/ml, por ejemplo 120 mg/ml.

Se puede contemplar que la concentración de denosumab u otro anticuerpo anti-RANKL humano, o porción de unión al antígeno del mismo, para formulaciones que tienen un pH de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2 incluyen intervalos superiores a 70 mg/ml, o al menos 71 mg/ml, o al menos aproximadamente 75 mg/ml, o al menos aproximadamente 80 mg/ml, o al menos aproximadamente 85 mg/ml, o al menos aproximadamente 90 mg/ml, o al menos aproximadamente 95 mg/ml, o al menos aproximadamente 100 mg/ml, o al menos aproximadamente 105 mg/ml, o al menos aproximadamente 110 mg/ml, o al menos aproximadamente 115 mg/ml, o al menos aproximadamente 120 mg/ml, y up a aproximadamente 200 mg/ml. Por ejemplo, los intervalos contemplados incluyen

5 71 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 140 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 120 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 110 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, o aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 90 mg/ml, o aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml, o aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml, o aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 140 mg/ml, por ejemplo 120 mg/ml.

10 La formulación farmacéutica acuosa puede comprender el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración superior a 70 mg/ml, por ejemplo, superior a 80 mg/ml, superior a 90 mg/ml, superior a 100 mg/ml, superior a 125 mg/ml, superior a 150 mg/ml, superior a 175 mg/ml, superior a 200 mg/ml, superior a 225 mg/ml, superior a 250 mg/ml, superior a 275 mg/ml. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración inferior a aproximadamente 300 mg/ml, por ejemplo, inferior a aproximadamente 275 mg/ml, inferior a aproximadamente 250 mg/ml, inferior a aproximadamente 225 mg/ml, inferior a aproximadamente 200 mg/ml, inferior a aproximadamente 175 mg/ml, o inferior a aproximadamente 150 mg/ml. La concentración del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación está en un intervalo de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 225 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 275 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 275 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 25 mg/ml. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender una concentración del anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo, en un intervalo de superior a 70 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, por ejemplo, superior a 80 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 90 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 100 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 125 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 150 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 175 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 200 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, superior a 70 mg/ml a aproximadamente 275 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, superior a aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender una concentración del anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo en un intervalo de aproximadamente 100 a aproximadamente 140 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml.

45 La formulación farmacéutica acuosa puede comprender una concentración del anticuerpo o porción de unión al antígeno del mismo que es aproximadamente $120 \text{ mg/ml} \pm 12 \text{ mg/ml}$, por ejemplo, aproximadamente 108 mg/ml a aproximadamente 132 mg/ml, aproximadamente 115 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 116 mg/ml, aproximadamente 117 mg/ml, aproximadamente 118 mg/ml, aproximadamente 119 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 121 mg/ml, aproximadamente 122 mg/ml, aproximadamente 123 mg/ml, aproximadamente 124 mg/ml.

Denosumab y otros anticuerpos monoclonales humanos anti-RANKL, y porciones de unión al antígeno del mismo, se pueden preparar según la descripción proporcionada en la publicación de patente internacional WO 2003002713 A2.

55 Estudios de formulación en disoluciones de denosumab a alta concentración (por ejemplo, 120 mg/ml), descritos a continuación, mostraron un gran aumento en la formación de HMWS (tasa y grado) inferior a pH 5 y especialmente a pH más bajo (por ejemplo pH 4,5). A medida que aumentó el pH, se mostró que había un aumento en la formación de las especies de dímeros. Equilibrando los dos efectos, se contempla que una formulación descrita en el presente documento tendrá un pH en un intervalo de aproximadamente 5,0 a menos de 5,2, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,19, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,15, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,10, por ejemplo aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,05, aproximadamente 5,1, o aproximadamente 5,15.

65 Los estudios descritos en el presente documento también mostraron un efecto estabilizante y reductor de la agregación independiente, hecho posible gracias a la inclusión de un inhibidor de la agregación de aminoácidos. Por consiguiente, se contempla que cuando se incluye un inhibidor de la agregación de aminoácidos, el pH de la formulación puede

5 estar en un intervalo de aproximadamente 4,9 a aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,4, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2, o aproximadamente 5,0 a menos de 5,2, o aproximadamente 5,0 a 5,19, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,15, o aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,10, por ejemplo, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,05, aproximadamente 5,1, o aproximadamente 5,15, o aproximadamente 5,2.

10 La formulación acuosa se puede tamponar. Cuando se usa, el tampón puede ser un tampón orgánico. El sistema tampón puede estar centrado a 25 °C alrededor de pH 4 a 5,5, o 4,5 a 5,5, o 4,5 a 5, por ejemplo. Por ejemplo, el sistema tampón pueden tener un pKa dentro de una unidad de pH de pH 5,0-5,2 a 25 °C. Dicho sistema tampón es ácido acético / acetato, que tiene un pKa de aproximadamente 4,75 a 25 °C. Otro de dicho sistema tampón es ácido glutámico / glutamato, que tiene un pKa de aproximadamente 4,27 a 25 °C. Otros sistemas tampón alternativos contemplados incluyen sistemas basados en iones que incluyen succinato (pKa de 4,21 a 25 °C), propionato (pKa de 4,87 a 25 °C), malato (pKa de 5,13 a 25 °C), piridina (pKa de 5,23 a 25 °C) y piperazina (pKa de 5,33 a 25 °C). Se contempla que el tampón se puede proporcionar como la sal de sodio (o sal de disodio, según convenga), o 15 alternativamente como una sal de potasio, magnesio o amonio. Los tampones se pueden basar en acetato, citrato, succinato, fosfato e hidroximetilaminometano (Tris), por ejemplo. Se contemplan particularmente tampones basados en acetato, glutamato y succinato, por ejemplo, acetato o glutamato.

20 Una comparación de formación de HMWS por cromatografía líquida de resolución ultra-alta de exclusión por tamaño (SE-UHPLC) en formulaciones de 120 mg/ml de denosumab que tienen tampones acetato o glutamato, pero de otro modo equivalentes, mostraron que no hubo diferencia entre el tipo de tampón cuando se evaluaron durante cuatro semanas de almacenamiento a 37 °C.

25 Cuando se usa, el tampón se incluirá en una cantidad suficiente para mantener el pH seleccionado de la formulación en condiciones de almacenamiento para la estabilidad en almacén del producto, por ejemplo, 3 años a 4 °C, o 1 mes a 25 °C, o 2 semanas a 25 °C, o 7 días a 25 °C. La concentración de tampón puede estar en un intervalo de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 20 mM, o aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM, por ejemplo 10 mM, o 15 mM, o 18 mM, o 25 mM. Por ejemplo, un tampón acetato usado con el anticuerpo monoclonal anti-RANKL (por ejemplo denosumab) y fenilalanina puede estar en un intervalo de aproximadamente 2 mM a 30 aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 16 mM a aproximadamente 41 mM, o aproximadamente 25 mM a aproximadamente 39 mM, o aproximadamente 30 mM a aproximadamente 34 mM. Dicho de otra forma, un tampón de diafiltración usado para concentrar el anticuerpo hasta una concentración superior a 70 mg/ml (por ejemplo, 120 mg/ml) puede estar en un intervalo de 5 mM a aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 15 mM a 35 aproximadamente 25 mM, o aproximadamente 20 mM. También se contempla proporcionar una formulación estabilizada con aminoácidos que esté auto-tamponada. El tampón se puede incluir en una cantidad suficiente para mantener el pH seleccionado de la formulación en condiciones de almacenamiento para la estabilidad en almacén del producto, por ejemplo, 36 meses a de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, opcionalmente, seguido de 40 aproximadamente 1 mes a de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C.

45 La formulación farmacéutica acuosa puede comprender un tampón, y opcionalmente, el tampón está centrado, a 25 °C, en un intervalo de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente pH 5,5. El tampón puede tener un pKa dentro de una unidad de pH de pH 5,0-5,2 a 25 °C. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender tampón de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 60 mM, tampón aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o tampón de aproximadamente 9 mM a aproximadamente 45 mM (por ejemplo, aproximadamente 15 mM a aproximadamente 30 mM tampón, por ejemplo, tampón aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM). El tampón puede ser acetato o glutamato.

50 La formulación también puede incluir uno o más estabilizadores contra la agregación de proteínas y otros excipientes de formulación. Se contempla que dichos estabilizadores y excipientes incluyen, pero no se limitan a, inhibidores de la agregación de aminoácidos, modificadores de la tonicidad, tensioactivos, agentes solubilizantes (por ejemplo, N-metil-2-pirrolidona), conjugación de PEG y ciclodextrinas (por ejemplo, Captisol®).

55 El término "inhibidor de la agregación de aminoácidos" se refiere a un aminoácido o una combinación de aminoácidos (por ejemplo mezclas, o dipéptidos, u oligopéptidos que tienen 2 a 10 residuos), donde cualquier aminoácido dado está presente ya sea en su forma de base libre o en su forma de sal (por ejemplo, HCl de arginina), o un análogo de aminoácido, y que reduce HMWS o inhibe la formación de HMWS. Se contemplan sales que incluyen sales de sodio, sales de potasio y sales de clorhidrato. Además, se contemplan sales de arginina con clorhidrato, glutamato, butirato y glicolato. Donde se usa una combinación de aminoácidos, todos los aminoácidos pueden estar presentes en sus 60 formas de base libre, todos pueden estar presentes en sus formas de sal, o algunos pueden estar presentes en sus formas de base libre mientras que otros están presentes en sus formas de sal. Además de o alternativamente a los dipéptidos y oligopéptidos, se pueden usar mezclas de uno o más aminoácidos, por ejemplo una mezcla de arginina y fenilalanina. Solo un tipo de inhibidor de la agregación de aminoácidos puede estar presente en la formulación farmacéutica acuosa. Solo un aminoácido puede estar presente, por ejemplo, solo L-arginina o solo L-fenilalanina 65 puede estar presente en la formulación.

Se contempla el uso de uno o más aminoácidos que llevan una cadena lateral cargada, por ejemplo, uno o más de arginina, lisina, histidina, aspartato y glutamato. Los aminoácidos se pueden seleccionar de aminoácidos básicos, por ejemplo, arginina, lisina, histidina, o una combinación de los mismos. Se contempla particularmente la arginina. En el presente método se puede usar cualquier estereoisómero (es decir, isómero L, D o DL) de un aminoácido particular, o combinaciones de estos estereoisómeros, o formulación mientras que el aminoácido particular esté presente en su forma de base libre o su forma de sal. Se contempla particularmente un L-estereoisómero, por ejemplo, L-arginina. Opcionalmente, el aminoácido es uno que tiene una cadena lateral positivamente cargada, por ejemplo, arginina.

Opcionalmente, se contempla el uso de uno o más aminoácidos que tengan anillos aromáticos en sus cadenas laterales, por ejemplo, fenilalanina, tirosina, triptófano, o una combinación de los mismos. Se contempla particularmente la fenilalanina.

Opcionalmente, se contempla el uso de uno o más aminoácidos hidrófobos, por ejemplo, alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, valina, prolina o glicina.

Opcionalmente, se contempla el uso de uno o más aminoácidos hidrófobos alifáticos, por ejemplo, alanina, isoleucina, leucina, o valina. Se contempla particularmente la leucina.

También se pueden usar en el presente método o formulación análogos de aminoácidos que muestran efectos reductores o inhibidores de la agregación. El término "análogo de aminoácido" se refiere a un derivado del aminoácido que existe de forma natural. Análogos contemplados incluyen, por ejemplo, derivados de amino y N-monoetilo, y n-acetilo. Otros análogos contemplados incluyen dipéptidos, u oligopéptidos que tienen 2 a 10 residuos, por ejemplo arginina-arginina y fenilalanina-arginina. Opcionalmente, se contempla que la n-acetil arginina y la n-acetil lisina no se usen solos, sino que se pueden usar en combinación con otro inhibidor de la agregación de aminoácidos. Al igual que con los aminoácidos, los análogos de aminoácidos se usan en el presente método o formulación en cualquiera de su forma de base libre o su forma de sal.

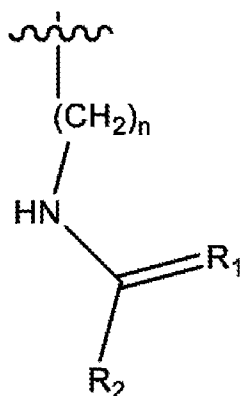
El (Los) inhibidor(es) de la agregación de aminoácidos usado(s) en el presente método o formulación protegen a la proteína terapéuticamente activa de diversos estreses, aumentando así o/y manteniendo la estabilidad de la proteína o formulación que contiene la proteína durante la vida útil de la proteína (antes y durante el almacenamiento, antes de uso). En el presente documento, el término "estrés" incluye, pero no se limita a, calor, congelación, pH, luz, agitación, oxidación, deshidratación, superficies, cizallamiento, congelación/descongelación, presión, metales pesados, compuestos fenólicos, desnaturalizantes, etc., de cualquier fuente, por ejemplo, transporte. Se contempla particularmente el estrés por calor. El término estrés engloba cualquier factor que module (es decir, reduzca, mantenga o aumente) la estabilidad de una proteína o una formulación que contiene la proteína. El aumento y/o mantenimiento de la estabilidad con adición de un inhibidor de la agregación de aminoácidos ocurre en un modo dependiente de la concentración. Es decir, las concentraciones crecientes de inhibidor de la agregación de aminoácidos conducen al aumento y/o mantenimiento de la estabilidad de una proteína o una formulación que contiene una proteína de la presente divulgación cuando esa proteína o formulación que contiene esa proteína presenta normalmente la formación de agregado en ausencia del inhibidor de la agregación de aminoácidos. Como se muestra en los ejemplos a continuación, la inclusión de un inhibidor de la agregación de aminoácidos en la formulación también puede reducir la cantidad de HMWS ya formados. Por ejemplo, dichos inhibidores de la agregación de aminoácidos incluyen arginina y el dipéptido arginina-fenilalanina. La determinación de la cantidad de un inhibidor particular de la agregación de aminoácidos que se va a usar en el presente método o formulación para reducir la formación de agregados aumentando así la estabilidad de proteínas, y aumentando así la estabilidad de la formulación durante toda la vida útil de la proteína, se puede determinar fácilmente para denosumab o cualquier anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL particular de interés en vista de la divulgación en el presente documento.

Se ha mostrado que la presencia de un inhibidor de la agregación de aminoácidos en la formulación reduce la cantidad de especies diméricas y su tasa cinética de formación. Por ejemplo, incluir arginina en una concentración de 75 mM en una formulación de denosumab que tiene un pH de 5,2 produjo una reducción de aproximadamente el 0,3 % y el 25 % en las cantidades de las especies de dímero y su tasa cinética de formación, respectivamente, después de 1 mes a 37 °C cuando se compara con una formulación similar sin arginina a un pH de 5,2. A diferencia, se descubrió que un anticuerpo monoclonal que no es un anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL no se estabilizaba por inclusión de arginina, y en su lugar produjo un aumento de HMWS. Por consiguiente, otro método de la divulgación es un método de reducción de HMWS en una formulación de denosumab u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL mediante la adición de un inhibidor de la agregación de aminoácidos, por ejemplo, arginina o fenilalanina.

Por consiguiente, la formulación farmacéutica acuosa puede comprender un inhibidor de la agregación de aminoácidos, que opcionalmente es un aminoácido. El aminoácido puede ser un aminoácido de L-estereoisómero (L-aminoácido), aunque se contemplan aminoácidos de D-estereoisómero (D-aminoácidos). El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede comprender un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada, también denominada en el presente documento un "aminoácido cargado". El término "aminoácido cargado" se refiere a un aminoácido que comprende una cadena lateral que tiene carga negativa (es decir, desprotonado) o carga negativa (es decir, protonado) en disolución acuosa a pH fisiológico. Por ejemplo, los aminoácidos de carga negativa incluyen, por ejemplo, ácido aspártico y ácido glutámico, mientras que los aminoácidos de carga positiva incluyen, por ejemplo, arginina, lisina e

histidina. Los aminoácidos cargados incluyen los aminoácidos cargados entre los 20 aminoácidos codificados, así como aminoácidos atípicos o que no existen de forma natural o no codificados. Por consiguiente, el inhibidor de la agregación de aminoácidos puede ser un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva. El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva puede comprender una estructura de cadena lateral

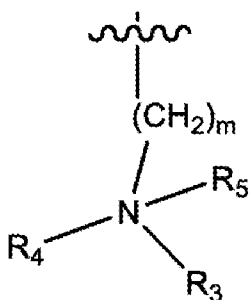
5



[Fórmula I]

en donde n es 1 a 7, en donde cada uno de R₁ y R₂ se selecciona independientemente del grupo que consiste en H, alquilo C₁-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)NH₂, NH, NH₂(alquil C₁-C₁₈)SH, (alquil C₀-C₄)cicloalquilo (C₃-C₆), (alquil C₀-C₄)(heterocíclico C₂-C₅), (alquil C₀-C₄)(aril C₆-C₁₀)R₇ y (alquil C₁-C₄)(heteroarilo C₃-C₉), en donde R₇ es H u OH, en donde opcionalmente uno de R₁ y R₂ es un grupo amino libre (-NH₃⁺),

10



[Fórmula II]

en donde m es 1 a 7, en donde cada uno de R₃ y R₄ se selecciona independientemente del Grupo A que consiste en: H, alquilo C₁-C₁₈, (alquil C₁-C₁₈)OH, (alquil C₁-C₁₈)NH₂, (alquil C₁-C₁₈)SH, (alquil C₀-C₄)cicloalquilo (C₃-C₆), (alquil C₀-C₄)(heterocíclico C₂-C₅), (alquil C₀-C₄)(aril C₆-C₁₀)R₈ y (alquil C₁-C₄)(heteroarilo C₃-C₉), en donde R₈ es H u OH, en donde, R₅ está opcionalmente presente, y, cuando está presente, se selecciona del grupo A, opcionalmente, en donde cada uno de R₃ y R₄ y R₅ es H.

15

20

El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva puede comprender una estructura de cadena lateral de la fórmula I y, n está en un intervalo de 2 a 4. R₁ puede ser NH o NH₂. R₂ puede ser NH₂ o NH₃⁺. El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva puede ser arginina. El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva puede comprender una estructura de cadena lateral de la fórmula II y, m está en un intervalo de 3 a 5. Cada uno de R₃ y R₄ puede ser H. R₅ puede estar presente, y opcionalmente es H. El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva puede ser lisina. El aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva está presente en la formulación como una sal, opcionalmente, una sal de clorhidrato (HCl). Por consiguiente, la composición farmacéutica acuosa puede comprender HCl de L-arginina o HCl de L-lisina.

25

30

El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede ser un aminoácido aromático. El aminoácido aromático puede comprender un fenilo o un indol. El aminoácido aromático puede comprender una cadena de alquilo C₁-C₆ (por ejemplo, una cadena de alquilo C₁-C₃) entre el carbono alfa y el fenilo o indol. El aminoácido aromático puede ser L-fenilalanina. El aminoácido aromático puede ser L-triptófano.

35

El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede ser un aminoácido hidrófobo. La hidrofobia se puede medir o puntuar según una cualquiera de las escalas de hidrofobia conocidas en la técnica. En general, cuanto más positiva sea la puntuación, más hidrófobo será el aminoácido. La hidrofobia se puede puntuar en la escala de hidrofobia de

Kyte y Doolittle (Kyte J, Doolittle RF (mayo de 1982). "A simple method for displaying the hydropathic character of a protein". J. Mol. Biol. 157 (1): 105-32.) El aminoácido hidrófobo puede tener una puntuación superior a aproximadamente 2,5 en la escala de hidrofobia de Kyte y Doolittle. El aminoácido hidrófobo puede comprender una cadena lateral que comprende un alquilo C₂ a C₁₂, ramificado o de cadena lineal, o un cicloalquilo C₄ a C₈, un heterociclo C₄ a C₈ que comprende un heteroátomo de nitrógeno, opcionalmente, en donde el heterociclo es un imidazol, pirrol o indol. Para los fines en el presente documento, el término "cicloalquilo" engloba cualquier ciclo de carbono, que incluye biciclos o triciclos de carbono.

El aminoácido hidrófobo puede comprender un alquilo C₃ a C₈, opcionalmente, el aminoácido hidrófobo comprende un alquilo C₃ ramificado o alquilo C₄ ramificado. El aminoácido hidrófobo puede ser L-valina, L-leucina o L-isoleucina.

El inhibidor de la agregación de aminoácidos se usa en una cantidad eficaz para proporcionar una elevada estabilidad, y se puede usar en una concentración en un intervalo de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 120 mM, o aproximadamente 38 mM a aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 38 mM a aproximadamente 113 mM, o aproximadamente 38 mM a aproximadamente 75 mM, por ejemplo aproximadamente 10 mM, aproximadamente 38 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 113 mM o aproximadamente 150 mM. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 300 mM, opcionalmente, inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 90 mM. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM (por ejemplo, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 15 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 25 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 140 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 130 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 120 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 110 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 90 mM), cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva, opcionalmente, L-arginina. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM (por ejemplo, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM), cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva, opcionalmente, L-arginina.

La formulación farmacéutica acuosa puede comprender inhibidor de la agregación de aminoácidos aproximadamente 5 mM a aproximadamente 180 mM (por ejemplo, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 180 mM, aproximadamente 15 mM a aproximadamente 180 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 180 mM, aproximadamente 25 mM a aproximadamente 180 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 170 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 170 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 160 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 140 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 130 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 120 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 110 mM), cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido aromático, opcionalmente, L-fenilalanina. La formulación farmacéutica acuosa puede comprender inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 100 mM (por ejemplo, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 55 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 65 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 85 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 95 mM), opcionalmente, inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido aromático, opcionalmente, L-fenilalanina.

Opcionalmente, la formulación farmacéutica acuosa comprende inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 300 mM, cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido hidrófobo, opcionalmente, L-valina, L-isoleucina o L-leucina. Opcionalmente, la formulación farmacéutica acuosa comprende inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 200 mM (por ejemplo, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 30 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 40 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 50 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 60 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 70 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 80 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 90 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 290 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 280 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 270 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 260 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 250 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 240 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 230 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 220 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 210 mM), opcionalmente, inhibidor de la agregación de aminoácidos de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, cuando el inhibidor de la

- agregación de aminoácidos es un aminoácido hidrófobo, opcionalmente, L-valina, L-isoleucina o L-leucina. La composición farmacéutica acuosa puede comprender: clorhidrato de L-arginina de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM; L-fenilalanina de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; L-triptófano de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; clorhidrato de L-lisina de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM; L-leucina de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; L-isoleucina de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; L-valina de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM; o cualquier combinación de los mismos.
- La concentración del inhibidor de la agregación de aminoácidos puede estar en relación molar con el anticuerpo. La relación molar entre el inhibidor de la agregación de aminoácidos y el anticuerpo anti-RANKL puede ser aproximadamente 10 a aproximadamente 200 (por ejemplo, aproximadamente 25 a aproximadamente 150, aproximadamente 50 a aproximadamente 100), cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido aromático, opcionalmente, L-fenilalanina. Opcionalmente, la relación molar es aproximadamente 20 a aproximadamente 90. La relación molar entre el inhibidor de la agregación de aminoácidos y el anticuerpo anti-RANKL puede ser aproximadamente 20 a 300, cuando el inhibidor de la agregación de aminoácidos es un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva, opcionalmente, L-arginina. Opcionalmente, la relación molar es aproximadamente 45 a aproximadamente 180.
- Los tensioactivos son agentes activos en la superficie que son anfipáticos (que tienen una cabeza polar y una cola hidrófoba). Los tensioactivos se acumulan preferentemente en las interfases, dando como resultado una tensión interfacial reducida. Un tensioactivo puede estar incluido opcionalmente en la formulación. El uso de un tensioactivo también puede ayudar a mitigar la formación de partículas proteínicas grandes.
- El tensioactivo puede ser un tensioactivo no iónico. Los ejemplos incluyen ésteres de ácidos grasos de polioxitilensorbitano (por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 80), alquilaril poliéteres, por ejemplo, alquil fenol oxietilados (por ejemplo, Triton™ X-100) y poloxámeros (por ejemplo, Pluronic®, por ejemplo, Pluronic® F68), y combinaciones de cualquiera de los anteriores, ya sea dentro de una clase de tensioactivos o entre clases de tensioactivos. Se contemplan particularmente el polisorbato 20 y el polisorbato 80.
- Una concentración de tensioactivo en un intervalo de aproximadamente 0,004 % (p/v) a aproximadamente 0,1 % (p/v) (por ejemplo, para el polisorbato 20 o polisorbato 80) es adecuada, por ejemplo, aproximadamente 0,004 % a aproximadamente 0,05 %, o aproximadamente 0,004 % a aproximadamente 0,02 %, o aproximadamente 0,01 %. La formulación puede comprender al menos aproximadamente 0,004 % (p/v) de tensioactivo, y opcionalmente, menos de aproximadamente 0,15 % (p/v). Aproximadamente 0,005 % (p/v) a aproximadamente 0,015 % (p/v) de tensioactivo pueden estar presentes en la formulación, opcionalmente, aproximadamente 0,005 % (p/v), aproximadamente 0,006 % (p/v), aproximadamente 0,007 % (p/v), aproximadamente 0,008 % (p/v), aproximadamente 0,009 % (p/v), aproximadamente 0,010 % (p/v), aproximadamente 0,011 % (p/v), aproximadamente 0,012 % (p/v), aproximadamente 0,013 % (p/v), o aproximadamente 0,014 % (p/v).
- La formulación acuosa estabilizada puede ser adecuada para administración por cualquier vía aceptable, que incluye parenteral, y específicamente subcutánea. Por ejemplo, la administración subcutánea puede ser al brazo superior, muslo superior o abdomen. Otras vías incluyen, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intranodal e intraesplénica. Se prefiere la vía subcutánea.
- Si la disolución está en una forma prevista para administración a un sujeto, se puede preparar para que sea isotónica con el sitio de administración previsto. Por ejemplo, la osmolalidad puede estar en un intervalo de aproximadamente 270 a aproximadamente 350 mOsm/kg, o aproximadamente 285 a aproximadamente 345 mOsm/kg, o aproximadamente 300 a aproximadamente 315 mOsm/kg. Por ejemplo, si la disolución está en una forma prevista para administración por vía parenteral, puede ser isotónica con la sangre (osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm/kg). La formulación farmacéutica acuosa puede tener una osmolalidad en un intervalo de aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 500 mOsm/kg, o aproximadamente 225 mOsm/kg a aproximadamente 400 mOsm/kg, o aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.
- La formulación farmacéutica acuosa puede tener una conductividad en un intervalo de aproximadamente 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a aproximadamente 5500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, opcionalmente, en donde la conductividad está en un intervalo de aproximadamente 2500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a aproximadamente 5500 $\mu\text{S}/\text{cm}$, cuando la formulación comprende un aminoácido que comprende una cadena lateral cargada positiva, o en un intervalo de aproximadamente 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$ a aproximadamente 2000 $\mu\text{S}/\text{cm}$, cuando la formulación comprende un aminoácido aromático o carece del inhibidor de la agregación de aminoácidos. La formulación farmacéutica acuosa puede tener una viscosidad que es no más de aproximadamente 6 cP a 5 °C, opcionalmente, en donde la viscosidad es aproximadamente 4,5 cP a aproximadamente 5,5 cP. La formulación farmacéutica acuosa puede tener una viscosidad que es inferior a aproximadamente 13 cP a 25 °C, opcionalmente, aproximadamente 2,0 cP a aproximadamente 10 cP, opcionalmente, aproximadamente 2,5 cP a aproximadamente 4 cP.
- Los modificadores de la tonicidad, o agentes de ajuste de la tonicidad, son conocidos en la técnica, e incluyen compuestos tales como sales (por ejemplo, cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio,

fosfato de potasio, bicarbonato sódico, carbonato cálcico, lactato de sodio), azúcares (por ejemplo, dextrano, dextrosa, lactosa, trehalosa) y alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, sorbitol, xilitol, glicerol, propilenglicol). El modificador de la tonicidad se puede seleccionar del grupo que consiste en: sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa, glicerol y combinaciones de los mismos. El modificador de la tonicidad puede ser sorbitol. El sorbitol se puede usar, por ejemplo, en una concentración en un intervalo del 0,1 % (p/v) al 5 % (p/v), o 1,2 % (p/v) al 5 % (p/v), por ejemplo 3,6 % (p/v), 4,6 % (p/v), o 4,7 % (p/v). Opcionalmente, la formulación comprende aproximadamente 1,0 % (p/p) a aproximadamente 5,0 % (p/p) de modificador de la tonicidad. Por ejemplo, la formulación comprende aproximadamente 2,0 % (p/p) a aproximadamente 5,0 % (p/p) de sorbitol, o aproximadamente 3,5 % (p/p) a aproximadamente 5,0 % (p/p) de sorbitol, o aproximadamente 4,0 % (p/p) a aproximadamente 5,0 % (p/p) de sorbitol. Opcionalmente, la formulación no comprende sorbitol o está libre de sorbitol. Opcionalmente, la formulación no comprende modificador de la tonicidad.

Otros excipientes conocidos en la técnica se pueden usar en la formulación, en tanto que no afecten negativamente la estabilidad. Se pueden usar azúcares y polioles para proteger las proteínas de la agregación, que incluyen proporcionar estabilidad a la congelación/descongelación. Dichos compuestos incluyen sorbitol, manitol, glicerol, eritritol, caprilato, triptofanato, sarcósido y glicina. También se pueden usar estabilizadores para preparar los preparados liofilizados, por ejemplo, azúcares estabilizantes, por ejemplo, disacáridos tales como trehalosa y sacarosa. Un preparado liofilizado también puede incluir un espesante, como se conoce en la técnica. Otros excipientes conocidos en la técnica para la estabilización de las proteínas incluyen agentes solubilizantes (por ejemplo, N-metil-2-pirrolidona), polietilenglicol (PEG) y ciclodextrinas (por ejemplo, Captisol®). Se pueden usar ácidos y bases farmacéuticamente aceptables para ajustar el pH de la disolución, por ejemplo, hidróxido sódico.

Para administración parenteral, la formulación puede estar en forma de una disolución acuosa estéril sin pirógenos, aceptable por vía parenteral, que comprende denosumab u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL, con o sin agentes terapéuticos adicionales, en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo para inyección parenteral puede ser agua destilada estéril en la que el denosumab u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL, con o sin al menos un agente terapéutico adicional, se formula como una disolución isotónica estéril. La formulación contendrá excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, excipientes de calidad USP (Farmacopea de los Estados Unidos).

Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir en una formulación farmacéutica para reducir la acción bacteriana en él, por ejemplo, facilitándose así la producción de una formulación multiuso. Los ejemplos de conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos que incluyen fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos que incluyen metil y propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. Alternativamente, la formulación puede estar libre de conservantes. Por ejemplo, la formulación, cuando se presenta en una forma farmacéutica de un solo uso, puede estar libre de conservantes.

Aunque la formulación se ha descrito en el presente documento en su forma acuosa, la formulación estabilizada también puede liofilizarse posteriormente para preparar un liofilizado. Por consiguiente, a menos que el contexto dice claramente lo contrario, se contempla que referencias a la formulación y su método incluyen un liofilizado resultante de la disolución acuosa estabilizada.

La formulación farmacéutica que se va a usar para la administración *in vivo* es normalmente estéril. Esto se puede llevar a cabo por filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones parentales se pueden poner, en general, en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de disolución intravenosa, o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica, o una jeringa precargada. La formulación se puede almacenar o en una forma lista para su uso, o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye o diluye antes de administración.

En el presente documento se describen kits para producir una unidad de administración de una sola dosis. Cada uno de los kits puede contener tanto un primer recipiente que tiene una preparación secada de denosumab u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL preparado a partir de una formulación en disolución descrita en el presente documento, como un segundo recipiente que tiene agua estéril o una disolución acuosa. Los kits pueden contener jeringas precargadas de una sola y de múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas y liojeringas líquidas).

La formulación estabilizada descrita en el presente documento se puede usar junto con uno o más agentes terapéuticos adicionales, por ejemplo calcio y un compuesto de vitamina D. La formulación estabilizada descrita en el presente documento se puede administrar a un paciente que recibe terapia con un agente terapéutico adicional, o la formulación estabilizada descrita en el presente documento se puede coadministrar con un agente terapéutico adicional.

La formulación estabilizada se puede usar para prevenir o tratar cualquier enfermedad sensible a denosumab u otro anticuerpo monoclonal humano anti-RANKL, o una porción de unión al antígeno del mismo. Dichos usos y métodos relacionados incluyen, pero no se limitan a, las divulgaciones descritas a continuación.

La formulación se puede usar para prevenir un evento relacionado con el esqueleto (SRE) en un paciente en necesidad del mismo, que incluye administrar una cantidad eficaz de una formulación estabilizada descrita en el presente documento. El SRE se puede seleccionar, por ejemplo, del grupo que consiste en una fractura patológica, radioterapia al hueso, cirugía al hueso y compresión de médula espinal. El paciente puede ser uno que tiene una metástasis ósea de un tumor sólido. El tumor sólido puede ser, por ejemplo, uno o más de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón no microcítico y carcinoma de células renales. La cantidad de formulación puede ser eficaz para reducir el telopéptido urinario aminoterminal del marcador de renovación ósea corregido por creatinina (uNTx/Cr), opcionalmente en al menos el 80 %. El paciente puede ser un paciente con mieloma múltiple.

La formulación se puede usar para tratar un paciente con tumor óseo de células gigantes, que incluye administrar una cantidad eficaz de una formulación estabilizada descrita en el presente documento. El paciente puede tener un tumor óseo de células gigantes manera que es recurrente, inoperable, o para el que la resección quirúrgica es probable que dé como resultado una intensa morbilidad. El paciente puede ser, por ejemplo, un adulto o un adolescente esqueléticamente maduro.

La formulación se puede usar para tratar un paciente con hipercalcemia de tumor maligno de hueso, que incluye administrar una cantidad eficaz de una formulación estabilizada descrita en el presente documento. El tumor maligno puede ser resistente a la terapia con bisfosfonato. El método o uso puede incluir administrar una cantidad de formulación eficaz para reducir o mantener el calcio en suero del paciente a un nivel inferior o igual a aproximadamente 11,5 mg/dl.

La formulación se puede usar para tratar osteoporosis en un paciente en necesidad del mismo, que incluye administrar una cantidad eficaz de una formulación estabilizada descrita en el presente documento. Por ejemplo, el paciente puede ser una mujer posmenopáusica con alto riesgo de fractura. El paciente puede ser un hombre con alto riesgo de fractura.

La formulación se puede usar para aumentar la masa ósea en un paciente en necesidad del mismo, que incluye administrar una cantidad eficaz de una formulación estabilizada descrita en el presente documento. Por ejemplo, la cantidad de formulación administrada puede ser una cantidad eficaz para reducir la incidencia de nuevas fracturas vertebrales y/o fracturas no vertebrales. La cantidad de formulación administrada puede ser una cantidad eficaz para reducir la resorción ósea. La cantidad de formulación puede ser una cantidad eficaz para aumentar la densidad ósea en el paciente en al menos un área seleccionada de la columna lumbar, toda la cadera y el cuello femoral. La cantidad de formulación puede ser una cantidad eficaz para aumentar la masa ósea en el hueso cortical y/o el hueso trabecular del paciente. La cantidad de formulación puede ser una cantidad eficaz para reducir el telopéptido C de tipo 1 sérico del marcador de resorción ósea (CTX). El paciente en necesidad del mismo puede tener opcionalmente osteoporosis. El paciente en necesidad del mismo puede ser una mujer con alto riesgo de fractura que recibe terapia adyuvante con inhibidores de la aromatasas para cáncer de mama. El paciente en necesidad del mismo puede ser un hombre con alto riesgo de fractura que recibe terapia de privación androgénica para cáncer de próstata no metastásico. El paciente en necesidad del mismo puede ser un hombre con osteoporosis con alto riesgo de fractura.

La formulación se puede usar como un tratamiento adyuvante para mujeres posmenopáusicas con cáncer de mama en fase precoz con alto riesgo de reaparición de enfermedad que reciben terapia del cáncer adyuvante/neoadyuvante.

La formulación se puede usar como un tratamiento de primera línea de pacientes con cáncer de pulmón no microcítico metastásico en combinación con quimioterapia basada en platino.

La formulación se puede usar para tratar estenosis subglótica idiopática (ISS).

La formulación se puede usar para la prevención de cáncer de mama y cáncer de ovario en mujeres sanas con mutación en BRCA-1.

Opcionalmente, la formulación se puede usar en combinación con un inhibidor del punto de control inmunitario. Opcionalmente, el inhibidor del punto de control inmunitario es específico de una proteína que funciona en una vía del punto de control inmunitario, por ejemplo, por ejemplo, CTLA4, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7H4, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 o TIM3. Opcionalmente, el inhibidor del punto de control inmunitario es un anticuerpo, fragmento de unión al antígeno del mismo, o un producto de proteína de anticuerpo específico de CTLA4, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7H4, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 o TIM3. Dichos inhibidores del punto de control inmunitario incluyen, pero no se limitan a: atezolizumab, avelumab, ipilimumab, tremelimumab, BMS-936558, MK3475, CT-011, AM-224, MDX-1105, IMP321, MGA271. Los inhibidores de PD-1 incluyen, por ejemplo, pembrolizumab y nivolumab. Los inhibidores de PD-L1 incluyen, por ejemplo, atezolizumab, avelumab y durvalumab. Los inhibidores de CTLA4 incluyen, por ejemplo, ipilimumab. La formulación se puede usar para tratar pacientes con melanoma con metástasis óseas, opcionalmente en combinación con un anticuerpo PD-1 (por ejemplo, nivolumab, pembrolizumab). La formulación se puede usar para tratar pacientes con cáncer de mama, opcionalmente, en combinación con un inhibidor de CTLA4, tal como ipilimumab.

La formulación se puede usar para tratar tumores ricos en células gigantes, por ejemplo, en hiperparatiroidismo o con un quiste óseo aneurismático secundario.

5 La formulación se puede usar para tratar cáncer de próstata metastásico progresivo resistente a la castración (mCRPC). La formulación se puede usar para tratar cáncer de próstata sensible a la castración. La formulación se puede usar para tratar cáncer de próstata resistente a las hormonas.

10 La formulación se puede usar para tratar cáncer de mama metastásico (mBC). La formulación se puede usar para tratar cáncer de mama preoperatorio. La formulación se puede usar para tratar cáncer de mama temprano. La formulación se puede usar para tratar cáncer de mama primario negativo a los receptores de hormonas, RANK positivo o RANK negativo. La formulación se puede usar para tratar cáncer de mama HER2 negativo posmenopáusico.

La formulación se puede usar para tratar síndrome mielodisplásico, por ejemplo, en un paciente anciano.

15 La formulación se puede usar para tratar pérdida de hueso inducida por el tratamiento del cáncer (CTIBL).

La formulación se puede usar para tratar un tumor uterino del cuello uterino.

20 La formulación se puede usar para inducir efectos inmunomoduladores en pacientes con o sin inmunoterapia.

25 La formulación se puede usar para prevenir o tratar pérdida de hueso asociada a la osteoporosis, enfermedad de Paget, osteomielitis, hipercalcemia, osteopenia, osteonecrosis y artritis reumatoide. La formulación se puede usar para prevenir o tratar afecciones inflamatorias con pérdida de hueso. La formulación se puede usar para prevenir o tratar afecciones autoinmunitarias con pérdida de hueso. La formulación se puede usar para prevenir o tratar pérdida de hueso asociada a cáncer, que incluye cánceres de mama, próstata, tiroides, riñón, pulmón, esófago, recto, vejiga, cuello uterino, ovario, hígado y gastrointestinal, mieloma múltiple, linfoma y enfermedad de Hodgkin.

30 La formulación se puede administrar en cualquier programa cronológico adecuado. El programa de administración puede ser una vez cada cuatro semanas. Opcionalmente, la administración puede incluir administración en los días 8 y 15 del primer mes de terapia. La administración puede ser en un programa de una vez cada seis meses. Por ejemplo, se contempla un programa de una vez cada seis meses para su uso con osteoporosis y masa ósea creciente. Otras dosis de mantenimiento contempladas son cada 3 semanas, cada 3 meses y cada 6 semanas.

35 La formulación farmacéutica acuosa se puede usar para tratar a un paciente con mieloma múltiple o una metástasis ósea de un tumor sólido. La formulación se puede administrar en dosis de aproximadamente 120 mg cada 4 semanas como una inyección subcutánea en la parte superior del brazo, la parte superior del muslo, o el abdomen.

40 La formulación farmacéutica acuosa se puede usar para tratar un paciente con un tumor de hueso de células gigantes. La formulación se puede administrar en dosis de aproximadamente 120 mg cada 4 semanas con dosis adicionales de 120 mg en los días 8 y 15 del primer mes de terapia. La formulación se puede administrar por vía subcutánea en la parte superior del brazo, la parte superior del muslo o el abdomen del paciente. Se pueden administrar calcio y vitamina D al paciente para tratar o prevenir la hipocalcemia.

45 La formulación farmacéutica acuosa se puede usar para tratar un paciente con hipercalcemia de tumor maligno. La formulación se puede administrar en dosis de aproximadamente 120 mg cada 4 semanas con dosis adicionales de 120 mg en los días 8 y 15 del primer mes de terapia. La formulación se puede administrar por vía subcutánea en la parte superior del brazo, la parte superior del muslo, o el abdomen.

50 La formulación farmacéutica acuosa se puede usar para tratar mujeres posmenopáusicas con osteoporosis con alto riesgo de fractura, o usar para aumentar la masa ósea en hombres con alto riesgo de fractura que reciben terapia de deprivación androgénica para cáncer de próstata no metastásico o en mujeres con alto riesgo de fractura que reciben terapia adyuvante con inhibidores de la aromatasas para cáncer de mama. La formulación farmacéutica acuosa se puede administrar por un profesional sanitario y en dosis de 60 mg cada 6 meses como una inyección subcutánea en la parte superior del brazo, la parte superior del muslo o el abdomen. Al paciente se le puede indicar que tome 1000 mg de calcio diariamente y al menos 400 UI de vitamina D diariamente.

55 Un tipo de formulación según la divulgación contendrá denosumab, acetato y arginina. La arginina es opcionalmente L-arginina. La arginina es opcionalmente clorhidrato de L-arginina. La formulación puede incluir opcionalmente sorbitol. La formulación puede incluir opcionalmente polisorbato. El polisorbato puede ser opcionalmente polisorbato 20. El pH puede ser opcionalmente aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2, o inferior a 5,2.

60 Otro tipo de formulación según la divulgación contendrá denosumab, acetato y fenilalanina. La formulación puede incluir opcionalmente sorbitol. La formulación puede incluir opcionalmente polisorbato. El polisorbato puede ser opcionalmente polisorbato 20. El pH puede ser opcionalmente aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2, o inferior a 5,2. Por ejemplo, la formulación puede incluir denosumab a una concentración de aproximadamente 108 mg/ml a aproximadamente 132 mg/ml, acetato de aproximadamente 28,8 mM a aproximadamente 35,2 mM, fenilalanina de

33,3 mM a aproximadamente 40,7 mM, 3,51 % (p/v) a aproximadamente 4,29 % (p/v) de sorbitol, y aproximadamente 0,009 % (p/v) a aproximadamente 0,011 % (p/v) de polisorbato 20, un pH 5,1, y opcionalmente puede estar contenido en un PFS, opcionalmente que contiene aproximadamente 1 ml o menos de aproximadamente 1 ml (por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml) de formulación. Por ejemplo, la formulación puede incluir denosumab a una concentración de 120 mg/ml, acetato 32 mM, fenilalanina 37 mM, 3,9 % (p/v) de sorbitol y 0,01 % (p/v) de polisorbato 20, un pH 5,1, y opcionalmente puede estar contenido en PFS, que contiene opcionalmente aproximadamente 1 ml o menos de aproximadamente 1 ml (por ejemplo, aproximadamente 0,5 ml) de formulación. La formulación se puede preparar concentrando denosumab usando un tampón de diafiltración que contiene acetato 20 mM, 4,2 % (p/v) de sorbitol y fenilalanina 40 mM, un pH 4,7.

Otro tipo de formulación según la divulgación contendrá denosumab, glutamato y arginina. La arginina es opcionalmente L-arginina. La arginina es opcionalmente clorhidrato de L-arginina. La formulación puede incluir opcionalmente sorbitol. La formulación puede incluir opcionalmente polisorbato. El polisorbato puede ser opcionalmente polisorbato 20. El pH puede ser opcionalmente aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2, o inferior a 5,2.

Otro tipo de formulación según la divulgación contendrá denosumab, acetato, arginina y fenilalanina. La formulación puede incluir opcionalmente sorbitol. La formulación puede incluir opcionalmente polisorbato. El polisorbato puede ser opcionalmente polisorbato 20. El pH puede ser opcionalmente aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2, o inferior a 5,2.

Otro tipo de formulación según la divulgación contendrá denosumab, glutamato, arginina y fenilalanina. La arginina es opcionalmente L-arginina. La arginina es opcionalmente clorhidrato de L-arginina. La formulación puede incluir opcionalmente sorbitol. La formulación puede incluir opcionalmente polisorbato. El polisorbato puede ser opcionalmente polisorbato 20. El pH puede ser opcionalmente aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2, o inferior a 5,2.

Las formulaciones según la divulgación se pueden preparar por cualquier método adecuado. En un tipo de método, una disolución que contiene un anticuerpo anti-RANKL monoclonal (por ejemplo, denosumab) se puede preparar a una concentración inferior a 70 mg/ml, una cantidad adecuada del inhibidor de la agregación de aminoácidos descrito en el presente documento se pueden añadir a la disolución, y entonces la disolución se puede concentrar hasta una cantidad superior a 70 mg/ml descrita en el presente documento, por ejemplo, 120 mg/ml. Opcionalmente, la disolución puede ser en primer lugar sobreconcentrada, es decir, hasta una concentración de anticuerpo anti-RANKL monoclonal (por ejemplo, denosumab) superior a la concentración objetivo final, y a continuación la disolución sobreconcentrada se pueden diluir, por ejemplo, con un disolución de tampón de pH ajustado, hasta la concentración y pH objetivo final. Por ejemplo, la sobreconcentración puede dar como resultado una cantidad de anticuerpo monoclonal anti-RANKL (por ejemplo, denosumab) en un intervalo de 130 mg/ml a 300 mg/ml o 180 mg/ml a 300 mg/ml. La concentración inicial de denosumab antes de la concentración no está particularmente limitada, y puede ser, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml, o aproximadamente 2 mg/ml, o aproximadamente 5 mg/ml, o aproximadamente 8 mg/ml, o aproximadamente 10 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml, o aproximadamente 30 mg/ml, o aproximadamente 40 mg/ml, o aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 60 mg/ml, o aproximadamente 70 mg/ml, o en un intervalo englobado por cualquiera de dichas concentraciones, por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 70 mg/ml, o aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml.

La concentración de la formulación se puede llevar a cabo por cualquier método adecuado. El proceso de concentración puede incluir centrifugación. El proceso de concentración puede incluir ultrafiltración.

La introducción del inhibidor de la agregación de aminoácidos en la formulación se puede hacer por cualquier proceso adecuado. Por ejemplo, el inhibidor de la agregación de aminoácidos se puede introducir en la formulación por una simple adición (enriquecimiento) en la formulación, por ejemplo, como se describe en los ejemplos que siguen. En otro método, el inhibidor de la agregación de aminoácidos se puede introducir en la formulación por diafiltración frente a una disolución de tampón que contiene el inhibidor de la agregación de aminoácidos, por ejemplo, como se describe en los ejemplos que siguen. El inhibidor de la agregación de aminoácidos se puede introducir en la formulación antes o después de la concentración del anticuerpo anti-RANKL monoclonal por encima de 70 mg/ml. Como se muestra en los ejemplos que siguen, existe un beneficio de añadir el inhibidor de la agregación de aminoácidos a la disolución antes de la concentración, ya que inhibe la agregación durante el proceso de concentración.

Por consiguiente, la divulgación proporciona métodos de preparación de una formulación farmacéutica acuosa estable, que comprende un anticuerpo monoclonal humano anti-ligando del receptor activador del factor nuclear kappa-B (anti-RANKL) humano, o una porción de unión al antígeno del mismo. El método puede comprender combinar el anticuerpo anti-RANKL monoclonal, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración superior a 70 mg/ml con un inhibidor de la agregación de aminoácidos, un tampón, un tensioactivo, y opcionalmente, un modificador de la tonicidad. El anticuerpo, o porción de unión al antígeno, puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento, y la concentración del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, puede ser según las enseñanzas en el presente documento. El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede ser cualquiera de los descritos en el presente documento. Por ejemplo, el inhibidor de la agregación de aminoácidos puede ser un

aminoácido de carga positiva, un aminoácido aromático, o un aminoácido hidrófobo. El inhibidor de la agregación de aminoácidos puede estar en relación molar con el anticuerpo como se describe en el presente documento. La cantidad y selección de inhibidor de la agregación, tensioactivo, modificador de la tonicidad y tampón es como se ha descrito anteriormente. La divulgación también proporciona las formulaciones hechas por los métodos de preparación, descritos en el presente documento.

Una formulación según la divulgación en el presente documento puede incluir ajustar el pH de una disolución de anticuerpo anti-RANKL monoclonal de alta concentración (por ejemplo, denosumab) descrita en el presente documento, por ejemplo, una que tiene una concentración superior a 70 mg/ml, o 120 mg/ml. La formulación se puede hacer ajustando el pH de una disolución de baja concentración de anticuerpo anti-RANKL monoclonal (por ejemplo, denosumab) y luego concentrando la disolución hasta la concentración deseada más alta. Se conocen en la técnica agentes de ajuste del pH adecuados.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustración. En todos los ejemplos presentados en el presente documento, se usan las siguientes abreviaturas: DF, diafiltración; PS20, polisorbato 20, HCl, clorhidrato, UF/DF, ultrafiltración/diafiltración; F n.º, formulación número; HMWS, especies de alto peso molecular; SE-UHPLC, cromatografía de líquidos de rendimiento ultra-alto de exclusión por tamaño. Además, en todos estos ejemplos, la composición del tampón DF o tampón de diálisis se usa para hacer que la formulación final comprenda denosumab, así como se proporcionan concentraciones estimadas de los componentes de la formulación final. Las concentraciones finales de ciertos componentes de las formulaciones finales almacenadas y posteriormente analizadas para su estabilidad se pueden diferenciar de las concentraciones de DF o tampón de diálisis dependiendo de la presencia o ausencia de un contraión (por ejemplo, HCl). Sin un contraión, las formulaciones tienen baja fuerza iónica. En dichos casos, el acetato se concentra conjuntamente con denosumab, de forma que las formulaciones finales comprendan una mayor concentración de acetato, con respecto a la concentración de DF o tampón de diálisis. Por ejemplo, el uso de un tampón de DF que comprende acetato 10 mM conduce a acetato ~23 mM en la formulación final de denosumab (120 mg/ml) (pH 5,1), cuando ni el tampón DF ni la formulación final comprenden un contraión (por ejemplo, HCl) y así es de baja fuerza iónica. Similarmente, un tampón DF que comprende acetato 20 mM conduce a acetato ~32 mM en la formulación final de denosumab (120 mg/ml), a pH 5,1, sin un contraión (por ejemplo, HCl). Cuando un contraión (por ejemplo, HCl de HCl de arginina) está presente, el acetato no se concentra conjuntamente con denosumab y, por lo tanto, la concentración de acetato del tampón DF y la concentración de acetato de la composición final son, en general, equivalentes. Además, los excipientes pueden ser excluidos volumétricamente, o pueden ser afectados por interacciones no específicas. Por ejemplo, en una formulación de denosumab 120 mg/ml, las concentraciones de fenilalanina y sorbitol son aproximadamente 7-10 % inferiores a las que se indican en el tampón DF y la concentración de arginina es aproximadamente 10-15 % inferior. En vista de lo anterior, en todas las siguientes concentraciones de ejemplo se proporcionan los componentes de las formulaciones finales, teniendo en cuenta la exclusión de excipientes anteriormente descrita y los efectos de concentración conjunta del acetato.

EJEMPLO DE REFERENCIA 1

Se preparó una evaluación inicial de doce formulaciones para su efecto para minimizar la cantidad (%) de HMWS en una formulación líquida de denosumab de alta concentración (120 mg/ml), y su formación con el tiempo. Las alternativas de formulación incluyeron cambios en el tipo de tampón, estabilizadores y pH de la disolución. Las formulaciones probadas, A-L, se describen en la Tabla 1 a continuación. Todos los valores tampón citados son para la concentración de tampón contra la que se diafiltra el anticuerpo. Cada excipiente y tensioactivo se añadió a la disolución después del intercambio de tampón al nivel indicado en la tabla. Aunque no se midieron las concentraciones de acetato en las presentes formulaciones, las formulaciones 120 mg/ml de denosumab diafiltradas con sorbitol contra acetato 10 mM tuvieron valores de acetato finales aproximados de acetato entre 25 mM y 35 mM.

Denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2 fue UF/DF contra acetato 10 mM, pH 5,2 y se concentró hasta 160 mg/ml. Las disoluciones madre se prepararon en acetato 10 mM a pH 5,2 que consisten en:

- 35 % de sorbitol
- 1 % de polisorbato 20
- 1 % de polisorbato 80
- 30 % de Pluronic® F-68
- 3 % de Triton™ X-100
- HCl de L-arginina 250 mM
- N-acetil-arginina (NAR) 250 mM

N-acetil-lisina (NAK) 250 mM

Prolina 250 mM

Polietilenglicol (PEG) 3350 250 mM

Ciclodextrina Captisol® 250 mM

Para lograr las formulaciones A a J, el material de 160 mg/ml preparado con acetato 10 mM, pH 5,2, se diluyó hasta 120 mg/ml usando acetato 10 mM a un pH de 5,2, seguido por una adición de las disoluciones madre correspondientes de sorbitol, excipiente y/o tensioactivo hasta una concentración final diana enumerada en la Tabla 1. Para lograr las formulaciones K y L, las formulaciones autotamponadas y de glutamato, respectivamente, dos alícuotas separadas de del material de 160 mg/ml se sometieron a intercambio de tampón adicional por centrifugación. El material para las formulaciones K y L se diluyó entonces hasta 120 mg/ml usando el tampón respectivo, seguido de una adición del sorbitol correspondiente, y las disoluciones madre de polisorbato 20 hasta una concentración final objetivo enumerada en la tabla de formulación en la Tabla 1.

TABLA 1

	<i>Abreviatura</i>	<i>Composición de la formulación</i>
A	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
B	Acetato/Sorbitol/PS80/pH 5,2	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 80, pH 5,2
C	Acetato/Sorbitol/Pluronic F68/pH 5,2	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de Pluronic F68, pH 5,2
D	Acetato/Sorbitol/Triton X-100/pH 5,2	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de Triton X-100, pH 5,2
E	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
F	Acetato/NAR/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, NAR 10 mM, 3,7 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
G	Acetato/NAK/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, NAK 10 mM, 3,7 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
H	Acetato/Prolina/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, L-prolina 10 mM, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
I	Acetato/PEG/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, PEG3350 5 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
J	Acetato/Captisol/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Captisol 2,7 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
K	Auto-tamponada/Sorbitol/PS20/pH 5,2	5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5,2
L	Glutamato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,0	Glutamato 10 mM, HCl de L-arginina 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, 0,01 (p/v) de polisorbato 20, pH 5,0

La Figura 1 muestra el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C. La formulación L, que consiste en tampón glutamato de aproximadamente 10 mM, HCl de L-arginina 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol como modificador de la tonicidad, 0,01 % (p/v) de polisorbato 20 como tensioactivo, y a un valor de pH de 5,0, mostró tanto cantidades iniciales reducidas de HMWS, lo que indica cierta reducción de agregados ya formados, como cinética reducida para la formación de HMWS a 37 °C.

EJEMPLO DE REFERENCIA 2

La evaluación de formulaciones de excipientes de acetato 10 mM, L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, 0,01 % (p/v) de polisorbato 20 y una formulación de excipientes de acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 % (p/v) de polisorbato 20, cada una de ellas con denosumab de alta concentración (120 mg/ml), a una temperatura de 37 °C durante hasta 1 mes, reveló los efectos de pH e inhibidor de la agregación de aminoácidos sobre la tasa y el grado de

formación de HMWS. Las formulaciones probadas se describen en la Tabla 2 a continuación. Todos los valores de tampón y excipiente citados son para las concentraciones de tampón y excipiente contra las que se dializa el anticuerpo.

- 5 Para preparar muestras de prueba M-Q, se dializó una alícuota de 3 ml de denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2, contra 500 ml de tampón DF descrito a continuación, con un total de 3 cambios de tampón para lograr una dilución de 1 millón de veces de la formulación previa para garantizar el intercambio completo de tampón. A continuación se sobreconcentró el material usando una centrifugadora-concentradora, seguido de una dilución a 120 mg/ml y la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final de 0,01 %.

10

TABLA 2

	<i>Abreviatura</i>	<i>Composición de formulación DF</i>
M	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH4,5	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,5
N	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH4,8	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,8
O	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,2
P	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,5
Q	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,3A	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,8

- 15 La FIGURA 2 muestra el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C. La FIGURA 3 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño en función de la formulación tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes.

- 20 A medida que disminuyó el pH de la disolución, hubo un aumento en la formación de agregados grandes. A pH inferior a 4,8, y especialmente 4,5, agregados grandes fueron las HWMS dominantes, con un aumento espectacular para la formulación de prueba a pH 4,5. Como se muestra en la FIGURA 3, las formulaciones P y Q tuvieron la cantidad más baja de HWMS de orden superior (tiempo de retención de aproximadamente 6 minutos), seguido por formulaciones comparativas O, N y M que tiene valores decrecientes de pH.

- 25 Sin embargo, a medida que aumentó el pH, hubo, en general, un aumento resultante en las especies dímeras. Como se muestra en la FIGURA 3, la formulación N tuvo la cantidad más baja de especies dímeras (tiempo de retención aproximadamente 6,8 minutos), seguido de las formulaciones M, O, P y Q.

- 30 La presencia de arginina en la formulación O a una concentración de 75 mM produjo aproximadamente 0,3 % y 25 % de reducciones en las cantidades de las especies dímeras y su tasa cinética de formación, respectivamente, después de 1 mes a 37 °C cuando se compara con la formulación P que tiene el mismo pH, pero sin arginina.

EJEMPLO DE REFERENCIA 3

- 35 Este ejemplo demuestra el efecto del pH sobre las formulaciones de denosumab de alta concentración.

- 40 Se formuló denosumab (a una concentración de 120 mg/ml) con acetato, sorbitol y polisorbato 20 (PS20) con o sin un inhibidor de la agregación de aminoácidos a tres valores de pH diferentes: 4,8, 5,1 y 5,4. En este estudio, el inhibidor de la agregación de aminoácidos fue el HCl de L-arginina. Todas las formulaciones se prepararon intercambiando el tampón de una disolución inicial que contenía una concentración menor de denosumab, seguido de sobreconcentración del material de denosumab y luego una dilución del material de denosumab con las cantidades deseadas de tampón, excipientes y tensioactivos. Brevemente, una alícuota de denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2 (material inicial) se dializó contra un tampón DF, como se describe en la TABLA 3A, con un total de 3 cambios de tampón para lograr una dilución de 1 millón de veces del material inicial para garantizar el intercambio de tampón completo. El material de denosumab de tampón intercambiado se concentró entonces usando una centrifugadora-concentradora hasta una concentración de denosumab superior a 120 mg/ml, y el material concentrado se diluyó posteriormente para lograr una concentración de 120 mg/ml de denosumab. Se añadió PS20 a una concentración final del 0,01 %.

- 50 Se creyó que la proteína a alta concentración contribuía a un pH de disolución basado en su estado de carga. La concentración de acetato de la formulación 1 aumentó para lograr el pH final objetivo, y las concentraciones de acetato de las formulaciones 2 y 3 se hicieron corresponder con las de la formulación 1. Las concentraciones de acetato de las formulaciones 4-6 requirieron una cantidad incluso más alta de acetato para hacer corresponder las concentraciones de acetato final de las formulaciones 1-3, debido a que el acetato no se concentra conjuntamente en

presencia de la sal de HCl. La formulación 7 sirvió de control para garantizar que el aumento de la concentración de acetato en las formulaciones 4-6 no impidió la estabilidad de la proteína en las formulaciones de clorhidrato de arginina.

Las diferentes formulaciones de denosumab preparadas y probadas en este estudio se describen en la TABLA 3A.

5

TABLA 3A

F n.º	Formulación final estimada*	Composición de tampón DF
1	Acetato 40 mM/4,58 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 4,8	Acetato 30 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,35
2	Acetato 40 mM/4,58 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 30 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,9
3	Acetato 40 mM/4,58 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,4	Acetato 30 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 5,2
4	Acetato 40 mM/Arginina 65 mM/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 4,8	Acetato 40 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 4,8
5	Acetato 40 mM/Arginina 65 mM/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,4	Acetato 40 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,4
6	Acetato 40 mM/Arginina 65 mM/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 40 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1
7	Acetato 10 mM/Arginina 65 mM/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1

*Las formulaciones finales comprendieron 120 mg/ml de denosumab y PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y tuvieron el pH indicado. Se estiman concentraciones de sorbitol al 8,5 % inferiores a la concentración de sorbitol del tampón DF. Se estiman concentraciones de arginina al 12,5 % inferiores a la concentración de arginina del tampón DF.

10 Se llenó una muestra de cada formulación en un recipiente a un volumen de llenado de 1 ml y se almacenó a una temperatura de 37 °C durante hasta 4 semanas. La inhibición de la agregación, y la estabilidad contra la inhibición de la agregación con el tiempo, basada en la formación de HMWS y especies dímeras, se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de inhibición de la agregación de estas formulaciones se compararon en condiciones iniciales y durante y después del periodo de almacenamiento.

15 El porcentaje de HMWS se monitorizó por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C. La FIGURA 4 representa un gráfico del porcentaje de HMWS en función del tiempo para las formulaciones 1-7 y la TABLA 3B proporciona los puntos de datos del gráfico.

TABLA 3B

Nombre de formulación	Tiempo de almacenamiento a 37 °C		
	0 semanas	2 semanas	4 semanas
1 Acetato(40)/Sorbitol/PS20/pH 4,8	0,7	1,2	1,6
2 Acetato(40)/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
3 Acetato(40)/Sorbitol/PS20/pH 5,4	1,5	2,1	2,7
4 Acetato(40)/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	0,6	1,2	1,9
5 Acetato(40)/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,4	0,9	1,3	1,7
6 Acetato(40)/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,4
7 Acetato(10)/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,8	1,1	1,4

F n.º mostrado en la columna izquierda según F n.º de la Tabla 3A.

20

La FIGURA 5 muestra los cromatogramas de exclusión por tamaño para cada formulación tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes. Las formulaciones sin arginina se muestran en el panel izquierdo, mientras que las formulaciones con arginina se muestran en el panel derecho.

25

Como se muestra en la FIGURA 4, las formulaciones que contienen arginina rindieron mejor que las formulaciones de control sin clorhidrato de arginina, y las formulaciones a pH 5,1 rindieron mejor que formulaciones comparables a pH 4,8 y pH 5,4. Para las formulaciones 1-3 sin clorhidrato de arginina, las especies dímeras aumentaron a medida que el pH de la disolución aumentó hasta 5,4 (FIGURA 5A). Para las formulaciones 4-6 que contenían clorhidrato de arginina, como el pH de disolución disminuyó hasta 4,8, hubo un aumento en la formación de agregados mayores, así como un aumento en las especies dímeras a medida que el pH de la disolución aumentó hasta 5,4 (FIGURA 5B). A pH de disolución 5,1, la formulación 6 con la presencia de clorhidrato de arginina tuvo la cantidad más baja de HMWS total en comparación con la formulación 2 sin la presencia de clorhidrato de arginina. Además, el comportamiento de la formulación 7 demostró que un aumento en la concentración de tampón acetato de 10 mM a 40 mM tuvo un efecto relativamente más pequeño sobre la formación de HMWS.

EJEMPLO DE REFERENCIA 4

Este ejemplo demuestra una relación entre el pH y la formación de HMWS para diferentes formulaciones de denosumab que comprenden concentraciones variables de denosumab.

Se evaluaron concentraciones de proteína de denosumab desde 15 mg/ml hasta 150 mg/ml para evaluar la sensibilidad al pH de la formación de HMWS a diversas concentraciones de proteína y a concentraciones de clorhidrato de arginina 75 mM. Se evaluaron dos valores de pH, es decir, pH 4,8 y 5,1, en cada una de las concentraciones probadas de proteína: 15, 60, 120 y 150 mg/ml.

Se evaluaron un total de 8 formulaciones (formulaciones 8-15; descritas en la TABLA 4A) en este estudio. Para preparar estas formulaciones, se dializaron dos alícuotas de denosumab a 70 mg/ml en acetato a pH 5,2 contra el tampón DF respectivo descrito en la TABLA 4A. Ambas configuraciones de diálisis n.º 1 y n.º 2 pasaron a través de un total de 3 cambios de tampón para lograr una dilución de 1 millón veces de la formulación previa para garantizar el intercambio de tampón completo. Después de la diálisis, se retiraron alícuotas de cada configuración de diálisis n.º 1 y n.º 2 descrita en la TABLA 4A para preparar la etapa de dilución para las formulaciones 8, 9, 12 y 13. El material restante se sobreconcentró a continuación usando una centrifugadora-concentradora, seguido de una dilución hasta las concentraciones correspondientes de denosumab enumeradas en la TABLA 4A y la adición de PS20 hasta una concentración final del 0,01 %.

TABLA 4A

F n.º	Formulación final estimada*	Composición de tampón DF	Configuración de diálisis
8	15 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 4,8	1
9	60 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 4,8	
10	120 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 4,8	
11	150 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 4,8	
12	15 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1	2

F n.º	Formulación final estimada*	Composición de tampón DF	Configuración de diálisis
13	60 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1	
14	120 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1	
15	150 mg-ml de denosumab/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1	

*Las formulaciones finales comprendieron PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y tuvieron el pH indicado. La concentración estimada de acetato fue 10 mM, se estiman concentraciones de sorbitol a ~8,5 % inferiores a la concentración de sorbitol del tampón DF. Se estiman concentraciones de arginina a 65 mM. Se estiman concentraciones de sorbitol al 2,2 % (p/v).

5 Las formulaciones se envasaron en recipientes a un volumen de llenado de 1 ml y se almacenaron a una temperatura de 37 °C durante hasta 1 mes. La inhibición de la agregación, y la estabilidad contra la inhibición de la agregación con el tiempo, basada en la formación de HMWS y especies dímeras, se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de inhibición de la agregación de estas formulaciones se compararon en condiciones iniciales y durante y después del periodo de almacenamiento.

10 La FIGURA 6 representa un gráfico del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo de almacenamiento a 37 °C para cada formulación y la TABLA 4B proporciona los puntos de datos para el gráfico.

TABLA 4B

Formulación	Porcentaje de HMWS		
	0	2 semanas	4 semanas
8 15 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	0,4	0,4	0,5
9 60 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	0,4	0,8	1,1
10 120 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	0,5	1,4	1,9
11 150 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 4,8	0,6	1,7	2,4
12 15 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,4	0,3	0,4
13 60 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	0,7	0,9
14 120 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,6	1,2	1,5
15 150 mg-ml/Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,7	1,3	1,7

15 Las Figuras 7A y 7B muestran cromatogramas de exclusión por tamaño en función de la formulación tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes. Como se muestra en la Figura 6, el % de HMWS aumentó a medida que aumentó la concentración de proteína. Las formulaciones 8-11 a pH 4,8 tuvieron coherentemente niveles más altos de HMWS en comparación con las formulaciones correspondientes a pH 5,1 (formulaciones 12-15). El aumento en % de HMWS a pH 4,8 es debido a un gran pico de agregado mostrado en la Figura 7A (arriba) a aproximadamente 5,75 minutos. Aunque el % de HMWS al pH de disolución 5,1 tuvo especies dímeras crecientes a medida que aumentó la concentración de proteína, la HMWS total fue inferior a las concentraciones correspondientes de proteína al pH de disolución 4,8 (Figura 7B (abajo)).

25 La diferencia en los niveles de HMWS a pH 5,1 frente a pH 4,8 llegó a ser mayor a medida que aumentó la concentración de denosumab, siendo la diferencia mayor a mayores concentraciones de denosumab.

EJEMPLO 5

Se evaluaron formulaciones con diversas concentraciones de arginina, NAR, y dos dipéptidos que consistían en arginina-arginina (Arg-Arg) y arginina-fenilalanina (Arg-Phe) para los efectos estabilizadores sobre las disoluciones que tenían una concentración de denosumab de 120 mg/ml.

Las formulaciones probadas se describen en la TABLA 5 que sigue. Todos los valores de acetato y excipiente (excepto dipéptidos) citados son para las concentraciones de tampón y excipiente contra las que se diafiltra el anticuerpo. Cada dipéptido se añadió a la disolución después del intercambio de tampón al nivel indicado en la tabla. Las formulaciones R a X se lograron por UF/DF contra el tampón DF enumerado a continuación. Las formulaciones Y y Z se lograron por UF/DF, juntas en un único conjunto, contra el tampón DF que contenía acetato 10 mM, 3,6 % de sorbitol, pH 4,0. Después de UF/DF, el conjunto de formulaciones Y y Z se dividió en 2, y a continuación se enriquecieron en los dipéptidos Arg-Arg o Arg-Phe a partir de una disolución madre 1 M que contenía 3,6 % de sorbitol a pH 5,1. El polisorbato 20 se añadió a cada formulación a una concentración diana final de 0,01 %. El acetato se concentra conjuntamente sin arginina, dando como resultado una concentración final de acetato de aproximadamente 25 mM en las formulaciones S a X. El sorbitol se excluye preferentemente en el proceso de concentración, dando como resultado una reducción de aproximadamente el 7 al 8 % (p/v) de la concentración inicial.

Las formulaciones se envasaron en recipientes a un volumen de llenado de 1,0 ml. Las formulaciones se almacenan a temperaturas de 2 °C a 8 °C durante hasta 12 meses y 25 °C, 30 °C y 37 °C durante 3 meses. La estabilidad basada en la formación de HMWS se evalúa usando SE-UHPLC. La estabilidad de estas formulaciones de dipéptido después de un mes a 37 °C se comparó con las formulaciones de clorhidrato de arginina a 37 °C como se muestra en la Figura 8.

TABLA 5

	<i>Formulación final estimada</i>	Composición de formulación DF
R	Acetato/5 % de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
S	Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg-HCl 38 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de L-arginina 38 mM, pH 5,1
T	Acetato/2,4 % de sorbitol/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de L-arginina 75 mM, pH 5,1
U	Acetato 18 mM/2,4 % de sorbitol/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 18 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, HCl de L-arginina 75 mM, pH 5,1
V	Acetato/1,2 % de sorbitol/Arg-HCl 113 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, 1,2 % de sorbitol, HCl de L-arginina 113 mM, pH 5,1
W	Acetato/0 % de sorbitol/Arg-HCl 150 mM/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 0 % (p/v) sorbitol, HCl de L-arginina 150 mM, pH 5,1
X	Acetato/NAR 150 mM/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, NAR 150 mM, pH 5,1
Y	Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg-Arg 38 mM/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
Z	Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg-Phe 38 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0

La Figura 8 muestra el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C. Los resultados muestran entonces que los inhibidores de la agregación de aminoácidos inhibieron la formación de HMWS. El dipéptido arginina-fenilalanina, por ejemplo, mostró una mejora significativa, dando como resultado aproximadamente 0,3 % menos de HMWS en comparación con las otras formulaciones. El orden de prioridad de menores a mayores HMWS era Z << V < Y ≈ T ≈ W ≈ X ≈ U < S < R. Como se puede apreciar en la figura, tanto las formulaciones que contienen el dipéptido arginina-arginina (Arg-Arg) (formulación Y) como arginina-fenilalanina (Arg-Phe) (formulación Z) redujeron la formación de HMWS en comparación con la formulación de control que carecía de arginina y que carecía de dipéptidos que contienen arginina (formulación R). La formulación Z contuvo la menor cantidad de HMWS, superior a la formulación Y.

EJEMPLO 6

Este ejemplo demuestra la inhibición de la agregación y estabilidad de denosumab en función de diferentes concentraciones de arginina y fenilalanina, y una mezcla comparativa de arginina y fenilalanina.

5 Como se ha descrito anteriormente, se identificó que el clorhidrato de arginina (HCl) y los dipéptidos de HCl de arginina-fenilalanina reducían el nivel de partida inicial y la tasa de formación de HMWS de denosumab. En este estudio, se evaluaron las formulaciones que contenían concentraciones de HCl de arginina, concentraciones de fenilalanina y una combinación de HCl de arginina y fenilalanina para los efectos estabilizadores sobre disoluciones que contenían denosumab a 120 mg/ml.

10 Las formulaciones probadas (formulaciones 16-20) se describen en la TABLA 6A a continuación. Para preparar estas formulaciones, una alícuota de denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2, se dializó contra el tampón DF descrito en la TABLA 6A, con un total de 3 cambios de tampón para lograr una dilución de 1 millón de veces de la formulación previa para garantizar el intercambio de tampón completo. A continuación se sobreconcentró el material usando una centrifugadora-concentradora, seguido de una dilución a 120 mg/ml y la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final de 0,01 %. La formulación 16 se consideró la formulación de control.

15 **TABLA 6A**

	Formulación final estimada*	Composición de tampón DF
16	Acetato 23 mM/4,6 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
17	Acetato 10 mM/Arginina 65 mM/2,2 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1
18	Acetato 23 mM/Fenilalanina 35 mM/4 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, fenilalanina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
19	Acetato 23 mM/Fenilalanina 68 mM/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, fenilalanina 75 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
20	Acetato 10 mM/Arginina 33 mM/Fenilalanina 35 mM/2,2 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de arginina 38 mM, fenilalanina 38 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1

*Las formulaciones finales comprendieron 120 mg/ml de denosumab y PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y tuvieron el pH indicado. Se estiman concentraciones de sorbitol y fenilalanina a ~8,5 % inferiores a la concentración del tampón DF. Se estiman concentraciones de arginina a ~12,5 % inferiores a la concentración del tampón DF.

20 Las formulaciones se envasaron en recipientes a un volumen de llenado de 1,0 ml. Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 37 °C durante hasta 1 mes. La inhibición de la agregación, y la estabilidad contra la inhibición de la agregación con el tiempo, basada en la formación de HMWS y especies dímeras, se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de inhibición de la agregación de estas formulaciones se compararon en condiciones iniciales y durante y después del período de almacenamiento.

25 La Figura 9 muestra el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C. La Figura 10 muestra cromatogramas de exclusión por tamaño en función de la formulación tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes. La TABLA 6B a continuación muestra el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C.

TABLA 6B

	Formulación	Porcentaje de HMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
16	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
17	Acetato/Arginina 75 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,5
18	Acetato/Fenilalanina 38 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	0,9	1,3
19	Acetato/Fenilalanina 75 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	0,8	1,2
20	Acetato/Arginina 38 mM/Fenilalanina 38 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,7	1,0	1,4

30

Todas las formulaciones que comprendían un inhibidor de la agregación de aminoácidos, arginina o fenilalanina (formulaciones 17-20) fueron superiores a la formulación de control de sorbitol que carecía de cualquier inhibidor de la agregación de aminoácidos (formulación 16). Todas las formulaciones que contenían fenilalanina (formulaciones 18, 19 y 20) contuvieron similarmente bajos niveles de HMWS, cuando se compararon con tanto las formulaciones de control como de HCl de arginina (formulaciones 16 y 17, respectivamente) (Figura 9). La tasa de formación de HMWS fue similar en las formulaciones que contenían HCl de arginina y fenilalanina (formulaciones 17-19), como se muestra en la Figura 9. La formulación de combinación que comprendía tanto arginina 38 mM como fenilalanina 38 mM (76 nM total, formulación 20) demostró una estabilidad mejor que la formulación de arginina 75 mM (formulación 17) (Figura 9), pero no mejor que la formulación de fenilalanina 75 mM (formulación 19) (Figura 9).

EJEMPLO 7

Este ejemplo demuestra la inhibición de la agregación y estabilidad de denosumab en función de diferentes concentraciones de fenilalanina.

En estudios previos, se identificaron dipéptidos de clorhidrato de arginina y clorhidrato de arginina-fenilalanina para minimizar el nivel de partida inicial y la tasa de formación de HMWS de denosumab. Se evaluaron las formulaciones que contenían clorhidrato de arginina, diversas concentraciones de fenilalanina y una combinación de clorhidrato de arginina y fenilalanina para los efectos estabilizantes sobre las disoluciones que contenían denosumab a 120 mg/ml.

Las formulaciones probadas se describen en la Tabla 7A que sigue. Para preparar las muestras de prueba A-E, una alícuota de denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2, se dializó contra los tampones DF descritos a continuación, con un total de 3 cambios de tampón para lograr una dilución de 1 millón de veces de la formulación previa para garantizar el intercambio de tampón completo. El material se concentró conjuntamente a continuación hasta aproximadamente 130 mg/ml a 150 mg/ml usando una centrifugadora-concentradora, seguido de una dilución hasta 120 mg/ml y la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final de 0,01 %. La formulación A se consideró la formulación de control.

Las formulaciones se envasaron en recipientes a un volumen de llenado de 1,0 ml. Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 37 °C durante hasta 1 mes. La estabilidad basada en la formación de HMWS se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de estabilidad de estas formulaciones se compararon después de un mes a 37 °C con las formulaciones de sorbitol y clorhidrato de arginina/sorbitol a 37 °C como se muestra en la Figura 11A.

Para preparar las muestras de prueba F - K, se ultrafiltró/diafiltró (UF/DF) una alícuota de denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2, contra los tampones DF descritos a continuación para un total de 12 diavolumenes para garantizar el intercambio de tampón completo. El material se concentró entonces en exceso hasta aproximadamente 200 mg/ml usando ultrafiltración, seguido de una dilución hasta 120 mg/ml y la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final del 0,01 %. La concentración de acetato fue 20 mM en estas formulaciones. La formulación F se consideró la formulación de control. Todos los valores de acetato y excipiente citados son para las concentraciones de tampón y excipiente contra los que se dializa el anticuerpo.

Las formulaciones se envasaron en recipientes a un volumen de llenado de 1,0 ml. Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 40 °C durante hasta 1 mes. La estabilidad basada en la formación de HMWS se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de estabilidad de estas formulaciones se compararon después de un mes a 40 °C con las formulaciones de sorbitol y clorhidrato de arginina/sorbitol a 40 °C como se muestra en la Figura 11B.

TABLA 7A

F n.º	Formulación final estimada	Composición de tampón DF*
A	Acetato 23 mM/4,6 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
B	Acetato 10 mM/Arginina 65 mM/2,2 % (p/v) de sorbitol PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1
C	Acetato 23 mM/Fenilalanina 35 mM/4,0 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, fenilalanina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
D	Acetato 23 mM/Fenilalanina 69 mM/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, fenilalanina 75 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1
E	Acetato 10 mM/Arginina 33 mM/Fenilalanina 35 mM/2,2 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de arginina 38 mM, fenilalanina 38 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1
F	Acetato 23 mM/4,3 % (p/v) de sorbitol PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, 4,7 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0

F n.º	Formulación final estimada	Composición de tampón DF*
G	Acetato 23 mM/Fenilalanina 4,6 mM/4,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, fenilalanina 5 mM, 4,7 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
H	Acetato 23 mM/Fenilalanina 9 mM/4,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, fenilalanina 10 mM, 4,7 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
I	Acetato 23 mM/Fenilalanina 18 mM/4,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, fenilalanina 20 mM, 4,7 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
J	Acetato 32 mM/Fenilalanina 37 mM/4,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, fenilalanina 40 mM, 4,7 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
K	Acetato 32 mM/Fenilalanina 55 mM/4,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, fenilalanina 60 mM, 4,7 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0

*Las formulaciones finales comprendieron 120 mg/ml de denosumab y PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y tuvieron el pH indicado. Se estiman concentraciones de sorbitol y fenilalanina a ~8,5 % inferiores a la concentración del tampón DF. Se estiman concentraciones de arginina a ~12,5 % inferiores a la concentración del tampón DF.

5 La Figura 11A y la Tabla 7B muestran el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C. La Figura 11B y la Tabla 7C muestran el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 40 °C. Las Figuras 12A y 12B muestran cromatogramas de exclusión por tamaño en función de la formulación tras el almacenamiento a 37 °C y 40 °C durante 1 mes, respectivamente.

TABLA 7B

	Formulación	Porcentaje de HMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
A	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
B	Acetato/Arginina 75 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,5
C	Acetato/Fenilalanina 38 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	0,9	1,3
D	Acetato/Fenilalanina 75 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	0,8	1,2
E	Acetato/Arginina 38 mM/Fenilalanina 38 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,7	1,0	1,4

10

TABLA 7C

	Formulación	Porcentaje de HMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
F	Acetato 20 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,67	1,44	1,96
G	Acetato 20 mM/Fenilalanina 5 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,64	1,34	1,74
H	Acetato 20 mM/Fenilalanina 10 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,60	1,26	1,68
I	Acetato 20 mM/Fenilalanina 20 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,53	1,12	1,51
J	Acetato 20 mM/Fenilalanina 40 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,48	1,02	1,37
K	Acetato 20 mM/Fenilalanina 60 mM/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,44	0,96	1,28

15 Todas las formulaciones de fenilalanina (formulaciones C, D, E, G - K), contuvieron menores niveles de HMWS cuando se compararon con tanto las formulaciones de sorbitol como de clorhidrato de arginina/sorbitol (formulaciones A y B, respectivamente). La formulación de combinación de clorhidrato de arginina y fenilalanina tuvo estabilidad similar cuando se comparó con la formulación de arginina/sorbitol (formulación B). Todas las formulaciones fueron superiores a la formulación de control de sorbitol (formulación A y F).

20

EJEMPLO 8

Este ejemplo demuestra una evaluación de diferentes inhibidores de la agregación de aminoácidos.

Se realizó una evaluación de diferentes inhibidores de la agregación de aminoácidos preparando ocho formulaciones con un aminoácido hidrófobo, aromático o polar/cargado para determinar su efecto sobre la minimización de la cantidad (%) de HMWS en una formulación líquida de denosumab de alta concentración (120 mg/ml), y la formación de HMWS con el tiempo. La formulación incluyó uno de los ocho L-aminoácidos y una cantidad reducida de sorbitol, con respecto a una formulación de control que no contenía ningún inhibidor de la agregación de aminoácidos y una cantidad más alta de sorbitol para la isotonicidad (formulación 26).

Los inhibidores de la agregación de aminoácidos probados se agruparon en uno de tres grupos (grupos I-III) y contuvieron la cantidad del inhibidor de la agregación de aminoácidos, del siguiente modo:

I. Aminoácidos aromáticos:

(a) Fenilalanina 38 mM (formulación 27);

(b) Triptófano 38 mM (formulación 28);

II. Aminoácidos polares/cargados:

(a) HCl de arginina 75 mM (formulación 29);

(b) Lisina 75 mM (formulación 30);

(c) Histidina 75 mM (formulación 31);

III. Aminoácidos hidrófobos:

(a) Leucina 38 mM (formulación 32);

(b) Isoleucina 38 mM (formulación 33);

(c) Valina 38 mM (formulación 34).

Para preparar las formulaciones 26-34, una alícuota de denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2, se dializó contra tampón DF descrito en la Tabla 8A, con un total de 3 cambios de tampón para lograr una dilución de 1 millón de veces de la formulación previa para garantizar el intercambio de tampón completo. La diálisis de la formulación F de histidina usó un tampón con un pH inicial de 4,0 y se predijo que el pH se desplazaría hasta el pH objetivo de 5,1 tras la concentración de proteína debido al efecto de Donnan y la concentración de acetato. Sin embargo, el pH no se desplazó al pH objetivo de 5,1 después de que la proteína se concentrara hasta 120 mg/ml, sino que permaneció a pH 4,0. Para llevar el pH de la formulación de histidina a pH 5,1, se requirió la valoración con NaOH diluido (0,1 N). Las formulaciones restantes se concentraron en exceso usando unidades de centrifugadora-concentradora, seguido de una dilución hasta 124-128 mg/ml y la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final de 0,01 % (p/v).

TABLA 8A

F n.º	Formulación final estimada	Composición del tampón de diálisis*
26 (A)	Acetato 23 mM/4,6 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, 0,01 % (p/v) de polisorbato 20, pH 4,0
27 (B)	Acetato 23 mM/Fenilalanina 35 mM/4 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, fenilalanina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
28 (C)	Acetato 23 mM/Triptófano/4 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, triptófano 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
29 (D)	Acetato 10 mM/Arginina 66 mM/2,2 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1
30 (E)	Acetato 10 mM/Lisina 66 mM/2,2 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de lisina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1
31 (F)	Acetato 10 mM/Histidina/2,2 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, histidina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
32 (G)	Acetato 23 mM/Leucina/4 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, leucina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0

F n.º	Formulación final estimada	Composición del tampón de diálisis*
33 (H)	Acetato 23 mM/Isoleucina/4 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, isoleucina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
34 (I)	Acetato 23 mM/Valina/4 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, valina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0

*Las formulaciones finales comprendieron 120 mg/ml de denosumab y PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y tuvieron el pH indicado. Se estiman concentraciones de sorbitol y fenilalanina a ~8,5 % inferiores a la concentración de sorbitol del tampón DF. Se estiman concentraciones de arginina al -12,5 % inferiores a la concentración de arginina del tampón DF. Las letras en () que aparecen después de F n.º corresponden a las Figuras 13-18

Las formulaciones se envasaron en recipientes a un volumen de llenado de 1,0 ml. Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 37 °C durante hasta 4 semanas. La inhibición de la agregación, y la estabilidad contra la inhibición de la agregación con el tiempo, basada en la formación de HMWS y especies dímeras, se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de inhibición de la agregación de estas formulaciones se compararon en condiciones iniciales y durante y después del periodo de almacenamiento.

Las Figuras 13-15 representan gráficos del porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función del tiempo de almacenamiento a 37 °C para cada formulación y la Tabla 8B proporciona los puntos de datos para los gráficos. La Figura 16-18 muestran las superposiciones cromatográficas de las formulaciones enumeradas en la Tabla 8A tras el almacenamiento a 37 °C durante 1 mes. Las Figuras 13 y 16 se refieren a formulaciones que comprenden aminoácidos aromáticos, las Figuras 14 y 17 se refieren a formulaciones que comprenden aminoácidos polares/cargados y las Figuras 15 y 18 se refieren a formulaciones que comprenden aminoácidos hidrófobos.

TABLA 8B

Formulación		Porcentaje de HMWS			
		0 semanas	2 semanas	4 semanas	Aumento 0-4 semanas
AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS (Figura 13)					
26	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	0,9	1,9	2,3	1,4
27	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	0,5	0,9	1,2	0,7
28	Acetato/Triptófano/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	0,7	0,9	0,4
AMINOÁCIDOS POLARES/CARGADOS (Figura 14)					
26	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	0,9	1,9	2,3	1,4
29	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	0,5	1,1	1,5	1,0
30	Acetato/Lisina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,6	1,2	1,6	1,0
31	Acetato/Histidina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	1,7	2,1	2,7	1,0

AMINOÁCIDOS HIDRÓFOBOS (Figura 15)					
26	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	0,9	1,9	2,3	1,4
27	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 (control)	0,5	0,9	1,2	0,7
32	Acetato/Leucina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	1,1	1,4	0,9
33	Acetato/Isoleucina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	1,1	1,3	0,8

AMINOÁCIDOS HIDRÓFOBOS (Figura 15)					
34	Acetato/Valina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	0,5	1,0	1,3	0,8
F n.º se proporciona en la columna izquierda y corresponde a F n.º de la Tabla 8A.					

5 Como se muestra en las Figuras 13-15, todas las formulaciones que contenían un inhibidor de la agregación de aminoácidos (formulaciones 27-34) demostraron cierta mejora en la estabilidad, con respecto a la formulación de acetato/sorbitol (formulación 26). Las formulaciones que contenían un aminoácido aromático (formulaciones 27 y 28) mostraron la mayor reducción en el % de HMWS. La formulación que contenía fenilalanina (formulación 27) también demostró una gran reducción en HMWS, y la formulación que contenía triptófano mostró la mayor reducción, con respecto al control (formulación 26). De las formulaciones de denosumab que contenían aminoácidos polares/cargados (formulaciones 29-31), en general, mostraron mayor cantidades de agregados de mayor orden (Figura 17) en comparación con otras formulaciones que tenían estabilizadores de aminoácidos (Figuras 16 y 18), y esta formulación específica de histidina mostró mayores cantidades de HWMS en general cuando se comparó con la formulación de acetato/sorbitol (formulación 26) (Figura 14). Los resultados de la formulación de histidina podrían estar sesgados por el proceso de diálisis, mayor duración transcurrida a pH 4,0, y la valoración de la formulación con NaOH diluido. Todas las formulaciones que contenían un aminoácido hidrófobo (formulaciones 32-34) demostraron una mejora consistente en la formación de HMWS.

EJEMPLO 9

20 Este ejemplo demuestra un posible mecanismo de acción de arginina y fenilalanina en la estabilización de denosumab. La espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) es un tecnología sensible y robusta para caracterizar la interacción de proteína-proteína/ligando/excipientes. El método detecta cambios en el enlace de hidrógeno de la amida del esqueleto debido a la interacción con el excipiente.

25 Se llevó a cabo espectrometría de masas por intercambio de hidrógeno/deuterio (HDX-MS) con denosumab (a concentración de 3 mg/ml) en tampón acetato 10 mM (pH 5,2) ("A52") en presencia de L-arginina (formulación 35), L-fenilalanina (formulación 36) o L-glicina (formulación 37) y se comparó con una formulación de denosumab que carecía de cualquier inhibidor de la agregación de aminoácidos (formulación 38). Los experimentos se llevaron a cabo a 4 °C (con concentración 75 mM de L-arginina, L-fenilalanina o L-glicina) y 37 °C (con concentración 150 mM de L-arginina, L-fenilalanina o L-glicina). Después de analizar más de 530 péptidos, se identificó un pequeño número de regiones con cambio conformacional significativo. Algunos péptidos representativos de estas regiones se capturan en las Figuras 19-30.

35 Las Figuras 19-24 son gráficos del % de incorporación de deuterio a 4 °C en función del tiempo (log (s)) para los aminoácidos de cadena ligera 28-33 (Figura 19), aminoácidos de cadena ligera 108-116 (Figura 20), aminoácidos de cadena ligera 125-132 (Figura 21), aminoácidos de cadena pesada 47-59 (Figura 22), aminoácidos de cadena pesada 243-253 (Figura 23) y aminoácidos de cadena pesada 392-399 (Figura 24) para cada una de las formulaciones 35-38.

40 Las Figuras 25-30 son gráficos del % de incorporación de deuterio a 37 °C en función del tiempo (log (s)) para los aminoácidos de cadena ligera 28-33 (Figura 25), aminoácidos de cadena ligera 108-117 (Figura 26), aminoácidos de cadena ligera 124-131 (Figura 27), aminoácidos de cadena pesada 47-59 (Figura 28), aminoácidos de cadena pesada 242-253 (Figura 29) y aminoácidos de cadena pesada 392-399 (Figura 30) para cada una de las formulaciones 35-38.

45 Estos datos soportan que Arg y Gly tienen un efecto de interacción similar sobre denosumab, aunque la Arg tuvo un distintivo de HDX ligeramente más fuerte (cambios conformacionales) sobre denosumab: estabilización fuerte en la región Fab LC 28-33; sutil estabilización en las regiones Fab LC 108-132 y HC 47-59, Fc CH3 HC 392-399; y sutil desestabilización en la región Fc CH2 243-253. Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, se concibe que el efecto del clorhidrato de arginina es debido a la exclusión preferencial combinada de la superficie de denosumab e interacciones superficiales débiles, mientras que la glicina funciona por exclusión preferencial.

50 Sin embargo, la fenilalanina no mostró perturbación estructural significativa sobre denosumab. Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, se concibe que el efecto estabilizador de la fenilalanina podría ser mediante uno o más de los siguientes mecanismos: interacciones de cadena lateral debidas a que no existe efecto sobre el esqueleto del péptido (sin distintivo de HDX); y/o interacción catión-pi con cadenas laterales de arginina/lisina sin afectar la red de enlaces de hidrógeno del esqueleto.

EJEMPLO 10

Este ejemplo demuestra un posible mecanismo de acción de la fenilalanina que estabiliza al denosumab.

60 Para estudiar el efecto específico de Phe sobre denosumab, se realizó una simulación de dinámica molecular. Específicamente, el dominio Fab de denosumab se solvató en una caja de simulación con exceso de Phe y se

realizaron dos simulaciones de 10 ns. Conjuntamente, se seleccionaron residuos de Phe unidos a Fab durante más del 90 % del tiempo para el análisis adicional. Se identificaron nueve de dichos casos. En 5 de las 9 observaciones de residencia de largo tiempo, el residuo de Phe se unió a la interfase de las regiones VH/VL (variable pesada/variable ligera) y CH/CL (constante pesada/constante ligera). En un ejemplo, se creyó que la cadena lateral de Phe estaba interactuando con las cadenas laterales de restos hidrófobos (por ejemplo, V93, Y95 y W112 de la cadena pesada y A44 y P45 de la cadena ligera), en la interfase de VH/VL. En otro ejemplo, se creyó que el anillo de Phe de cadena lateral estaba interactuando con los grupos de residuos NH₃⁺ y COO⁻ (por ejemplo, T165 de la cadena ligera y G171, V172 y T174 de la cadena pesada) en la interfase de CH1 y CL. Sin pretender quedar ligado a teoría particular alguna, esta observación condujo a la idea de que el efecto específico de Phe en mitigar la agregación de denosumab es debido a la interacción del grupo fenilo con restos hidrófobos (por ejemplo, R30, G31, R32 y Y33 de CDR1 de la cadena ligera, A52 de CDR2 de la cadena ligera y M106 de CDR3 de la cadena pesada) que forman la interfase de cadenas constantes pesadas 1 (Hc) y constantes ligeras (Lc). Se supone que esta interacción sustituye una superficie previamente hidrófoba con una superficie relativamente más cargada (por consiguiente hidrófila) de grupos NH₃⁽⁺⁾ y COO⁽⁻⁾ del excipiente de Phe.

EJEMPLO 11

Se realizó una evaluación de estabilidad de múltiples construcciones de anticuerpos anti-RANKL (de isotipos IgG1, IgG2 e IgG4). Como se ha descrito anteriormente, tanto el HCl de arginina como la fenilalanina minimizan las HMWS de partida, y los niveles de HMWS con el tiempo, cuando se compara con la formulación de control de acetato/sorbitol de denosumab (que es una inmunoglobulina IgG2). Esta evaluación se llevó a cabo comparando el potencial de Arg-HCl y Phe para reducir HMWS en formulaciones que contienen diferentes construcciones de anticuerpos anti-RANKL. Las construcciones de IgG1 e IgG4 probadas en este estudio contuvieron las mismas regiones determinantes de la complementariedad (CDR) cuando se compararon con denosumab, pero contuvieron diferentes armazones de dominio constante. La diferente construcción de IgG2 probada en este estudio tuvo diferentes CDR con respecto a denosumab, pero contuvo el mismo armazón de dominio constante.

Cada construcción de anticuerpo probada se purificó y concentró a partir de 8 mg/ml a 70 mg/ml usando concentración centrífuga. Cada volumen concentrado se dividió en tres alícuotas y luego se dializó contra un tampón acetato formulado con sorbitol, sorbitol/fenilalanina y sorbitol/clorhidrato de arginina para preparar las formulaciones 39-47, como se describen en Tabla 9. Las muestras posteriores a la diálisis se concentraron en exceso hasta más de 120 mg/ml con concentración centrífuga. La proteína de anticuerpo se diluyó hasta 120 mg/ml con el tampón respectivo.

TABLA 9

F n.º	Formulación final estimada	Composición de tampón DF
39	Acetato 23 mM/4,6 % (p/v) de Sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG1	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
40	Acetato 10 mM/66 mM Arginina/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG1	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1
41	Acetato 23 mM/35 mM Fenilalanina/3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG1	Acetato 10 mM, 3,3 % (p/v) de sorbitol, fenilalanina 38 mM, pH 4,0
42	Acetato 23 mM/4,6 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG2	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
43	Acetato 10 mM/66 mM Arginina/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG2	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1
44	Acetato 23 mM/35 mM Fenilalanina/3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG2	Acetato 10 mM, 3,3 % (p/v) de sorbitol, fenilalanina 38 mM, pH 4,0
45	23 mM Acetato/4,6 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG4	Acetato 10 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0
46	Acetato 10 mM/66 mM	

F n.º	Formulación final estimada	Composición de tampón DF
	Arginina/3,3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG4	Acetato 10 mM, 3,6 % (p/v) de sorbitol, HCl de arginina 75 mM, pH 5,1
47	Acetato 23 mM/35 mM Fenilalanina/3 % (p/v) de sorbitol/PS20/pH 5,1-IgG4	Acetato 10 mM, 3,3 % (p/v) de sorbitol, fenilalanina 38 mM, pH 4,0

*Las formulaciones finales comprendieron PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y tuvieron el pH indicado. Se estiman concentraciones de sorbitol y fenilalanina a ~8,5 % inferiores a la concentración del tampón DF. Se estiman concentraciones de arginina a ~12,5 % inferiores a la concentración del tampón DF.

- 5 Las formulaciones se envasaron en recipientes de vial de vidrio a un volumen de llenado de 1,0 ml. Las formulaciones se almacenaron a una temperatura de 37 °C durante hasta 1 mes. La inhibición de la agregación, y la estabilidad contra la inhibición de la agregación con el tiempo, basada en la formación de HMWS, se evaluó usando SE-UHPLC. Los perfiles de inhibición de la agregación de estas formulaciones se compararon en condiciones iniciales y después del periodo de almacenamiento. La estabilidad de estas formulaciones después del almacenamiento se comparó dentro de la clase de las inmunoglobulinas.
- 10 Las Figuras 31, 33 y 35 (y las Tablas 10, 12 y 14 relacionadas que siguen) muestran el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con inmunoglobulinas G (IgG1, IgG2 e IgG4, respectivamente). Las Figuras 32, 34 y 36 (y Tablas 11, 13 y 15 relacionadas que siguen) muestran el porcentaje de especies de bajo peso molecular (LMWS, por ejemplo, fragmentación de proteínas) como se monitoriza por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 37 °C con inmunoglobulinas G (IgG1, IgG2 e IgG4, respectivamente).
- 15 Las Figuras 37, 38 y 39 muestran las superposiciones de cromatogramas de exclusión por tamaño en función de la formulación tras el almacenamiento a 37 °C durante t=4sem.

TABLA 10: % de HMW, comparación de IgG1 (A, B, C) a 37 °C durante 4 semanas

	Formulación	Porcentaje de HMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
39	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG1	0,3	0,7	0,9
40	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG1	0,3	0,8	1,0
41	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG1	0,3	0,6	0,7

20

TABLA 11: % de LMWS, comparación de IgG1 (A, B, C) a 37 °C durante 4 semanas

	Formulación	Porcentaje de LMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
39	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG1	1,2	2,4	3,1
40	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG1	1,2	2,8	4,3
41	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG1	1,2	2,1	3,0

TABLA 12: % de HMW, comparación de IgG2 (D, E, F) a 37 °C durante 4 semanas

	Formulación	Porcentaje de HMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
42	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,4	1,7	2,0
43	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,4	2,8	3,1
44	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,3	1,8	2,4

25

TABLA 13: % de LMWS, IgG2 (D, E, F) comparación a 37 °C durante 4 semanas

	Formulación	Porcentaje de LMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
42	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,7	4,0	7,8
43	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,8	8,2	16,2
44	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,7	3,1	6,2

TABLA 14: % de HMW, comparación de IgG4 (G, H, I) a 37 °C durante 4 semanas

	Formulación	Porcentaje de HMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
45	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,6	1,1	1,3
46	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,7	1,1	1,6
47	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,6	1,0	1,3

5

TABLA 15: % de LMWS, comparación de IgG4 (G, H, I) a 37 °C durante 4 semanas

	Formulación	Porcentaje de LMWS		
		0	2 semanas	4 semanas
45	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,7	1,6	1,9
46	Acetato/Arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,8	1,6	2,1
47)	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,7	1,4	1,8

10 Como se muestra en las Figuras 31 y 32, la molécula de IgG1, que tiene una región CDR similar a las muestras previas de denosumab, mostró una reducción de aproximadamente 0,2 % en HMWS con la adición de fenilalanina cuando se compara con la formulación de control de acetato/sorbitol. Las muestras de IgG2 que tienen una CDR diferente y se representan en las Figuras 33 y 34 mostraron un aumento en HMWS en la formulación de acetato/fenilalanina/sorbitol cuando se compara con la formulación de control de acetato/sorbitol. Las formulaciones de acetato/sorbitol y acetato/fenilalanina/sorbitol tuvieron estabilidad similar para el tipo de muestra de IgG4, teniendo el acetato/sorbitol/arginina mayor formación de HMWS como se muestra en las Figuras 35 y 36. En todos los casos con los tipos de muestra de IgG1, IgG2 e IgG4, la formulación que contiene acetato/sorbitol/arginina mostró un aumento de la degradación de HMWS cuando se comparó con las formulaciones de acetato/sorbitol (control) y acetato/fenilalanina/sorbitol.

20 Debido al gran aumento en las fragmentación de proteínas en la formulación de acetato/arginina/sorbitol como se representa en las Figuras 37 y 38, se mostró la relación entre la fragmentación y la isoforma de anticuerpo en las Figuras 32, 34 y 36. Se ha mostrado en la bibliografía que la agregación mediada por la fragmentación de anticuerpos monoclonales puede dar lugar a anticuerpos almacenados a 37 °C [Perico N. et al., J. Pharm. Sci. (2009) 98, pgs. 3031 - 3042]. Este mecanismo es posible en esta evaluación ya que la fragmentación es la mayor en las formulaciones de acetato/arginina/sorbitol. La fragmentación se minimiza en la formulación de acetato/fenilalanina/sorbitol conduciendo potencialmente a menos especies de HMWS. El tipo de muestra de IgG4 no ha acelerado la fragmentación o agregación.

30 A partir de los datos recopilados en este estudio, así como de datos de modelos moleculares de datos previos recopilados con denosumab, se puede establecer una fuerte correlación entre la secuencia de aminoácidos de CDR y el efecto relativo de reducir HMWS con fenilalanina. Se observó una reducción en las especies de HMW en denosumab (IgG2) y la variante de IgG1 que tenía aminoácidos de CDR idénticos, pero no se observó reducción en HMWS en la variante de IgG2 con diferentes dominios CDR. Parecería que las secuencias de aminoácidos contenidas dentro de los dominios CDR son susceptibles a interactuar con fenilalanina y posterior inhibición de la agregación. La molécula IgG4 también tuvo regiones CDR idénticas cuando se comparó con denosumab, pero se detectó un cambio mínimo en la agregación durante el transcurso del estudio. La molécula de IgG4 se diferencia de las versiones IgG1 e IgG2 principalmente por su longitud de aminoácidos bisagra y su estructura funcionalmente activa. Como las isoformas de anticuerpos IgG1 e IgG2 tienen una estructura extendida que normalmente se describe como una forma de "Y", un dominio CH1 de Fab de IgG4 interactúa con el dominio CH2 formando una estructura más compacta [Aalberse R.C. et al., Immunology (2002), 105, pgs. 9-19]. Esta estructura compacta podría inhibir las reacciones de fragmentación y agregación observadas normalmente con las modalidades IgG1 e IgG2.

EJEMPLO 12

Se realiza un estudio para monitorizar la estabilidad de denosumab formulado como se describe a continuación y a propósito de la Tabla 16 (formulaciones 51-55). Los tampones de diafiltración se diferencian en la concentración de acetato y pH de partida para producir formulaciones finales con pH 5,1 a concentración de 120 mg/ml de denosumab. Además, el nivel de sorbitol se ajusta para mantener la isotonicidad del producto final (~300 mOsm/Kg). Denosumab a 70 mg/ml se diafiltra contra cada tampón durante más de 7 diavolumenes, luego se ultrafiltró a aproximadamente 180 g/ml y se diluyó con el tampón de diafiltración y polisorbato hasta la concentración de 120 mg/ml de denosumab y 0,01 % de polisorbato 20. La estabilidad se evalúa usando SE-UHPLC después del almacenamiento a 37 °C y muestra que la estabilidad de denosumab en estas formulaciones es altamente similar. Especies de HMW iniciales disminuyen ligeramente a medida que aumentan las concentraciones de acetato inicial. A diferencia, las tasas de agregación mejoran ligeramente en formulaciones con menores niveles de acetato.

15 TABLA 16

F n.º	Tampón DF	Formulación final estimada*	Osmolalidad (mOsm/kg)
51	Acetato 5 mM, fenilalanina 40 mM, 4,4 % de sorbitol, pH 4,0	Acetato 16 mM, fenilalanina 37 mM, 4,1 % de sorbitol	304
52	Acetato 10 mM, fenilalanina 40 mM, 4,2 % de sorbitol, pH 4,4	Acetato 23 mM, fenilalanina 37 mM, 3,9 % de sorbitol	300
53	Acetato 20 mM, fenilalanina 40 mM, 4,0 % de sorbitol, pH 4,7	Acetato 32 mM, fenilalanina 37 mM, 3,7 % de sorbitol	304
54	Acetato 20 mM, fenilalanina 40 mM, 4,2 % de sorbitol, pH 4,7	Acetato 32 mM, fenilalanina 37 mM, 3,9 % de sorbitol	315
55	Acetato 30 mM, fenilalanina 40 mM, 3,7 % de sorbitol, pH 4,8	Acetato 41 mM, fenilalanina 37 mM, 3,4 % de sorbitol	303

* Las formulaciones finales comprendieron 120 mg/ml de denosumab y PS20 a una concentración final de 0,01 % (p/v) y un pH 5,1.

EJEMPLO DE REFERENCIA 13

El siguiente ejemplo informa de los resultados de estudios sobre el efecto de la arginina sobre la estabilidad a la desnaturalización química de denosumab a tres valores de pH diferentes: 4,5, 4,8 y 5 (o 5,2).

Todos los experimentos de desnaturalización química se llevaron a cabo usando un instrumento de Unchained Labs - HUNK con detector de fluorescencia. La longitud de onda de excitación fue 280 nm y los barridos de emisión se registraron entre 300 y 500 nm. Para cada experimento de desnaturalización, se dispensaron proteína, tampón y desnaturalizante (HCl de guanidinio) en 36 pocillos con un aumento lineal en la concentración de desnaturalizante, dando como resultado una curva de 36 puntos para cada condición. El software de ajuste a curva proporcionado por el fabricante del instrumento (Uncadenaed Labs) se usó para ajustar los puntos de datos. Se usó un modelo de dos estados puesto que hubo evidencia de solo una única transición (nativa ↔ desnaturalizada). Los experimentos se llevaron a cabo usando urea 0 - 6 M en acetato 10 mM, 5,0 % p/v de sorbitol, y se valoraron hasta el pH requerido de 4,5, 4,8 o 5 (5,2). La concentración de la proteína denosumab fue 7 mg/ml en todos los experimentos.

La Figura 40 muestra las curvas de desnaturalización química isotérmica de denosumab en ausencia de arginina, a pH 4,5, 4,8 y 5,0. En ausencia de arginina, la $C_{1/2}$ de desnaturalizante químico requerida para el 50 % de desplegamiento es similar en las tres condiciones de pH probadas.

La Figura 41 muestra las curvas de desnaturalización química isotérmica de denosumab en presencia de HCl de arginina 75 mM a pH 4,5, 4,8 y 5,2. Hubo un marcado aumento en la estabilidad química a la desnaturalización a pH 5,2 cuando se comparó con pH 4,8 y 4,5. La $C_{1/2}$ aumenta en 1 M del desnaturalizante HCl de guanidinio a pH 5,2 frente a pH más bajo. Por lo tanto, la naturaleza protectora de la arginina es sorprendente y altamente dependiente del pH.

EJEMPLO 14

El siguiente ejemplo proporciona los resultados de estudios sobre el efecto de la arginina y la fenilalanina sobre la estabilidad con el tiempo de formulaciones de denosumab de alta concentración en jeringas.

En estudios previos, se identificó que el clorhidrato de arginina y la fenilalanina reducían el nivel de partida inicial y la tasa de formación de HMWS de denosumab. En este estudio, se evaluaron formulaciones que contenían clorhidrato de arginina, fenilalanina y una combinación de clorhidrato de arginina y fenilalanina para estabilizar los efectos en disoluciones que contenían denosumab a 120 mg/ml y se almacenaron en jeringas durante hasta tres meses y a dos temperaturas diferentes.

Las formulaciones probadas se describen en la TABLA 17 que sigue. Para preparar las formulaciones 56-59, denosumab a 70 mg/ml en acetato, pH 5,2, se diafiltró contra los tampones de diafiltración (DF) descritos a continuación, durante 8 diavolúmenes para garantizar el intercambio de tampón completo. El material se ultrafiltró entonces hasta más de 180 mg/ml, seguido por una dilución hasta 120 mg/ml y la adición de polisorbato 20 hasta una concentración final de 0,01 %. La formulación 56 se consideró la formulación de control. Los valores de acetato, HCl de arginina y fenilalanina enumerados son para el tampón DF y se proporcionan los niveles estimados en la composición final a 120 mg/ml de denosumab, teniendo en cuenta la exclusión de excipiente y la concentración conjunta de acetato cuando no está presente otro contraión. Se midió la viscosidad a 5 °C y 25 °C usando un reómetro compacto modular Paar a velocidades de cizallamiento de hasta 1000 s⁻¹ (inversa de segundos). Las formulaciones se envasaron en jeringas de vidrio precargadas (PFS) a un volumen de llenado de 1,0 ml. Se almacenaron conjuntos paralelos de jeringas a una temperatura de 25 °C durante 3 meses y 37 °C durante 2 meses, respectivamente. La estabilidad se basó en la formación de HMWS como se evalúa usando SE-UHPLC.

TABLA 17

	Nombre abreviado de la formulación	Composición de tampón DF*	Formulación final estimada*	Conductividad (µS/cm)	Viscosidad a 5 °C	Viscosidad a 25 °C
56	Acetato/Sorbitol/PS20/pH 5,0	Acetato 20 mM, 5 % (p/v) de sorbitol, pH 4,7	Acetato 32 mM, 4,4 % de sorbitol	600	5,2	3,1
57	Acetato/HCl de arginina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de L-arginina 75 mM, 2,4 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de arginina 66 mM, 2,2 % de sorbitol	5250	4,8	2,7
58	Acetato/HCl de arginina/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de arginina 38 mM, fenilalanina 38 mM, 3,0 % (p/v) de sorbitol, pH 5,1	Acetato 10 mM, HCl de arginina 33 mM, fenilalanina 35 mM 2,8 % de sorbitol	3070	4,8	2,8
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, fenilalanina 38 mM, 4,4 % (p/v) de sorbitol, pH 4,0	Acetato 23 mM, fenilalanina 35 mM, 4,2 % de sorbitol	800	4,9	2,9

*Cada formulación final comprende 120 mg/ml de denosumab y 0,01 % de PS20 y el pH indicado en el Nombre abreviado de la formulación

Las Figuras 42 y 43 muestran el porcentaje de HMWS monitorizado por SE-UHPLC en función de la formulación y el tiempo a 25 °C durante 3 meses y 37 °C durante 2 meses, respectivamente.

Las TABLAS 18-21 muestran los mismos datos en forma tabulada y también el aumento en HMWS con respecto a los niveles iniciales de HMWS.

TABLA 18: % de nivel de HMWS a 25 °C durante 12 semanas

Nombre de formulación		Porcentaje de HMWS					
		0	2	4	6	8	12
56	Acetato/Sorbitol/pH 5,0	0,81	0,93	1,04	1,16	1,17	1,38
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitol/pH 5,1	0,72	0,85	0,93	1,02	1,07	1,21
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,59	0,75	0,85	0,93	0,97	1,12
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,66	0,7	0,79	0,88	0,92	1,08

TABLA 19: Aumento de HMWS a 25 °C durante 12 semanas

Formulación		Aumento de HMWS					
		0	2	4	6	8	12
56	Acetato/Sorbitol/pH 5,0	0,12	0,23	0,35	0,36	0,57	
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitol/pH 5,1	0,13	0,21	0,3	0,35	0,49	
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,16	0,26	0,34	0,38	0,53	
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,04	0,13	0,22	0,26	0,42	

5

TABLA 20: % de nivel de HMWS a 37 °C durante 8 semanas

Formulación		Porcentaje de HMWS				
		0	2	4	6	8
56	Acetato/Sorbitol/pH 5,0	0,81	1,3	1,66	1,94	2,49
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitol/pH 5,1	0,72	1,2	1,5	1,94	2,23
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,59	1,23	1,66	2,06	2,48
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,66	1,09	1,4	1,73	2,21

10

TABLA 21: Aumento de HMWS a 37 °C durante 8 semanas

Formulación		Aumento de HMWS			
		2	4	6	8
56	Acetato/Sorbitol/pH 5,0	0,49	0,85	1,13	1,68
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitol/pH 5,1	0,48	0,78	1,22	1,51
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,64	1,07	1,47	1,89
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitol/pH 5,1	0,43	0,74	1,07	1,55

15

Este ejemplo muestra que la adición de arginina, fenilalanina, y una combinación de las mismas, reduce cada una el nivel de HMWS inicial (t=0) con formulaciones de denosumab de alta concentración. A 25 °C, el aumento en HMWS se reduce en la formulación 59 de fenilalanina, en comparación con la formulación de control 56. A 37 °C, las formulaciones 57 y 59 tienen formación reducida de HMWS en comparación con la formulación 56 de control de sorbitol. La formulación que contiene tanto HCl de arginina como fenilalanina formaron HMWS a una mayor tasa a 37 °C con respecto a las otras formulaciones, que indica que la combinación de estos excipientes es desestabilizante para denosumab a dichas temperaturas más altas en esta formulación.

20

En toda esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprenden" y variaciones, tales como "comprende" y "que comprende", implica la inclusión de un número entero establecido o etapa o grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

25

En toda la memoria descriptiva, donde se describe que las composiciones incluyen componentes o materiales, se contempla que las composiciones también puedan consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación

5 de los componentes o materiales citados, a menos que se describa lo contrario. Asimismo, donde se describen métodos que incluyen etapas particulares, se contempla que los métodos también puedan consistir esencialmente en, o consistir en, cualquier combinación de las etapas citadas, a menos que se describa de otro modo. La divulgación descrita en el presente documento se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o etapa que no se desvele específicamente en el presente documento.

10 La práctica de un método desvelado en el presente documento, y las etapas individuales del mismo, se pueden realizar manualmente y/o con la ayuda de o la automatización proporcionada por equipo electrónico. Aunque se han descrito procesos con referencia a divulgaciones particulares, un experto habitual en la técnica apreciará fácilmente que se pueden usar otras formas de realizar los actos asociados a los métodos. Por ejemplo, se puede cambiar el orden de diversas de las etapas, a menos que se describa lo contrario. Además, algunas de las etapas individuales se pueden combinar, omitir, o subdividirse adicionalmente en etapas adicionales.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica acuosa que comprende:
 - un anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración en un intervalo de 100 a 140 mg/ml;
 - 1,0 % (p/p) al 5,0 % (p/p) de sorbitol;
 - al menos 0,004 % (p/v) y menos de 0,15 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80;
 - tampón acetato o glutamato 5 mM a 60 mM; y
 - L-fenilalanina o L-triptófano 5 mM a 180 mM;
- en donde la formulación farmacéutica acuosa tiene un pH en un intervalo de 5,0 a 5,4; y
- en donde el anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende (A) un dominio variable de la cadena ligera que comprende una CDR1 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, una CDR2 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y una CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:7; y (B) un dominio variable de la cadena pesada que comprende una CDR1 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, una CDR2 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9 y una CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.
2. La formulación farmacéutica acuosa de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende una región variable de la cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 2 y una región variable de la cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 1.
3. La formulación farmacéutica acuosa de la reivindicación 1 o 2, en donde el anticuerpo anti-RANKL, o porción de unión al antígeno del mismo, comprende una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 4 o 14 y una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 3 o 13.
4. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde el anticuerpo anti-RANKL es denosumab.
5. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la concentración del anticuerpo anti-RANKL es 120 mg/ml \pm 12 mg/ml.
6. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende L-fenilalanina.
7. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende L-fenilalanina o L-triptófano 20 mM a 50 mM, opcionalmente, L-fenilalanina.
8. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tampón es acetato.
9. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende L-fenilalanina, y que comprende tampón acetato en un intervalo de 2 mM a 30 mM, o 16 mM a 41 mM, o 25 mM a 39 mM, o 30 mM a 34 mM.
10. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende 2,0 % (p/p) al 5,0 % (p/p) de sorbitol.
11. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el tensioactivo es polisorbato 20.
12. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una formulación acuosa que tiene un pH de 5,0 a 5,2.
13. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene (i) una viscosidad que es no más de 6 cP a 5 °C, (ii) una conductividad en un intervalo de 500 μ S/cm a 2000 μ S/cm, (iii) una osmolalidad de 200 mOsm/kg a 500 mOsm/kg, (iv) menos del 2 % de especies de alto peso molecular (HMWS) y/o más del 98 % del pico principal de anticuerpo, como se mide por SE-UHPLC, tras el almacenamiento a 2 °C a 8 °C durante al menos 12 meses.
14. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende menos de 2 % de especies de alto peso molecular (HMWS) y/o más de 98 % del pico principal de anticuerpo, como se mide por SE-UHPLC, tras el almacenamiento a 2 °C a 8 °C durante al menos 36 meses.
15. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende menos de 2 % de especies de alto peso molecular (HMWS) y/o más de 98 % del pico principal de anticuerpo, como se mide

por SE-UHPLC, tras un primer almacenamiento a 2 °C a 8 °C durante al menos 36 meses, seguido de un segundo almacenamiento a 20 °C a 30 °C durante 1 mes.

5 16. La formulación farmacéutica acuosa de la reivindicación 1, en donde la formulación comprende denosumab en una concentración de 108 mg/ml a 132 mg/ml, acetato 28,8 mM a 35,2 mM, fenilalanina 33,3 mM a 40,7 mM, 3,51 % (p/v) a 4,29 % (p/v) de sorbitol y 0,009 % (p/v) a 0,011 % (p/v) de polisorbato 20, a pH 5,1.

10 17. La formulación farmacéutica acuosa de la reivindicación 17, que comprende denosumab a una concentración de 120 mg/ml, acetato 32 mM, fenilalanina 37 mM, 3,9 % (p/v) de sorbitol y 0,01 % (p/v) de polisorbato 20, a pH 5,1.

15 18. La formulación farmacéutica acuosa de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, para su uso en (a) el tratamiento o la prevención de un evento relacionado con el esqueleto (SRE) en un sujeto con metástasis óseas de tumores sólidos, (b) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto que es un adulto o un adolescente esqueléticamente maduro con tumor óseo de células gigantes de manera que sea inoperable o donde sea probable que la resección quirúrgica dé como resultado una intensa morbilidad, (c) el tratamiento de hipercalcemia de tumor maligno resistente a la terapia con bisfosfonato en un sujeto, (d) el tratamiento o la prevención de un SRE en un sujeto con mieloma múltiple o con metástasis óseas de un tumor sólido, (e) el tratamiento de osteoporosis de mujeres posmenopáusicas con alto riesgo de fractura, (f) el tratamiento para aumentar la masa ósea en mujeres con alto riesgo de fractura que reciben terapia adyuvante con inhibidores de la aromatasas para cáncer de mama, (g) el tratamiento para aumentar la masa ósea en hombres con alto riesgo de fractura que reciben terapia de privación androgénica para cáncer de próstata no metastásico, (h) el tratamiento para aumentar la masa ósea en hombres con osteoporosis con alto riesgo de fractura, (i) la terapia con calcio o vitamina D, (j) el tratamiento de tumor óseo de células gigantes en un paciente en necesidad del mismo, (k) el tratamiento de hipercalcemia de tumor maligno en un paciente en necesidad del mismo, (l) el tratamiento de osteoporosis en un paciente en necesidad del mismo, o (m) el aumento de la masa ósea en un paciente en necesidad del mismo.

20

25

FIGURA 1

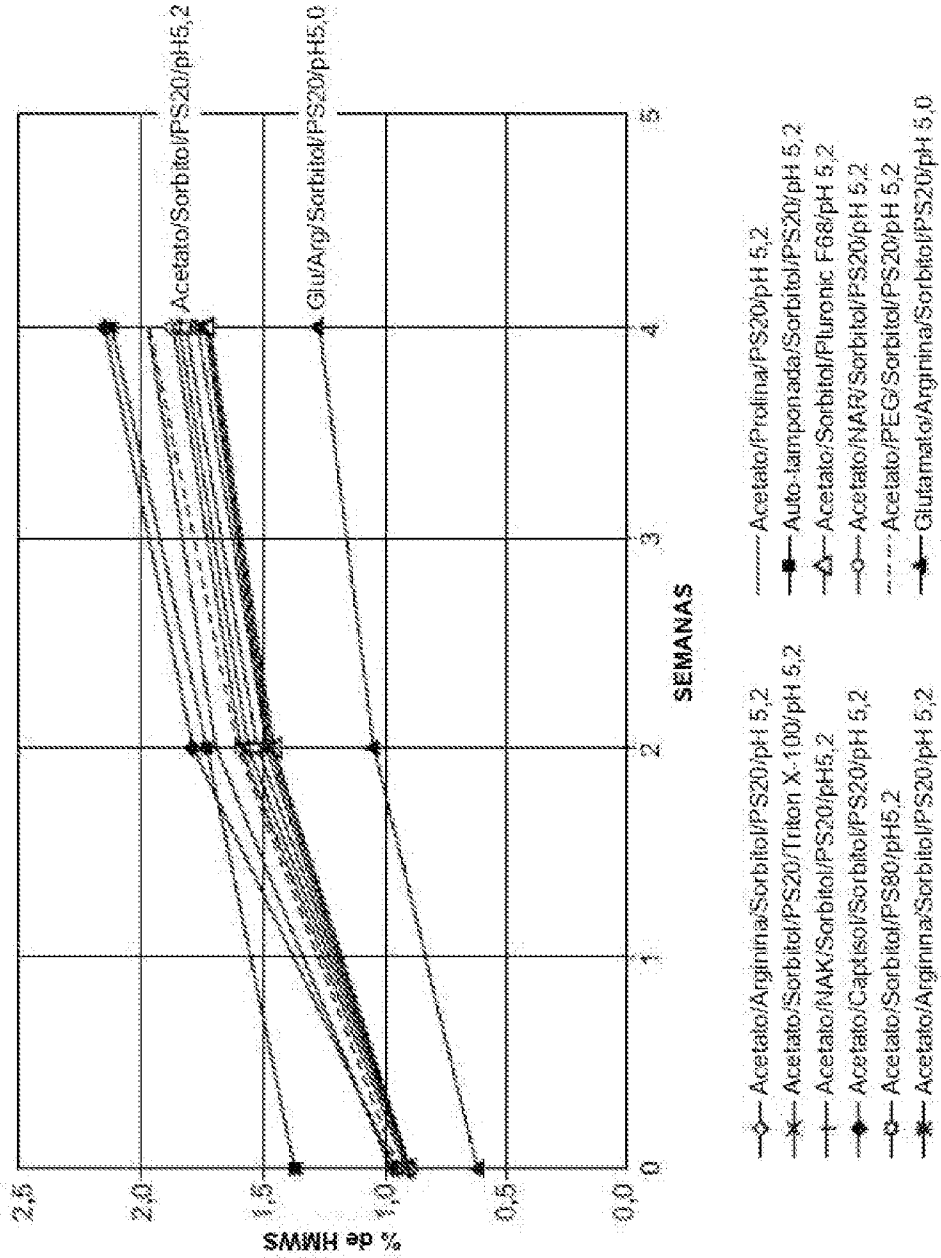


FIGURA 2

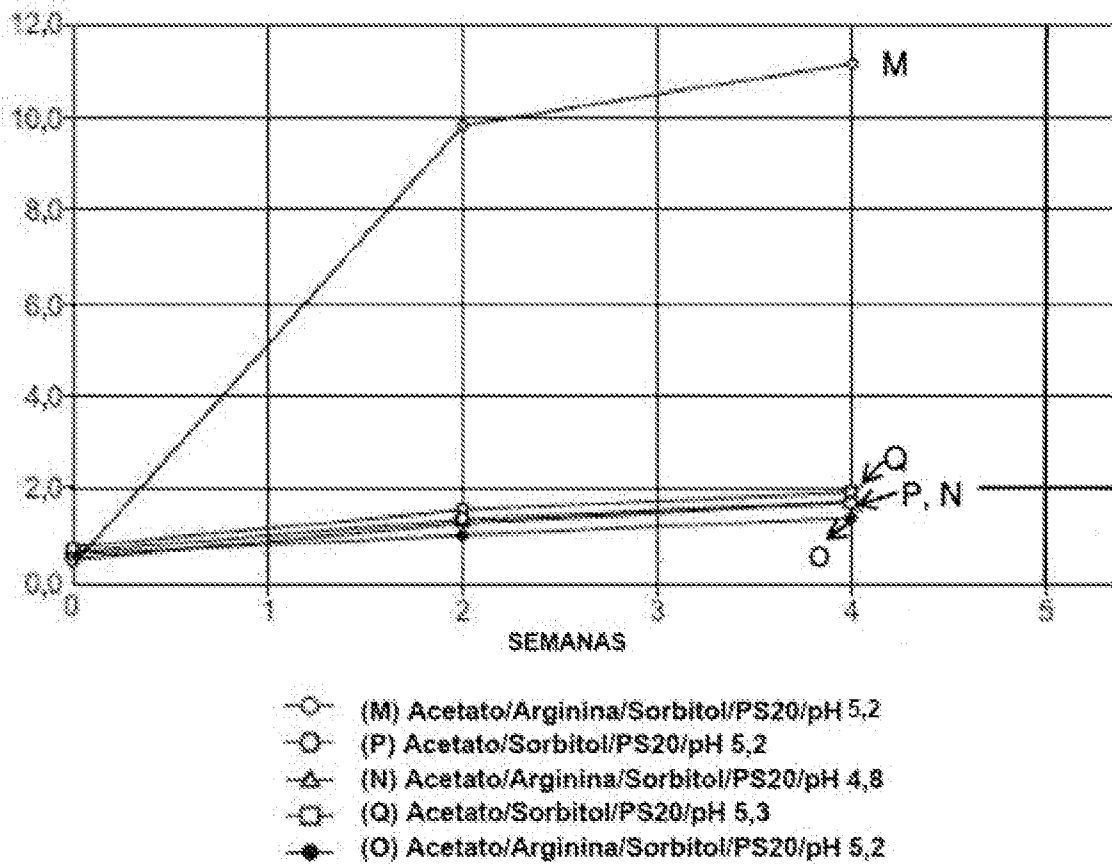


FIGURA 3

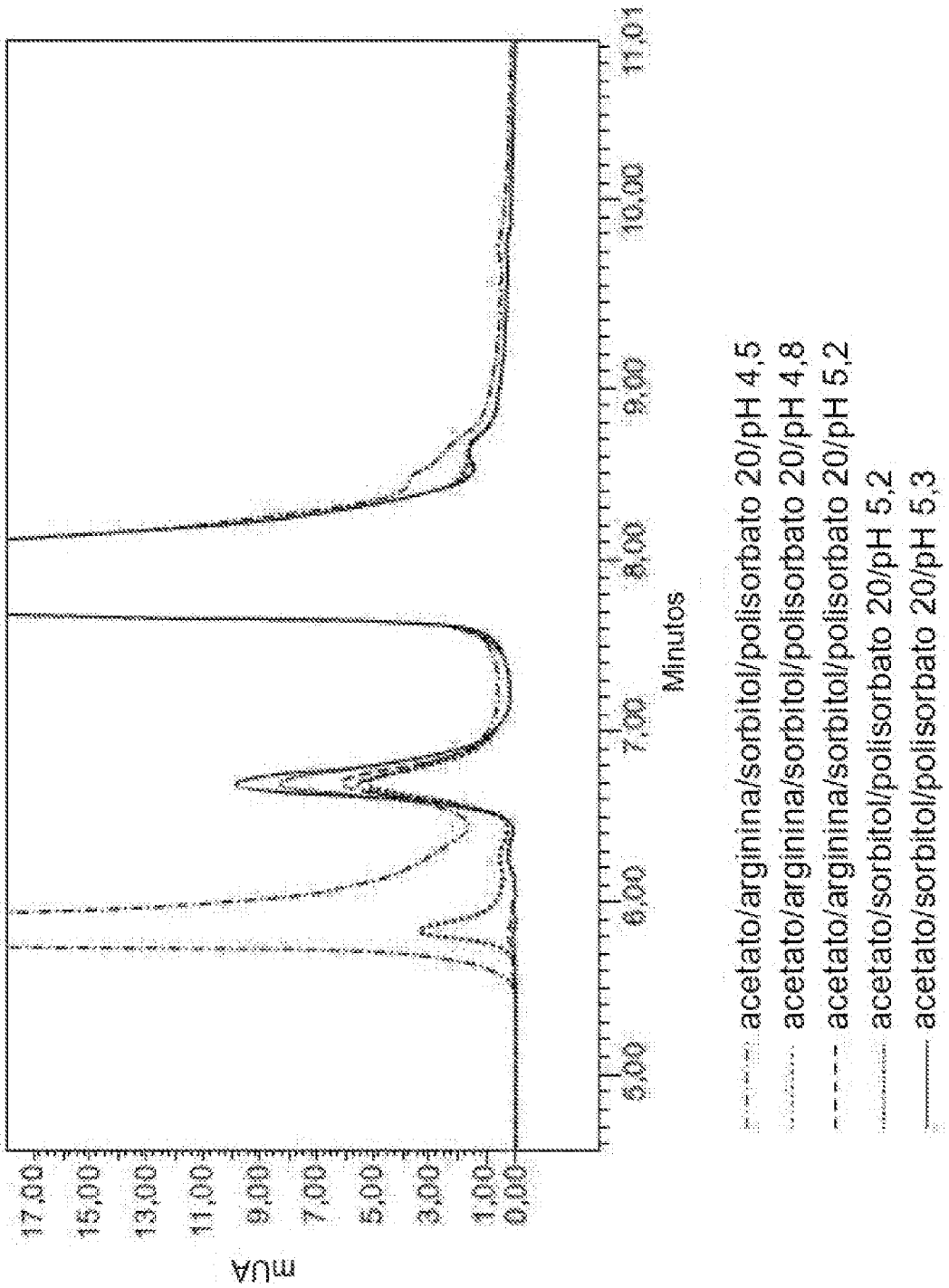


FIGURA 4

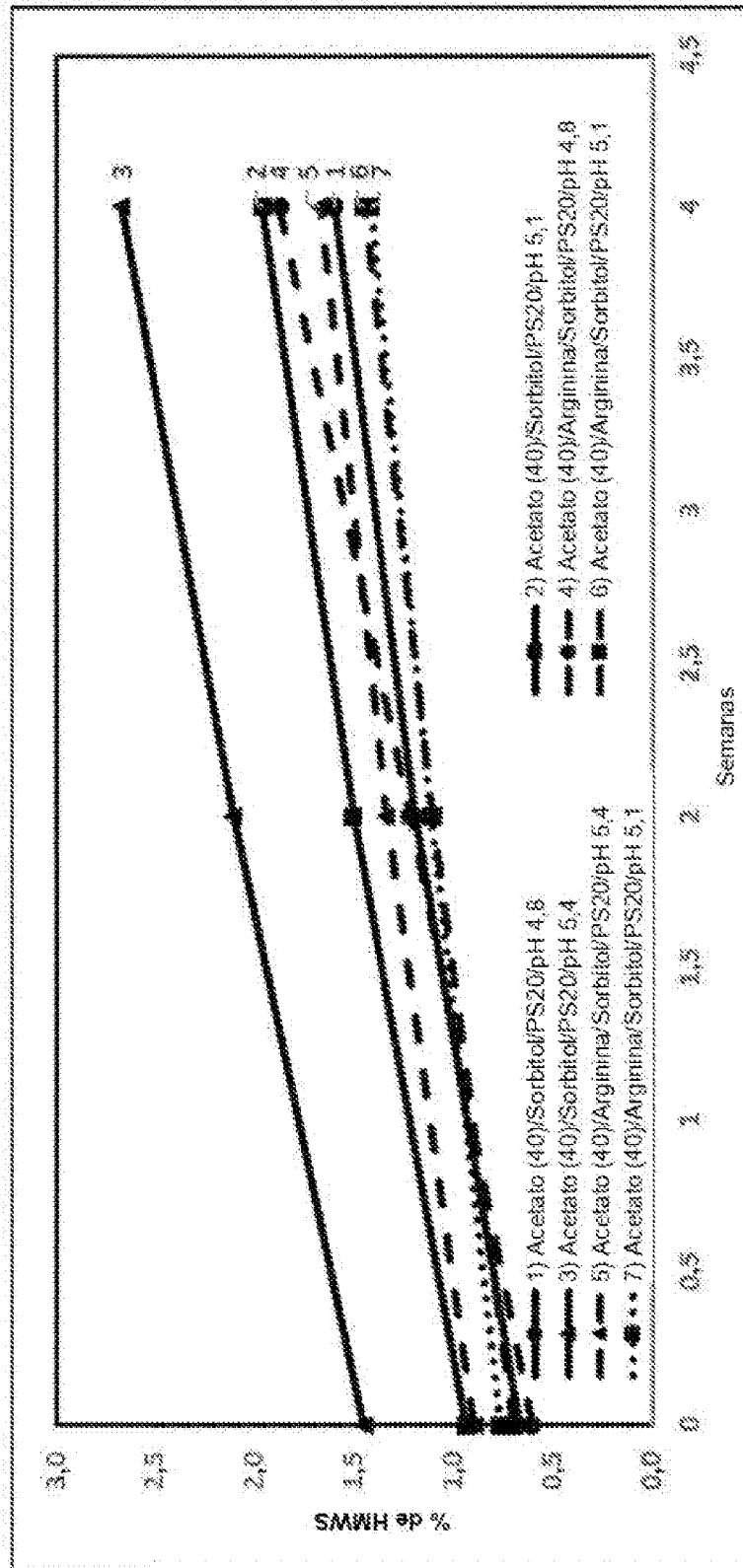


FIGURA 5A

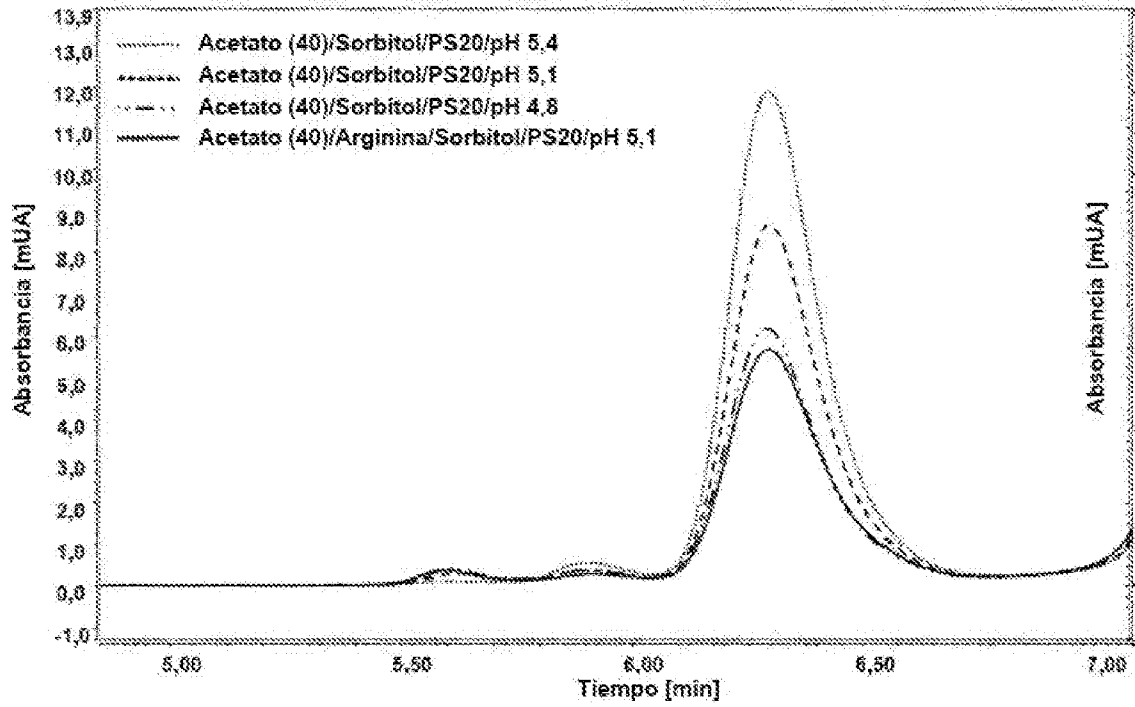


FIGURA 5B

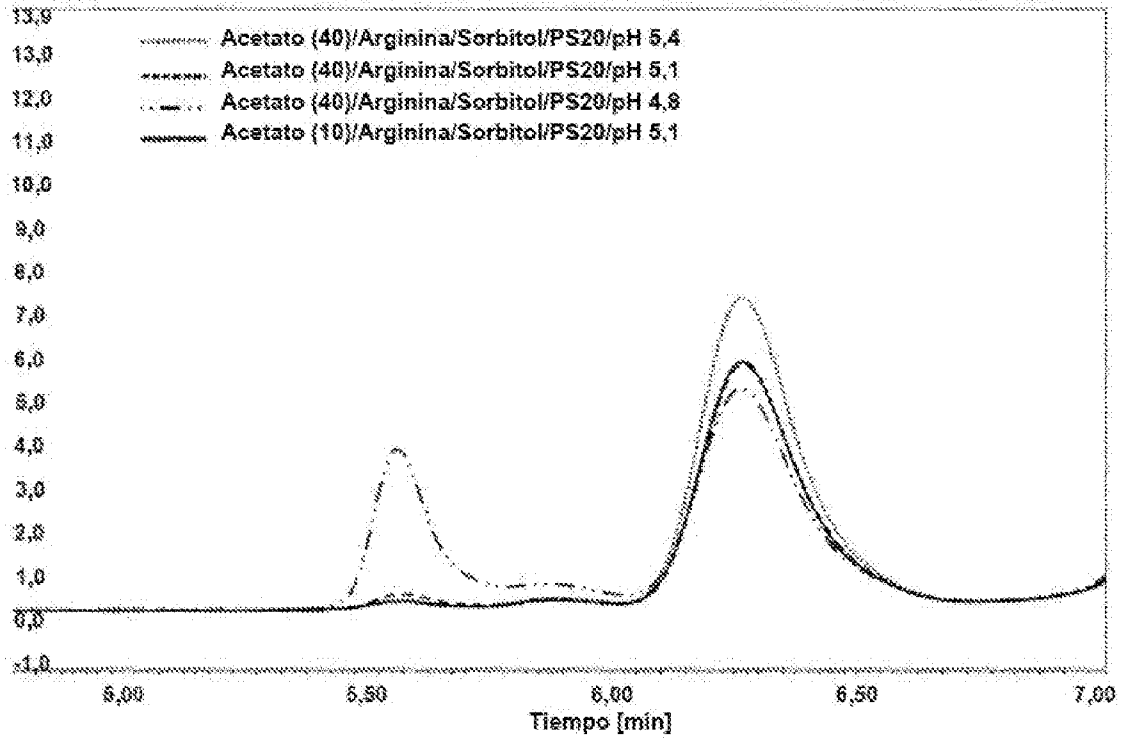


FIGURA 6

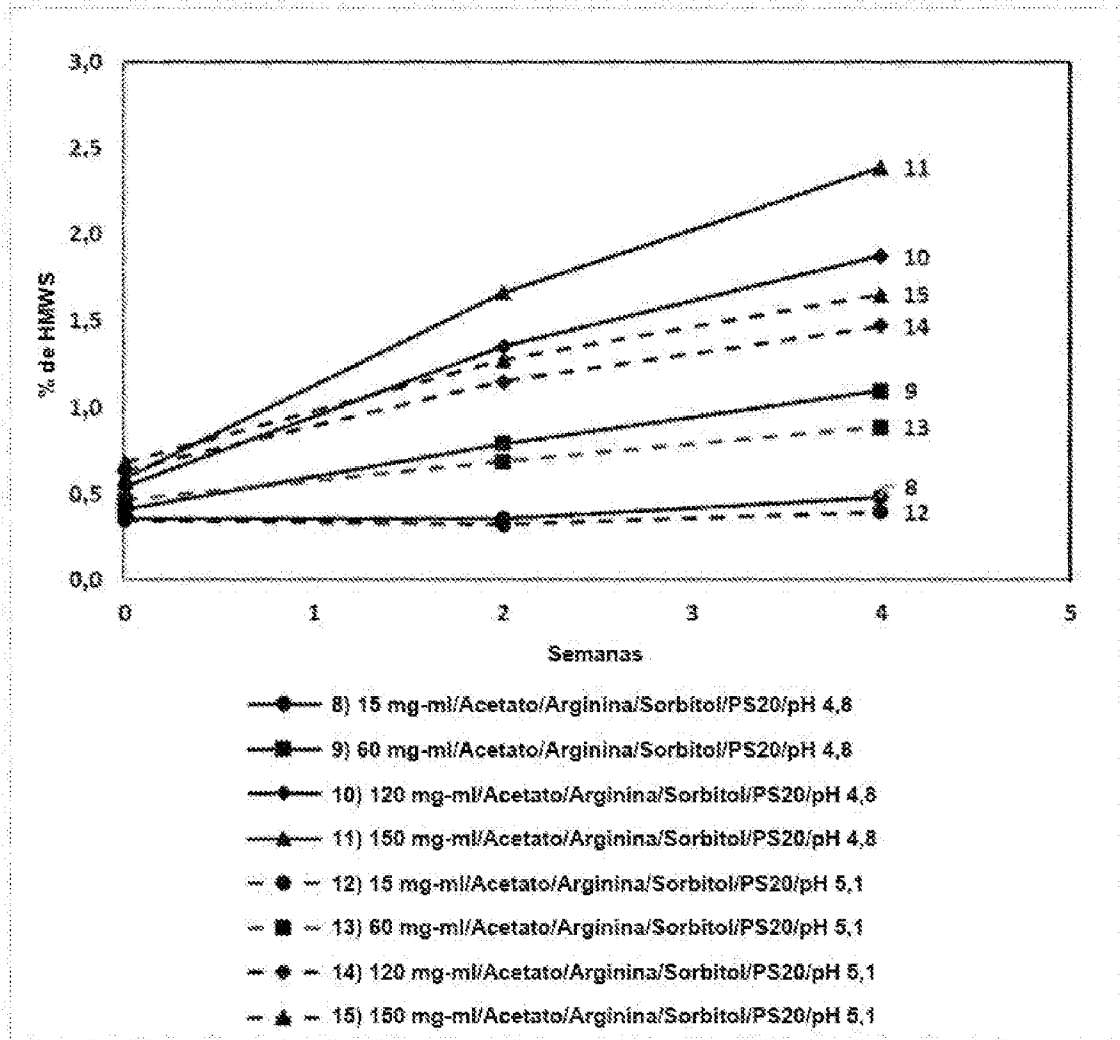


FIGURA 7

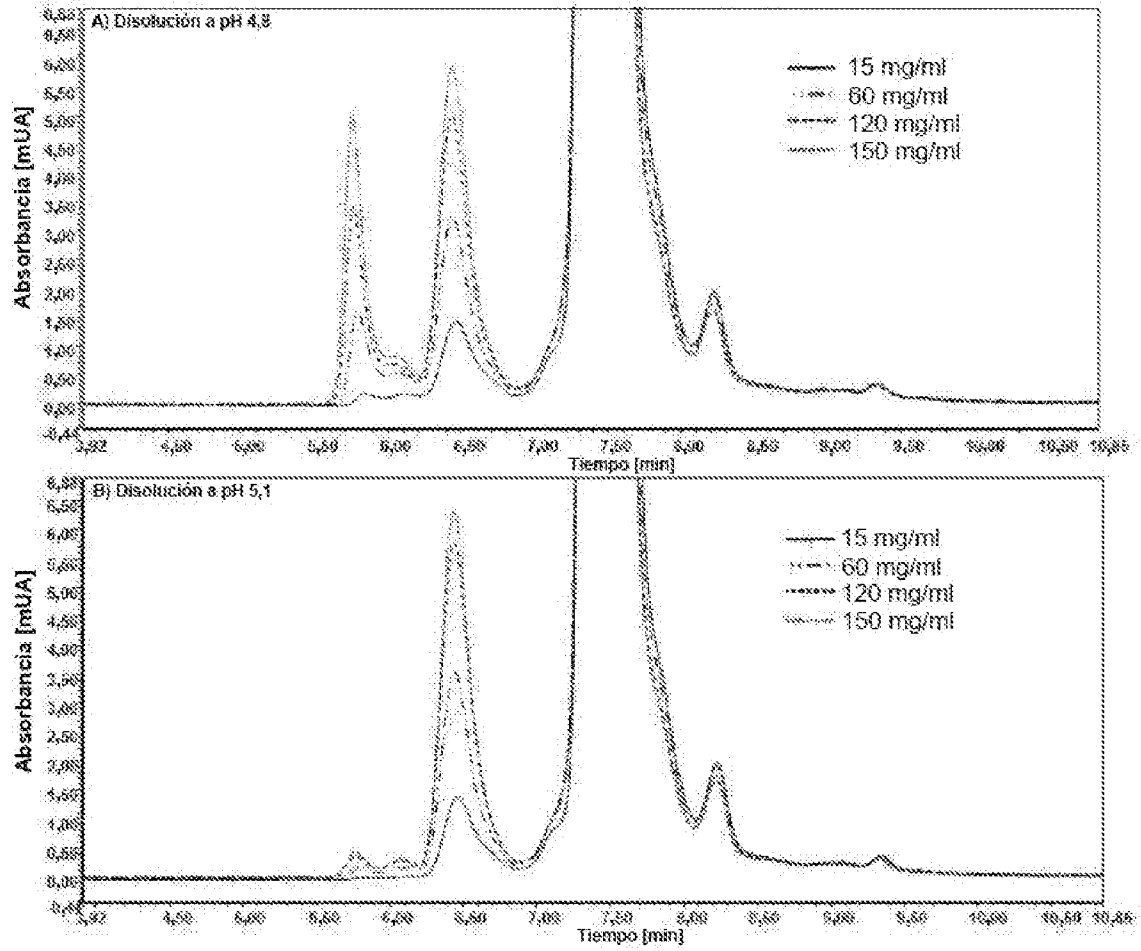
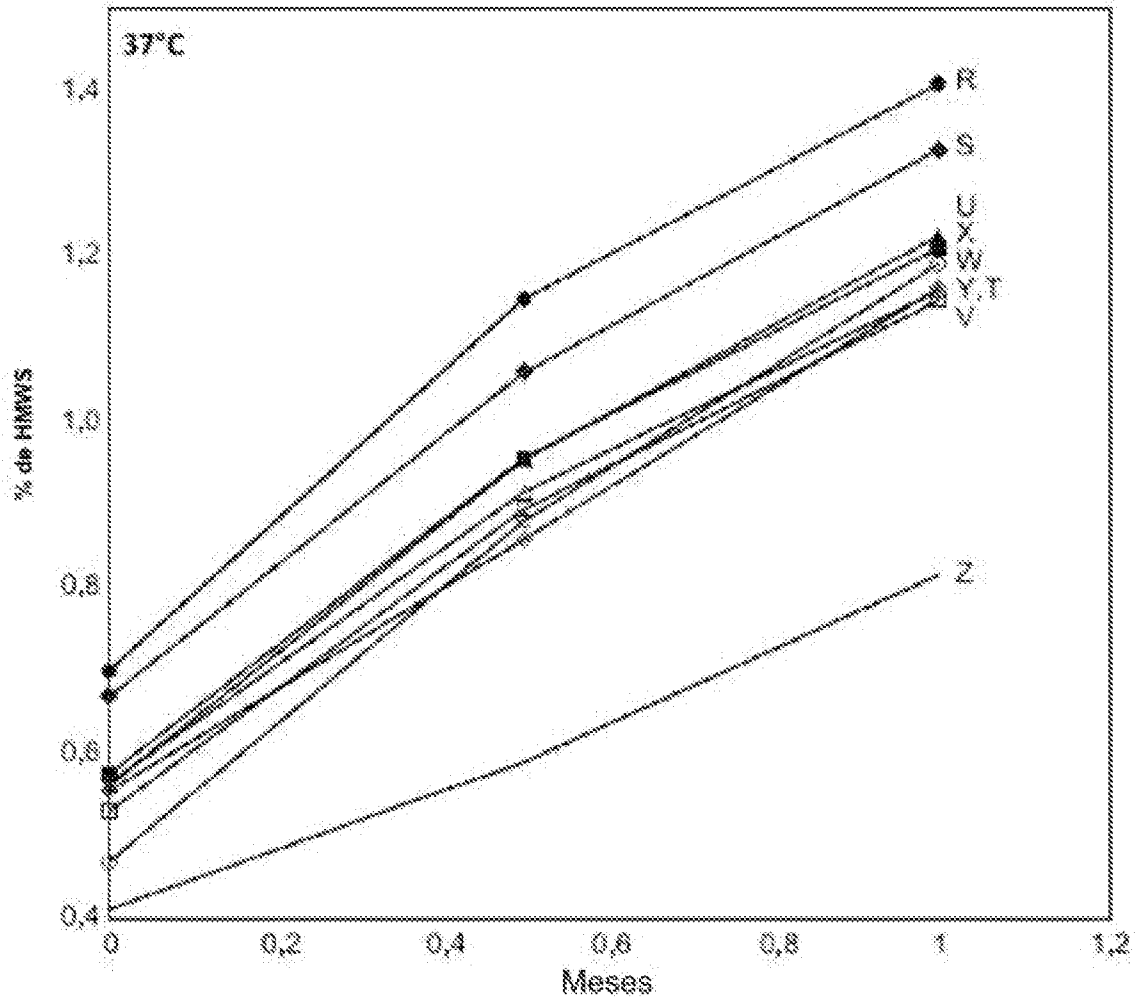


FIGURA 8



- R —●— Acetato/5 % de sorbitol/PS20/pH 5,1
- T —▲— Acetato/2,4 % de sorbitol/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2
- V —□— Acetato/1,2 % de sorbitol/Arg-HCl 113 mM/PS20/pH 5,2
- X —■— Acetato/NAR 150 mM/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2
- Z —— Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg-Phe 38 mM/PS20/pH 5,2
- S —◆— Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg- Hcl 38 mM/PS20/pH 5,2
- U —▲— Acetato 18 mM /2,4 % de sorbitol/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2
- W —◁— Acetato/0 % de sorbitol/Arg-HCl 150 mM/PS20/pH 5,1
- Y —◇— Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg- Arg 38 mM /PS20/pH 5,1
- Z —— Acetato/3,6 % de sorbitol/Arg-Phe38 mM/PS20/pH 5,2

FIGURA 9

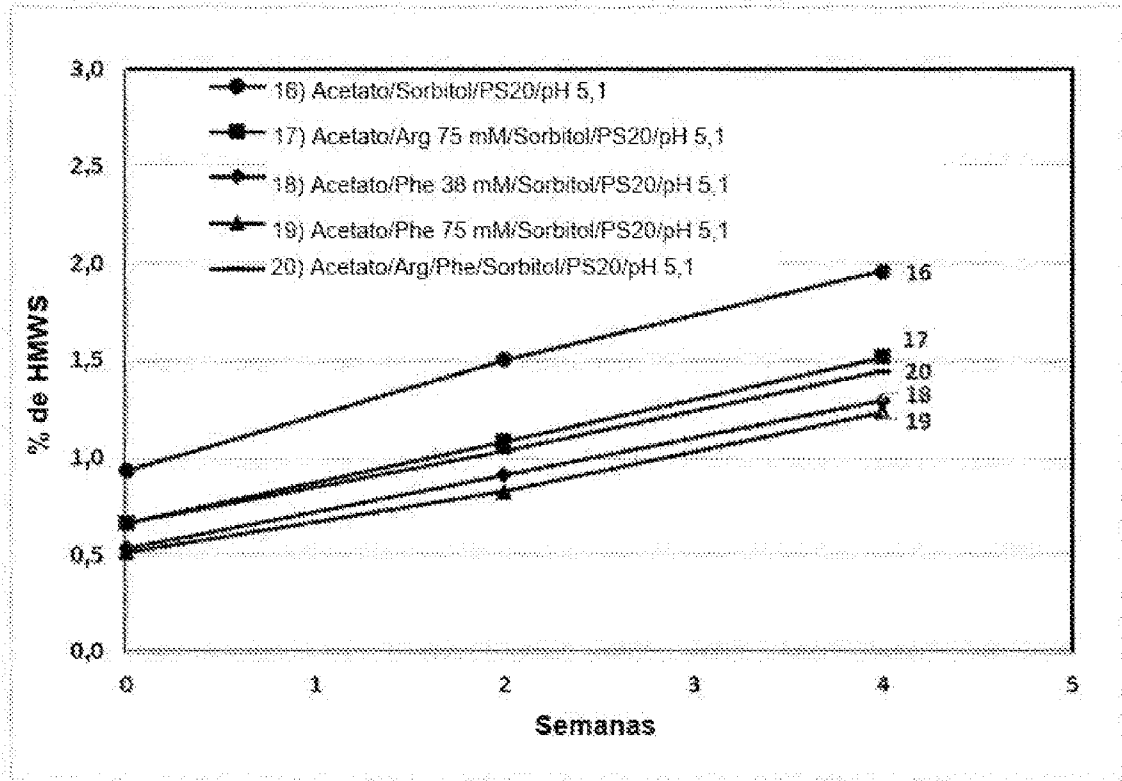


FIGURA 10

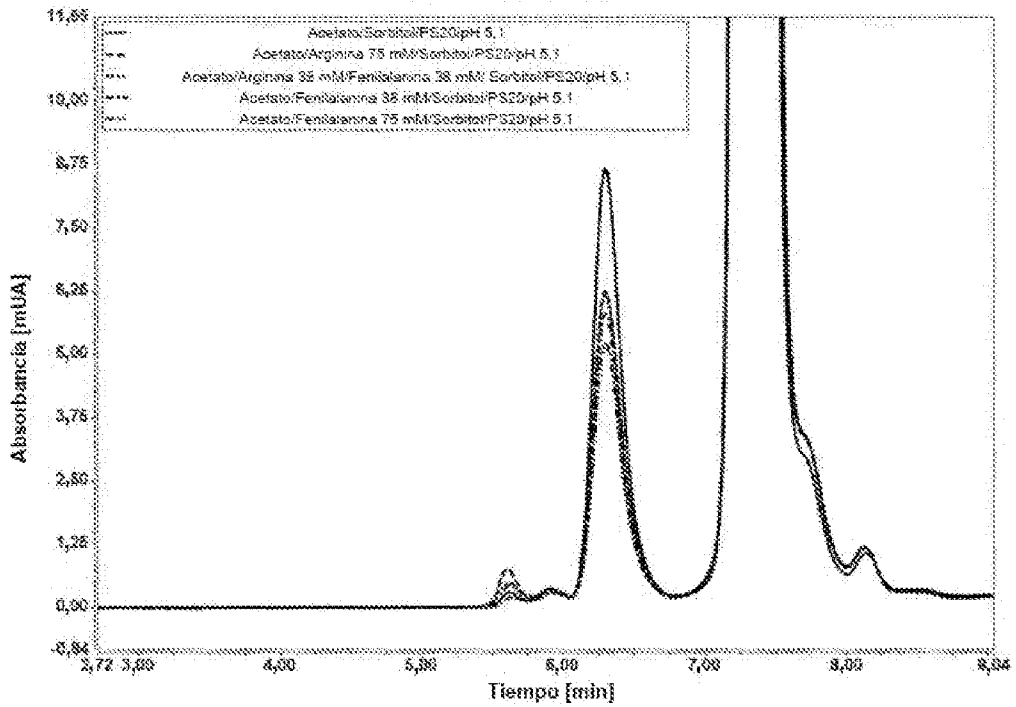


FIGURA 11A

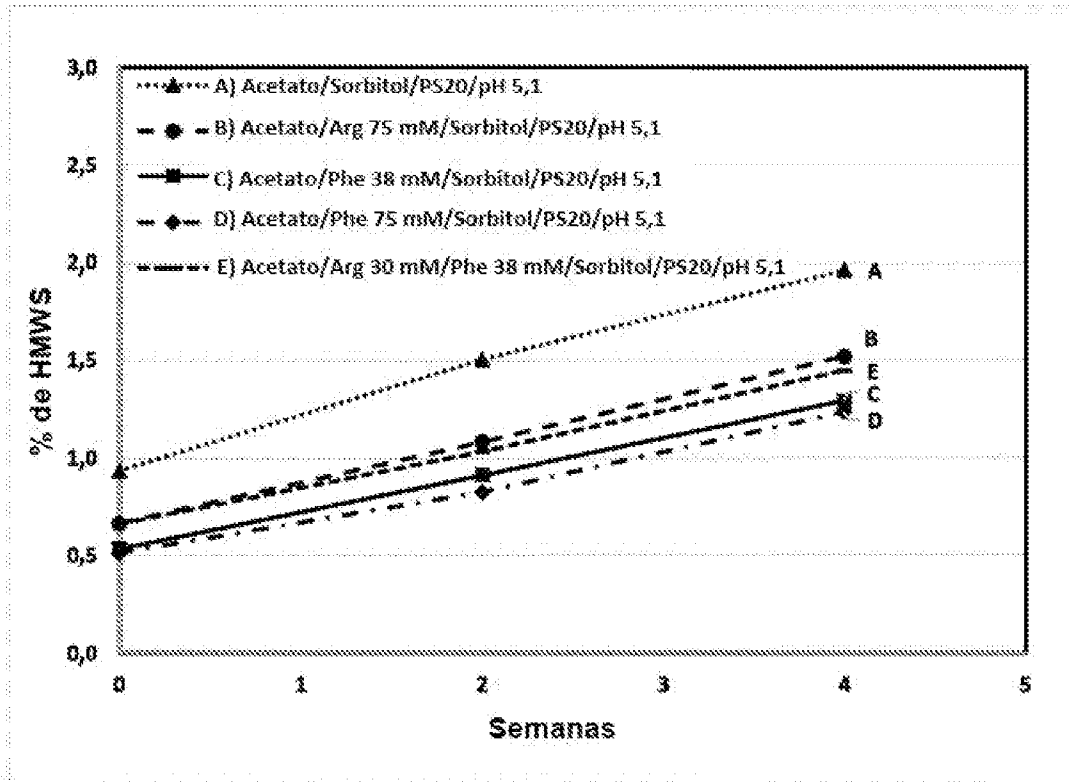


FIGURA 11B

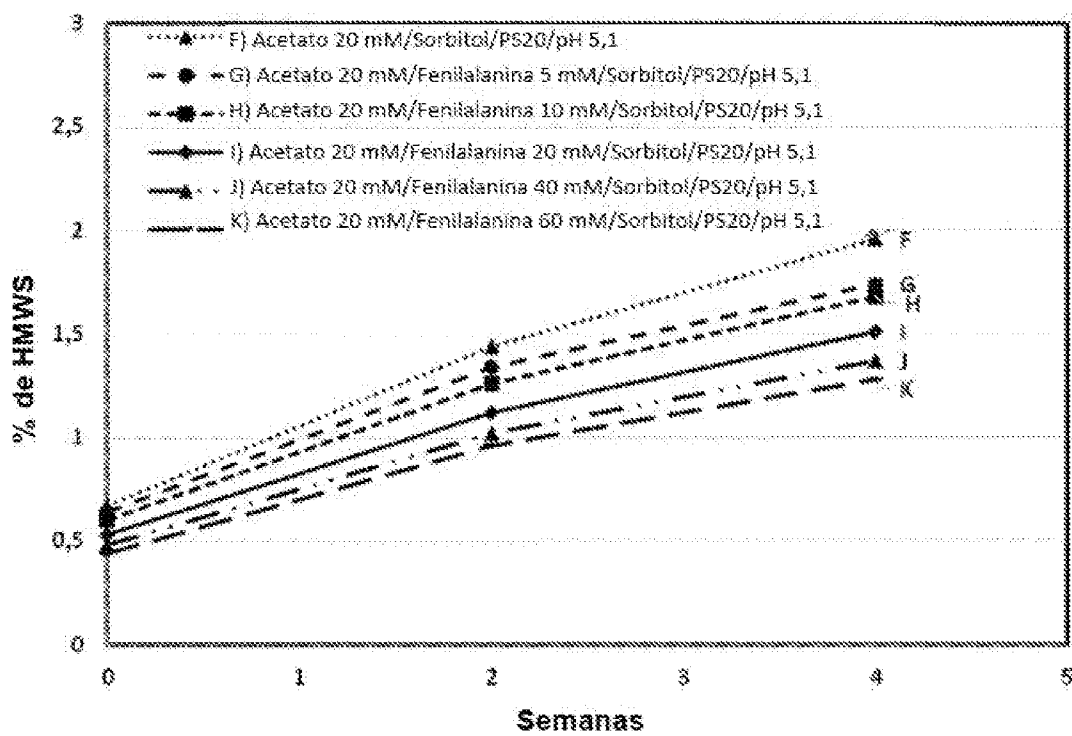


FIGURA 12A

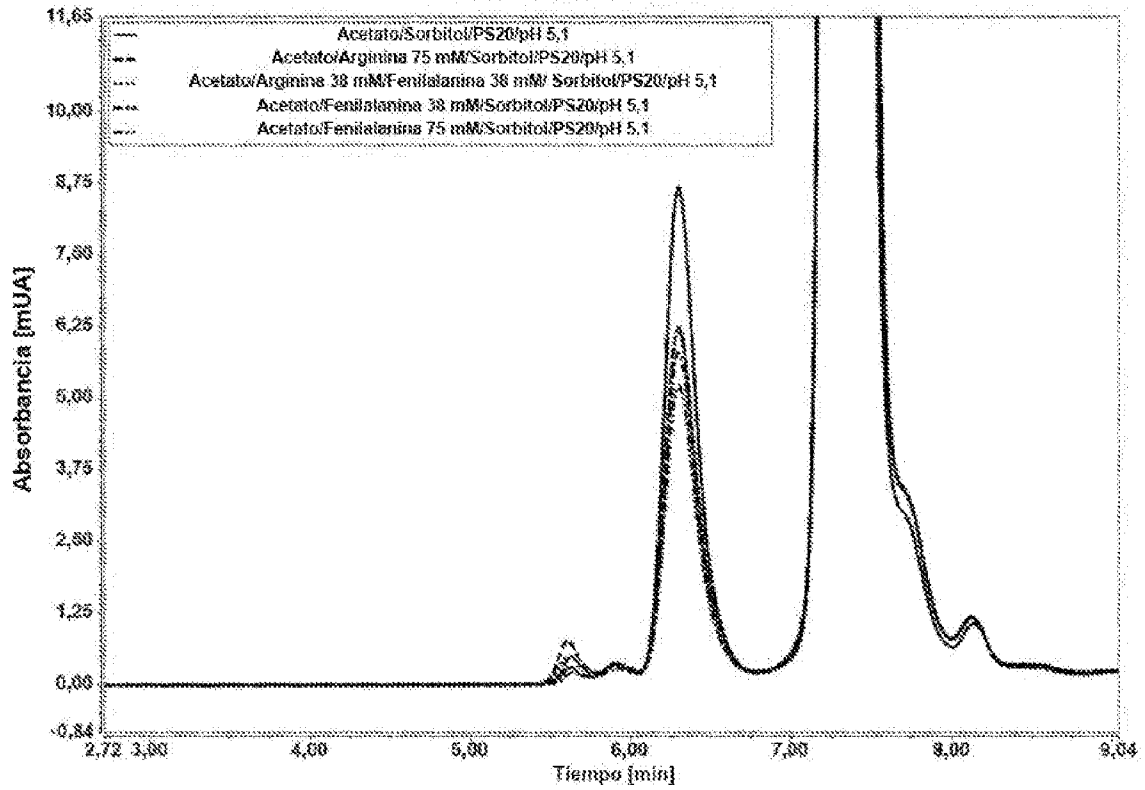


FIGURA 12B

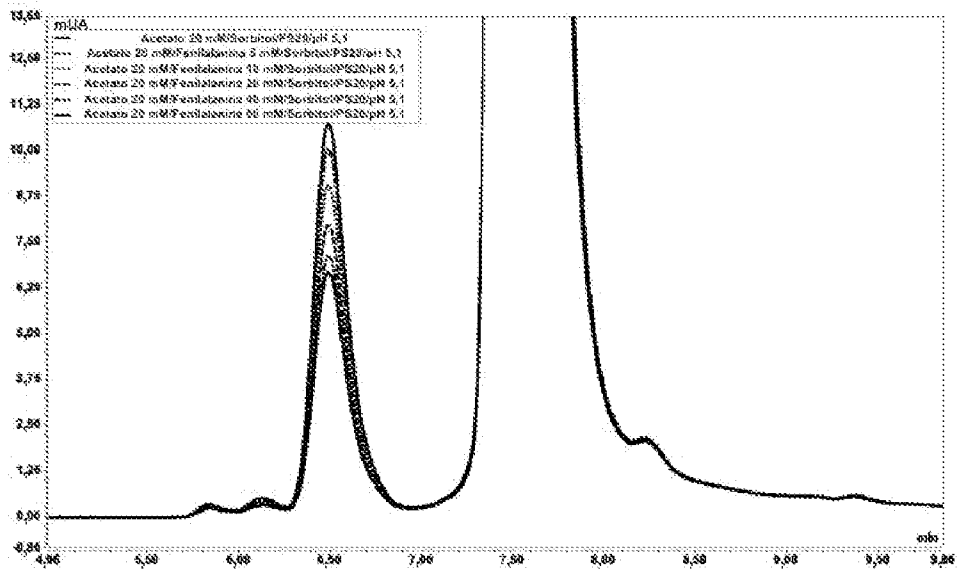


FIGURA 13

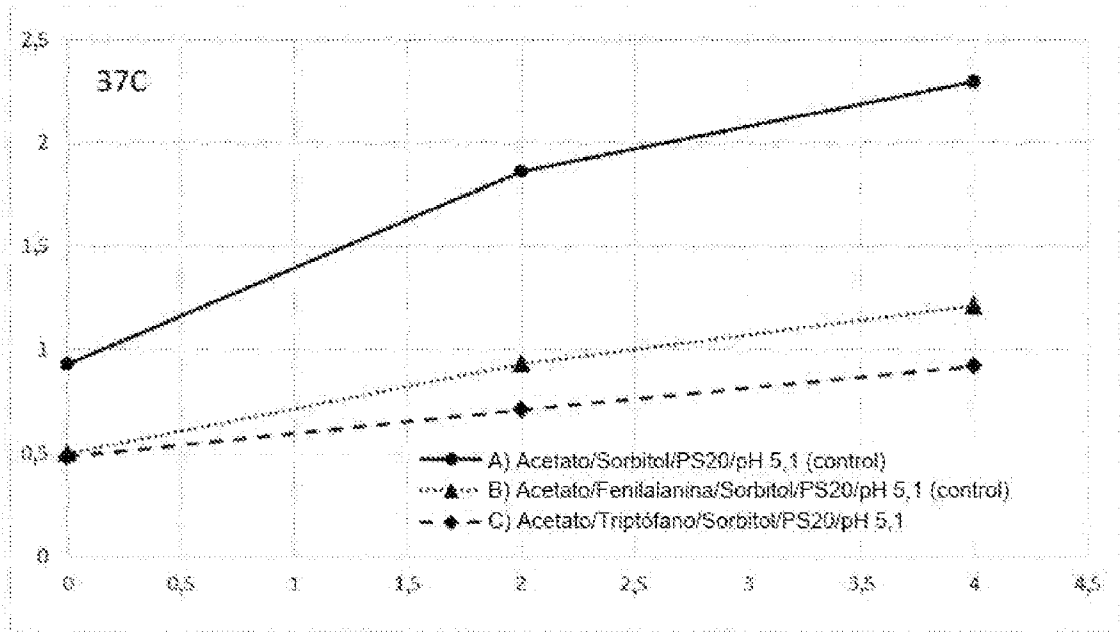


FIGURA 14

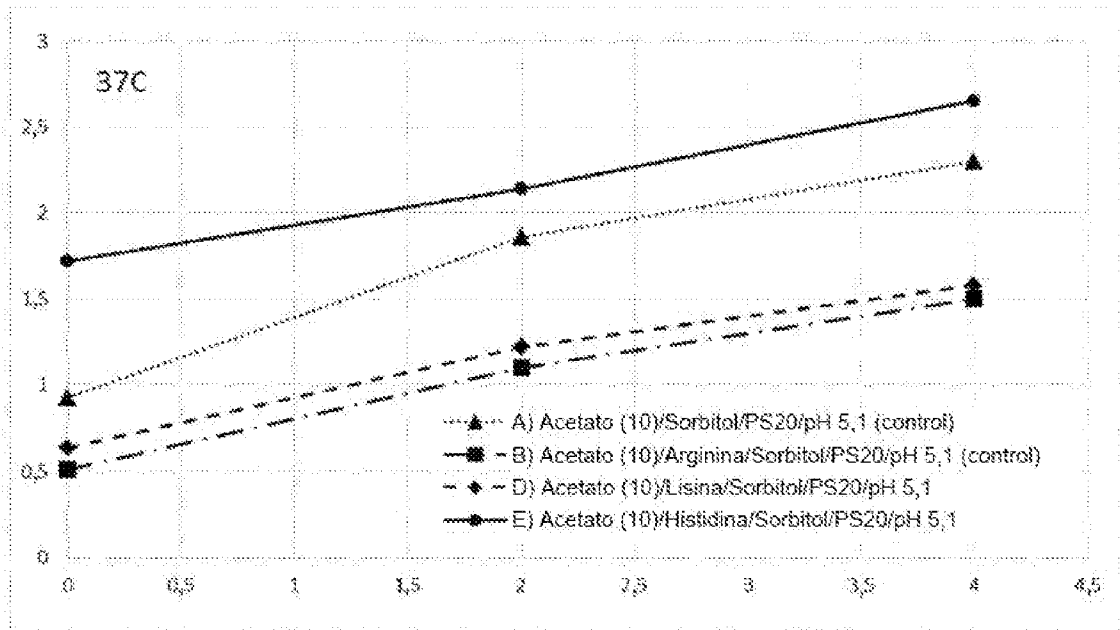


FIGURA 15

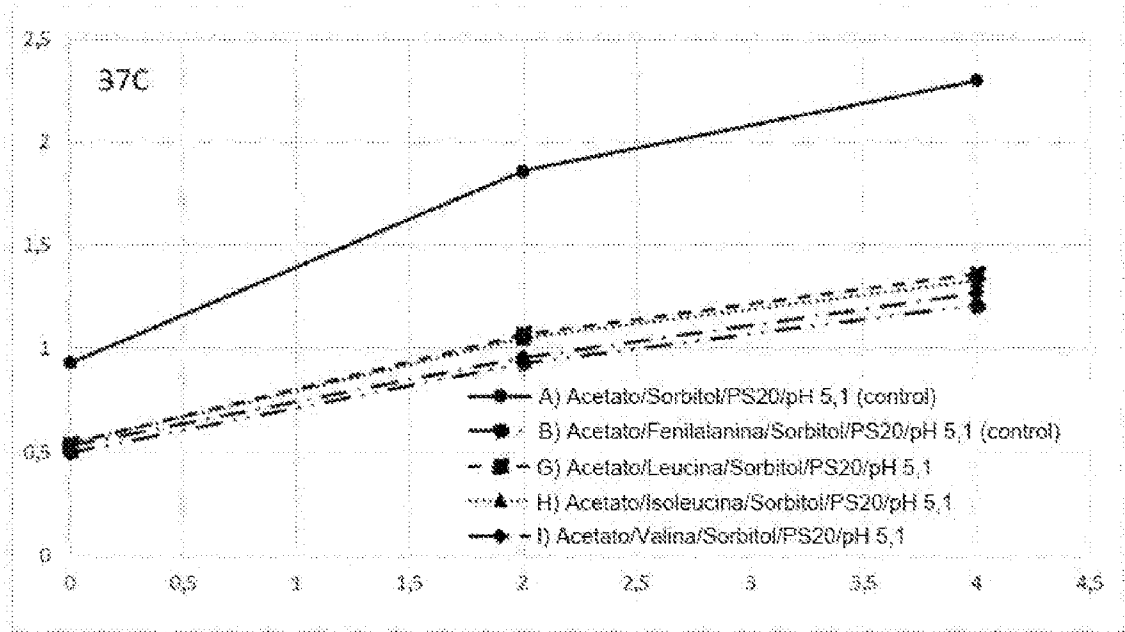


FIGURA 16

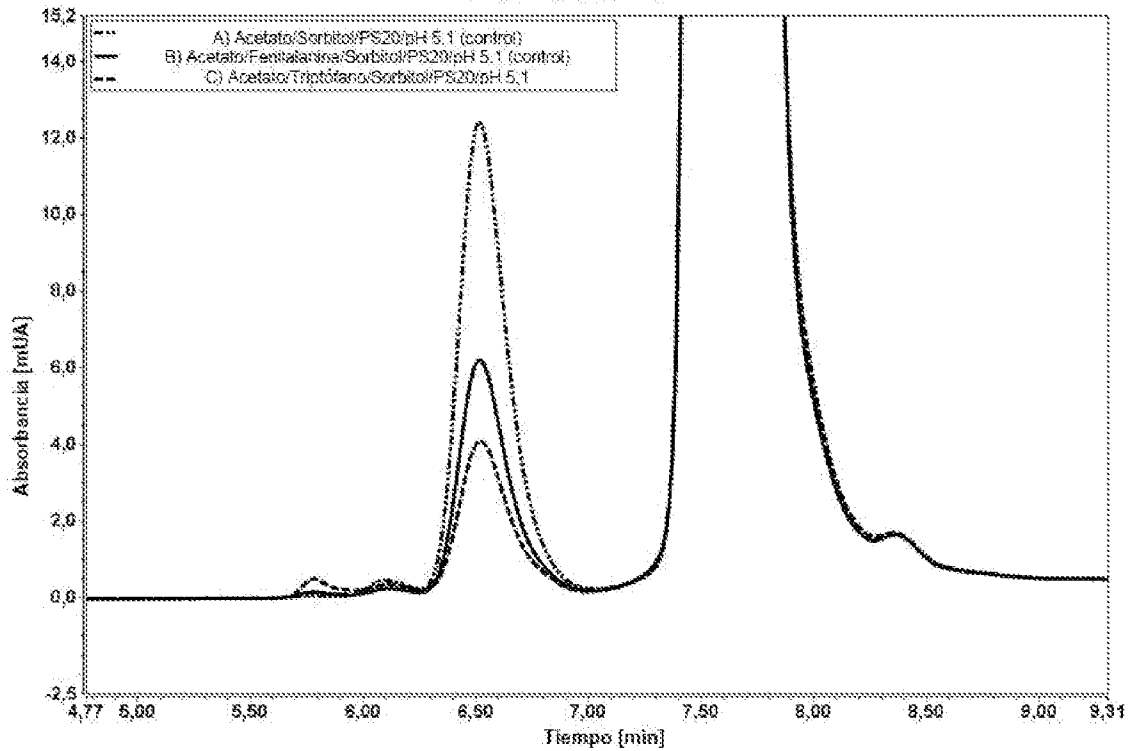


FIGURA 17

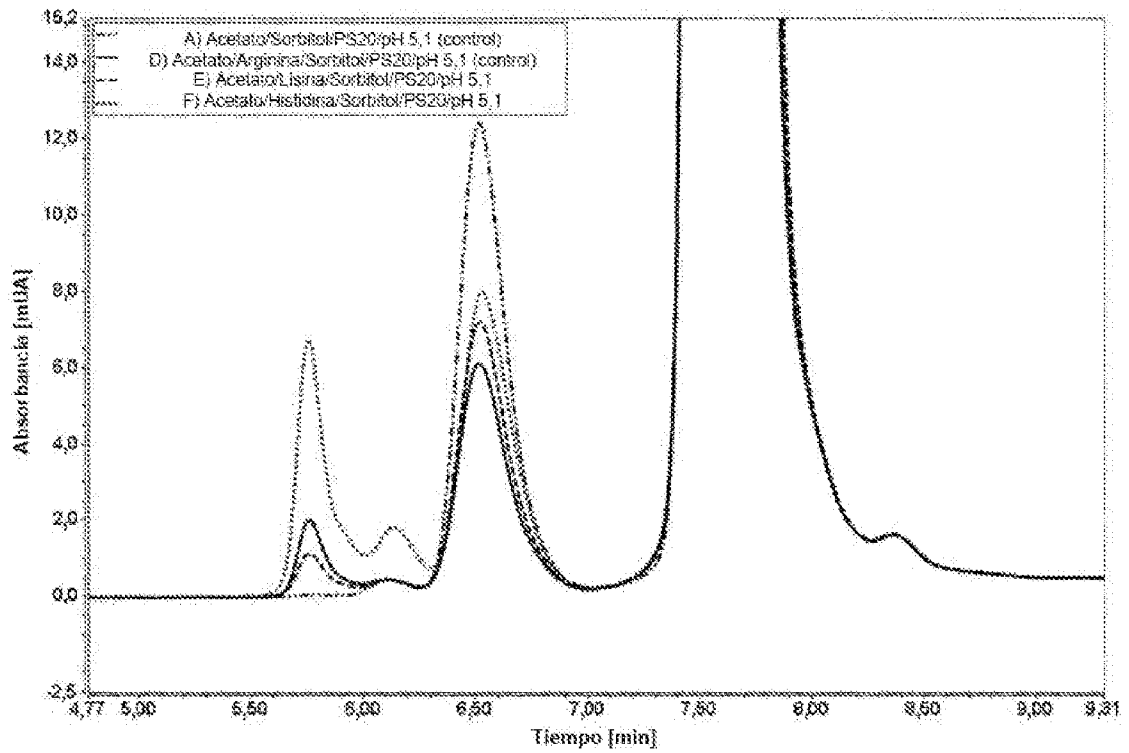


FIGURA 18

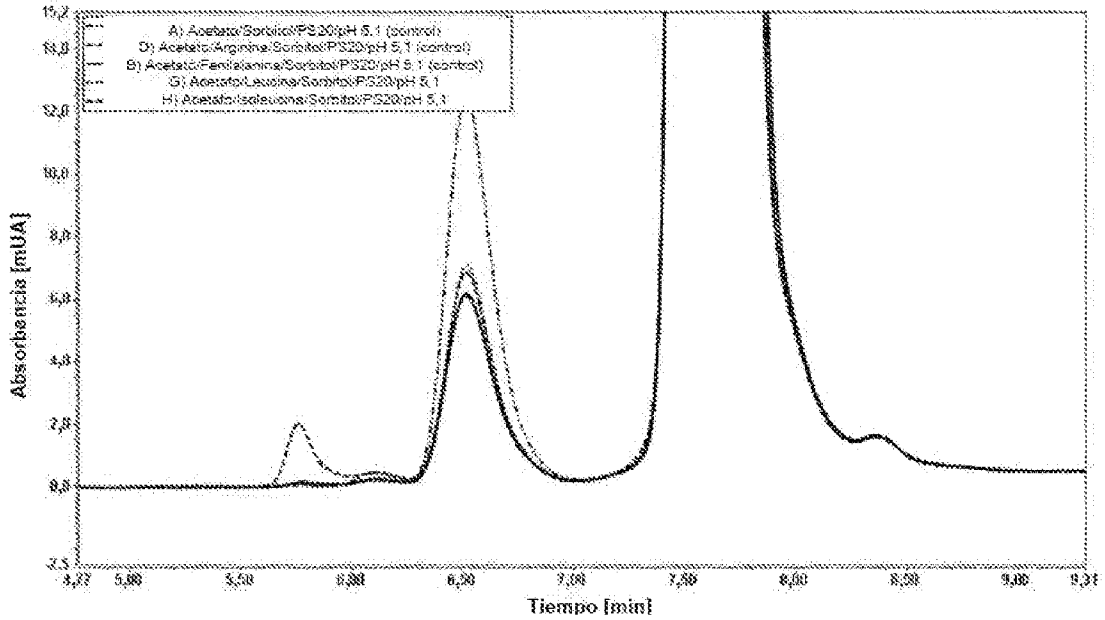


FIGURA 19

LC 28-33
QSVRGRY

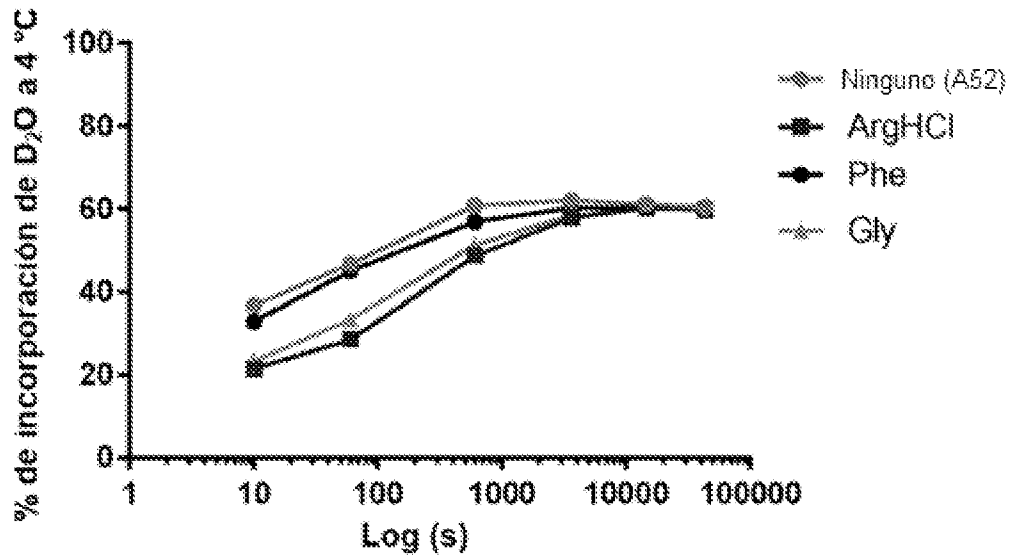


FIGURA 20

LC 108-116(+2)
KRTVAAPSV

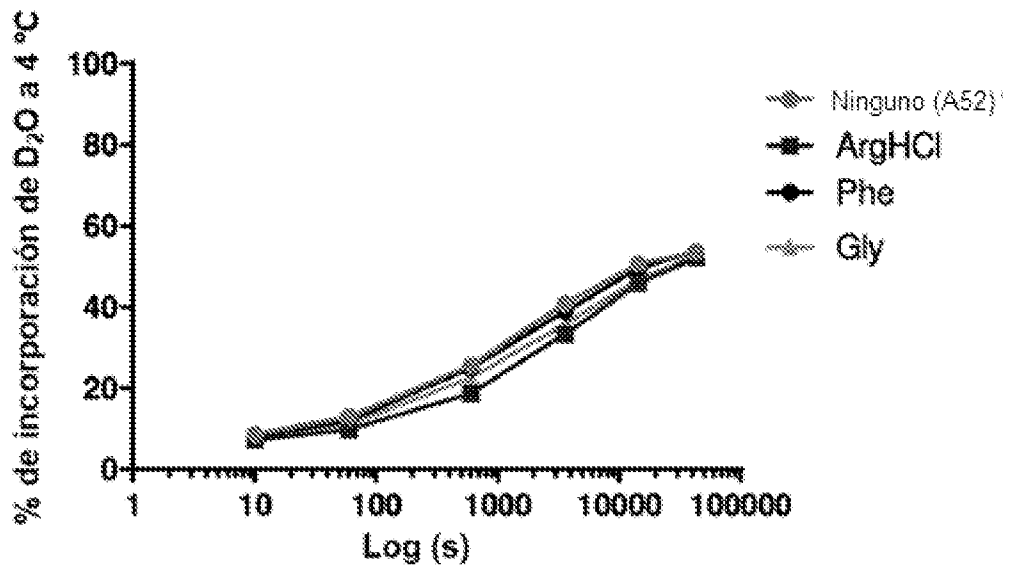


FIGURA 21

LC 125-132(+2)
QLKSGTAS

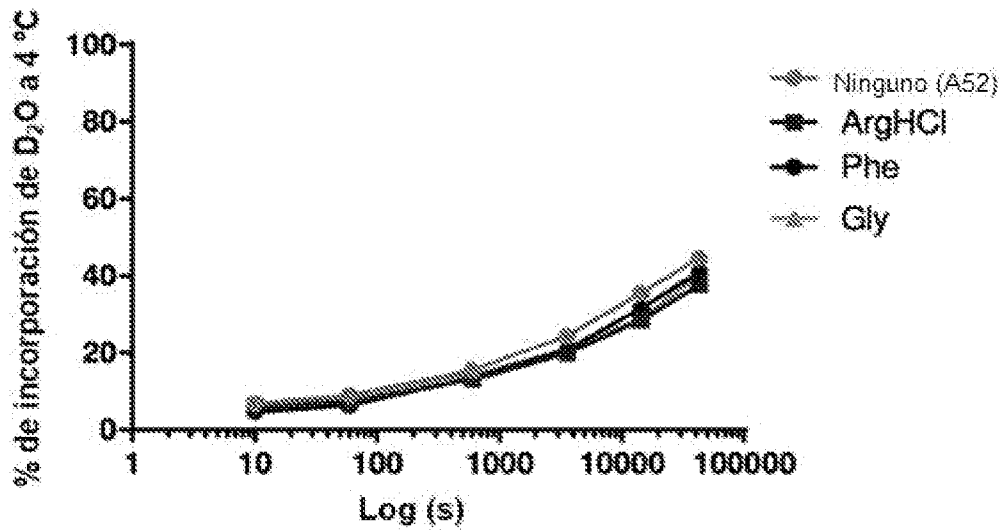


FIGURA 22

HC 47-59(+1)
WVSGITGSGGSTY

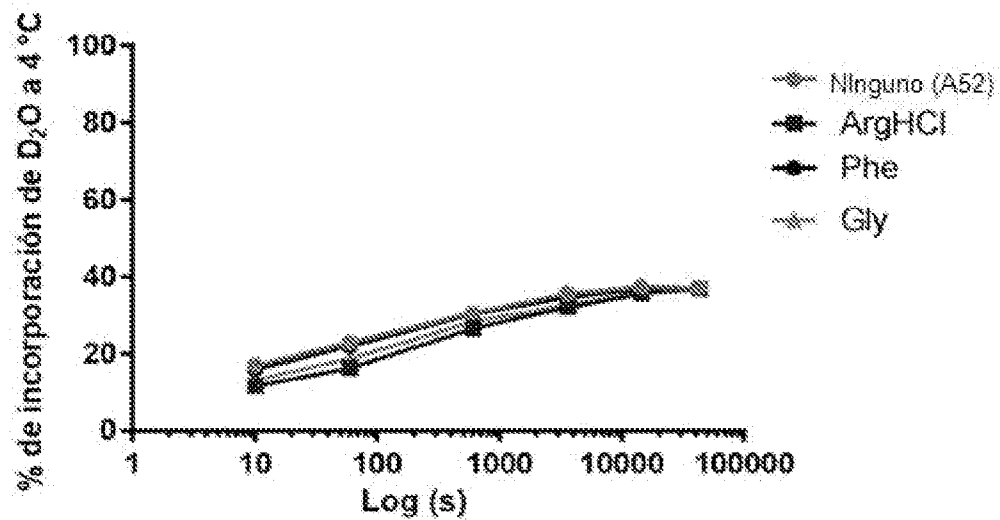


FIGURA 23

HC 243-253(+2)
LFPKPKDILM

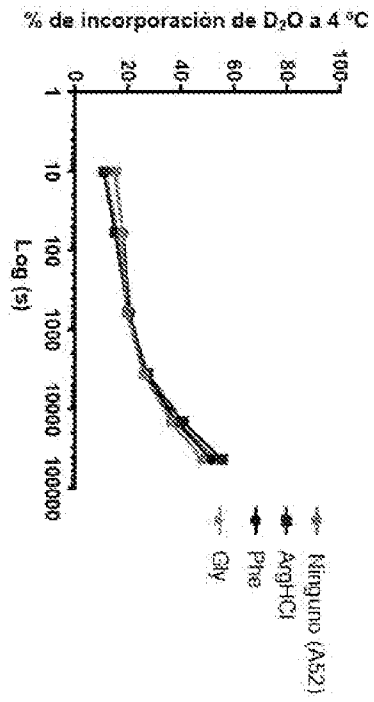


FIGURA 24

HC 392-399(+2)
YKTTTPML

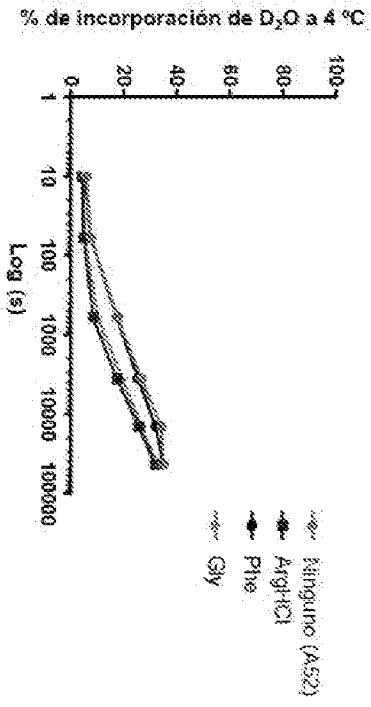


FIGURA 25

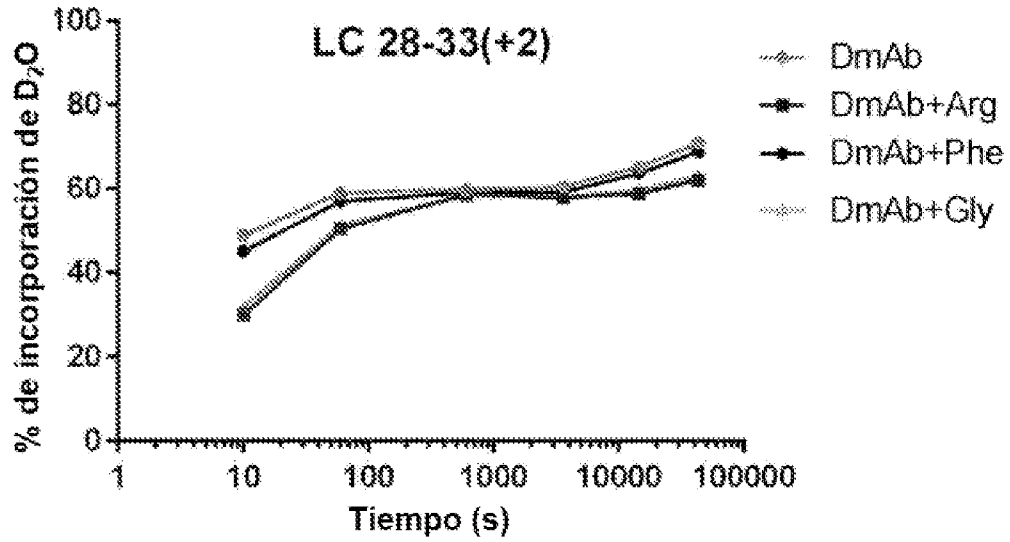


FIGURA 26

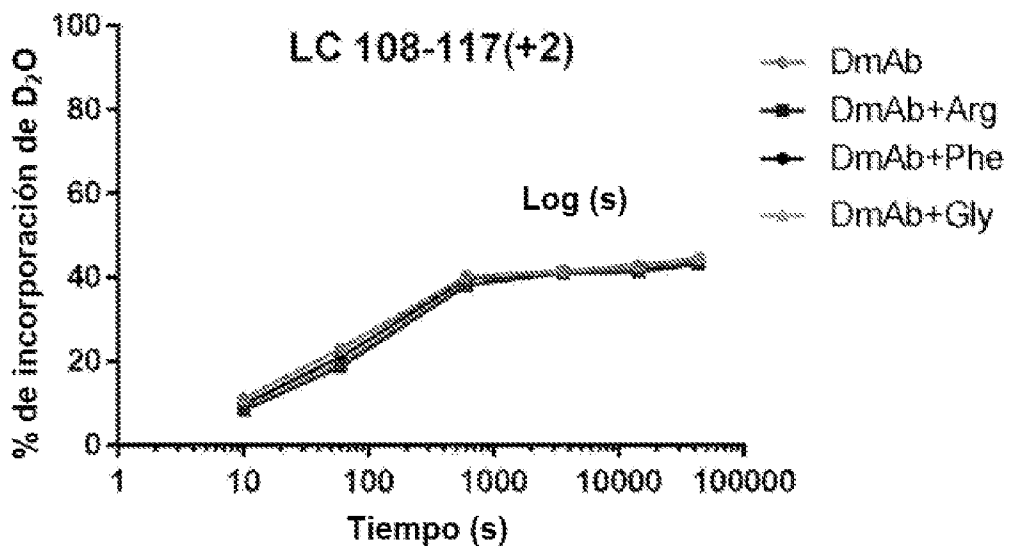


FIGURA 27

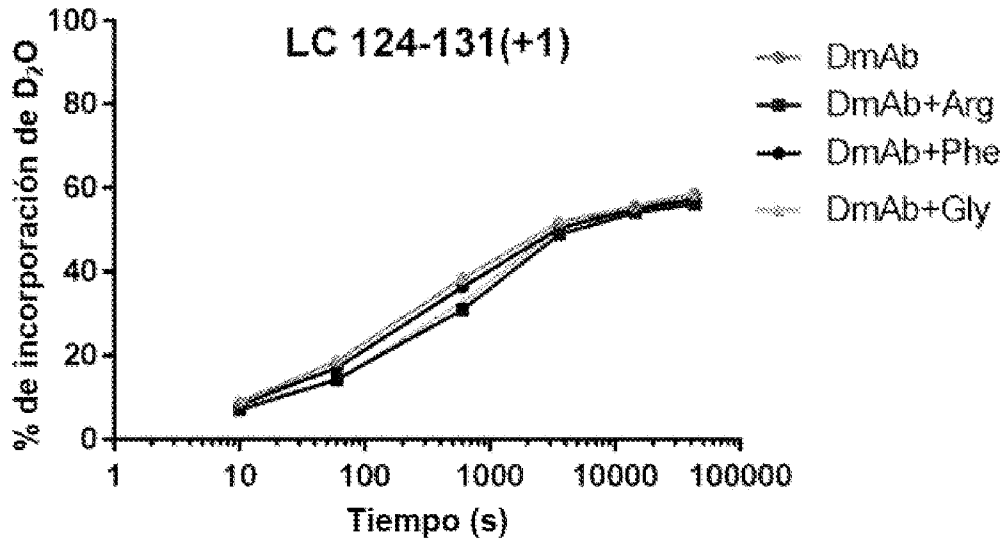


FIGURA 28

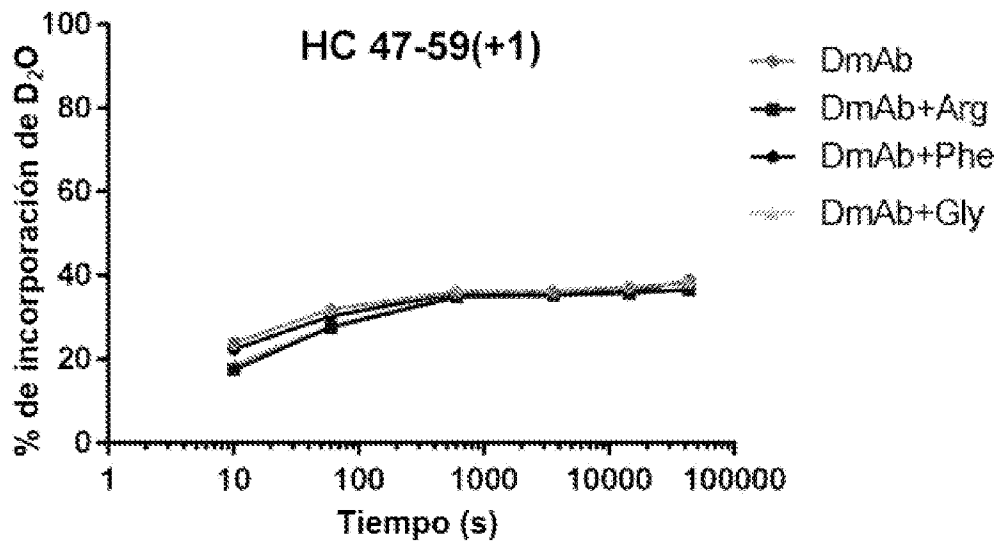


FIGURA 29

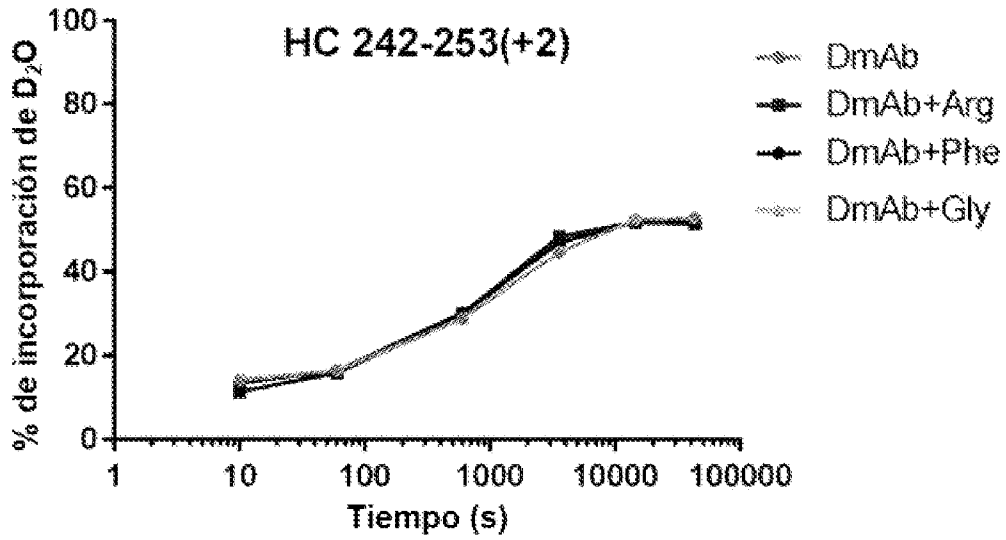


FIGURA 30

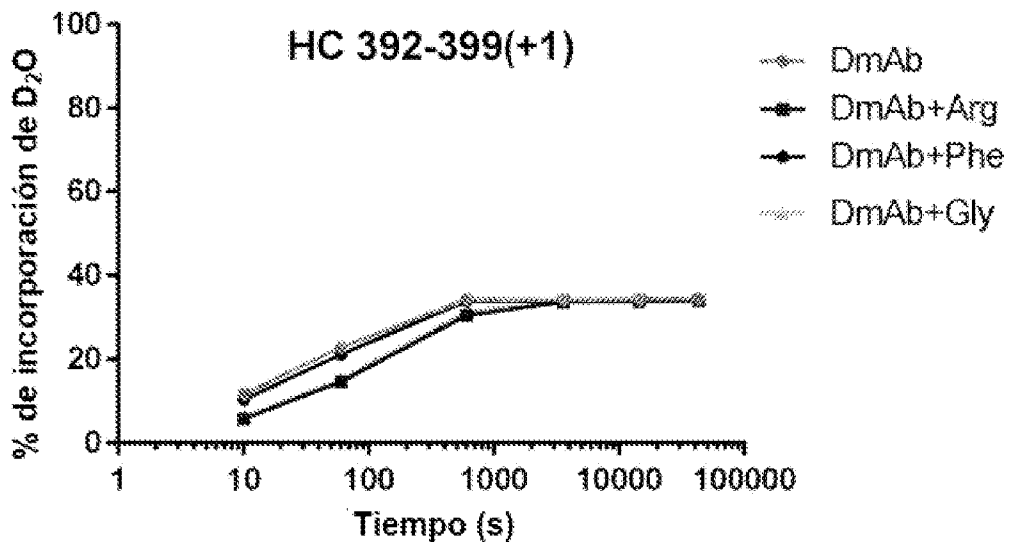


FIGURA 31

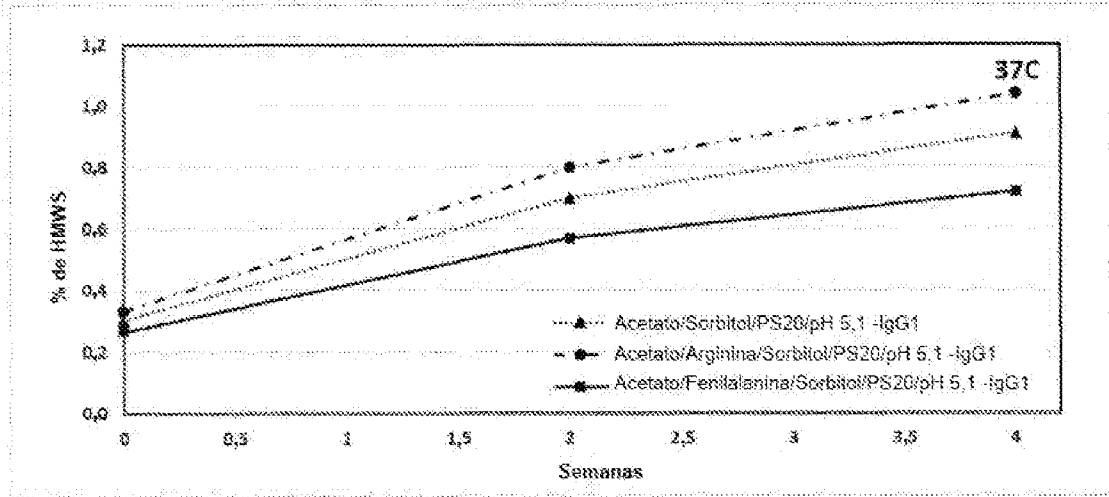


FIGURA 32

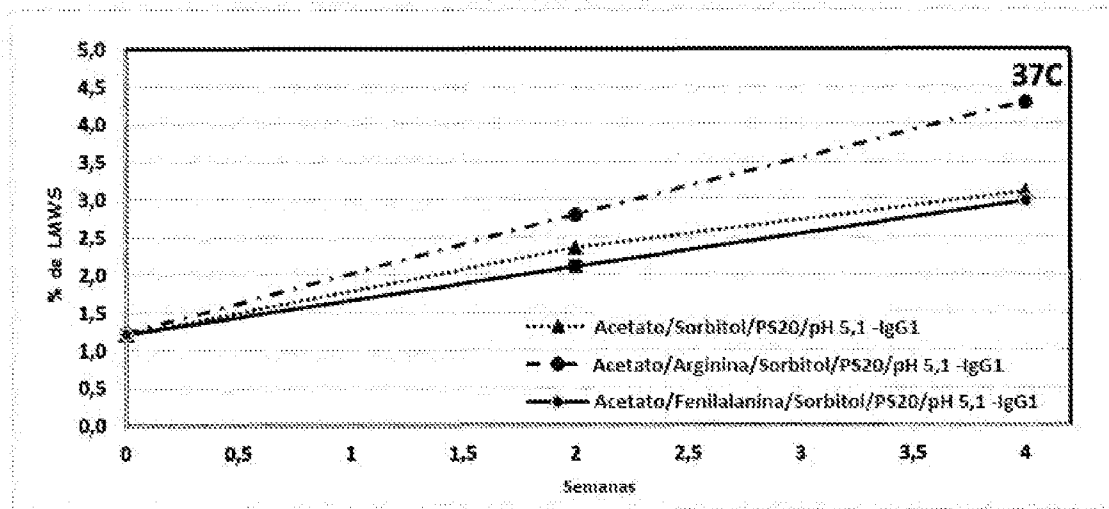


FIGURA 33

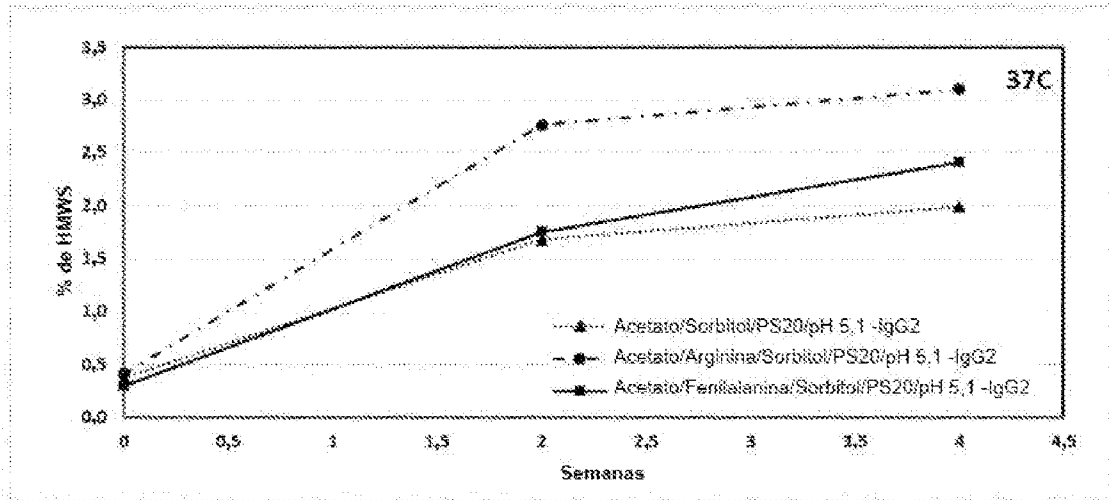


FIGURA 34

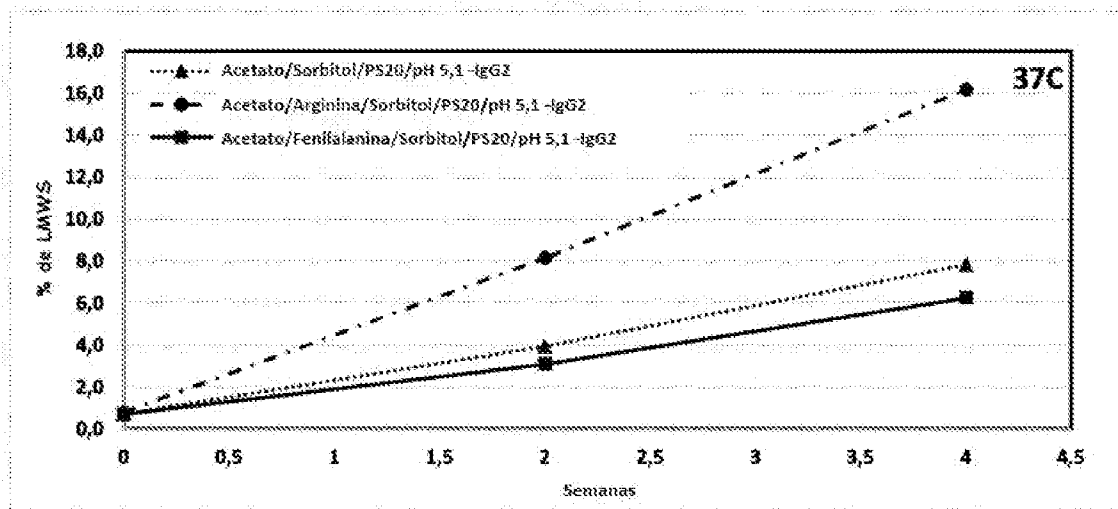


FIGURA 35

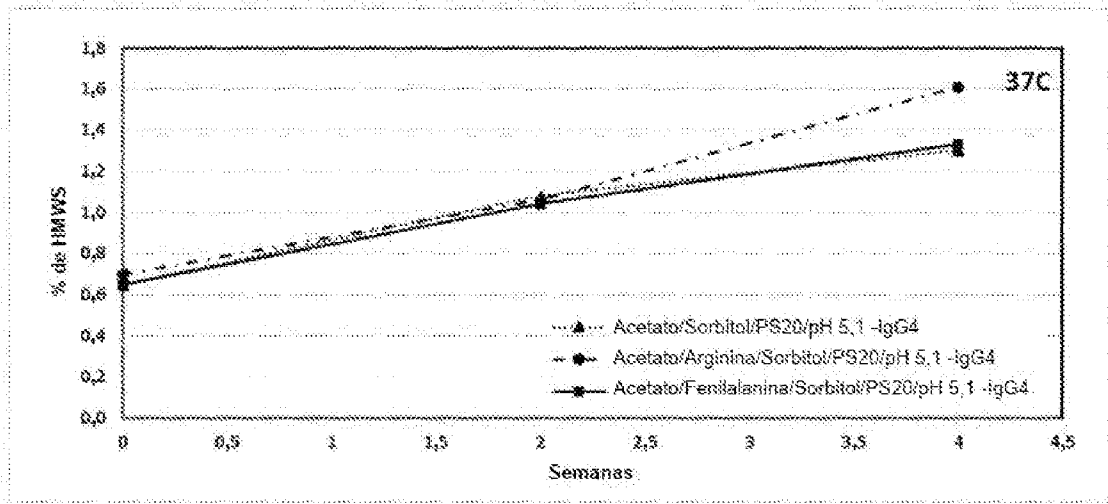


FIGURA 36

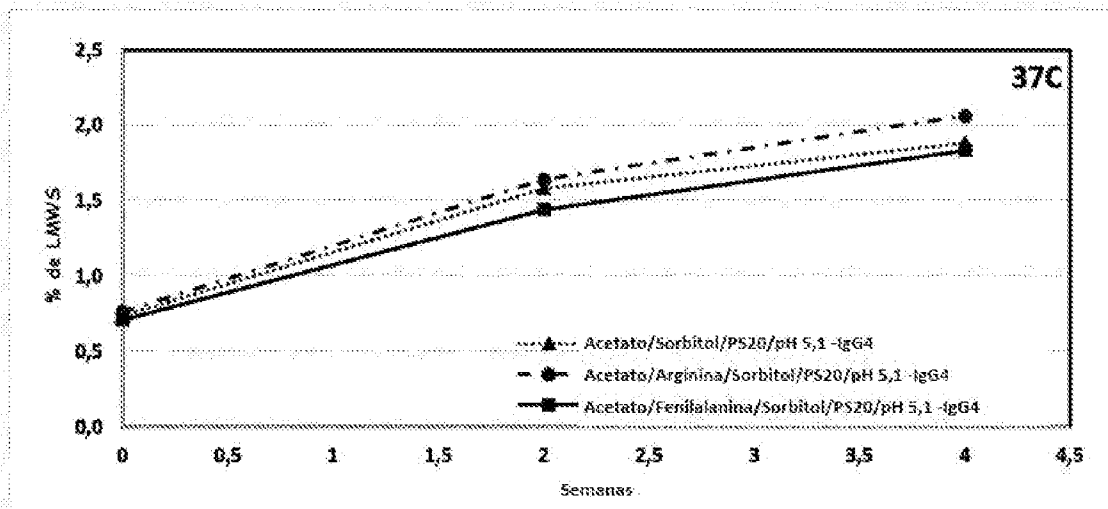


FIGURA 37

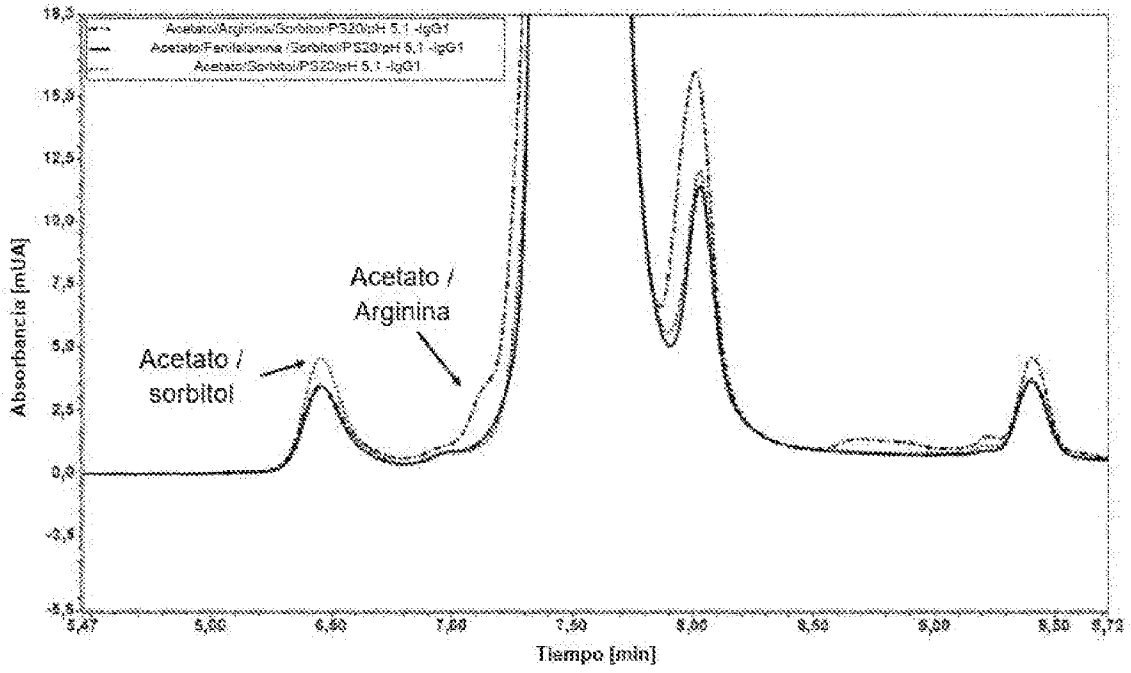
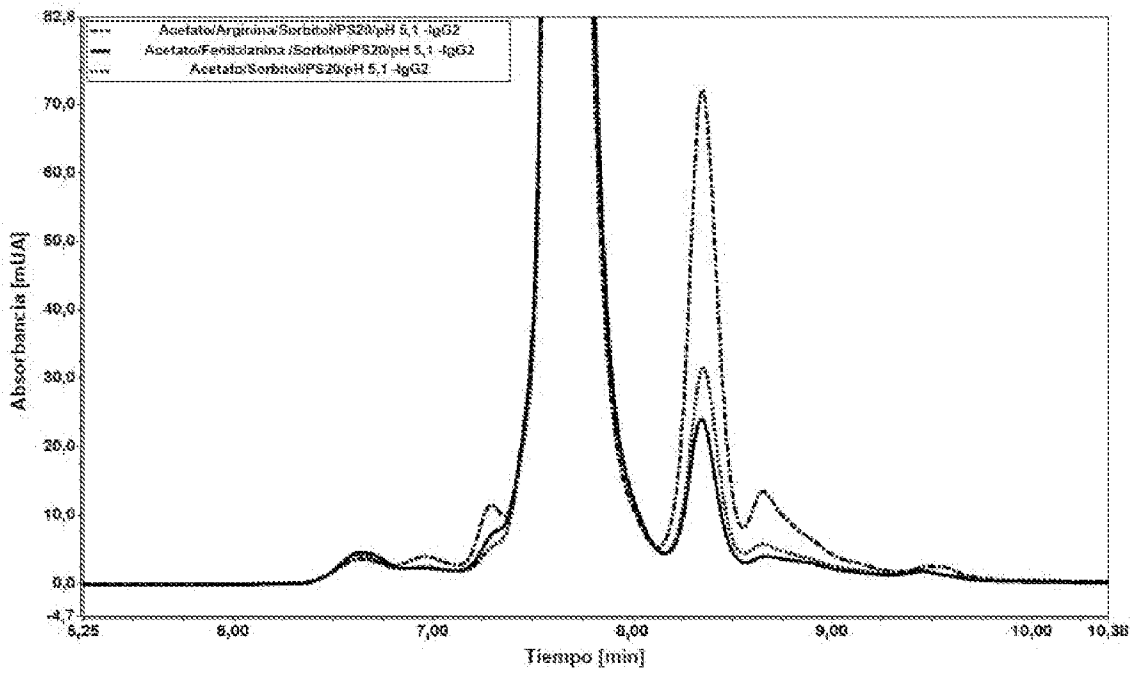


FIGURA 38



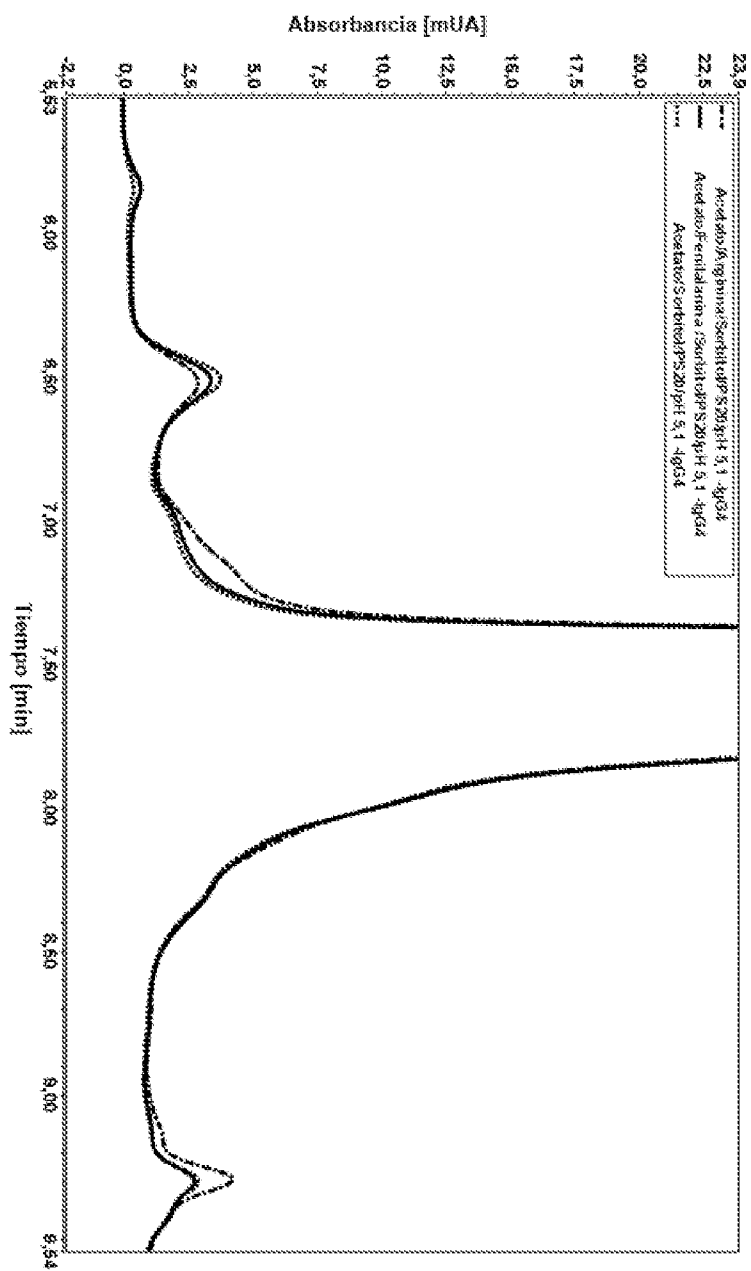


FIGURA 39

FIGURA 40

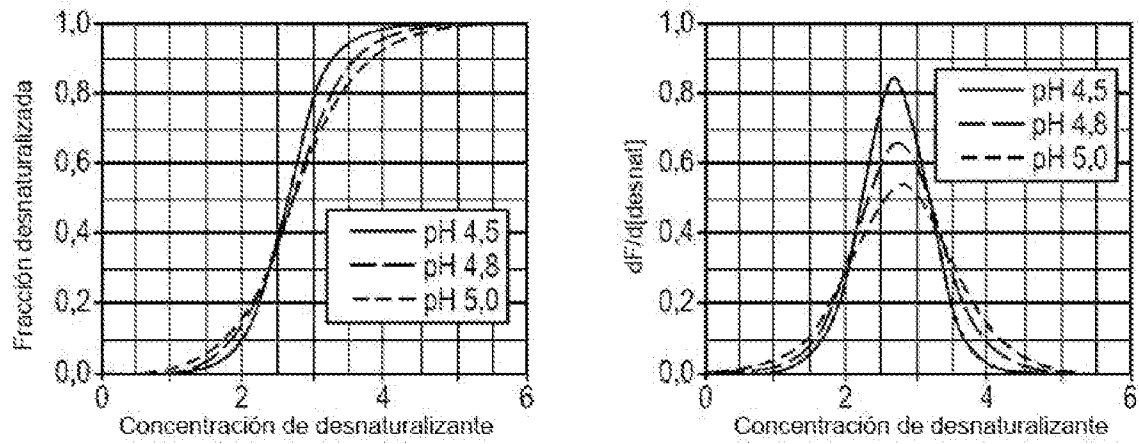


FIGURA 41

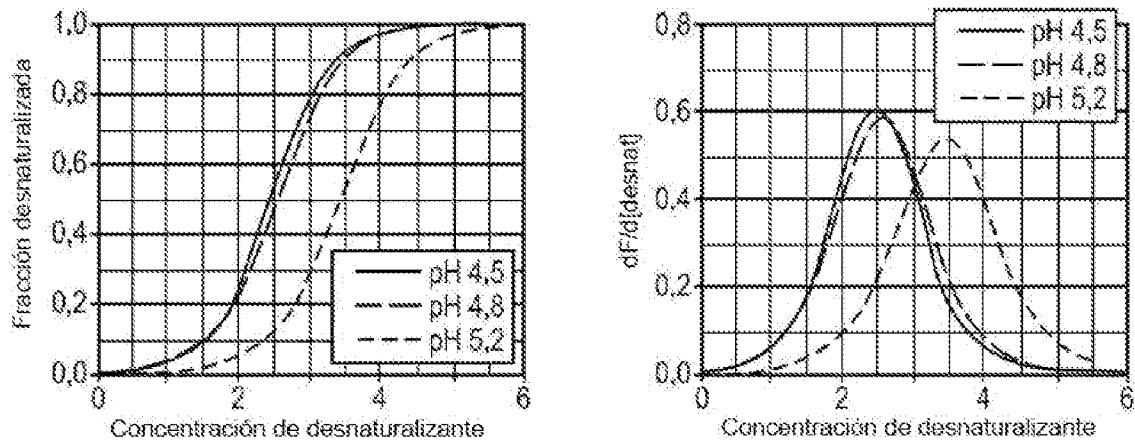


FIGURA 42

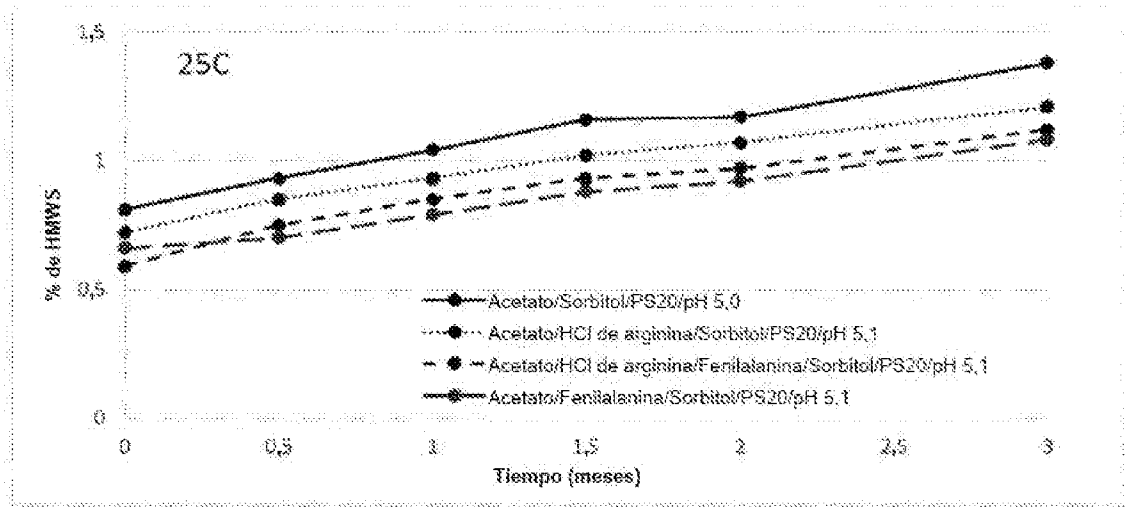


FIGURA 43

