

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. 3615066 DAL TITOLO:  
"FORMULAZIONI DI ANTICORPI ANTI-RANKL UMANI E METODI DI  
UTILIZZO DELLE STESSE"

\*\*\* \*\*

DESCRIZIONE

**STATO DELL'ARTE**

**Campo della divulgazione**

L'invenzione riguarda anticorpi monoclonali anti-RANKL umani, incluse formulazioni acquose ad alta concentrazione di denosumab e relativi biosimili.

**Breve descrizione della tecnologia correlata**

Denosumab è disponibile in commercio in forme di soluzione ai dosaggi di 60 mg/mL e 70 mg/mL.

L'aumento delle concentrazioni di formulazioni proteiche può causare problemi di stabilità, per esempio l'aggregazione determina la formazione di specie ad alto peso molecolare (HMWS). HMWS, in particolare quelle che conservano la maggior parte della configurazione nativa della controparte monomerica, possono rappresentare un problema in alcune formulazioni proteiche. L'aggregazione può anche potenzialmente influenzare la biodisponibilità sottocutanea e la farmacocinetica di una proteina terapeutica.

Le operazioni di riempimento e rifinitura, nonché la somministrazione, possono comportare passaggi di flusso di soluzioni proteiche attraverso pompe a pistone, pompe peristaltiche o aghi per

iniezione. Tali processi possono conferire sollecitazioni di taglio e meccaniche che possono causare denaturazione delle proteine e determinare l'aggregazione. Questo fenomeno può essere esacerbato quando le soluzioni proteiche diventano più concentrate.

US 2011/0060290 riguarda composizioni stabilizzate di agenti leganti specifici per RANKL, agenti leganti specifici per TNF, e/o agenti leganti specifici per IL-1R1 in contenitori.

### **SOMMARIO**

In conformità con la presente invenzione è fornita la divulgazione che dimostra per la prima volta che l'aggiunta di un inibitore di aggregazione amminoacidico a una soluzione acquosa comprendente un'elevata concentrazione di un anticorpo anti-RANKL porta a una quantità ridotta di aggregati anticorpali formati nel tempo, nonché velocità di formazione più lenta di tali aggregati. La presente divulgazione fornisce anche un effetto di pH sulla formazione di aggregati in soluzioni acquose concentrate di anticorpo anti-RANKL, in cui la formazione di aggregati diminuita si osserva quando il pH delle soluzioni acquose è nell'intervallo da circa 5,0 a meno di 5,2. Ulteriormente suggerito dalla divulgazione presentata qui è che la stabilizzazione dell'anticorpo anti-RANKL avviene tramite interazioni tra l'inibitore di aggregazione amminoacidico e l'anticorpo. Senza essere legati ad alcuna particolare teoria, è contemplato che le interazioni idrofobe, nonché altri tipi di interazioni intermolecolari, tra l'inibitore di aggregazione amminoacidico e l'anticorpo anti-RANKL hanno un effetto stabilizzante sulle soluzioni di

anticorpo concentrate. Di conseguenza, la divulgazione della presente invenzione riguarda formulazioni farmaceutiche acquose stabili comprendenti una concentrazione elevata di un anticorpo anti-RANKL le cui formulazioni comprendono basse quantità (ad esempio, inferiore a circa 2%) di aggregati.

In una prima forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- un anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione in un intervallo da 100 a 140 mg/mL;
- sorbitolo da 1,0% (p/p) a 5,0% (p/p);
- polisorbato 20 o polisorbato 80 almeno 0,004% (p/v) e inferiore a 0,15% (p/v);
- tampone acetato o glutammato da 5 mM a 60 mM; e
- L-fenilalanina o L-triptofano da 5 mM a 180 mM;

in cui la formulazione farmaceutica acquosa ha un pH in un intervallo da 5,0 a 5,4; e in cui l'anticorpo anti-RANKL, o la relativa porzione legante l'antigene, comprende (A) un dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR1 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5, un dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR2 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 6, e un dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR3 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; e (B) un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR1 di

catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 8, un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR2 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9, e un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR3 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 10.

In una seconda forma di realizzazione, l'invenzione fornisce la formulazione farmaceutica acquosa dell'invenzione per uso in (a) trattamento o prevenzione di un evento scheletrico (SRE) in un soggetto con metastasi ossee da tumori solidi, (b) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto che è un adulto o un adolescente maturo a livello scheletrico con tumore a cellule giganti dell'osso che non è resecabile o in cui la resezione chirurgica è suscettibile di determinare grave morbidità, (c) trattamento di ipercalcemia di natura maligna refrattaria a terapia con bisfosfonato in un soggetto, (d) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto con mieloma multiplo o con metastasi ossee da un tumore solido, (e) trattamento di osteoporosi di donne in post menopausa ad alto rischio di frattura, (f) trattamento per aumentare la massa ossea in donne ad alto rischio di frattura che ricevono terapia con inibitore di aromatasi adiuvante per cancro della mammella, (g) trattamento per aumentare la massa ossea in uomini ad alto rischio di frattura che ricevono terapia di deprivazione androgenica per cancro della prostata non metastatico, (h) trattamento per aumentare la massa ossea in uomini con osteoporosi ad alto rischio di frattura, (i) terapia con calcio o vitamina D, (j) trattamento

del tumore a cellule giganti dell'osso in un paziente che ne ha bisogno, (k) trattamento di ipercalcemia di natura maligna in un paziente che ne ha bisogno, (l) trattamento di osteoporosi in un paziente che ne ha bisogno, o (m) aumento della massa ossea in un paziente che ne ha bisogno.

### **ULTERIORE DIVULGAZIONE**

Una formulazione farmaceutica acquosa può comprendere un anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene a una concentrazione maggiore di 70 mg/mL e avente un pH in un intervallo da circa 5,0 a meno di 5,2.

Una formulazione farmaceutica acquosa può comprendere una miscela di un anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene e un inibitore di aggregazione amminoacidico. L'inibitore di aggregazione amminoacidico può comprendere un amminoacido comprendente una catena laterale carica, un amminoacido aromatico o un amminoacido idrofobo. L'amminoacido comprendente una catena laterale carica può essere un amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva, come, per esempio, arginina e lisina. L'amminoacido aromatico può comprendere un fenile o un indolo. Facoltativamente, l'amminoacido aromatico comprende inoltre una catena C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alchile tra il carbonio alfa e il fenile o l'indolo. Amminoacidi, inclusi, per esempio, fenilalanina e triptofano,

sono inibitori di aggregazione amminoacidici esemplificativi. L'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere un amminoacido idrofobo avente un punteggio maggiore di circa 2,5 sulla scala di idrofobicità di Kyte e Doolittle. Facoltativamente, l'amminoacido idrofobo è valina, leucina o isoleucina. Inibitori di aggregazione amminoacidici aggiuntivi sono contemplati come descritto qui.

La formulazione farmaceutica acquosa può inoltre comprendere un modificatore di tonicità, un tensioattivo, un tampone, o qualsiasi relativa combinazione.

È descritta una presentazione della formulazione per la conservazione e l'uso, ad esempio in una fiala monouso, una siringa monouso, o contenitore in vetro, rivestito di vetro o primario rivestito con vetro. Un contenitore, facoltativamente, una fiala, siringa preriempita (PFS), o un contenitore in vetro possono comprendere qualsiasi delle formulazioni farmaceutiche acquose descritte qui. Il contenitore può comprendere circa 1 mL o meno (ad esempio, circa 0,5 mL) della formulazione farmaceutica acquosa.

Metodi per realizzare una formulazione farmaceutica acquosa stabile comprendente un anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL), o una relativa porzione legante l'antigene, possono comprendere la combinazione dell'anticorpo monoclonale anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione maggiore di 70 mg/mL con un inibitore di aggregazione amminoacidico, un tampone, un

tensoattivo e facoltativamente, un modificatore di tonicità. È descritta la formulazione farmaceutica acquosa stabile realizzata secondo uno qualsiasi dei metodi per la realizzazione di una formulazione farmaceutica acquosa stabile descritta qui.

Sono descritti metodi di utilizzo di una formulazione come descritta qui per prevenire o trattare una malattia che risponde a un anticorpo monoclonale anti-RANKL umano o una relativa porzione legante l'antigene. L'uso può comprendere il trattamento terapeutico di un soggetto che comprende il trattamento o la prevenzione di un evento scheletrico (SRE), il trattamento o la prevenzione di un tumore a cellule giganti dell'osso, il trattamento o la prevenzione di ipercalcemia di natura maligna, il trattamento o la prevenzione di osteoporosi, o per aumentare la massa ossea, in un soggetto. Per esempio, il trattamento terapeutico comprende (a) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto con metastasi ossee da tumori solidi, (b) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto che è un adulto o un adolescente maturo a livello scheletrico con tumore a cellule giganti dell'osso che non è resecabile o in cui la resezione chirurgica è suscettibile di determinare grave morbilità, (c) trattamento di ipercalcemia di natura maligna refrattaria a terapia con bisfosfonato in un soggetto, (d) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto con mieloma multiplo o con metastasi ossee da un tumore solido, (e) trattamento di osteoporosi di donne in post menopausa ad alto rischio di frattura, (f) trattamento per aumentare la massa ossea in donne ad alto rischio di frattura che ricevono terapia con inibitore di aromatasi

adiuvante per cancro della mammella, (g) trattamento per aumentare la massa ossea in uomini ad alto rischio di frattura che ricevono terapia di deprivazione androgenica per cancro della prostata non metastatico, (h) trattamento per aumentare la massa ossea in uomini con osteoporosi ad alto rischio di frattura, (i) terapia con calcio o vitamina D.

Sono descritti un metodo per prevenire un evento scheletrico (SRE) in un paziente che ne ha bisogno, un metodo per trattare tumore a cellule giganti dell'osso in un paziente che ne ha bisogno, un metodo per trattare ipercalcemia di natura maligna in un paziente che ne ha bisogno, un metodo per trattare osteoporosi in un paziente che ne ha bisogno, e un metodo per aumentare la massa ossea in un paziente che ne ha bisogno. I metodi comprendono la somministrazione al paziente di una quantità efficace di una qualsiasi delle formulazioni descritte qui. La formulazione può essere erogata per via sottocutanea al paziente.

È descritto l'uso di denosumab, o un altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano o una relativa porzione legante l'antigene, nella produzione di un medicinale come descritto qui per trattare un paziente che necessita di un anticorpo monoclonale anti-RANKL umano.

Un kit può includere una composizione o articolo descritto/o qui insieme a un foglietto illustrativo, etichetta della confezione, istruzioni o altra marcatura che riguarda o divulga qualsiasi dei metodi o divulgazioni divulgati qui.

È descritto un metodo per migliorare la stabilità di una formulazione farmaceutica acquosa includente un anticorpo

monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione maggiore di 70 mg/mL, includente il passaggio di preparare la formulazione farmaceutica acquosa includente l'anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene a un pH in un intervallo da circa 5,0 a meno di 5,2, in cui la formulazione farmaceutica acquosa mostra stabilità migliorata al pH in un intervallo da circa 5,0 a meno di 5,2 rispetto a una formulazione farmaceutica acquosa equivalente che non è a un pH in un intervallo da circa 5,0 a meno di 5,2.

È descritto un metodo per migliorare la stabilità di una formulazione farmaceutica acquosa includente un anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene, includente il passaggio di preparare la formulazione farmaceutica acquosa comprendente l'anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene in miscela con un inibitore di aggregazione amminoacidico, in cui la formulazione farmaceutica acquosa mostra stabilità migliorata con l'inibitore di aggregazione amminoacidico rispetto a una formulazione farmaceutica acquosa equivalente senza l'inibitore di aggregazione amminoacidico.

È descritto un metodo per ridurre il livello di aggregati di HMWS in una soluzione di denosumab o un altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano.

### **BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI**

Le Figure 1, 2 e 8 mostrano la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C per varie formulazioni di denosumab ad alta concentrazione. La legenda di Figura 1 corrisponde alla formulazione avente l'abbreviazione mostrata in Tabella 1. La legenda di Figura 8 corrisponde alla lettera mostrata in Tabella 5.

La Figura 3 mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale per varie formulazioni di denosumab ad alta concentrazione dopo conservazione a 37 °C per 1 mese. La legenda di Figura 3 corrisponde alla formulazione avente l'abbreviazione mostrata in Tabella 2.

La Figura 4 è un grafico della % di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo per ciascuna formulazione avente il corrispondente n. F mostrato in Tabella 3A.

La Figura 5 è una coppia di cromatogrammi di esclusione dimensionale per le formulazioni elencate in Tabella 3A. La legenda di Figura 5 corrisponde al nome delle formulazioni indicate in Tabella 3B.

La Figura 6 è un grafico della % di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo di conservazione a 37 °C per ciascuna formulazione avente il corrispondente n. F mostrato in Tabella 4A.

La Figura 7A mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale per formulazioni a pH 4,8 aventi la concentrazione di denosumab elencata in Tabella 4A.

La Figura 7B mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale per formulazioni a pH 5,1 aventi la concentrazione di denosumab elencata in Tabella 4A.

La Figura 9 è un grafico della % di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo di conservazione a 37 °C per ciascuna formulazione avente il corrispondente n. F mostrato in Tabella 6B.

La Figura 10 mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale in funzione della formulazione dopo conservazione a 37 °C per 1 mese per le formulazioni aventi il nome indicato in Tabella 6B.

La Figura 11A è un grafico della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo a 37 °C per la formulazione avente la lettera indicata in Tabella 7B.

La Figura 11B è un grafico della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo a 40 °C per la formulazione avente la lettera indicata in Tabella 7C.

La Figura 12A mostra i cromatogrammi di esclusione dimensionale per le formulazioni di Tabella 7B.

La Figura 12B mostra i cromatogrammi di esclusione dimensionale per le formulazioni di Tabella 7C.

Le Figure 13, 14 e 15 sono grafici della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo di conservazione

a 37 °C per ciascuna formulazione la lettera corrispondente della Formulazione mostrata in Tabella 8A. Le Figure 16, 17 e 18 sono le sovrapposizioni cromatografiche delle formulazioni elencate in Tabella 8A dopo conservazione a 37 °C per 1 mese. Le Figure 13 e 16 riguardano formulazioni comprendenti amminoacidi aromatici, le Figure 14 e 17 riguardano formulazioni comprendenti amminoacidi polari/carichi, e le Figure 15 e 18 riguardano formulazioni comprendenti amminoacidi idrofobi.

Le Figure 19-24 sono grafici della % di incorporazione di deuterio a 4 °C in funzione del tempo (log (sec)) per gli amminoacidi di catena leggera 28-33 (Figura 19), gli amminoacidi di catena leggera 108-116 (Figura 20), gli amminoacidi di catena leggera 125-132 (Figura 21), gli amminoacidi di catena pesante 47-59 (Figura 22), gli amminoacidi di catena pesante 243-253 (Figura 23), e gli amminoacidi di catena pesante 392-399 (Figura 24) per ciascuna delle Formulazioni 35-38.

Le Figure 25-30 sono grafici della % di incorporazione di deuterio a 37 °C in funzione del tempo (log (sec)) per gli amminoacidi di catena leggera 28-33 (Figura 25), gli amminoacidi di catena leggera 108-117 (Figura 26), gli amminoacidi di catena leggera 124-131 (Figura 27), gli amminoacidi di catena pesante 47-59 (Figura 28), gli amminoacidi di catena pesante 242-253 (Figura 29), e gli amminoacidi di catena pesante 392-399 (Figura 30) per ciascuna delle Formulazioni 35-38.

La Figura 31 è un grafico della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C col nome della formulazione indicato in Tabella 10.

La Figura 32 è un grafico della percentuale di LMWS come monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C col nome della formulazione indicato in Tabella 11.

La Figura 33 è un grafico della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C col nome della formulazione indicato in Tabella 12.

La Figura 34 è un grafico della percentuale di LMWS come monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C col nome della formulazione indicato in Tabella 13.

La Figura 35 è un grafico della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C col nome della formulazione indicato in Tabella 14.

La Figura 36 è un grafico della percentuale di LMWS come monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C col nome della formulazione indicato in Tabella 15.

La Figura 37 consiste in sovrapposizioni di cromatogrammi di esclusione dimensionale per ciascuna formulazione avente il nome della formulazione indicato in Tabella 10.

La Figura 38 consiste in sovrapposizioni di cromatogrammi di esclusione dimensionale per ciascuna formulazione avente il nome della formulazione indicato in Tabella 12.

La Figura 39 consiste in sovrapposizioni di cromatogrammi di esclusione dimensionale per ciascuna formulazione avente il nome della formulazione indicato in Tabella 14.

Le Figure 40A e 40 B sono grafici contenenti le curve di denaturazione chimica isotermica di denosumab in assenza di arginina, a pH 4,5, 4,8 e 5,0. La Figura 40A è un grafico della frazione di denosumab denaturato in funzione della concentrazione denaturante. La Figura 40B è un grafico che riporta  $dF/d[\text{denaturante}]$  in funzione della concentrazione denaturante.

Le Figure 41A e 41 B sono grafici contenenti le curve di denaturazione chimica isotermica di denosumab in presenza di arginina HCl 75 mM a pH 4,5, 4,8 e 5,2. La Figura 41A è un grafico della frazione di denosumab denaturato in funzione della concentrazione denaturante. La Figura 41B è un grafico che riporta  $dF/d[\text{denaturante}]$  in funzione della concentrazione denaturante.

Le Figure 42 e 43 sono grafici della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo a 25 °C per 3 mesi e 37 °C per 2 mesi, rispettivamente, per la formulazione avente il nome della formulazione in Tabella 17.

#### **DESCRIZIONE DETTAGLIATA**

Sarebbe auspicabile fornire una soluzione acquosa più concentrata di denosumab, e altri anticorpi anti-RANKL umani, e relative porzioni leganti l'antigene, che sono stabili quanto, o più stabili, delle soluzioni diluite. La soluzione più concentrata potrebbe fornire comodità

al paziente, per esempio consentendo la somministrazione di un volume più piccolo, come iniezione di 1 mL, per erogare 120 mg di principio attivo, come denosumab, piuttosto che un'iniezione di 1,7 mL o 2 mL di una formulazione di principio attivo più diluita. Inoltre, consentirebbe un volume ancora più piccolo di soluzione per iniezione per erogare una dose inferiore di principio attivo, ad esempio 0,5 mL di concentrazione di denosumab 120 mg/mL per erogare una dose da 60 mg. Sarebbe anche auspicabile fornire una soluzione acquosa di denosumab, e altri anticorpi anti-RANKL umani, e relative porzioni leganti l'antigene, che siano più stabili rispetto alle soluzioni note in precedenza. La formulazione concentrata stabile avrà anche altri vantaggi, come consentire la manipolazione e la spedizione di volumi inferiori di prodotto, e consentire una durata di conservazione più lunga dei prodotti.

Gli aggregati nei prodotti biologici possono differire per origine, dimensione e tipo. Gli aggregati che possono influenzare l'efficacia o la sicurezza di un prodotto biologico destano particolare preoccupazione, ad esempio aggregati che possono migliorare le risposte immunitarie e causare effetti clinici avversi. Gli aggregati ad alto peso molecolare, noti anche come specie ad alto peso molecolare (HMWS), in particolare quelli che conservano la maggior parte della configurazione nativa della controparte monomeric, possono destare particolare preoccupazione. L'aggregazione può anche potenzialmente influenzare la biodisponibilità sottocutanea e la farmacocinetica di una proteina terapeutica.

La formazione degli aggregati può avere varie cause. In generale, l'aggregazione delle proteine deriva dall'instabilità conformazionale, che è il risultato di cambiamenti strutturali della proteina, e dall'instabilità colloidale, che è dominata dalle forze intermolecolari. Nel caso in cui sia necessario un evento di nucleazione critico per indurre la precipitazione, la cinetica dell'aggregazione proteica può essere caratterizzata dall'inclusione di una fase di tempo di latenza.

L'aggregazione dovuta a instabilità conformazionale implica passaggi di dispiegamento e associazione. Il dispiegamento della molecola proteica espone i residui amminoacidici idrofobi. I residui idrofobi delle molecole dispiegate possono quindi subire associazione, che porta ad aggregazione (ad esempio come dimeri, trimeri, altri multimeri e aggregati di ordine superiore). Tali associazioni sono concentrazione-dipendenti. Un aumento della concentrazione della proteina in un solvente acquoso in generale aumenta la velocità e l'entità di aggregazione, inclusa l'aggregazione indotta termicamente. Pertanto, gli additivi che influenzano l'energia libera del dispiegamento di proteine in soluzione possono influenzare la stabilità conformazionale.

L'instabilità colloidale determina aggregati tramite forze di associazione intramolecolari proteina-proteina. Tali forze possono essere influenzate da uno o più fattori includenti forza ionica, pH della soluzione e tipi di tamponi.

Denosumab è disponibile in commercio in forme di soluzione ai dosaggi di 60 mg/mL e 70 mg/mL. Tentativi di formulazione di soluzioni a

concentrazione più elevata di denosumab usando gli stessi eccipienti hanno mostrato che la concentrazione superiore influenzava dalla stabilità del prodotto, attraverso un aumento concomitante e proporzionale di HMWS. Per esempio, una concentrazione di 120 mg/mL di denosumab ha una concentrazione superiore al 70% superiore al 70 mg/mL di denosumab, ed è il doppio della concentrazione di 60 mg/ml.

Di conseguenza, una formulazione acquosa stabilizzata secondo la presente divulgazione resisterà alla formazione di aggregati in misura maggiore rispetto alle formulazioni precedentemente note. È descritta una formulazione acquosa stabilizzata caratterizzata da un pH da 5,0 a meno di 5,2. Un'altra divulgazione non esclusiva è una formulazione acquosa stabilizzata includente un inibitore di aggregazione amminoacidico. Sono anche descritte presentazioni di dosaggio correlate, ad esempio come fiale monouso, siringhe, e contenitori in vetro e metodi di trattamento correlati. Sono inoltre descritti metodi per realizzare formulazioni farmaceutiche acquose stabili.

Come descritto di seguito, il pH e l'inibitore di aggregazione amminoacidico (ad esempio, arginina, il dipeptide arginina-arginina, il dipeptide arginina-fenilalanina ) sono due leve mostrate per ridurre il livello di HMWS e la velocità di formazione di HMWS di denosumab a 120 mg/mL. HMWS possono essere descritte come interazioni proteiche intermolecolari che sono o irreversibili (ad esempio covalenti) o reversibili (ad esempio interazioni auto-associate non covalenti). Vi sono quattro cause ben accettate per reazioni di auto-associazione proteiche che

possono portare ad aumenti di viscosità e di HMWS; interazioni idrofobe, di carica, polari e di dipolo. Sia il pH della formulazione che l'arginina (un amminoacido basico altamente carico a valori di pH da neutro a acido) possono interferire con forze intermolecolari di proteina carica. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria particolare, è pensabile che la formazione di HMWS di denosumab a 120 mg/mL si basa sulla carica della proteina, e questi cambi di formulazione stanno interrompendo le forze di carica coinvolte nel meccanismo di formazione di HMWS. Inoltre, senza voler essere vincolati da alcuna teoria particolare, è pensabile che potrebbero esserci anche interazioni di autoassociazione di proteine idrofobe nella formazione di HMWS, poiché l'arginina contiene una corta catena alifatica di idrocarburi nella catena laterale. Questa catena alifatica può interrompere le interazioni idrofobe tra le proteine. Questa idea è ulteriormente supportata dall'inclusione di fenilalanina nella formulazione per avere un'ulteriore riduzione dei livelli di HMWS. Senza essere legati ad alcuna particolare teoria, l'arginina stabilizza l'anticorpo anti-RANKL in modo differente dalla fenilalanina, tale per cui, se l'arginina interagisce con l'anticorpo tra interazioni idrofobe, l'arginina può interagire con l'anticorpo in uno o più altri modi.

Altri eccipienti che possono avere un impatto potenzialmente positivo sulla riduzione del livello di HMWS e sulla velocità di formazione possono avere un gruppo con carica positiva simile a valori di pH da neutri a acidi rispetto a arginina, e/o possono essere di natura idrofoba

simili alla fenilalanina. Esempi di questi eccipienti possono includere lisina, N-acetil arginina, N-acetil lisina, tirosina, triptofano, e leucina.

Le formulazioni, le presentazioni di dosaggio e i metodi sono contemplati per includere qualsiasi combinazione di uno o più degli elementi, delle caratteristiche e dei passaggi opzionali aggiuntivi ulteriormente descritti di seguito (inclusi quelli mostrati nelle figure), se non diversamente indicato.

Nelle giurisdizioni che vietano la brevettabilità di metodi praticati sul corpo umano, il significato di "somministrazione" di una composizione a un soggetto umano è limitato alla prescrizione di una sostanza controllata che un soggetto umano si auto-somministrerà mediante qualsiasi tecnica (ad esempio, orale, inalazione, applicazione topica, iniezione, inserimento, eccetera). Si intende l'interpretazione più ampia e ragionevole che sia coerente con le leggi o le norme che definiscono l'oggetto brevettabile. Nelle giurisdizioni che non vietano la brevettabilità di metodi che sono praticati sul corpo umano, la "somministrazione" di composizioni include sia metodi praticati sul corpo umano sia le attività precedenti.

Come usato qui, il termine "comprendente" indica la potenziale inclusione di altri agenti, elementi, passaggi o caratteristiche, in aggiunta a quelli specificati.

Occorre comprendere che ogni limitazione numerica massima fornita in questa descrizione include come aspetti alternativi intervalli formati con ogni limitazione numerica inferiore corrispondente, come se

tali intervalli fossero scritti espressamente. Ciascuna limitazione numerica minima data in tutta questa descrizione includerà come aspetti alternativi intervalli formati con ciascuna limitazione numerica superiore, come se tali intervalli fossero scritti espressamente. Ogni intervallo numerico dato nel corso di questa descrizione includerà ogni intervallo numerico più ristretto che rientra entro tale intervallo numerico più ampio, come se tali intervalli numerici più ristretti fossero tutti espressamente scritti qui. Le dimensioni e i valori divulgati qui devono essere intesi come includenti la divulgazione sia del valore indicato sia del corrispondente valore numerico esatto, ad esempio un valore descritto come "circa 10 mM" deve essere inteso includere, come divulgazione alternativa, "10 mM."

L'espressione "quantità terapeuticamente efficace" come usata qui, si riferisce a una quantità di un composto sufficiente a trattare, migliorare, o prevenire la condizione o la malattia identificata, o a mostrare un effetto inibitore, profilattico o terapeutico rilevabile. L'effetto può essere rilevato, ad esempio, mediante un miglioramento della condizione clinica, o una riduzione dei sintomi. La quantità efficace precisa per un soggetto dipenderà dal peso corporeo, dalla corporatura e dalla salute del soggetto; dalla natura e dall'estensione della condizione; e dall'agente terapeutico o combinazione di agenti terapeutici selezionato per la somministrazione. Laddove un farmaco è stato approvato dalla Food and Drug Administration (FDA) statunitense, una "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce al dosaggio approvato

dalla FDA o dalla sua controparte straniera per il trattamento della malattia o condizione identificata.

La presente divulgazione fornisce formulazioni farmaceutiche acquose stabilizzate (o stabili) come dimostrato dalle quantità ridotte di aggregati e/o tassi di formazione di aggregati ridotti dopo conservazione. Come descritto qui, la stabilità di tali formulazioni è mostrata dalle quantità ridotte di HMWS e/o tassi di formazione di HMWS ridotti dopo conservazione per periodi di tempo diversi e a temperature diverse. In generale, le formulazioni a elevata stabilità sono associate a quantità inferiori di HMWS, tassi di formazione di HMWS inferiori, e/o picchi principali di anticorpo superiori a temperature di conservazione superiori, rispetto a temperature inferiori. Come usata qui, l'espressione "specie ad alto peso molecolare" o "HMWS" si riferisce a aggregati di ordine superiore dell'anticorpo delle formulazioni, nonché aggregati di ordine inferiore dell'anticorpo delle formulazioni. Gli aggregati di ordine inferiore includono, per esempio, specie dimeriche. Le quantità di aggregati e i tassi di formazione possono essere misurati o monitorati mediante tecniche, come, ad esempio, SE-UHPLC. I cromatogrammi di SE-UHPLC dell'anticorpo, in alcuni casi, mostrano un picco attorno a 5,8 minuti a rappresentare la quantità di HMWS della formulazione farmaceutica acquosa, un picco attorno a 6,7 minuti a rappresentare le specie dimeriche, e un picco attorno a 8,0 minuti che riflette la quantità di forme non aggregate intatte dell'anticorpo. Rispetto alla conservazione a 4 °C, la conservazione a 37 °C consente l'accelerazione di un saggio

di stabilità in modo tale che la stabilità di una particolare formulazione può essere determinata in un periodo di tempo inferiore, rispetto al periodo di tempo di conservazione a 4 °C. Per esempio, la conservazione a 37 °C per 1, 2, o 3 mesi può essere indicativa o predittiva di una conservazione a 4 °C per 36 mesi.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può mostrare un'entità e una velocità di formazione di HMWS ridotte dopo 3 mesi di conservazione a 37 °C, rispetto a una formulazione di controllo con concentrazione equivalente consistente in acetato 10 mM, sorbitolo 5% (p/v), polisorbato 20 0,01% (p/v) come eccipienti e avere un pH della soluzione di 5,2.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui e includente un inibitore di aggregazione amminoacidico può mostrare un'entità di formazione di HWMS ridotta dopo 1 mese di conservazione a 37 °C, rispetto a una formulazione di controllo equivalente senza l'inibitore di aggregazione amminoacidico. Per esempio, l'entità della formazione può essere ridotta tale per cui la quantità % di HMWS mediante SE-UPHLC è inferiore di almeno circa lo 0,1%, o circa lo 0,2%, o circa lo 0,3%, o circa lo 0,4%, o circa lo 0,5%, o circa lo 0,6%, o circa lo 0,7%, per esempio in un intervallo da circa 0,1% a circa 2%, o da circa 0,1% a circa 1%, rispetto alla formulazione di controllo dopo 1 mese di conservazione a 37 °C.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può avere una quantità bassa di HMWS dopo 1 mese di conservazione a 37 °C,

mediante SE-UHPLC. Per esempio, la quantità di HMWS può essere non più del 2%, o meno del 2%, o non più dell'1,9%, o meno dell'1,9%, o non più dell'1,8%, o meno dell'1,8%, o non più dell'1,7%, o meno dell'1,7%, o non più dell'1,6%, o meno dell'1,6%, o non più dell'1,5%, o meno dell'1,5%, o non più dell'1,4%, o meno dell'1,4%, o non più dell'1,3%, o meno dell'1,3%, o non più dell'1,2%, o meno dell'1,2%, per esempio in un intervallo di circa 0,01% a circa 2%, o da circa 0,01% a circa 1,9%, o da circa 0,01% a circa 1,8%, o da circa 0,01% a circa 1,7%, o da circa 0,01% a circa 1,6%, o da circa 0,01% a circa 1,5%, o da circa 0,01% a circa 1,4%, o da circa 0,01% a circa 1,3%, o da circa 0,01% a circa 1,2%. La quantità di HMWS dopo 1 mese di conservazione a 37 °C, mediante SE-UHPLC può essere maggiore del 2%, ad esempio maggiore del 2% e fino al 3%, mentre la ridotta velocità di aggregazione fornita dall'inibitore di aggregazione amminoacidico può consentire una durata di conservazione del prodotto adatta, ad esempio fino a tre anni o fino a due anni.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può avere una quantità bassa di HMWS dopo 3 mesi di conservazione a 37 °C, mediante SE-UHPLC. Per esempio, la quantità di HMWS può essere non più del 2%, o meno del 2%, o non più dell'1,9%, o meno dell'1,9%, o non più dell'1,8%, o meno dell'1,8%, o non più dell'1,7%, o meno dell'1,7%, o non più dell'1,6%, o meno dell'1,6%, o non più dell'1,5%, o meno dell'1,5%, o non più dell'1,4%, o meno dell'1,4%, o non più dell'1,3%, o meno dell'1,3%, o non più dell'1,2%, o meno dell'1,2%, per esempio in

un intervallo di circa 0,01% a circa 2%, o da circa 0,01% a circa 1,9%, o da circa 0,01% a circa 1,8%, o da circa 0,01% a circa 1,7%, o da circa 0,01% a circa 1,6%, o da circa 0,01% a circa 1,5%, o da circa 0,01% a circa 1,4%, o da circa 0,01% a circa 1,3%, o da circa 0,01% a circa 1,2%.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può avere una quantità bassa di HMWS dopo 36 mesi di conservazione a 4 °C, mediante SE-UHPLC. Per esempio, la quantità di HMWS può essere non più del 2%, o meno del 2%, o non più dell'1,9%, o meno dell'1,9%, o non più dell'1,8%, o meno dell'1,8%, o non più dell'1,7%, o meno dell'1,7%, o non più dell'1,6%, o meno dell'1,6%, o non più dell'1,5%, o meno dell'1,5%, o non più dell'1,4%, o meno dell'1,4%, o non più dell'1,3%, o meno dell'1,3%, o non più dell'1,2%, o meno dell'1,2%, per esempio in un intervallo di circa 0,01% a circa 2%, o da circa 0,01% a circa 1,9%, o da circa 0,01% a circa 1,8%, o da circa 0,01% a circa 1,7%, o da circa 0,01% a circa 1,6%, o da circa 0,01% a circa 1,5%, o da circa 0,01% a circa 1,4%, o da circa 0,01% a circa 1,3%, o da circa 0,01% a circa 1,2%.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può avere una quantità elevata dei picchi principali di denosumab o altro anticorpo (o relativa porzione legante l'antigene) dopo 1 mese di conservazione a 37 °C, mediante SE-UHPLC. Per esempio, la quantità del picco principale può essere almeno del 95%, o superiore al 95%, o almeno 96%, o superiore al 96%, o almeno 97%, o superiore al 97%, o almeno 97,5%, o superiore al 97,5%, o almeno 98%, o superiore al 98%, o almeno 98,1%, o superiore al 98,1%, o almeno 98,2%, o superiore al

98,2%, o almeno 98,3%, o superiore al 98,3%, o almeno 98,4%, o superiore al 98,4%, o almeno 98,5%, o superiore al 98,5%, o almeno 98,6%, o superiore al 98,6%, per esempio in un intervallo da circa 95% a circa 99,9%, o da circa 96% a circa 99,9%, o da circa 97% a circa 99,9%, o da circa 97,5% a circa 99,9%, o da circa 98% a circa 99,9%, o da circa 98,1% a circa 99,9%, o da circa 98,2% a circa 99,9%, o da circa 98,3% a circa 99,9%, o da circa 98,4% a circa 99,9%, o da circa 98,5% a circa 99,9%, o da circa 98,6% a circa 99,9%.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può avere una quantità elevata del picco principale di denosumab o altro anticorpo (o relativa porzione legante l'antigene) dopo 3 mesi di conservazione a 37 °C, mediante SE-UHPLC. Per esempio, la quantità del picco principale può essere almeno del 95%, o superiore al 95%, o almeno 96%, o superiore al 96%, o almeno 97%, o superiore al 97%, o almeno 97,5%, o superiore al 97,5%, o almeno 98%, o superiore al 98%, o almeno 98,1%, o superiore al 98,1%, o almeno 98,2%, o superiore al 98,2%, o almeno 98,3%, o superiore al 98,3%, o almeno 98,4%, o superiore al 98,4%, o almeno 98,5%, o superiore al 98,5%, o almeno 98,6%, o superiore al 98,6%, per esempio in un intervallo da circa 95% a circa 99,9%, o da circa 96% a circa 99,9%, o da circa 97% a circa 99,9%, o da circa 97,5% a circa 99,9%, o da circa 98% a circa 99,9%, o da circa 98,1% a circa 99,9%, o da circa 98,2% a circa 99,9%, o da circa 98,3% a circa 99,9%, o da circa 98,4% a circa 99,9%, o da circa 98,5% a circa 99,9%, o da circa 98,6% a circa 99,9%.

Una formulazione stabilizzata come descritto qui può avere una quantità elevata del picco principale di denosumab o altro anticorpo (o relativa porzione legante l'antigene) dopo 36 mesi di conservazione a 4 °C, mediante SE-UHPLC. Per esempio, la quantità del picco principale può essere almeno del 95%, o superiore al 95%, o almeno 96%, o superiore al 96%, o almeno 97%, o superiore al 97%, o almeno 97,5%, o superiore al 97,5%, o almeno 98%, o superiore al 98%, o almeno 98,1%, o superiore al 98,1%, o almeno 98,2%, o superiore al 98,2%, o almeno 98,3%, o superiore al 98,3%, o almeno 98,4%, o superiore al 98,4%, o almeno 98,5%, o superiore al 98,5%, o almeno 98,6%, o superiore al 98,6%, per esempio in un intervallo da circa 95% a circa 99,9%, o da circa 96% a circa 99,9%, o da circa 97% a circa 99,9%, o da circa 97,5% a circa 99,9%, o da circa 98% a circa 99,9%, o da circa 98,1% a circa 99,9%, o da circa 98,2% a circa 99,9%, o da circa 98,3% a circa 99,9%, o da circa 98,4% a circa 99,9%, o da circa 98,5% a circa 99,9%, o da circa 98,6% a circa 99,9%.

È contemplato che la formulazione stabilizzata possa avere sia una quantità bassa di HMWS che una quantità elevata di picco principale, secondo una descrizione descritta sopra, dopo conservazione.

Le formulazioni farmaceutiche acquose possono comprendere non più di circa il 4% di specie ad alto peso molecolare (HMWS) e/o possono comprendere più di circa il 96% del picco principale di anticorpo, come misurato mediante SE-UHPLC, dopo conservazione. Le formulazioni farmaceutiche acquose possono comprendere non più di

circa il 3% di specie ad alto peso molecolare (HMWS) e/o possono comprendere più di circa il 97% del picco principale di anticorpo, come misurato mediante SE-UHPLC, dopo conservazione. Le formulazioni farmaceutiche acquose possono comprendere meno di circa il 2% di HMWS e/o più di circa il 98% del picco principale di anticorpo, come misurato mediante SE-UHPLC, dopo conservazione. La conservazione può essere a una temperatura di circa 2 °C a circa 8 °C (ad esempio, circa 2 °C, circa 3 °C, circa 4 °C, circa 5 °C, circa 6 °C, circa 7 °C, circa 8 °C) per almeno 12 mesi, 24 mesi, o 36 mesi (ad esempio, almeno o circa 12 mesi, almeno o circa 16 mesi, almeno o circa 20 mesi, almeno o circa 24 mesi, almeno o circa 28 mesi, almeno o circa 32 mesi, almeno o circa 36 mesi, facoltativamente, più a lungo). La conservazione può essere da circa 20 °C a circa 30 °C (ad esempio, da circa 21 °C a circa 30 °C, da circa 22 °C a circa 30 °C, da circa 23 °C a circa 30 °C, da circa 24 °C a circa 30 °C, da circa 25 °C a circa 30 °C, da circa 26 °C a circa 30 °C, da circa 27 °C a circa 30 °C, da circa 28 °C a circa 30 °C, da circa 28 °C a circa 30 °C, da circa 20 °C a circa 29 °C, da circa 20 °C a circa 28 °C, da circa 20 °C a circa 27 °C, da circa 20 °C a circa 26 °C, da circa 20 °C a circa 25 °C, da circa 20 °C a circa 24 °C, da circa 20 °C a circa 23 °C, da circa 20 °C a circa 22 °C) per circa 1 mese (ad esempio, circa 26 giorni, circa 27 giorni, circa 28 giorni, circa 29 giorni, circa 30 giorni, circa 31 giorni, circa 32 giorni, circa 33 giorni, circa 34 giorni, circa 35 giorni, circa 36 giorni). La conservazione può comprendere una prima conservazione seguita da una seconda conservazione, in cui la prima

conservazione è da circa 2 °C a circa 8 °C per almeno 12 mesi, 24 mesi, o 36 mesi e la seconda conservazione è da circa 20 °C a circa 30 °C per circa 1 mese. Le formulazioni farmaceutiche acquose possono comprendere non più del 2% di HMWS, o meno del 2% di HMWS, o non più dell'1,9% di HMWS, o meno dell'1,9% di HMWS, o non più dell'1,8% di HMWS, o meno dell'1,8% di HMWS, o non più dell'1,7% di HMWS, o meno dell'1,7% di HMWS, o non più dell'1,6% di HMWS, o meno dell'1,6% di HMWS, o non più dell'1,5% di HMWS, o meno dell'1,5% di HMWS, o non più dell'1,4% di HMWS, o meno dell'1,4% di HMWS, o non più dell'1,3% di HMWS, o meno dell'1,3% di HMWS, o non più dell'1,2% di HMWS, o meno dell'1,2% di HMWS, per esempio in un intervallo da circa 0,01% a circa 2% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,9% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,8% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,7% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,6% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,5% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,4% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,3% di HMWS, o da circa 0,01% a circa 1,2% di HMWS, facoltativamente, come misurato mediante SE-UHPLC. Le formulazioni farmaceutiche acquose possono comprendere più del 98% del picco principale di anticorpo, o almeno il 95% del picco principale di anticorpo, o superiore al 95% del picco principale di anticorpo, o almeno 96% del picco principale di anticorpo, o superiore al 96% del picco principale di anticorpo, o almeno 97% del picco principale di anticorpo, o superiore al 97% del picco principale di anticorpo, o almeno 97,5% del picco principale di anticorpo, o superiore al 97,5% del picco principale di

anticorpo, o almeno 98% del picco principale di anticorpo, o superiore al 98% del picco principale di anticorpo, o almeno 98,1% del picco principale di anticorpo, o superiore al 98,1% del picco principale di anticorpo, o almeno 98,2% del picco principale di anticorpo, o superiore al 98,2% del picco principale di anticorpo, o almeno 98,3% del picco principale di anticorpo, o superiore al 98,3% picco principale di anticorpo, o almeno 98,4% picco principale di anticorpo, o superiore al 98,4% del picco principale di anticorpo, o almeno 98,5% del picco principale di anticorpo, o superiore al 98,5% del picco principale di anticorpo, o almeno 98,6% del picco principale di anticorpo, o superiore al 98,6% del picco principale di anticorpo, per esempio in un intervallo da circa 95% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 96% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 97% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 97,5% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98,1% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98,2% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98,3% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98,4% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98,5% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, o da circa 98,6% a circa 99,9% del picco principale di anticorpo, facoltativamente, come misurato mediante SE-UHPLC.

Come usato qui, il termine "anticorpo" si riferisce a una proteina avente un formato immunoglobulinico convenzionale, comprendente

catene pesanti e leggere, e comprendente regioni variabili e costanti. Per esempio, un anticorpo può essere una IgG che è una struttura "a forma di Y" di due coppie identiche di catene polipeptidiche, ciascuna coppia avendo una catena "leggera" (tipicamente avente un peso molecolare di circa 25 kDa) e una catena "pesante" (tipicamente avente un peso molecolare da circa 50 a 70 kDa). Un anticorpo ha una regione variabile e una regione costante. Nei formati di IgG, la regione variabile consta generalmente da circa 100 a 110 o più amminoacidi, comprende tre regioni determinanti la complementarità (CDR), è principalmente responsabile del riconoscimento di antigeni, e varia sostanzialmente tra gli altri anticorpi che si legano ad antigeni diversi. Vedere, ad esempio, Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4a ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999).

In breve, in un'impalcatura di anticorpo, le CDR sono incorporate all'interno di una intelaiatura nella regione variabile di catena pesante e leggera dove costituiscono le regioni in gran parte responsabili del legame e del riconoscimento di antigeni. Una regione variabile comprende almeno tre CDR di catena pesante o tre CDR di catena leggera (Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service N.I.H., Bethesda, Md.; vedere anche Chothia e Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., 1989, Nature 342: 877-883), all'interno di una regione di intelaiatura (designate

come regioni di intelaiatura da 1 a 4, FR1, FR2, FR3, e FR4, da Kabat et al., 1991; vedere anche Chothia e Lesk, 1987, supra).

Le catene leggere umane sono classificate come catene leggere kappa e lambda. Le catene pesanti sono classificate come mu, delta, gamma, alfa, o epsilon, e definiscono l'isotipo dell'anticorpo come IgM, IgD, IgG, IgA, e IgE, rispettivamente. IgG ha svariate sottoclassi, incluse, ma a titolo non limitativo IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4. IgM ha sottoclassi, incluse, ma a titolo non limitativo, IgM1 e IgM2. Le divulgazioni descritte qui includono tutte tali classi o isotipi di anticorpi. La regione costante di catena leggera può essere, per esempio, una regione costante di catena leggera di tipo kappa o lambda, ad esempio, una regione costante di catena leggera di tipo kappa o lambda umana. La regione costante di catena pesante può essere, per esempio, una regione costante di catena pesante di tipo alfa, delta, epsilon, gamma, o mu, ad esempio, una regione costante di catena pesante di tipo alfa, delta, epsilon, gamma, o mu umana. Di conseguenza, l'anticorpo può essere un anticorpo di isotipo IgA, IgD, IgE, IgG o IgM, incluso uno qualsiasi tra IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. L'anticorpo anti-RANKL può essere un anticorpo IgG1, IgG2 o IgG4.

L'anticorpo può essere un anticorpo monoclonale o un anticorpo policlonale. L'anticorpo può comprendere una sequenza che è sostanzialmente simile a un anticorpo presente in natura prodotto da un mammifero, ad esempio, topo, ratto, coniglio, capra, cavallo, pollo, criceto, maiale o essere umano. A questo proposito, l'anticorpo può

essere considerato come un anticorpo di mammifero, ad esempio un anticorpo di topo, anticorpo di ratto, anticorpo di coniglio, anticorpo di capra, anticorpo di cavallo, anticorpo di pollo, anticorpo di criceto, anticorpo di maiale o anticorpo di essere umano. L'anticorpo anti-RANKL può essere un anticorpo monoclonale umano. La proteina ricombinante può essere un anticorpo chimerico o un anticorpo umanizzato. L'espressione "anticorpo chimerico" viene usata qui per riferirsi a un anticorpo contenente domini costanti di una specie e i domini variabili da una seconda, o più generalmente, contenente tratti di sequenza amminoacidica di almeno due specie. Il termine "umanizzato" quando usato in relazione ad anticorpi si riferisce ad anticorpi aventi almeno regioni CDR da una fonte non umana che vengono ingegnerizzati affinché abbiano una struttura e una funzione immunologica più simili ai veri anticorpi umani rispetto agli anticorpi della fonte originale. Per esempio, l'umanizzazione può implicare l'innesto di CDR da un anticorpo non umano, come un anticorpo di topo, in un anticorpo umano. L'umanizzazione può anche implicare selezionare sostituzioni amminoacidiche per rendere una sequenza non umana più simile a una sequenza umana.

Un anticorpo può essere clivato in frammenti mediante enzimi, come, ad esempio, papaina e pepsina. La papaina cliva un anticorpo per produrre due frammenti Fab e un frammento Fc singolo. La pepsina cliva un anticorpo per produrre un frammento  $F(ab')_2$  e un frammento pFc'. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere un frammento

anticorpale, ad esempio, un Fab, Fc, F(ab')<sub>2</sub>, o un pFc', che mantiene almeno un sito legante l'antigene (RANKL). Per quanto riguarda le formulazioni farmaceutiche acquose e i metodi della presente divulgazione, l'anticorpo può essere privo di alcune porzioni di un anticorpo, e può essere un frammento anticorpale che si lega a RANKL. Il frammento anticorpale può essere una porzione legante l'antigene di un anticorpo anti-RANKL.

I prodotti proteici anticorpali possono essere un formato legante l'antigene a base di frammenti anticorpali, ad esempio, scFv, Fab e VHH/VH, che mantengono la completa capacità di legare l'antigene. Il frammento legante l'antigene più piccolo in assoluto che mantiene il suo sito legante l'antigene completo è il frammento di Fv, che è costituito interamente da regioni variabili (V). Un linker peptidico amminoacidico solubile e flessibile viene usato per connettere le regioni V a un frammento scFv (frammento di catena singola variabile) per la stabilizzazione della molecola, oppure i domini costanti (C) vengono aggiunti alle regioni V per generare un frammento Fab (frammento, legante l'antigene). Sia scFv che Fab sono frammenti ampiamente usati che possono essere facilmente prodotti in ospiti, ad esempio, ospiti procariotici. Altri prodotti proteici di anticorpi includono scFv stabilizzato con legame disolfuro (ds-scFv), Fab di catena singola (scFab), nonché formati di anticorpi di e multimerici come dia-, tria- e tetra-body, o minibody (miniAb) che comprendono diversi formati costituiti da scFv collegati a domini di oligomerizzazione. I frammenti più piccoli sono

VHH/VH di Ab di catena pesante camelidi nonché Ab di dominio singolo (sdAb). L'elemento costitutivo che viene più frequentemente usato per creare nuovi formati di anticorpi è il frammento di anticorpo di dominio variabile (V) di catena singola (scFv), che comprende i domini V della catena pesante e leggera (dominio VH e VL) collegati da un linker peptidico di ~15 residui amminoacidici. Una fusione di peptibody o peptide-Fc è ancora un altro prodotto proteico di anticorpo. La struttura di un peptibody è costituita da un peptide biologicamente attivo innestato su un dominio Fc. I peptibody sono ben descritti nell'arte. Vedere, ad esempio, Shimamoto et al., *mAbs* 4(5): 586-591 (2012).

Altri prodotti proteici anticorpali includono, ad esempio, un anticorpo di catena singola (SCA); un diabody; un triabody; un tetrabody; e anticorpi bispecifici o trispecifici. Gli anticorpi bispecifici possono essere suddivisi in cinque classi principali: BslgG, IgG acclusa, frammenti di BsAb, proteine di fusione bispecifiche e coniugati di BsAb. Vedere, ad esempio, Spiess et al., *Molecular Immunology* 67(2) Parte A: 97-106 (2015).

L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere, consistere essenzialmente in, o consistere in uno qualsiasi di questi prodotti proteici anticorpali (ad esempio, scFv, Fab VHH/VH, frammento Fv, ds-scFv, scFab, anticorpo dimerico, anticorpo multimerico (ad esempio, un diabody, triabody, tetrabody), miniAb, peptibody VHH/VH di anticorpo di catena pesante camelide, sdAb, diabody; un triabody; un tetrabody; un anticorpo bispecifico o trispecifico,

BsIgG, IgG acclusa, frammento BsAb, proteina di fusione bispecifica e coniugato BsAb).

L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere, consistere essenzialmente in, o consistere in un prodotto proteico anticorpale in forma monomerica o forma polimerica, oligomerica o multimerica. In determinate divulgazioni in cui l'anticorpo comprende due o più frammenti di regioni leganti l'antigene distinti, l'anticorpo viene considerato bispecifico, trispecifico o multispecifico, o bivalente, trivalente o multivalente, a seconda del numero di epitopi distinti che sono riconosciuti e legati dall'anticorpo.

Un anticorpo umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene per uso nella formulazione è un anticorpo o una relativa porzione legante l'antigene che lega specificamente la proteina RANKL umana o la proteina osteoprotegerina umana (OPGL) di un relativo frammento e inibisce o neutralizza l'attività della proteina RANKL o OPGL e/o inibisce la via di segnalazione RANK/RANKL, ed è citato qui come anticorpo monoclonale anti-RANKL umano o una relativa porzione legante l'antigene. Per esempio, le formulazioni descritte qui possono comprendere un anticorpo monoclonale anti-RANKL umano che si lega specificamente alla sequenza amminoacidica di RANKL umano (SEQ ID NO: 12) o una sua porzione. La proteina RANKL umana è una proteina transmembrana o solubile che viene codificata dalla sequenza polinucleotidica di SEQ ID NO: 11, che è nota per essere essenziale per

la formazione, funzione e sopravvivenza degli osteoclasti. Per esempio, gli anticorpi anti-RANKL umani inibiscono l'interazione di RANKL con il suo recettore RANK.

Un esempio di un anticorpo monoclonale anti-RANKL umano è denosumab, che è venduto in forma commerciale come Xgeva<sup>®</sup> e Prolia<sup>®</sup>. Xgeva<sup>®</sup> è una formulazione di denosumab alla dose di 120 mg in 1,7 mL di soluzione (70 mg/mL) in una monouso fiala, contenente 120 mg di denosumab, acetato (18 mM), sorbitolo (4,6%), acqua per iniezione (USP) e idrossido di sodio fino a un pH di 5,2. Prolia<sup>®</sup> è disponibile come formulazioni di denosumab alla dose di 60 mg in 1 mL di soluzione (60 mg/mL). Ciascuna siringa preriempita monouso da 1 mL di Prolia<sup>®</sup> contiene 60 mg di denosumab (soluzione 60 mg/mL), sorbitolo 4,7%, acetato 17 mM, polisorbato 20 0,01%, acqua per iniezione (USP), e idrossido di sodio fino a un pH di 5,2. Formulazioni come descritto qui, e incluso denosumab o una relativa porzione, sono specificamente contemplate. Denosumab è un anticorpo monoclonale completamente umano IgG2 che si lega a RANKL umano. Denosumab ha un peso molecolare approssimativo di 147 kDa e viene espresso nella linea di cellule di ovario di criceto cinese (CHO). Le sequenze amminoacidiche della catena leggera (LC) variabile e della catena pesante (HC) variabile di denosumab sono espresse in SEQ ID NO: 1 e 2, rispettivamente e la LC e la HC a lunghezza intera sono espresse come SEQ ID NO: 3 e 4. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 1 (LC variabile di

denosumab) è, facoltativamente, un acido nucleico di SEQ ID NO: 19. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 2 (HC variabile di denosumab) è, facoltativamente, un acido nucleico di SEQ ID NO: 20. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 3 (LC a lunghezza intera di denosumab) è, facoltativamente, un acido nucleico di SEQ ID NO: 21. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 4 (HC a lunghezza intera di denosumab) è, facoltativamente, un acido nucleico di SEQ ID NO: 23. La forma matura della LC, che è rappresentata come amminoacidi 21-235 della LC a lunghezza intera, è esposta come SEQ ID NO: 13, mentre la forma matura della HC, che è rappresentata come amminoacidi 20-467 della HC a lunghezza intera, è esposta come SEQ ID NO: 14. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 13 (la forma matura della LC) è, facoltativamente, un acido nucleico di SEQ ID NO: 22. Acido nucleico comprendente una sequenza nucleotidica codificante per la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 14 (la forma matura della HC) è, facoltativamente, un acido nucleico di SEQ ID NO: 24. In aggiunta, le CDR di LC di denosumab sono esposte come SEQ ID NO: 5 (CDR1 di LC), SEQ ID NO: 6 (CDR2 di LC) e SEQ ID NO: 7 (CDR3 di LC). Le CDR di HC di Denosumab sono esposte come SEQ ID NO: 8 (CDR1 di HC), SEQ ID NO: 9 (CDR2 di HC), e SEQ ID NO: 10 (CDR3 di HC).

Denosumab è stato descritto e rivendicato nella domanda di brevetto internazionale n. WO 03/002713 e nel brevetto U.S. n. 7,364,736.

Come usato qui, il termine "denosumab" include biosimili di denosumab. Come usato qui, "biosimile" (di un prodotto di riferimento/farmaco biologico approvato, come un anticorpo, terapeutico proteico, ecc.) si riferisce a un prodotto biologico che è simile al prodotto di riferimento in base ai dati derivati da (a) studi analitici che dimostrano che il prodotto biologico è altamente simile al prodotto di riferimento nonostante differenze minori nei componenti clinicamente inattivi; (b) studi su animali (inclusa la valutazione della tossicità); e/o (c) uno o più studi clinici (inclusa la valutazione di immunogenicità e farmacocinetica o farmacodinamica) che sono sufficienti per dimostrare la sicurezza, la purezza e la potenza in una o più condizioni appropriate di utilizzo per cui il prodotto di riferimento è concesso in licenza e destinato a essere utilizzato e per il quale è richiesta la licenza per il prodotto biologico. Il prodotto biologico e il prodotto di riferimento biosimili possono utilizzare lo stesso meccanismo o meccanismi di azione per la condizione o le condizioni d'uso prescritte, raccomandate o suggerite nell'etichettatura proposta, ma solo nella misura in cui il meccanismo o i meccanismi di azione sono noti per il prodotto di riferimento. La condizione o le condizioni di utilizzo prescritte, raccomandate, o suggerite nell'etichettatura proposta per il prodotto biologico possono essere state precedentemente approvate per il prodotto di riferimento. La via di somministrazione, la forma di dosaggio e/o il dosaggio del prodotto

biologico possono essere gli stessi del prodotto di riferimento. L'impianto in cui il prodotto biologico è prodotto, processato, confezionato o mantenuto può soddisfare standard progettati per garantire che il prodotto biologico continui ad essere sicuro, puro e potente. Il prodotto di riferimento può essere approvato in almeno uno tra U.S., Europa o Giappone. Un biosimile può essere, per esempio, un anticorpo avente la stessa sequenza amminoacidica primaria come anticorpo commercializzato, ma può essere realizzato in differenti tipi cellulari o mediante differenti metodi di produzione, purificazione o formulazione.

Le formulazioni possono comprendere un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una delle sequenze amminoacidiche delle SEQ ID NO: 1-4, 13, 14, o una relativa porzione. Le formulazioni possono comprendere un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una delle sequenze amminoacidiche di CDR espote come SEQ ID: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, o almeno due delle sequenze amminoacidiche di CDR espote come SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, o almeno tre delle sequenze amminoacidiche di CDR espote come SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, o almeno quattro delle sequenze amminoacidiche di CDR espote come SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10, o almeno cinque delle sequenze amminoacidiche di CDR espote come SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID

NO: 9 o SEQ ID NO: 10, o almeno sei delle sequenze amminoacidiche di CDR esposte come SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 o SEQ ID NO: 10.

Le formulazioni possono comprendere un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno all'80% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno all'85% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 90% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 91% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 92% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 93% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che

è identica almeno al 94% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 95% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 96% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 97% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 98% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK, o un anticorpo anti-RANKL umano comprendente almeno una sequenza amminoacidica che è identica almeno al 99% a una qualsiasi di SEQ ID NO: 1-4, 13 e 14 e inibisce l'interazione tra RANKL e il suo recettore, RANK.

La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere un anticorpo anti-RANKL, o una relativa porzione legante l'antigene, incluso un prodotto proteico anticorpale, come descritto qui. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, comprende un dominio variabile di catena leggera comprendente una sequenza di CDR1 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica esposta in

SEQ ID NO: 5. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere un dominio variabile di catena leggera comprendente una sequenza di CDR2 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 6. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere un dominio variabile di catena pesante comprendente una sequenza di CDR3 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 10. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere una SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, e SEQ ID NO: 10. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere (i) un dominio variabile di catena leggera comprendente una sequenza di CDR3 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO:7; (ii) un dominio variabile di catena pesante comprendente una sequenza di CDR1 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 8, facoltativamente, SEQ ID NO: 27; (iii) un dominio variabile di catena pesante comprendente una sequenza di CDR2 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica esposta in SEQ ID NO: 9, o (iv) qualsiasi relativa combinazione. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere (A) un dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR1 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5, un dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR2 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 6, e un

B

dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR3 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; e (B) un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR1 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 8 (facoltativamente, SEQ ID NO: 27), un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR2 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9, e un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR3 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 10. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere: (A) un dominio variabile di catena leggera selezionato dal gruppo consistente in: (i) un dominio variabile di catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica che è identico almeno all'80% (ad esempio, almeno 85%, almeno 90%, almeno 91%, almeno 92%, almeno 93%, almeno 94%, almeno 95%, almeno 96%, almeno 97%, almeno 98%, almeno 99%) alla SEQ ID NO: 1; (ii) un dominio variabile di catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica codificata da una sequenza polinucleotidica comprendente SEQ ID NO: 19; e (iii) un dominio variabile di catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica codificata da un polinucleotide che si ibrida in condizioni stringenti al complementare di un polinucleotide consistente in SEQ ID NO: 19; oppure (B) il dominio variabile di catena pesante selezionato dal gruppo consistente in: (i) un dominio variabile di catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica che è identica

almeno all'80% (ad esempio, almeno 85%, almeno 90%, almeno 91%, almeno 92%, almeno 93%, almeno 94%, almeno 95%, almeno 96%, almeno 97%, almeno 98%, almeno 99%) a SEQ ID NO: 2; (ii) un dominio variabile di catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica codificata da una sequenza polinucleotidica comprendente SEQ ID NO: 20, e (iii) un dominio variabile di catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica codificata da un polinucleotide che si ibrida in condizioni stringenti al complementare di un polinucleotide consistente in SEQ ID NO: 20; oppure (C) un dominio variabile di catena leggera di (A) e un dominio variabile di catena pesante di (B). L'anticorpo anti-RANKL può essere un anticorpo completamente umano, un anticorpo umanizzato o un anticorpo chimerico. La porzione legante l'antigene può essere un Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, o un Fv a catena singola. L'anticorpo anti-RANKL può essere un anticorpo IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> o IgG<sub>4</sub>, facoltativamente, in cui l'anticorpo anti-RANKL comprende una sequenza di SEQ ID NO: 15. L'anticorpo anti-RANKL può comprendere una sequenza di SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, o della SEQ ID NO: 18. L'anticorpo anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, può comprendere: (A) una catena leggera selezionata dal gruppo consistente in: (i) una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica che è identica almeno all'80% (ad esempio, almeno 85%, almeno 90%, almeno 91%, almeno 92%, almeno 93%, almeno 94%, almeno 95%, almeno 96%, almeno 97%, almeno 98%, almeno 99%) a SEQ ID NO: 3 o SEQ ID NO: 13; (ii) una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica

codificata da una sequenza polinucleotidica di SEQ ID NO: 21 o 23; e (iii) una catena leggera comprendente una sequenza amminoacidica codificata da un polinucleotide che si ibrida in condizioni stringenti al complementare di un polinucleotide consistente in SEQ ID NO: 21 o 23; o (B) una catena pesante selezionata dal gruppo consistente in: (i) una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica che è identica almeno all'80% (ad esempio, almeno 85%, almeno 90%, almeno 91%, almeno 92%, almeno 93%, almeno 94%, almeno 95%, almeno 96%, almeno 97%, almeno 98%, almeno 99%) a SEQ ID NO: 4 o SEQ ID NO: 14; (ii) una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica codificata da una sequenza polinucleotidica di SEQ ID NO: 22 o 24, e (iii) una catena pesante comprendente una sequenza amminoacidica codificata da un polinucleotide che si ibrida in condizioni stringenti al complementare di un polinucleotide consistente in SEQ ID NO: 22 o 24; o (C) un dominio variabile di catena leggera di (A) e un dominio variabile di catena pesante di (B).

La concentrazione di denosumab o altro anticorpo anti-RANKL umano, o relativa porzione legante l'antigene, nella formulazione acquosa può essere in generale in qualsiasi intervallo utile, ad esempio circa da 0,1 a circa 200 mg/mL. Poiché la concentrazione viene aumentata, vi è un aumento di viscosità, che può ostacolare il processamento della formulazione in una presentazione di dosaggio sterile per uso farmaceutico.

La stabilità migliorata della formulazione mediante un inibitore di aggregazione amminoacidico può esister a qualsiasi concentrazione di denosumab o di un altro anticorpo anti-RANKL umano, o relativa porzione legante l'antigene, inclusi da circa 10 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 15 mg/mL a circa 150 mg/mL, o da circa 30 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 180 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 160 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 150 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 140 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 130 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 120 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 110 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 100 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 90 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 80 mg/mL, o da circa 60 mg/mL a circa 70 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 180 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 160 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 150 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 140 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 130 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 120 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 110 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 100 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 90 mg/mL, o da circa 70 mg/mL a circa 80 mg/mL, per esempio 120 mg/mL.

La concentrazione di denosumab o di un altro anticorpo anti-RANKL umano, o relativa porzione legante l'antigene, per formulazioni aventi un pH da circa 5,0 a meno di 5,2 può essere contemplata per includere intervalli superiori a 70 mg/mL, o almeno 71 mg/mL, o almeno circa 75 mg/mL, o almeno circa 80 mg/mL, o almeno circa 85 mg/mL, o

almeno circa 90 mg/mL, o almeno circa 95 mg/mL, o almeno circa 100 mg/mL, o almeno circa 105 mg/mL, o almeno circa 110 mg/mL, o almeno circa 115 mg/mL, o almeno circa 120 mg/mL, e fino a circa 200 mg/mL. Per esempio intervalli contemplati includono, da 71 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 180 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 160 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 150 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 140 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 130 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 120 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 110 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 100 mg/mL, o da circa 75 mg/mL a circa 90 mg/mL, o da circa 120 mg/mL a circa 200 mg/mL, o da circa 120 mg/mL a circa 180 mg/mL, o da circa 120 mg/mL a circa 160 mg/mL, o da circa 120 mg/mL a circa 140 mg/mL, per esempio 120 mg/mL.

La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere l'anticorpo, o relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione maggiore di 70 mg/mL, ad esempio, maggiore di 80 mg/mL, maggiore di 90 mg/mL, maggiore di 100 mg/mL, maggiore di 125 mg/mL, maggiore di 150 mg/mL, maggiore di 175 mg/mL, maggiore di 200 mg/mL, maggiore di 225 mg/mL, maggiore di 250 mg/mL, maggiore di 275 mg/mL. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere l'anticorpo, o relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione inferiore a circa 300 mg/mL, ad esempio, inferiore a circa 275 mg/mL, inferiore a circa 250 mg/mL, inferiore a circa 225 mg/mL, inferiore a circa 200 mg/mL, inferiore a circa 175 mg/mL o inferiore a circa 150 mg/mL.

La concentrazione dell'anticorpo, o della relativa porzione legante l'antigene, nelle formulazione è in un intervallo da circa 10 mg/mL a circa 300 mg/mL, ad esempio, da circa 25 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 50 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 75 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 125 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 150 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 175 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 200 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 225 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 250 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 275 mg/mL a circa 300 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 275 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 250 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 225 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 200 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 175 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 150 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 125 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 100 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 75 mg/mL, da circa 10 mg/mL a circa 50 mg/mL o da circa 10 mg/mL a circa 25 mg/mL. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere una concentrazione dell'anticorpo o della relativa porzione legante l'antigene, in un intervallo da maggiore di 70 mg/mL a circa 300 mg/mL, ad esempio, da maggiore di 80 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 90 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 100 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 125 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 150 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 175 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 200 mg/mL a circa 300 mg/mL, da maggiore di 70 mg/mL a circa 275 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a circa 250 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a circa 225 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a

circa 200 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a circa 175 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a circa 150 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a circa 125 mg/mL, da maggiore di circa 70 mg/mL a circa 100 mg/mL. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere una concentrazione dell'anticorpo o della relativa porzione legante l'antigene in un intervallo da circa 100 a circa 140 mg/mL, ad esempio, circa 110 mg/mL, circa 120 mg/mL, circa 130 mg/mL. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere una concentrazione dell'anticorpo o della relativa porzione legante l'antigene che è circa 120 mg/mL  $\pm$  12 mg/mL, ad esempio, da circa 108 mg/mL a circa 132 mg/mL, da circa 115 mg/mL a circa 125 mg/mL, circa 116 mg/mL, circa 117 mg/mL, circa 118 mg/mL, circa 119 mg/mL, circa 120 mg/mL, circa 121 mg/mL, circa 122 mg/mL, circa 123 mg/mL, circa 124 mg/mL.

Denosumab e altri anticorpi monoclonali anti-RANKL umani e relative porzioni leganti l'antigene possono essere preparati secondo la descrizione fornita nella pubblicazione di brevetto internazionale WO 2003002713 A2.

Studi di formulazione su soluzioni di denosumab a concentrazione elevata (ad esempio 120 mg/mL), descritti di seguito, hanno mostrato un grande aumento della formazione di HMWS (velocità ed entità) al di sotto di pH 5 e specialmente a pH inferiore (ad esempio pH 4,5). Con l'aumento del pH, è stato mostrato un aumento della formazione delle specie dimeriche. Bilanciando i due effetti, è contemplato che una formulazione descritta qui avrà un pH in un

intervallo da circa 5,0 a meno di 5,2, o da circa 5,0 a circa 5,19, o da circa 5,0 a circa 5,15, o da circa 5,0 a circa 5,10, per esempio circa 5,0, circa 5,05, circa 5,1 o circa 5,15.

Gli studi descritti qui hanno mostrato anche che un effetto di stabilizzazione e riduzione dell'aggregazione indipendente è reso possibile mediante inclusione di un inibitore di aggregazione amminoacidico. Di conseguenza, è contemplato che quando è incluso un inibitore di aggregazione amminoacidico, il pH della formulazione può essere in un intervallo da circa 4,9 a circa 5,4, o da circa 5,0 a circa 5,4, o da circa 5,0 a circa 5,2, o da circa 5,0 a meno di 5,2, o da circa 5,0 a 5,19, o da circa 5,0 a circa 5,15, o da circa 5,0 a circa 5,10, per esempio circa 5,0, circa 5,05, circa 5,1, o circa 5,15, o circa 5,2.

La formulazione acquosa può essere tamponata. Quando usato, il tampone può essere un tampone organico. Il sistema tampone può essere centrato a 25 °C attorno a un pH da 4 a 5,5, o da 4,5 a 5,5, o da 4,5 a 5, per esempio. Per esempio, il sistema tampone può avere una pKa entro un'unità di pH da pH 5,0-5,2 a 25 °C. Un tale sistema tampone è acido acetico /acetato, avente una pKa da circa 4,75 a 25 °C. Un altro tale sistema tampone è acido glutammico / glutammato, avente una pKa da circa 4,27 a 25 °C. Altri sistemi tampone alternativi contemplati includono sistemi a base di ioni includenti succinato (pKa da 4,21 a 25 °C), propionato (pKa da 4,87 a 25 °C), malato (pKa da 5,13 a 25 °C), piridina (pKa da 5,23 a 25 °C) e piperazina (pKa da 5,33 a 25 °C). È contemplato che il tampone può essere fornito come sale di sodio (o sale

di disodio, come appropriato), o in alternativa come sale di potassio, magnesio o ammonio. I tamponi possono essere a base di acetato, citrato, succinato, fosfato e idrossimetilamminometano (Tris), per esempio. I tamponi a base di acetato, glutammato e succinato sono particolarmente contemplati, ad esempio acetato o glutammato.

Un confronto di formazione di HMWS mediante cromatografia liquida a ultra alta prestazione a esclusione dimensionale (SE-UHPLC) in formulazioni di denosumab 120 mg/mL aventi tamponi acetato o glutammato, ma altrimenti equivalenti, ha mostrato che non vi era differenza tra il tipo di tampone quando valutato per quattro settimane di conservazione a 37 °C.

Quando usato, il tampone sarà incluso in una quantità sufficiente per mantenere il pH selezionato della formulazione in condizioni di conservazione per la durata di conservazione del prodotto, ad esempio 3 anni a 4 °C, o 1 mese a 25 °C, o 2 settimane a 25 °C, o 7 giorni a 25 °C. La concentrazione del tampone può essere in un intervallo da circa 2 mM a circa 40 mM, o da circa 5 mM a circa 20 mM, o da circa 10 mM a circa 25 mM, o da circa 15 mM a circa 25 mM, per esempio 10 mM, o 15 mM, o 18 mM, o 25 mM. Per esempio, un tampone acetato usato con l'anticorpo monoclonale anti-RANKL (ad esempio denosumab) e fenilalanina può essere in un intervallo da circa 2 mM a circa 30 mM, o da circa 16 mM a circa 41 mM, o da circa 25 mM a circa 39 mM, o da circa 30 mM a circa 34 mM. Detto in un altro modo, un tampone di diafiltrazione usato per concentrare l'anticorpo fino a una concentrazione

maggiore di 70 mg/mL (ad esempio 120 mg/mL) può essere in un intervallo da 5 mM a circa 30 mM, o da circa 15 mM a circa 25 mM, o circa 20 mM. È anche contemplato fornire una formulazione stabilizzata con amminoacidi che è auto-tamponata. Il tampone può essere incluso in una quantità sufficiente per mantenere il pH selezionato della formulazione in condizioni di conservazione per la durata di conservazione del prodotto, ad esempio, 36 mesi a circa 2 °C - circa 8 °C, a cui fa seguito facoltativamente, circa 1 mese a circa 20 °C - circa 30 °C.

La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere un tampone, e facoltativamente, il tampone è centrato a 25 °C, in un intervallo da circa pH 4,0 a circa pH 5,5. Il tampone può avere una pKa entro un'unità di pH di pH 5,0-5,2 a 25 °C. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere da circa 5 mM a circa 60 mM di tampone, da circa 5 mM a circa 50 mM di tampone, o da circa 9 mM a circa 45 mM di tampone (ad esempio, da circa 15 mM a circa 30 mM di tampone, ad esempio, circa 20 mM, circa 25 mM di tampone). Il tampone può essere acetato o glutammato.

La formulazione può anche includere uno o più stabilizzanti contro l'aggregazione delle proteine e altri eccipienti di formulazione. Tali stabilizzanti ed eccipienti sono contemplati per includere, ma non sono limitati a, inibitori di aggregazione amminoacidici, modificatori di tonicità, tensioattivi, agenti solubilizzanti (ad esempio N-Metil-2-pirrolidone), PEG-coniugazione e ciclodestrine (ad esempio, Captisol®).

L'espressione "inibitore di aggregazione amminoacidico" si riferisce a un amminoacido o una combinazione di amminoacidi (ad esempio miscele, o dipeptidi, o oligopeptidi aventi 2 - 10 residui), dove qualsiasi amminoacido dato è presente nella sua forma di base libera o nella sua forma di sale (ad esempio arginina HCl), o un analogo amminoacidico, e che riduce HMWS o inibisce la formazione di HMWS. Sono contemplati i sali includenti sali di sodio, sali di potassio e sali di cloridrato. In aggiunta, sali di arginina con cloridrato, glutammato, butirrato e glicolato sono contemplati. Laddove si utilizza una combinazione di amminoacidi, tutti gli amminoacidi possono essere presenti nelle loro forme di base libera, tutti possono essere presenti nella loro forma di sale, o alcuni possono essere presenti nelle loro forme di base libera mentre altri sono presenti nelle loro forme di sale. In aggiunta a o in alternativa ai dipeptidi e oligopeptidi, possono essere usate le miscele di uno o più amminoacidi, ad esempio una miscela di arginina e fenilalanina. Solo un tipo di inibitore di aggregazione amminoacidico può essere presente nella formulazione farmaceutica acquosa. Solo un amminoacido può essere presente, ad esempio, solo L-arginina o solo L-fenilalanina possono essere presenti nella formulazione.

È contemplato l'uso di uno o più amminoacidi che portano una catena laterale carica, per esempio uno o più tra arginina, lisina, istidina, aspartato e glutammato. Gli amminoacidi possono essere selezionati tra amminoacidi basici, ad esempio, arginina, lisina, istidina o una relativa

combinazione. Arginina è contemplata in particolare. Qualsiasi stereoisomero (cioè, isomero L, D o DL) di un particolare amminoacido, o combinazioni di questi stereoisomeri, può essere usato nel presente metodo o formulazione fintanto che il particolare amminoacido è presente nella sua forma di base libera o nella sua forma di sale. Un L-stereoisomero è contemplato in particolare, ad esempio L-arginina. Facoltativamente l'amminoacido è uno avente una catena laterale con carica positiva, ad esempio arginina.

Facoltativamente, è contemplato l'uso di uno o più amminoacidi che hanno anelli aromatici nelle loro catene laterali, ad esempio fenilalanina, tirosina, triptofano o una relativa combinazione. Fenilalanina è contemplata in particolare.

Facoltativamente, è contemplato l'uso di uno o più amminoacidi idrofobi, per esempio alanina, isoleucina, leucina, fenilalanina, valina, prolina o glicina.

Facoltativamente, è contemplato l'uso di uno o più amminoacidi idrofobi alifatici, per esempio, alanina, isoleucina, leucina o valina. Leucina è contemplata in particolare.

Gli analoghi di amminoacidi che mostrano effetti di riduzione o inibizione dell'aggregazione possono anche essere usati nel presente metodo o formulazione. L'espressione "analogo amminoacidico" si riferisce a un derivato dell'amminoacido presente in natura. Analoghi contemplati includono per esempio, ammino- e N-monoetil- e n-acetil-derivati. Altri analoghi contemplati includono dipeptidi o oligopeptidi

aventi da 2 a 10 residui, ad esempio arginina-arginina e fenilalanina-arginina. Facoltativamente, è contemplato che n-acetil arginina e n-acetil lisina non saranno usati da soli, ma possono essere usati in combinazione con un altro inibitore di aggregazione amminoacidico. Come con gli amminoacidi, gli analoghi amminoacidici vengono usati nel presente metodo o formulazione o nella loro forma di base libera o nella loro forma di sale.

L'uno o più inibitori di aggregazione amminoacidici usati nel presente metodo o formulazione proteggono la proteina terapeuticamente attiva contro vari stress aumentando o/e mantenendo così la stabilità della proteina o formulazione contenente la proteina durante la durata della proteina (prima e durata la conservazione, prima dell'uso). Qui, il termine "stress" include ma non è limitato a calore, congelamento, pH, luce, agitazione, ossidazione, disidratazione, superfici, taglio, congelamento/scongelamento, pressione, metalli pesanti, composti fenolici, denaturanti, ecc., da qualsiasi fonte, ad esempio trasporto. Lo stress termico è contemplato in particolare. Il termine stress comprende qualsiasi fattore che modula (cioè riduce, mantiene o aumenta) la stabilità di una proteina o di una formulazione contenente la proteina. La stabilità aumentata e/o mantenuta con l'aggiunta di un inibitore di aggregazione amminoacidico avviene in modo concentrazione-dipendente. Cioè, l'aumento delle concentrazioni di inibitore di aggregazione amminoacidico porta a stabilità aumentata e/o mantenuta di una proteina o di una formulazione contenente una proteina

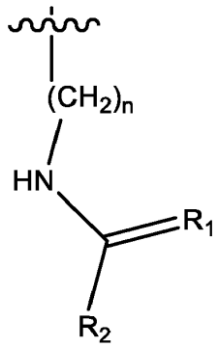
della presente divulgazione quando tale proteina o formulazione contenente tale proteina mostra normalmente una formazione di aggregati in assenza dell'inibitore di aggregazione amminoacidico. Come mostrato negli Esempi di seguito, l'inclusione di un inibitore di aggregazione amminoacidico nella formulazione può anche ridurre la quantità di HMWS già formati. Per esempio, tali inibitori di aggregazione amminoacidici includono arginina e il dipeptide arginina-fenilalanina. La determinazione della quantità di un particolare inibitore di aggregazione amminoacidico da usare nel presente metodo o formulazione per diminuire la formazione di aggregati aumentando così la stabilità delle proteine, e aumentando quindi la stabilità della formulazione durante l'intera durata della proteina, può essere facilmente determinata per denosumab o qualsiasi particolare anticorpo monoclonale anti-RANKL umano di interesse in vista della divulgazione qui.

È stato mostrato che la presenza di un inibitore di aggregazione amminoacidico nella formulazione riduce la quantità di specie dimeriche e la sua velocità cinetica di formazione. Per esempio, l'inclusione di arginina a una concentrazione di 75 mM in una formulazione di denosumab avente un pH di 5,2 ha determinato una riduzione di all'incirca 0,3% e 25% delle quantità delle specie dimeriche e la sua velocità cinetica di formazione, rispettivamente, dopo 1 mese a 37 °C rispetto a una formulazione simile senza arginina a un pH di 5,2. Al contrario, è stato trovato che un anticorpo monoclonale che non è un anticorpo monoclonale anti-RANKL umano non è stabilizzato

dall'inclusione di arginina, e invece ha determinato un aumento di HMWS. Di conseguenza, un altro metodo della divulgazione è un metodo di riduzione di HMWS in una formulazione di denosumab o un altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano mediante l'aggiunta di un inibitore di aggregazione amminoacidico, ad esempio arginina o fenilalanina.

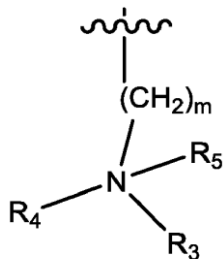
Di conseguenza, la formulazione farmaceutica acquosa può comprendere un inibitore di aggregazione amminoacidico, che facoltativamente è un amminoacido. L'amminoacido può essere un amminoacido L-stereoisomerico (L-amminoacido), sebbene amminoacidi D-stereoisomerici (D-amminoacidi) siano contemplati. L'inibitore di aggregazione amminoacidico può comprendere un amminoacido comprendente una catena laterale carica, qui indicato anche come "amminoacido carico". L'espressione "amminoacido carico" si riferisce a un amminoacido che comprende una catena laterale che è carica negativamente (cioè, de-protonata) o carica positivamente (cioè, protonata) in soluzione acquosa a pH fisiologico. Per esempio amminoacidi con carica negativa includono, per esempio, acido aspartico e acido glutammico, mentre amminoacidi con carica positiva includono, per esempio, arginina, lisina e istidina. Gli amminoacidi carichi includono gli amminoacidi carichi tra i 20 amminoacidi codificati, nonché gli amminoacidi atipici o non presenti in natura o non codificati. Di conseguenza, l'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere un amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva.

L'amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva può comprendere una struttura di catena laterale di Formula I o Formula II:



[Formula I]

in cui  $n$  è da 1 a 7, in cui ciascuno tra  $R_1$  e  $R_2$  è indipendente selezionato dal gruppo consistente in H, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchile, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchil)OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchil)NH<sub>2</sub>, NH, NH<sub>2</sub>(C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchil)SH, (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalchile, (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> eterociclico), (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> aril)R<sub>7</sub>, e (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub> eteroaril), in cui R<sub>7</sub> è H o OH, in cui facoltativamente uno tra R<sub>1</sub> e R<sub>2</sub> è un gruppo ammino libero (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>),



[Formula II]

in cui  $m$  è da 1 a 7, in cui ciascuno tra R<sub>3</sub> e R<sub>4</sub> è indipendente selezionato dal Gruppo A consistente in: H, C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchile, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchil)OH, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchil)NH<sub>2</sub>, (C<sub>1</sub>-C<sub>18</sub> alchil)SH, (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>)cicloalchile, (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>2</sub>-C<sub>5</sub> eterociclico), (C<sub>0</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub> aril)R<sub>8</sub>, e (C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub> alchil)(C<sub>3</sub>-C<sub>9</sub> eteroaril), in cui R<sub>8</sub> è H o OH, in cui, R<sub>5</sub> è

facoltativamente presente, e, quando presente, è selezionato dal Gruppo A, facoltativamente, in cui ciascuno tra  $R_3$  e  $R_4$  e  $R_5$  è H.

L'amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva può comprendere una struttura di catena laterale di Formula I e,  $n$  è in un intervallo da 2 a 4.  $R_1$  può essere NH o  $NH_2$ .  $R_2$  può essere  $NH_2$  o  $NH_3^+$ . L'amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva può essere arginina. L'amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva può comprendere una struttura di catena laterale di Formula II e,  $m$  è in un intervallo da 3 a 5. Ciascuno tra  $R_3$  e  $R_4$  può essere H.  $R_5$  può essere presente, e facoltativamente è H. L'amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva può essere lisina. L'amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva è presente nella formulazione come un sale, facoltativamente, un sale cloridrato (HCl). Di conseguenza, la composizione farmaceutica acquosa può comprendere L-arginina HCl o L-lisina HCl.

L'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere un amminoacido aromatico. L'amminoacido aromatico può comprendere un fenile o un indolo. L'amminoacido aromatico può comprendere una catena  $C_1$ - $C_6$  alchile (ad esempio, una catena  $C_1$ - $C_3$  alchile) tra il carbonio alfa e il fenile o indolo. L'amminoacido aromatico può essere L-fenilalanina. L'amminoacido aromatico può essere L-triptofano.

L'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere un amminoacido idrofobo. L'idrofobicità può essere misurata o classificata

secondo una qualsiasi delle scale di idrofobicità note nell'arte. In generale, più positivo è il punteggio, più idrofobo è l'amminoacido. L'idrofobicità può essere classificata sulla scala di idrofobicità di Kyte e Doolittle (Kyte J, Doolittle RF (maggio 1982). "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". J. Mol. Biol. 157 (1): 105-32.) L'amminoacido idrofobo può avere un punteggio maggiore di circa 2,5 sulla scala di idrofobicità di Kyte e Doolittle. L'amminoacido idrofobo può comprendere una catena laterale comprendente un C<sub>2</sub> - C<sub>12</sub> alchile, ramificato o a catena lineare, o un C<sub>4</sub> - C<sub>8</sub> cicloalchile, un C<sub>4</sub> - C<sub>8</sub> eterociclo comprendente un eteroatomo azoto, facoltativamente, in cui l'eterociclo è un imidazolo, pirrolo o indolo. Per gli scopi qui, il termine "cicloalchile" comprende qualsiasi ciclo di carbonio, inclusi bi-cicli o tri-cicli di carbonio.

L'amminoacido idrofobo può comprendere un C<sub>3</sub> - C<sub>8</sub> alchile, facoltativamente, l'amminoacido idrofobo comprende un C<sub>3</sub> alchile ramificato o C<sub>4</sub> alchile ramificato. L'amminoacido idrofobo può essere L-valina, L-leucina o L-iso-leucina.

L'inibitore di aggregazione amminoacidico è usato in una quantità efficace per fornire stabilità aumentata, e può essere usato a una concentrazione in un intervallo da circa 10 mM a circa 200 mM, per esempio un intervallo da circa 30 mM a circa 120 mM, o da circa 38 mM a circa 150 mM, o da circa 38 mM a circa 113 mM, o da circa 38 mM a circa 75 mM, per esempio circa 10 mM, circa 38 mM, circa 75 mM, circa 113 mM o circa 150 mM. La formulazione farmaceutica acquosa può

comprendere l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 5 mM a circa 300 mM, facoltativamente, inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 25 mM a circa 90 mM. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 5 mM a circa 150 mM (ad esempio, da circa 10 mM a circa 150 mM, da circa 15 mM a circa 150 mM, da circa 20 mM a circa 150 mM, da circa 25 mM a circa 150 mM, da circa 5 mM a circa 140 mM, da circa 5 mM a circa 130 mM, da circa 5 mM a circa 120 mM, da circa 5 mM a circa 110 mM, da circa 5 mM a circa 100 mM, da circa 5 mM a circa 90 mM), quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva, facoltativamente, L-arginina. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 30 mM a circa 80 mM (ad esempio, circa 35 mM, circa 40 mM, circa 45 mM, circa 50 mM, circa 55 mM, circa 60 mM, circa 65 mM, circa 70 mM, circa 75 mM), quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva, facoltativamente, L-arginina.

La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 5 mM a circa 180 mM (ad esempio, da circa 10 mM a circa 180 mM, da circa 15 mM a circa 180 mM, da circa 20 mM a circa 180 mM, da circa 25 mM a circa 180 mM, da circa 5 mM a circa 170 mM, da circa 5 mM a circa 170 mM, da circa 5 mM a circa 160 mM, da circa 5 mM a circa 150 mM, da circa 5 mM a

circa 140 mM, da circa 5 mM a circa 130 mM, da circa 5 mM a circa 120 mM, da circa 5 mM a circa 110 mM), quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido aromatico, facoltativamente, L-fenilalanina. La formulazione farmaceutica acquosa può comprendere l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 5 mM a circa 100 mM (ad esempio, circa 10 mM, circa 15 mM, circa 20 mM, circa 25 mM, circa 30 mM, circa 35 mM, circa 40 mM, circa 45 mM, circa 50 mM, circa 55 mM, circa 60 mM, circa 65 mM, circa 70 mM, circa 75 mM, circa 80 mM, circa 85 mM, circa 90 mM, circa 95 mM), facoltativamente, l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 20 mM a circa 50 mM, quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido aromatico, facoltativamente, L-fenilalanina.

Facoltativamente, la formulazione farmaceutica acquosa comprende l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 5 mM a circa 300 mM, quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido idrofobo, facoltativamente, L-valina, L-isoleucina o L-leucina. Facoltativamente, la formulazione farmaceutica acquosa comprende l'inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 5 mM a circa 200 mM (ad esempio, da circa 10 mM a circa 200 mM, da circa 20 mM a circa 200 mM, da circa 30 mM a circa 200 mM, da circa 40 mM a circa 200 mM, da circa 50 mM a circa 200 mM, da circa 60 mM a circa 200 mM, da circa 70 mM a circa 200 mM, da circa 80 mM a circa 200 mM, da circa 90 mM a circa 200 mM, da circa 100 mM a circa 200 mM, da circa 5 mM a circa 290 mM, da circa 5 mM a circa 280 mM, da circa

5 mM a circa 270 mM, da circa 5 mM a circa 260 mM, da circa 5 mM a circa 250 mM, da circa 5 mM a circa 240 mM, da circa 5 mM a circa 230 mM, da circa 5 mM a circa 220 mM, da circa 5 mM a circa 210 mM), facoltativamente, inibitore di aggregazione amminoacidico da circa 20 mM a circa 50 mM, quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido idrofobo, facoltativamente, L-valina, L-isoleucina o L-leucina. La composizione farmaceutica acquosa può comprendere: L-arginina cloridrato da circa 30 mM a circa 80 mM; L-fenilalanina da circa 20 mM a circa 50 mM; L-triptofano da circa 20 mM a circa 50 mM; L-lisina cloridrato circa 30 mM a circa 80 mM; L-leucina circa 20 mM a circa 50 mM; L-isoleucina da circa 20 mM a circa 50 mM; L-valina da circa 20 mM a circa 50 mM; o qualsiasi relativa combinazione.

La concentrazione dell'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere in rapporto molare con l'anticorpo. Il rapporto molare tra l'inibitore di aggregazione amminoacidico e l'anticorpo anti-RANKL può essere da circa 10 a circa 200 (ad esempio, da circa 25 a circa 150, da circa 50 a circa 100), quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido aromatico, facoltativamente, L-fenilalanina. Facoltativamente, il rapporto molare è da circa 20 a circa 90. Il rapporto molare tra l'inibitore di aggregazione amminoacidico e l'anticorpo anti-RANKL può essere circa da 20 a 300, quando l'inibitore di aggregazione amminoacidico è un amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva, facoltativamente, L-arginina. Facoltativamente, il rapporto molare è da circa 45 a circa 180.

I tensioattivi sono agenti attivi di superficie che sono anfipatici (aventi una testa polare e una coda idrofoba). I tensioattivi preferenzialmente si accumulano in corrispondenza delle interfacce, determinando una tensione interfacciale ridotta. Un tensioattivo può facoltativamente essere incluso nella formulazione. L'uso di un tensioattivo può anche aiutare a mitigare la formazione di grandi particelle proteinacee.

Il tensioattivo può essere un tensioattivo non ionico. Esempi includono esteri di acidi grassi poliossietilen sorbitano (ad esempio polisorbato 20, polisorbato 80), alchilaril polieteri, ad esempio alchilfenolo ossietilato (ad esempio Triton™ X-100), e polossameri (ad esempio Pluronic®, ad esempio Pluronic® F68), e combinazioni di qualsiasi dei precedenti, all'interno di una classe di tensioattivi o tra classi di tensioattivi. Polisorbato 20 e polisorbato 80 sono in particolare contemplati.

Una concentrazione di tensioattivo in un intervallo di circa da 0,004% (p/v) a circa 0,1% (p/v) (ad esempio, per polisorbato 20 o polisorbato 80) è adatta, per esempio da circa 0,004% a circa 0,05%, o da circa 0,004% a circa 0,02%, o circa 0,01%. La formulazione può comprendere almeno circa 0,004% (p/v) di tensioattivo, e facoltativamente, meno di circa 0,15% (p/v). Da circa 0,005% (p/v) a circa 0,015% (p/v) di tensioattivo può essere presente nella formulazione, facoltativamente, circa 0,005% (p/v), circa 0,006% (p/v), circa 0,007%

(p/v), circa 0,008% (p/v), circa 0,009% (p/v), circa 0,010% (p/v), circa 0,011% (p/v), circa 0,012% (p/v), circa 0,013% (p/v), o circa 0,014% (p/v).

La formulazione acquosa stabilizzata può essere adatta per la somministrazione mediante qualsiasi via accettabile, inclusa parenterale, e specificamente sottocutanea. Per esempio, la somministrazione sottocutanea può essere al braccio superiore, alla coscia superiore o all'addome. Altre vie includono endovenosa, intradermica, intramuscolare, intraperitoneale, intranodale e intrasplenica, per esempio. La via sottocutanea è preferita.

Se la soluzione è in una forma destinata alla somministrazione a un soggetto, può essere realizzata per essere isotonica con il sito di somministrazione previsto. Per esempio, l'osmolalità può essere in un intervallo da circa 270 a circa 350 mOsm/kG, o da circa 285 a circa 345 mOsm/kG, o da circa 300 a circa 315 mOsm/kG. Per esempio, se la soluzione è in una forma destinata alla somministrazione parenterale, può essere isotonica con il sangue (osmolalità di circa 300 mOsm/kG). La formulazione farmaceutica acquosa può avere un'osmolalità in un intervallo da circa 200 mOsm/kg a circa 500 mOsm/kg, o da circa 225 mOsm/kg a circa 400 mOsm/kg, o da circa 250 mOsm/kg a circa 350 mOsm/kg.

La formulazione farmaceutica acquosa può avere una conduttività in un intervallo da circa 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a circa 5500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , facoltativamente, in cui la conduttività è in un intervallo da circa 2500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a circa 5500  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , quando la formulazione comprende un

amminoacido comprendente una catena laterale con carica positiva, o in un intervallo da circa 500  $\mu\text{S}/\text{cm}$  a circa 2000  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , quando la formulazione comprende un amminoacido aromatico o è priva di inibitore di aggregazione amminoacidico. La formulazione farmaceutica acquosa può avere una viscosità che è non più di circa 6 cP a 5 °C, facoltativamente, in cui la viscosità è da circa 4,5 cP a circa 5,5 cP. La formulazione farmaceutica acquosa può avere una viscosità che è inferiore a circa 13 cP a 25 °C, facoltativamente, circa 2,0 cP a circa 10 cP, facoltativamente, circa 2,5 cP a circa 4 cP.

I modificatori di tonicità, o agenti regolanti la tonicità sono noti nell'arte, e includono i composti come sali (ad esempio, cloruro di sodio, cloruro di potassio, cloruro di calcio, fosfato di sodio, fosfato di potassio, bicarbonato di sodio, carbonato di calcio, sodio lattato), zuccheri (ad esempio, destrano, destrosio, lattosio, trealosio), e alditoli (ad esempio, mannitolo, sorbitolo, xilitolo, glicerolo, propilenglicole). Il modificatore di tonicità può essere selezionato dal gruppo consistente in: sorbitolo, mannitolo, saccarosio, trealosio, glicerolo e relative combinazioni. Il modificatore di tonicità può essere sorbitolo. Il sorbitolo può essere usato, ad esempio a una concentrazione in un intervallo da 0,1% (p/v) a 5% (p/v), o da 1,2% (p/v) a 5% (p/v), per esempio 3,6% (p/v), 4,6% (p/v) o 4,7% (p/v). Facoltativamente, la formulazione comprende da circa 1,0% (p/p) a circa 5,0% (p/p) di modificatore di tonicità. Per esempio, la formulazione comprende da circa 2,0% (p/p) a circa 5,0% (p/p) di sorbitolo, o da circa 3,5% (p/p) a circa 5,0% (p/p) di sorbitolo, o da circa

4,0% (p/p) a circa 5,0% (p/p) di sorbitolo. Facoltativamente, la formulazione non comprende alcun sorbitolo o è priva di sorbitolo. Facoltativamente, la formulazione non comprende alcun modificatore di tonicità.

Altri eccipienti noti nell'arte possono essere usati nella formulazione, purché essi non influenzino negativamente la stabilità. Zuccheri e polioli possono essere usati per proteggere le proteine dall'aggregazione, incluso fornire stabilità di congelamento/scongelo. Tali composti includono sorbitolo, mannitolo, glicerolo, eritritolo, caprilato, triptofanoato, sarcoside, e glicina. Possono anche essere usati stabilizzanti per la preparazione di preparazioni liofilizzate, per esempio zuccheri stabilizzanti, ad esempio disaccaridi come trealosio e saccarosio. Una preparazione liofilizzata può anche includere un agente di carica, come è noto nell'arte. Altri eccipienti noti nell'arte per la stabilizzazione delle proteine includono, agenti solubilizzanti (ad esempio N-Metil-2-pirrolidone), polietilenglicole (PEG) e ciclodestrine (ad esempio, Captisol®). Acidi e basi farmaceuticamente accettabili possono essere usati per regolare il pH della soluzione, ad esempio idrossido di sodio.

Per la somministrazione parenterale, la formulazione può essere sotto forma di una soluzione acquosa sterile, accettabile per via parenterale, apirogena, una soluzione acquosa comprendente denosumab o un altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano, con o senza agenti terapeutici aggiuntivi, in un veicolo farmaceuticamente

accettabile. Un veicolo per iniezione parenterale può essere acqua distillata sterile in cui denosumab o un altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano, con o senza almeno un agente terapeutico aggiuntivo, viene formulato come soluzione isotonica sterile. La formulazione conterrà eccipienti farmaceuticamente accettabili, ad esempio eccipienti di grado USP (Pharmacopeia degli Stati Uniti).

Un "conservante" è un composto che può essere incluso in una formulazione farmaceutica per ridurre l'azione batterica, per esempio facilitando così la produzione di una formulazione multiuso. Esempi di conservanti includono ottadecildimetilbenzile, cloruro di ammonio, cloruro di esametonio, cloruro di benzalconio (una miscela di cloruri di alchilbenzildimetilammonio in cui i gruppi alchile sono composti a catena lunga), e cloruro di benzetonio. Altri tipi di conservanti includono alcoli aromatici, inclusi fenolo, butil- e benzilalcol, alchilparabeni, inclusi metil- e propilparabene, catecolo, resorcinolo, cicloesano, 3-pentanol e m-cresolo. In alternativa, la formulazione può essere priva di conservanti. Per esempio, la formulazione quando presentata in una forma di dosaggio monouso può essere priva di conservanti.

Sebbene la formulazione sia stata descritta qui nella sua forma acquosa, la formulazione stabilizzata può anche essere successivamente liofilizzata per preparare un liofilizzato. Di conseguenza, a meno che il contesto non indichi altrimenti, i riferimenti alla formulazione e il suo metodo d'uso sono contemplati per includere un liofilizzato risultante dalla soluzione acquosa stabilizzata.

La formulazione farmaceutica da usare per la somministrazione in vivo è tipicamente sterile. Ciò può essere conseguito mediante filtrazione attraverso membrane per filtrazione sterili. Le composizioni parenterali generalmente possono essere poste in un contenitore avente una porta di accesso sterile, ad esempio una sacca o una fiala di soluzione endovenosa, aventi un tappo perforabile mediante un ago per iniezione ipodermica o una siringa preriempita. La formulazione può essere conservata in una forma pronta per l'uso o in una forma (ad esempio liofilizzata) che viene ricostituita o diluita prima della somministrazione.

Sono qui descritti kit per la produzione di un'unica unità di somministrazione a dose singola. I kit possono ciascuno contenere sia un primo contenitore avente una preparazione essiccata di denosumab o altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano realizzato da una soluzione formulazione descritta qui, che un secondo contenitore avente acqua sterile o una soluzione acquosa. I kit possono contenere siringhe pre-riempite a camera singola e multipla (ad esempio siringhe liquide e liosiringhe).

La formulazione stabilizzata descritta qui può essere usata insieme a uno o più agenti terapeutici aggiuntivi, ad esempio calcio e un composto di vitamina D. La formulazione stabilizzata descritta qui può essere somministrata a un paziente che riceve una terapia con un agente terapeutico aggiuntivo, oppure la formulazione stabilizzata descritta qui può essere co-somministrata con un agente terapeutico aggiuntivo.

La formulazione stabilizzata può essere usata per prevenire o trattare qualsiasi malattia che risponde a denosumab o un altro anticorpo monoclonale anti-RANKL umano, o una relativa porzione legante l'antigene. Tali usi e metodi correlati includono, ma non sono limitati a, le divulgazioni descritte di seguito.

La formulazione può essere usata per prevenire un evento scheletrico (SRE) in un paziente che ne ha bisogno, inclusa la somministrazione di una quantità efficace di una formulazione stabilizzata descritta qui. SRE può essere selezionato dal gruppo consistente in una frattura patologica, radioterapia all'osso, intervento chirurgico sull'osso e compressione del midollo spinale, per esempio. Il paziente può avere una metastasi ossea da un tumore solido. Il tumore solido può essere uno o più tra cancro della mammella, cancro della prostata, cancro polmonare, cancro polmonare non a piccole cellule e carcinoma a cellule renali, per esempio. La quantità della formulazione può essere efficace per ridurre il marcatore di turnover osseo telopeptide N-terminale urinario corretto per la creatinina (uNTx/Cr), facoltativamente di almeno l'80%. Il paziente può essere un paziente con mieloma multiplo.

La formulazione può essere usata per trattare un paziente con tumore a cellule giganti dell'osso, includendo la somministrazione di una quantità efficace di una formulazione stabilizzata descritta qui. Il paziente può avere un tumore a cellule giganti dell'osso che è ricorrente, non resecabile, o per il quale la resezione chirurgica è probabile che determini

una grave morbidità. Il paziente può essere un adulto o un adolescente con scheletro maturo, per esempio.

La formulazione può essere usata per trattare un paziente con ipercalcemia dell'osso di natura maligna, includendo la somministrazione di una quantità efficace di una formulazione stabilizzata descritta qui. La neoplasia maligna può essere refrattaria alla terapia con bisfosfonato. Il metodo o l'uso può includere la somministrazione di una quantità della formulazione efficace per ridurre o mantenere il calcio sierico del paziente a un livello inferiore o uguale circa 11,5 mg/dL.

La formulazione può essere usata per trattare osteoporosi in un paziente che ne ha bisogno, includendo la somministrazione di una quantità efficace di una formulazione stabilizzata descritta qui. Per esempio, il paziente può essere una donna in post menopausa ad alto rischio di frattura. Il paziente può essere un uomo ad alto rischio di frattura.

La formulazione può essere usata per aumentare la massa ossea in un paziente che ne ha bisogno, includendo la somministrazione di una quantità efficace di una formulazione stabilizzata descritta qui. Per esempio, la quantità della formulazione somministrata può essere una quantità efficace per diminuire l'incidenza di nuove fratture vertebrali e/o fratture non vertebrali. La quantità della formulazione somministrata può essere una quantità efficace per diminuire il riassorbimento osseo. La quantità della formulazione può essere una quantità efficace per aumentare la densità ossea nel paziente in almeno un'area selezionata

tra colonna lombare, anca complessiva e collo femorale. La quantità della formulazione può essere una quantità efficace per aumentare la massa ossea nell'osso corticale e/o osso trabecolare del paziente. La quantità della formulazione può essere una quantità efficace per ridurre il marcatore di riassorbimento osseo sierico C-telopeptide (CTX) di tipo 1. Il paziente che ne ha bisogno può avere facoltativamente l'osteoporosi. Il paziente che ne ha bisogno può essere una donna ad alto rischio di frattura che riceve terapia con inibitore di aromatasi adiuvante per cancro della mammella. Il paziente che ne ha bisogno può essere un uomo ad alto rischio di frattura che riceve terapia di deprivazione androgenica per cancro della prostata non metastatico. Il paziente che ne ha bisogno può essere un uomo con osteoporosi ad alto rischio di frattura.

La formulazione può essere usata come trattamento adiuvante per donne in post-menopausa con cancro della mammella allo stadio precoce ad alto rischio di recidiva della malattia che riceve terapia antitumorale con adiuvante/neoadiuvante.

La formulazione può essere usata come trattamento di prima linea di pazienti con cancro polmonare non a piccole cellule metastatico in combinazione con chemioterapia a base di platino.

La formulazione può essere usata per il trattamento di stenosi subglottica idiopatica (ISS).

La formulazione può essere usata per la prevenzione di cancro della mammella e cancro ovarico in donne sane con mutazione di BRCA-1.

Facoltativamente, la formulazione può essere usata in combinazione con un inibitore di checkpoint immunitario. Facoltativamente, l'inibitore di checkpoint immunitario è specifico per una proteina che funziona in una via di checkpoint immunitario, ad esempio, per esempio, CTLA4, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7H4, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 o TIM3. Facoltativamente, l'inibitore di checkpoint immunitario è un anticorpo, relativo frammento legante l'antigene, o un prodotto proteico anticorpale specifico per CTLA4, LAG3, PD-1, PD-L1, PD-L2, B7-H3, B7H4, BTLA, SLAM, 2B4, CD160, KLRG-1 o TIM3. Tali inibitori di checkpoint immunitario includono ma non sono limitati a: atezolizumab, avelumab, ipilimumab, tremelimumab, BMS-936558, MK3475, CT-011, AM-224, MDX-1105, IMP321, MGA271. Inibitori di PD-1 includono, per esempio, pembrolizumab e nivolumab. Gli inibitori di PD-L1 includono, per esempio, atezolizumab, avelumab e durvalumab. Inibitori di CTLA4 includono, ad esempio, ipilimumab. La formulazione può essere usata per trattare pazienti con melanoma con metastasi ossee, facoltativamente in combinazione con un anticorpo anti-PD-1 (ad esempio, nivolumab, pembrolizumab). La formulazione può essere usata per trattare pazienti con cancro della mammella, facoltativamente, in combinazione con un inibitore CTLA4, come ipilimumab.

La formulazione può essere usata per trattare tumori ricchi di cellule giganti, ad esempio in iperparatiroidismo o con una cisti ossea aneurismatica secondaria.

La formulazione può essere usata per trattare cancro della prostata resistente alla castrazione metastatico (mCRPC) progressivo. La formulazione può essere usata per trattare cancro della prostata sensibile alla castrazione. La formulazione può essere usata per trattare cancro della prostata resistente agli ormoni.

La formulazione può essere usata per trattare cancro della mammella metastatico (mBC). La formulazione può essere usata per trattare cancro della mammella pre-operatorio. La formulazione può essere usata per trattare cancro della mammella precoce. La formulazione può essere usata per trattare cancro della mammella primitivo negativo ai recettori ormonali, RANK-positivo o RANK-negativo. La formulazione può essere usata per trattare cancro della mammella HER2 negativo post-menopausa.

La formulazione può essere usata per trattare la sindrome mielodisplastica, ad esempio in un paziente anziano.

La formulazione può essere usata per trattare la perdita ossea indotta da trattamento antitumorale (CTIBL).

La formulazione può essere usata per trattare un tumore uterino della cervice.

La formulazione può essere usata per indurre effetti immunomodulatori in pazienti con o senza immunoterapia.

La formulazione può essere usata per prevenire o trattare perdita ossea associata a osteoporosi, malattia di Paget, osteomielite, ipercalcemia, osteopenia, osteonecrosi e artrite reumatoide. La

formulazione può essere usata per prevenire o trattare condizioni infiammatorie con perdita ossea. La formulazione può essere usata per prevenire o trattare condizioni autoimmuni con perdita ossea. La formulazione può essere usata per prevenire o trattare la perdita ossea associata a cancro, inclusi cancro della mammella, prostata, tiroide, del rene, polmone, dell'esofago, rettale, della vescica, cervicale, ovarico, del fegato e gastrointestinale, mieloma multiplo, linfoma e malattia di Hodgkin.

La formulazione può essere somministrata su qualsiasi programma temporale adatto. Lo schema di somministrazione può essere una volta ogni quattro settimane. Facoltativamente, la somministrazione può includere una somministrazione nei giorni 8 e 15 del primo mese di terapia. La somministrazione può essere su un programma di una volta ogni sei mesi. Un programma di una volta ogni sei mesi è contemplato per uso con osteoporosi e per aumentare la massa ossea, per esempio. Altre dosi di mantenimento contemplate sono ogni 3 settimane, ogni 3 mesi e ogni 6 settimane.

La formulazione farmaceutica acquosa può essere usata per trattare un paziente con mieloma multiplo o una metastasi ossea di un tumore solido. La formulazione può essere somministrata a una dose di circa 120 mg ogni 4 settimane come iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio, della coscia o dell'addome.

La formulazione farmaceutica acquosa può essere usata per trattare un paziente con un tumore a cellule giganti dell'osso. La

formulazione può essere somministrata a una dose di circa 120 mg ogni 4 settimane con dosi aggiuntive di 120 mg nei giorni 8 e 15 del primo mese di terapia. La formulazione può essere somministrata per via sottocutanea nella parte superiore del braccio, della coscia o dell'addome del paziente. Il calcio e la vitamina D possono essere somministrati al paziente per trattare o prevenire l'ipocalcemia.

La formulazione farmaceutica acquosa può essere usata per trattare un paziente con ipercalcemia di natura maligna. La formulazione può essere somministrata a una dose di circa 120 mg ogni 4 settimane con dosi aggiuntive di 120 mg nei giorni 8 e 15 del primo mese di terapia. La formulazione può essere somministrata per via sottocutanea nella parte superiore del braccio, della coscia o dell'addome.

La formulazione farmaceutica acquosa può essere usata per trattare donne in post menopausa con osteoporosi ad alto rischio di frattura, o usata per aumentare la massa ossea in uomini ad alto rischio di frattura che ricevono terapia di deprivazione androgenica per cancro della prostata non metastatico o in donne ad alto rischio di frattura che ricevono terapia con inibitore di aromatasi adiuvante per cancro della mammella. La formulazione farmaceutica acquosa può essere somministrata da un professionista sanitario e a una dose di 60 mg ogni 6 mesi come iniezione sottocutanea nella parte superiore del braccio, della coscia o dell'addome. Il paziente può anche essere istruito per assumere 1000 mg di calcio giornalmente e almeno 400 IU di vitamina D giornalmente.

Un tipo di formulazione secondo la divulgazione conterrà denosumab, acetato e arginina. L'arginina è facoltativamente L-arginina. L'arginina è facoltativamente L-arginina cloridrato. La formulazione può facoltativamente includere sorbitolo. La formulazione può facoltativamente includere polisorbato. Il polisorbato può facoltativamente essere polisorbato 20. Il pH può facoltativamente essere da circa 5,0 a circa 5,2, o inferiore a 5,2.

Un altro tipo di formulazione secondo la divulgazione conterrà denosumab, acetato e fenilalanina. La formulazione può facoltativamente includere sorbitolo. La formulazione può facoltativamente includere polisorbato. Il polisorbato può facoltativamente essere polisorbato 20. Il pH può facoltativamente essere da circa 5,0 a circa 5,2, o inferiore a 5,2. Per esempio, la formulazione può includere denosumab a una concentrazione da circa 108 mg/mL a circa 132 mg/mL, acetato da circa 28,8 mM a circa 35,2 mM, fenilalanina da 33,3 mM a circa 40,7 mM, sorbitolo da 3,51% (p/v) a circa 4,29% (p/v) e polisorbato 20 da circa 0,009% (p/v) a circa 0,011% (p/v), a pH 5,1, e facoltativamente può essere contenuta in una PFS, facoltativamente contenente circa 1 mL o meno di circa 1 mL (ad esempio, circa 0,5 mL) della formulazione. Per esempio, la formulazione può includere denosumab a una concentrazione di 120 mg/mL, 32 mM acetato, fenilalanina 37 mM, sorbitolo 3,9% (p/v), e polisorbato 20 0,01% (p/v), a pH 5,1, e facoltativamente può essere contenuta in una PFS, facoltativamente contenente circa 1 mL o meno di circa 1 mL (ad esempio

circa 0,5 mL) della formulazione. La formulazione può essere realizzata concentrando denosumab usando un tampone di diafiltrazione contenente acetato 20 mM, sorbitolo 4,2% (p/v) e fenilalanina 40 mM a pH 4,7.

Un altro tipo di formulazione secondo la divulgazione conterrà denosumab, glutammato e arginina. L'arginina è facoltativamente L-arginina. L'arginina è facoltativamente L-arginina cloridrato. La formulazione può facoltativamente includere sorbitolo. La formulazione può facoltativamente includere polisorbato. Il polisorbato può facoltativamente essere polisorbato 20. Il pH può facoltativamente essere da circa 5,0 a circa 5,2, o inferiore a 5,2.

Un altro tipo di formulazione secondo la divulgazione conterrà denosumab, acetato, arginina e fenilalanina. La formulazione può facoltativamente includere sorbitolo. La formulazione può facoltativamente includere polisorbato. Il polisorbato può facoltativamente essere polisorbato 20. Il pH può facoltativamente essere da circa 5,0 a circa 5,2, o inferiore a 5,2.

Un altro tipo di formulazione secondo la divulgazione conterrà denosumab, glutammato, arginina e fenilalanina. L'arginina è facoltativamente L-arginina. L'arginina è facoltativamente L-arginina cloridrato. La formulazione può facoltativamente includere sorbitolo. La formulazione può facoltativamente includere polisorbato. Il polisorbato può facoltativamente essere polisorbato 20. Il pH può facoltativamente essere da circa 5,0 a circa 5,2, o inferiore a 5,2.

Le formulazioni secondo la divulgazione possono essere realizzate mediante qualsiasi metodo adatto. In un tipo di metodo, una soluzione contenente un anticorpo monoclonale anti-RANKL (ad esempio, denosumab) può essere preparato a una concentrazione inferiore a 70 mg/mL, una quantità adatta dell'inibitore di aggregazione amminoacidico descritto qui può essere aggiunta alla soluzione, e poi la soluzione può essere concentrata fino a una quantità maggiore di 70 mg/mL descritta qui, ad esempio 120 mg/mL. Facoltativamente, la soluzione può essere prima sovra-concentrata, cioè fino a una concentrazione di anticorpo monoclonale anti-RANKL (ad esempio, denosumab) maggiore della concentrazione obiettivo finale, e poi la soluzione sovra-concentrata può essere diluita, ad esempio con una soluzione tampone con pH regolato, fino alla concentrazione e pH obiettivi finali. Per esempio, la sovra-concentrazione può determinare una quantità di anticorpo monoclonale anti-RANKL (ad esempio, denosumab) in un intervallo da 130 mg/mL a 300 mg/mL o da 180 mg/mL a 300 mg/mL. La concentrazione iniziale di denosumab prima della concentrazione non è particolarmente limitata, e può essere, per esempio circa 1 mg/mL, o circa 2 mg/mL, o circa 5 mg/mL, o circa 8 mg/mL, o circa 10 mg/mL, o circa 20 mg/mL, o circa 30 mg/mL, o circa 40 mg/mL, o da circa 50 mg/mL, o circa 60 mg/mL, o circa 70 mg/mL, o in un intervallo compreso tra tali concentrazioni, ad esempio da circa 1 mg/mL a circa 70 mg/mL, o da circa 1 mg/mL a circa 10 mg/mL.

La concentrazione della formulazione può essere eseguita mediante qualsiasi metodo adatto. Il processo di concentrazione può includere centrifugazione. Il processo di concentrazione può includere ultrafiltrazione.

L'introduzione dell'inibitore di aggregazione amminoacidico nella formulazione può essere eseguita mediante qualsiasi processo adatto. Per esempio, l'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere introdotto nella formulazione tramite semplice aggiunta (addizione) nella formulazione, ad esempio come descritto negli Esempi di seguito. In un altro metodo, l'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere introdotto nella formulazione tramite diafiltrazione contro una soluzione tampone contenente l'inibitore di aggregazione amminoacidico, ad esempio come descritto negli Esempi di seguito. L'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere introdotto nella formulazione prima o dopo la concentrazione dell'anticorpo monoclonale anti-RANKL oltre 70 mg/mL. Come mostrato negli Esempi di seguito, vi è un vantaggio nell'aggiunta dell'inibitore di aggregazione amminoacidico alla soluzione prima della concentrazione, poiché inibisce l'aggregazione durante il processo di concentrazione.

Di conseguenza, la divulgazione fornisce metodi per realizzare una formulazione farmaceutica acquosa stabile comprendente un anticorpo monoclonale umano anti-attivatore del recettore umano del fattore nucleare ligando kappa-B (anti-RANKL) o una relativa porzione legante l'antigene. Il metodo può comprendere la combinazione

dell'anticorpo monoclonale anti-RANKL, o relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione maggiore di 70 mg/mL con un inibitore di aggregazione amminoacidico, un tampone, un tensioattivo e facoltativamente, un modificatore di tonicità. L'anticorpo, o la porzione legante l'antigene può essere qualsiasi di quelli descritti qui, e la concentrazione dell'anticorpo, o relativa porzione legante l'antigene, possono essere conformi agli insegnamenti qui. L'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere qualsiasi di quelli descritti qui. Per esempio, l'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere un amminoacido con carica positiva, un amminoacido aromatico o un amminoacido idrofobo. L'inibitore di aggregazione amminoacidico può essere in rapporto molar con l'anticorpo come descritto qui. La quantità e la selezione di inibitore di aggregazione, tensioattivo, modificatore di tonicità e tampone sono come descritto sopra. La divulgazione fornisce anche le formulazioni realizzate mediante i metodi di produzione descritti qui.

Una formulazione secondo la divulgazione qui può includere regolazione del pH di una soluzione ad alta concentrazione di anticorpo monoclonale anti-RANKL (ad esempio, denosumab) descritta qui, ad esempio quella avente una concentrazione maggiore di 70 mg/mL o 120 mg/mL. La formulazione può essere preparata mediante regolazione del pH di una soluzione a bassa concentrazione di anticorpo monoclonale anti-RANKL (ad esempio, denosumab) e poi mediante concentrazione

della soluzione fino alla concentrazione finale superiore desiderata. Agenti di regolazione del pH adatti sono noti nell'arte.

### **ESEMPI**

I seguenti esempi sono forniti a scopo illustrativo. In tutti gli esempi presentati qui, sono usate le seguenti abbreviazioni: DF, diafiltrazione; PS20, polisorbato 20, HCl, cloridrato, UF/DF, ultrafiltrazione/diafiltrazione; n. F, numero di formulazione; HMWS, specie ad alto peso molecolare; SE-UHPLC, cromatografia liquida a ultra alta prestazione a esclusione dimensionale. Inoltre, in tutti questi esempi, sono forniti la composizione del tampone DF o del tampone di dialisi usata per realizzare la formulazione finale comprendente denosumab, nonché le concentrazioni stimate dei componenti della formulazione finale. Le concentrazioni finali di alcuni componenti delle formulazioni finali conservate e successivamente analizzate per la stabilità possono differire dalle concentrazioni del tampone DF o di dialisi a seconda della presenza o assenza di un controione (ad esempio, HCl). Senza un controione, formulazioni ha bassa forza ionica. In tali casi, l'acetato si co-concentra con denosumab, in modo tale che le formulazioni finali comprendano una concentrazione superiore di acetato, rispetto alla concentrazione del tampone DF o di dialisi. Per esempio, l'uso di un tampone DF comprendente acetato 10 mM porta ad acetato ~ 23 mM nella formulazione di denosumab finale (120 mg/mL) (pH 5,1), quando nè il tampone DF nè la formulazione finale comprende un controione (ad esempio, HCl) e quindi ha una bassa forza ionica. Analogamente, un

tampone DF comprendente acetato 20 mM porta ad acetato ~32 mM nella formulazione di denosumab finale (120 mg/mL), a pH 5,1, senza un controione (ad esempio, HCl). Quando è presente un controione (ad esempio, HCl di arginina HCl), l'acetato non si co-concentra con denosumab, e quindi la concentrazione di acetato del tampone DF e la concentrazione di acetato della composizione finale sono generalmente equivalenti. Inoltre, gli eccipienti possono essere volumetricamente esclusi, oppure possono essere influenzati da interazioni non specifiche. Per esempio, in una formulazione di denosumab 120 mg/mL, le concentrazioni di fenilalanina e sorbitolo sono all'incirca il 7-10% inferiori rispetto a quanto è indicato nel tampone DF e la concentrazione di arginina è all'incirca il 10-15% inferiore. In considerazione di quanto sopra, negli esempi che seguono vengono fornite le concentrazioni dei componenti delle formulazioni finali, tenendo in considerazione gli effetti di esclusione dell'eccipiente e di co-concentrazione dell'acetato sopra descritti.

#### **ESEMPIO DI RIFERIMENTO 1**

È stata fatta una valutazione iniziale di dodici formulazioni per il loro effetto di ridurre al minimo la quantità (%) di HMWS in una formulazione liquida di denosumab ad alta concentrazione (120 mg/mL), e la loro formazione nel tempo. Le alternative di formulazione includevano cambiamenti del tipo di tampone, di stabilizzanti e del pH della soluzione. Le formulazioni testate, A-L, sono descritte nella Tabella 1 di seguito. Tutti i valori dei tamponi citati sono per la concentrazione di

tampone contro cui l'anticorpo viene diafiltrato. Ciascun eccipiente e tensioattivo è stato aggiunto alla soluzione dopo lo scambio di tampone fino al livello indicato nella tabella. Sebbene la concentrazione di acetato nelle presenti formulazioni non sia stata misurata, formulazioni di denosumab 120 mg/mL con sorbitolo diafiltrato contro acetato 10 mM avevano valori di acetato finali approssimativi tra 25 mM e 35 mM di acetato.

Denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 è stato UF/DF contro acetato 10 mM, pH 5,2 e concentrato fino a 160 mg/mL. Le soluzioni madre sono state preparate in acetato 10 mM a pH 5,2 consistenti in:

- Sorbitolo 35%
- Polisorbato 20 1%
- Polisorbato 80 1%
- Pluronic® F-68 30%
- Triton™ X-100 3%
- L-Arginina HCl 250 mM
- N-acetil arginina (NAR) 250 mM
- N-acetil lisina (NAK) 250 mM
- Prolina 250 mM
- Polietilenglicole (PEG) 3350 250 mM
- Ciclodestrina Captisol® 250 mM

Per ottenere le formulazioni da A a J, il materiale 160 mg/mL preparato con acetato 10 mM, pH 5,2 è stato diluito fino a 120 mg/mL usando acetato 10 mM a un pH di 5,2 a cui ha fatto seguito un'aggiunta

delle soluzioni madre corrispondenti di sorbitolo, eccipiente, e/o tensioattivo fino a una concentrazione finale obiettivo elencata in Tabella 1. Per ottenere le formulazioni K e L, le formulazioni auto-tamponata e di glutammato, rispettivamente, due aliquote separate del materiale 160 mg/mL sono state sottoposte ad ulteriore scambio di tampone mediante centrifugazione. Il materiale per le formulazioni K e L è stato poi diluito fino a 120 mg/mL usando il rispettivo tampone a cui ha fatto seguito un'aggiunta delle soluzioni madri corrispondenti di sorbitolo e di polisorbato 20 fino a una concentrazione finale obiettivo elencata nella tabella delle formulazioni in Tabella 1.

**TABELLA 1**

	<i>Abbreviazione</i>	<i>Composizione di formulazione</i>
A	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2
B	Acetato/Sorbitolo/PS80/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Polisorbato 80 0,01 (p/v), pH 5,2
C	Acetato/Sorbitolo/Pluronic F68/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Pluronic F68 0,01 (p/v), pH 5,2

	<i>Abbreviazione</i>	<i>Composizione di formulazione</i>
D	Acetato/Sorbitolo/Triton X-100/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Triton X-100 0,01 (p/v), pH 5,2
E	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2
F	Acetato/NAR/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, NAR 10 mM, Sorbitolo 3,7% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2
G	Acetato/NAK/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, NAK 10 mM, Sorbitolo 3,7% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2
H	Acetato/Prolina/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, L-prolina 10 mM, Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2

	<i>Abbreviazione</i>	<i>Composizione di formulazione</i>
I	Acetato/PEG/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, PEG3350 5 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2
J	Acetato/Captisol/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Captisol 2,7 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,2
K	Auto-tamponata/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Sorbitolo 5% (p/v), Polisorbato 20 0,01% (p/v), pH 5,2
L	Glutammato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,0	Glutammato 10 mM, L-Arginina HCl 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Polisorbato 20 0,01 (p/v), pH 5,0

La Figura 1 mostra la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C. La Formulazione L, consistente in tampone glutammato all'incirca 10 mM, L-arginina HCl 10 mM, sorbitolo 2,4% (p/v) come modificatore di tonicità,

polisorbato 20 0,01% (p/v) come tensioattivo e a un valore di pH di 5,0 mostrava sia quantità di partenza diminuite di HMWS, a suggerire una certa riduzione di aggregati già formati, che cinetica diminuita per la formazione di HMWS a 37 °C.

### **ESEMPIO DI RIFERIMENTO 2**

La valutazione di formulazioni di eccipienti acetato 10 mM, L-arginina 75 mM, sorbitolo 2,4% (p/v), polisorbato 20 0,01% (p/v) e una formulazione di eccipienti acetato 10 mM, sorbitolo 5% (p/v), polisorbato 20 0,01% (p/v), ciascuno con denosumab a concentrazione elevata (120 mg/mL), a una temperatura di 37 °C per fino a 1 mese ha rivelato gli effetti del pH e dell'inibitore di aggregazione amminoacidico sulla velocità e l'entità della formazione di HMWS. Le formulazioni testate sono descritte in Tabella 2 di seguito. Tutti i valori di tampone ed eccipiente citati sono per le concentrazioni di tampone ed eccipiente contro cui l'anticorpo viene diafiltrato.

Per preparare i campioni di test M-Q, un'aliquota da 3 mL di denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 è stata dializzata contro 500 mL di tampone DF descritto di seguito, con un totale di 3 cambi di tampone per ottenere una diluizione di 1 milione di volte della formulazione precedente per garantire il completo scambio di tampone. Il materiale è stato poi sovra-concentrato usando un concentratore centrifugo, a cui ha fatto seguito una diluizione fino a 120 mg/mL e l'aggiunta di polisorbato 20 fino a una concentrazione finale di 0,01%.

### **TABELLA 2**

	<i>Abbreviazione</i>	<i>Composizione della formulazione per DF</i>
M	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,5	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 4,5
N	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 4,8
O	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,2
P	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,5
Q	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,3A	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,8

La FIGURA 2 mostra la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C. La FIGURA 3 mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale in funzione della formulazione dopo conservazione a 37 °C per 1 mese.

Poiché il pH della soluzione diminuiva, vi è stato un aumento della formazione di aggregati grandi. A pH inferiore a 4,8, e in particolare 4,5, aggregati grandi erano la HMWS dominante, con un aumento

drastico per la formulazione di test a pH 4,5. Come mostrato in FIGURA 3, le formulazioni P e Q avevano la quantità più bassa di HWMS di ordine superiore (tempo di ritenzione circa 6 minuti), seguite dalle formulazioni comparative O, N e M aventi valori decrescenti di pH.

Tuttavia, poiché il pH è stato aumentato, vi è stato generalmente un aumento delle specie dimeriche. Come mostrato in FIGURA 3, la formulazione N aveva la quantità più bassa di specie dimeriche (tempo di ritenzione circa 6,8 minuti), seguita dalle formulazioni M, O, P e Q.

La presenza di arginina nella formulazione O a una concentrazione di 75 mM ha determinato riduzioni di all'incirca 0,3% e 25% delle quantità delle specie dimeriche e della sua velocità cinetica di formazione, rispettivamente, dopo 1 mese a 37 °C rispetto alla formulazione P avente lo stesso pH, ma senza arginina.

### **ESEMPIO DI RIFERIMENTO 3**

Questo esempio dimostra l'effetto del pH su formulazioni di denosumab a elevata concentrazione.

Denosumab (a una concentrazione di 120 mg/mL) è stato formulato con acetato, sorbitolo e polisorbato 20 (PS20) con o senza un inibitore di aggregazione amminoacidico a tre differenti valori di pH: 4,8, 5,1, e 5,4. In questo studio, l'inibitore di aggregazione amminoacidico era L-Arginina HCl. Tutte le formulazioni sono state realizzate mediante scambio del tampone di una soluzione iniziale contenente una concentrazione inferiore di denosumab, a cui ha fatto seguito la sovra-concentrazione del materiale denosumab e poi una diluizione del

materiale denosumab con le quantità desiderate di tampone, eccipienti e tensioattivi. In breve, un'aliquota di denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 (materiale iniziale) è stata dializzata contro un tampone DF, come descritto in TABELLA 3A, con un totale di 3 cambi di tampone per ottenere una diluizione di 1 milione di volte del materiale iniziale per garantire il completo scambio di tampone. Il materiale denosumab scambiato col tampone è stato poi concentrato usando un concentratore centrifugo fino a una concentrazione di denosumab maggiore di 120 mg/mL, e il materiale concentrato è stato successivamente diluito per ottenere una concentrazione di 120 mg/mL di denosumab. PS20 è stato aggiunto fino a una concentrazione finale dello 0,01%.

Si è ritenuto che la proteina ad alta concentrazione contribuisse al pH della soluzione in base al suo stato di carica. La concentrazione di acetato della Formulazione 1 è stata aumentata per ottenere il pH finale obiettivo, e la concentrazione di acetato delle Formulazioni 2 e 3 corrispondeva a quella della Formulazione 1. La concentrazione di acetato delle Formulazioni 4-6 richiedeva una quantità ancora superiore di acetato per corrispondere alla concentrazione finale di acetato delle Formulazioni 1-3, a causa dell'acetato che non si co-concentra in presenza del sale HCl. La Formulazione 7 è servita da controllo per garantire che la concentrazione di acetato aumentata nelle Formulazioni 4-6 non ostacolasse la stabilità delle proteine in formulazioni con arginina cloridrato.

Le differenti formulazioni di denosumab realizzate e testate in questo studio sono descritte in TABELLA 3A.

**TABELLA 3A**

<b>n.</b>	<b>Formulazione finale stimata*</b>	<b>Composizione del tampone DF</b>
1	Acetato 40 mM/Sorbitolo 4,58% (p/v)/PS20/pH 4,8	Acetato 30 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,35
2	Acetato 40 mM/Sorbitolo 4,58% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 30 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,9
3	Acetato 40 mM/Sorbitolo 4,58% (p/v)/PS20/pH 5,4	Acetato 30 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 5,2
4	Acetato 40 mM/Arginina 65 mM/Sorbitolo 3,3% (p/v)/PS20/pH 4,8	Acetato 40 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 4,8
5	Acetato 40 mM/Arginina 65 mM/Sorbitolo 3,3% (p/v)/PS20/pH 5,4	Acetato 40 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,4
6	Acetato 40 mM/Arginina 65 mM/Sorbitolo 3,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 40 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,1

n. F	Formulazione finale stimata*	Composizione del tampone DF
7	Acetato 10 mM/Arginina 65 mM/Sorbitolo 3,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,1
<p>*Le formulazioni finali comprendevano denosumab 120 mg/mL e PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e avevano il pH indicato. Le concentrazioni di sorbitolo sono stimate al 8,5% inferiori rispetto alla concentrazione di sorbitolo del tampone DF. Le concentrazioni di arginina sono stimate al 12,5% inferiori rispetto alla concentrazione di arginina del tampone DF.</p>		

Un contenitore è stato riempito con un campione di ciascuna formulazione a un volume di riempimento di 1 mL e conservato a una temperatura di 37 °C per fino a 4 settimane. L'inibizione dell'aggregazione e la stabilità contro inibizione dell'aggregazione nel tempo, si basano sulla formazione di HMWS e specie dimeriche, sono state valutate usando SE-UHPLC. I profili di inibizione dell'aggregazione di queste formulazioni sono stati confrontati nelle condizioni iniziali e durante e dopo il periodo di conservazione.

La HMWS percentuale è stata monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C. La FIGURA 4 rappresenta un grafico della HMWS percentuale in funzione del tempo

per le Formulazioni 1-7 e la TABELLA 3B fornisce i punti di dati del grafico.

**TABELLA 3B**

Denominazione della formulazione	Tempo di conservazione a 37 °C		
	0 settimane	2 settimane	4 settimane
1 Acetato(40)/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	0,7	1,2	1,6
2 Acetato(40)/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
3 Acetato(40)/Sorbitolo/PS20/pH 5,4	1,5	2,1	2,7
4 Acetato(40)/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	0,6	1,2	1,9
5 Acetato(40)/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,4	0,9	1,3	1,7
6 Acetato(40)/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,4
7 Acetato(10)/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,8	1,1	1,4
n. F mostrato nella colonna di sinistra corrisponde al n. F della Tabella 3A.			

La FIGURA 5 mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale per ciascuna formulazione dopo conservazione a 37 °C per 1 mese. Le formulazioni senza arginina sono mostrate nel riquadro di sinistra, mentre le formulazioni con arginina sono mostrate nel riquadro di destra.

Come mostrato in FIGURA 4, le formulazioni contenenti arginina hanno avuto prestazioni migliori rispetto alle formulazioni di controllo senza arginina cloridrato, e le formulazioni a pH 5,1 hanno avuto prestazioni migliori rispetto alle formulazioni comparabili a pH 4,8 e pH 5,4. Per le formulazioni 1-3 senza arginina cloridrato, le specie dimeriche aumentavano mentre il pH della soluzione aumentava fino a 5,4 (FIGURA 5A). Per le formulazioni 4-6 contenenti arginina cloridrato, mentre il pH della soluzione diminuiva fino a 4,8, vi era un aumento della formazione di aggregati più grandi, nonché un aumento delle specie dimeriche mentre il pH della soluzione aumentava fino a 5,4 (FIGURA 5B). A pH della soluzione di 5,1, la formulazione 6 con la presenza di arginina cloridrato, aveva la quantità più bassa di HMWS totali rispetto alla formulazione 2 senza la presenza di arginina cloridrato. Inoltre, il comportamento della Formulazione 7 ha dimostrato che un aumento della concentrazione di tampone acetato da 10 mM a 40 mM aveva un effetto relativamente minore sulla formazione di HMWS.

#### **ESEMPIO DI RIFERIMENTO 4**

Questo esempio dimostra una relazione tra il pH e la formazione di HMWS per differenti formulazioni di denosumab comprendenti concentrazioni variabili di denosumab.

Le concentrazioni della proteina Denosumab da 15 mg/mL a 150 mg/mL sono state valutate per valutare la sensibilità al pH della formazione di HMWS a varie concentrazioni proteiche e a concentrazioni di 75 mM di arginina cloridrato. Due valori di pH, cioè pH 4,8 e 5,1, sono stati valutati a ciascuna delle concentrazioni proteiche testate: 15, 60, 120 e 150 mg/mL.

In questo studio è stato valutato un totale di 8 formulazioni (Formulazioni 8-15; descritte in TABELLA 4A). Per preparare queste formulazioni, due aliquote di denosumab a 70 mg/mL in acetato a pH 5,2 sono state dializzate contro il rispettivo tampone DF descritto in TABELLA 4A. Entrambi gli allestimenti per la dialisi n.1 e n.2 hanno subito un totale di 3 cambi di tampone per ottenere una diluizione di 1 milione di volte della formulazione precedente per garantire il completo scambio di tampone. Dopo la dialisi, le aliquote di ciascun allestimento di dialisi n.1 e n.2 descritte nella TABELLA 4A sono state rimosse per preparare il passaggio di diluizione per le Formulazioni 8, 9, 12 e 13. Il materiale rimanente è stato poi sovra-concentrato usando il concentratore centrifugo, a cui ha fatto seguito una diluizione fino alle concentrazioni di denosumab corrispondenti elencate in TABELLA 4A e l'aggiunta di PS20 fino a una concentrazione finale dello 0,01%.

#### **TABELLA 4A**

<b>n. F</b>	<b>Formulazione stimata*</b>	<b>finale</b>	<b>Composizione del tampone DF</b>	<b>Allestimenti della dialisi</b>
8	Denosumab mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ pH 4,8	15 mg- PS20/	Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 4,8	1
9	Denosumab mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ pH 4,8	60 mg- PS20/	Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 4,8	
10	Denosumab mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ pH 4,8	120 mg- PS20/	Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 4,8	
11	Denosumab mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ pH 4,8	150 mg- PS20/	Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 4,8	
12	Denosumab mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ pH 5,1	15 mg- PS20/	Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,1	2

n. F	Formulazione stimata*	finale	Composizione del tampone DF	Allestimenti della dialisi
13	Denosumab 60 mg- mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ PS20/		Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,1	
14	Denosumab 120 mg- mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ PS20/		Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,1	
15	Denosumab 150 mg- mL/Acetato /Arginina/Sorbitolo/ PS20/		Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), Arginina-HCl 75 mM, pH 5,1	

\*Le formulazioni finali comprendevano PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e avevano il pH indicato. La concentrazione stimata di acetato era 10 mM, le concentrazioni di sorbitolo sono stimate a ~8,5% inferiori rispetto alla concentrazione di sorbitolo del tampone DF. Le concentrazioni di arginina sono stimate a 65 mM. Le concentrazioni di sorbitolo sono stimate al 2,2% (p/v).

I contenitori sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1 mL e conservati a una temperatura di 37 °C per fino a

1 mese. L'inibizione dell'aggregazione e la stabilità contro inibizione dell'aggregazione nel tempo, si basano sulla formazione di HMWS e specie dimeriche, sono state valutate usando SE-UHPLC. I profili di inibizione dell'aggregazione di queste formulazioni sono stati confrontati nelle condizioni iniziali e durante e dopo il periodo di conservazione.

La FIGURA 6 rappresenta un grafico della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo di conservazione a 37 °C per ciascuna formulazione e la TABELLA 4B fornisce i punti di dati del grafico.

**TABELLA 4B**

Formulazione		Percentuale di HMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
8	15 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	0,4	0,4	0,5
9	60 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	0,4	0,8	1,1
10	120 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	0,5	1,4	1,9

Formulazione		Percentuale di HMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
11	150 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 4,8	0,6	1,7	2,4
12	15 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,4	0,3	0,4
13	60 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	0,7	0,9
14	120 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,6	1,2	1,5
15	150 mg- mL/Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,7	1,3	1,7

Le Figure 7A e 7B mostrano cromatogrammi di esclusione dimensionale in funzione della formulazione dopo conservazione a 37 °C per 1 mese. Come mostrato in Figura 6, la % di HMWS aumentava

all'aumentare della concentrazione della proteina. Le Formulazioni 8-11 a pH 4,8 avevano coerentemente livelli superiori di HMWS rispetto alle formulazioni corrispondenti a pH 5,1 (Formulazioni 12-15). L'aumento della % di HMWS a pH 4,8 è dovuto a un picco aggregato elevato mostrato in Figura 7A (sopra) a circa 5,75 minuti. Mentre la % di HMWS al pH della soluzione di 5,1 presentava specie dimeriche crescenti all'aumentare della concentrazione della proteina, le HMWS totali erano inferiori rispetto alle concentrazioni della proteina corrispondenti al pH della soluzione di 4,8 (Figura 7B (sotto)).

La differenza dei livelli di HMWS a pH 5,1 vs. pH 4,8 diventava maggiore quanto la concentrazione di denosumab aumentava, con la differenza maggiore a concentrazioni più elevate di denosumab.

#### **ESEMPIO 5**

Le formulazioni con varie concentrazioni di arginina, NAR, e due dipeptidi consistenti in arginina-arginina (Arg-Arg) e arginina-fenilalanina (Arg-Phe) sono state valutate per gli effetti stabilizzanti su soluzioni aventi una concentrazione di denosumab di 120 mg/mL.

Le formulazioni testate sono descritte in TABELLA 5 di seguito. Tutti i valori di acetato e eccipiente (esclusi i dipeptidi) citati sono per le concentrazioni di tampone ed eccipiente contro cui l'anticorpo viene diafiltrato. Ciascun dipeptide è stato aggiunto alla soluzione dopo lo scambio di tampone fino al livello indicato nella tabella. Le formulazioni da R a X sono state ottenute mediante UF/DF contro il tampone DF elencato di seguito. Le formulazioni Y e Z sono state ottenute mediante

UF/DF, insieme in un unico pool, contro il tampone DF contenente acetato 10 mM, sorbitolo 3,6%, pH 4,0. Dopo la UF/DF, il pool per le formulazioni Y e Z è stato diviso in 2, e i dipeptidi Arg-Arg o Arg-Phe sono stati poi addizionati in una soluzione madre 1 M contenente sorbitolo 3,6% a pH 5,1. Il polisorbato 20 è stato aggiunto a ciascuna formulazione a una concentrazione finale bersaglio dello 0,01%. L'acetato si co-concentra senza arginina, determinando una concentrazione finale di acetato di circa 25 mM nelle formulazioni da S a X. Il sorbitolo è preferenzialmente escluso nel processo di concentrazione, determinando una riduzione da circa il 7 all'8% (p/v) da una concentrazione iniziale.

I contenitori sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1.0 mL. Le formulazioni sono conservate alla temperatura da 2 °C a 8 °C per fino a 12 mesi e 25 °C, 30 °C e 37 °C per 3 mesi. La stabilità basata sulla formazione di HMWS è valutata usando SE-UHPLC. La stabilità di queste formulazioni di dipeptide dopo un mese a 37 °C è stata confrontata con le formulazioni di arginina cloridrato a 37 °C come mostrato in Figura 8.

**TABELLA 5**

	<i>Formulazione finale stimata</i>	Composizione della formulazione per DF
R	Acetato/Sorbitolo 5%/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,0

	<i>Formulazione finale stimata</i>	Composizione della formulazione per DF
S	Acetato/Sorbitolo 3,6%/Arg-HCl 38 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), L-Arginina HCl 38 mM, pH 5,1
T	Acetato/Sorbitolo 2,4%/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), L-Arginina HCl 75 mM, pH 5,1
U	Acetato 18 mM/Sorbitolo 2,4%/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 18 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), L-Arginina HCl 75 mM, pH 5,1
V	Acetato/Sorbitolo 1,2%/Arg-HCl 113 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 1,2%, L-Arginina HCl 113 mM, pH 5,1
W	Acetato/Sorbitolo 0%/Arg-HCl 150 mM/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, sorbitolo 0% (p/v), L-Arginina HCl 150 mM, pH 5,1
X	Acetato/NAR 150 mM/Arg-HCl 75 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 75 mM, NAR 150 mM, pH 5,1
Y	Acetato/Sorbitolo 3,6%/Arg-Arg 38 mM/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), pH 4,0
Z	Acetato/Sorbitolo 3,6%/Arg-Phe 38 mM/PS20/pH 5,2	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), pH 4,0

La Figura 8 mostra la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C. I risultati mostrano che gli inibitori di aggregazione amminoacidici hanno inibito la formazione di HMWS. Il dipeptide arginina-fenilalanina, per esempio, ha mostrato un significativo miglioramento, che determina circa lo 0,3% di HMWS in meno rispetto alle altre formulazioni. L'ordine di classificazione dall'HMWS dal più basso al più alto era  $Z \ll V < Y \approx T \approx W \approx X \approx U < S < R$ . Come si può vedere nella figura, entrambe le formulazioni contenenti il dipeptide arginina-arginina (Arg-Arg) (formulazione Y) e arginina-fenilalanina (Arg-Phe) (formulazione Z) hanno ridotto la formazione di HMWS rispetto alla formulazione di controllo senza arginina e senza i dipeptidi contenenti arginina (formulazione R). La formulazione Z conteneva l'ultima quantità di HMWS, superiore alla formulazione Y.

#### **ESEMPIO 6**

Questo esempio dimostra l'inibizione dell'aggregazione e la stabilità di denosumab in funzione di differenti concentrazioni di arginina e fenilalanina, e una miscela comparativa di arginina e fenilalanina.

Come descritto sopra, i dipeptidi di arginina cloridrato (HCl) e arginina HCl-fenilalanina sono stati identificati per ridurre il livello iniziale di partenza e la velocità di formazione di HMWS di denosumab. In questo studio, le formulazioni contenenti concentrazioni di arginina HCl, concentrazioni di fenilalanina, e una combinazione di arginina HCl e

fenilalanina sono state valutate per gli effetti stabilizzanti su soluzioni contenenti denosumab a 120 mg/mL.

Le formulazioni testate (Formulazioni 16-20) sono descritte in TABELLA 6A di seguito. Per preparare queste formulazioni, un'aliquota di denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 è stata dializzata contro il tampone DF descritto in TABELLA 6A, con un totale di 3 cambi di tampone per ottenere una diluizione di 1 milione di volte della formulazione precedente per garantire il completo scambio di tampone. Il materiale è stato poi sovra-concentrato usando un concentratore centrifugo, a cui ha fatto seguito una diluizione fino a 120 mg/mL e l'aggiunta di polisorbato 20 fino a una concentrazione finale di 0,01%. La formulazione 16 è stata considerata la formulazione di controllo.

**TABELLA 6A**

	<b>Formulazione finale stimata*</b>	<b>Composizione del tampone DF</b>
16	Acetato 23 mM/Sorbitolo 4,6%(p/v) /PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,0
17	Acetato 10 mM/Arginina 65 mM/Sorbitolo 2,2%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1
18	Acetato 23 mM/Fenilalanina 35 mM/Sorbitolo 4%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Fenilalanina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0

	<b>Formulazione finale stimata*</b>	<b>Composizione del tampone DF</b>
19	Acetato 23 mM/Fenilalanina 68 mM/Sorbitolo 3,3%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Fenilalanina 75 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), pH 4,0
20	Acetato 10 mM/Arginina 33 mM/Fenilalanina 35 mM/Sorbitolo 2,2%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Arginina HCl 38 mM, Fenilalanina 38 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1
<p>*Le formulazioni finali comprendevano denosumab 120 mg/mL e PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e avevano il pH indicato. Le concentrazioni di sorbitolo e fenilalanina sono stimate a ~8,5% inferiori rispetto alla concentrazione del tampone DF. Le concentrazioni di arginina sono stimate a ~12,5% inferiori rispetto alla concentrazione del tampone DF.</p>		

I contenitori sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1.0 mL. Le formulazioni sono state conservate a una temperatura di 37 °C per fino a 1 mese. L'inibizione dell'aggregazione e la stabilità contro inibizione dell'aggregazione nel tempo, si basano sulla formazione di HMWS e specie dimeriche, sono state valutate usando SE-UHPLC. I profili di inibizione dell'aggregazione di queste formulazioni sono stati confrontati nelle condizioni iniziali e durante e dopo il periodo di conservazione.

La Figura 9 mostra la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C. La Figura 10 mostra cromatogrammi di esclusione dimensionale in funzione della formulazione dopo conservazione a 37 °C per 1 mese. La TABELLA 6B di seguito mostra mostrano la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C.

**TABELLA 6B**

Formulazione		Percentuale di HMWS		
		0	2 settimane	4 settimane
16	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
17	Acetato/Arginina 75 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,5
18	Acetato/Fenilalanina 38 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	0,9	1,3
19	Acetato/Fenilalanina 75 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	0,8	1,2
20	Acetato/Arginina 38 mM/Fenilalanina 38 mM/ Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,7	1,0	1,4

Tutte le formulazioni comprendenti un inibitore di aggregazione amminoacidico, arginina o fenilalanina (Formulazioni 17-20), erano

superiori alla formulazione di controllo con sorbitolo in assenza di qualsiasi inibitore di aggregazione amminoacidico (Formulazione 16). Tutte le formulazioni contenenti fenilalanina (Formulazioni 18, 19 e 20) contenevano analogamente bassi livelli di HMWS, rispetto a entrambe le formulazioni di controllo e con arginina HCl (Formulazioni 16 e 17, rispettivamente) (Figura 9). La velocità di formazione di HMWS era simile tra le formulazioni contenenti arginina HCl e fenilalanina (Formulazioni 17-19), come mostrato in Figura 9. La formulazione di combinazione comprendente sia arginina 38 mM che fenilalanina 38 mM (totale 76 mM, Formulazione 20) ha dimostrato una stabilità migliore rispetto alla formulazione con arginina 75 mM (Formulazione 17) (Figura 9), ma non migliore rispetto alla formulazione con fenilalanina 75 mM (formulazione 19) (Figura 9).

#### **ESEMPIO 7**

Questo esempio dimostra l'inibizione dell'aggregazione e la stabilità di denosumab in funzione di differenti concentrazioni di fenilalanina.

In studi precedenti, i dipeptidi arginina cloridrato e arginina cloridrato-fenilalanina sono stati identificati per ridurre al minimo il livello iniziale di partenza e la velocità di formazione di HMWS di denosumab. Le formulazioni contenenti arginina cloridrato, a varie concentrazioni di fenilalanina, e una combinazione di arginina cloridrato e fenilalanina sono state valutate per gli effetti stabilizzanti su soluzioni contenenti denosumab a 120 mg/mL.

Le formulazioni testate sono descritte in Tabella 7A di seguito. Per preparare i campioni di test A-E, un'aliquota di denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 è stata dializzata contro i tamponi DF descritti di seguito, con un totale di 3 cambi di tampone per ottenere una diluizione di 1 milione di volte della formulazione precedente per garantire il completo scambio di tampone. Il materiale è stato poi sovraconcentrato fino all'incirca da 130 mg/mL a 150 mg/mL usando un concentratore centrifugo, a cui ha fatto seguito una diluizione fino a 120 mg/mL e l'aggiunta di polisorbato 20 fino a una concentrazione finale di 0,01%. La formulazione A è stata considerata la formulazione di controllo.

I contenitori sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1.0 mL. Le formulazioni sono state conservate a una temperatura di 37 °C per fino a 1 mese. La stabilità basata sulla formazione di HMWS è stata valutata usando SE-UHPLC. I profili di stabilità di queste formulazioni sono stati confrontati dopo un mese a 37 °C con le formulazioni di sorbitolo e arginina cloridrato/sorbitolo a 37 °C come mostrato in Figura 11A.

Per preparare i campioni di test F - K, un'aliquota di denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 è stata ultrafiltrata/diafiltrata (UF/DF) contro i tamponi DF descritti di seguito per un totale di 12 diavolumi per garantire il completo scambio di tampone. Il materiale è stato poi sovraconcentrato fino all'incirca a 200 mg/mL usando l'ultrafiltrazione, a cui ha fatto seguito una diluizione fino a 120 mg/mL e l'aggiunta di polisorbato 20 fino a una concentrazione finale di 0,01%. La

concentrazione di acetato era 20 mM in queste formulazioni. La formulazione F è stata considerata la formulazione di controllo. Tutti i valori di acetato e eccipiente citati sono per le concentrazioni di tampone ed eccipiente contro cui l'anticorpo viene dializzato.

I contenitori sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1.0 mL. Le formulazioni sono state conservate a una temperatura di 40 °C per fino a 1 mese. La stabilità basata sulla formazione di HMWS è stata valutata usando SE-UHPLC. I profili di stabilità di queste formulazioni sono stati confrontati dopo un mese a 40 °C con le formulazioni di sorbitolo e arginina cloridrato/sorbitolo a 40 °C come mostrato in Figura 11B.

TABELLA 7A

<b>n.</b>	<b>Formulazione finale stimata</b>	<b>Composizione del tampone</b>
<b>F</b>		<b>DF*</b>
A	Acetato 23 mM/Sorbitolo 4,6% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,0
B	Acetato 10 mM/Arginina 65 mM/Sorbitolo 2,2% (p/v) PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, L-Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1
C	Acetato 23 mM/Fenilalanina 35 mM/Sorbitolo 4,0% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Fenilalanina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0

<b>n.</b>	<b>Formulazione finale stimata</b>	<b>Composizione del tampone</b>
<b>F</b>		<b>DF*</b>
D	Acetato 23 mM/Fenilalanina 69 mM /Sorbitolo 3,3%(p/v)/ PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Fenilalanina 75 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), pH 5,1
E	Acetato 10 mM/Arginina 33 mM/Fenilalanina 35 mM/Sorbitolo 2,2%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Arginina HCl 38 mM, Fenilalanina 38 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1
F	Acetato 23 mM/Sorbitolo 4,3% (p/v) PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, Sorbitolo 4,7% (p/v), pH 4,0
G	Acetato 23 mM/Fenilalanina 4,6 mM/Sorbitolo 4,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, Fenilalanina 5 mM, Sorbitolo 4,7% (p/v), pH 4,0
H	Acetato 23 mM/Fenilalanina 9 mM/Sorbitolo 4,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, Fenilalanina 10 mM, Sorbitolo 4,7% (p/v), pH 4,0
I	Acetato 23 mM/Fenilalanina 18 mM/Sorbitolo 4,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, Fenilalanina 20 mM, Sorbitolo 4,7% (p/v), pH 4,0
J	Acetato 32 mM/Fenilalanina 37 mM/Sorbitolo 4,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, Fenilalanina 40 mM, Sorbitolo 4,7% (p/v), pH 4,0

n. F	Formulazione finale stimata	Composizione del tampone DF*
K	Acetato 32 mM/Fenilalanina 55 mM/Sorbitolo 4,3% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 20 mM, Fenilalanina 60 mM, Sorbitolo 4,7% (p/v), pH 4,0
<p>*Le formulazioni finali comprendevano denosumab 120 mg/mL e PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e avevano il pH indicato. Le concentrazioni di sorbitolo e fenilalanina sono stimate a ~8,5% inferiori rispetto alla concentrazione del tampone DF. Le concentrazioni di arginina sono stimate a ~12,5% inferiori rispetto alla concentrazione del tampone DF.</p>		

La Figura 11A e la Tabella 7B mostrano la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C. La Figura 11B e la Tabella 7C mostrano la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 40 °C. Le Figure 12A e 12B mostrano i cromatogrammi di esclusione dimensionale in funzione della formulazione dopo conservazione a 37 °C e 40 °C per 1 mese, rispettivamente.

TABELLA 7B

Formulazione	Percentuale di HMWS		
	0	2 settimane	4 settimane
A Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,9	1,5	2,0
B Acetato/Arginina 75 mM/Sorbitolo/ PS20/pH 5,1	0,7	1,1	1,5
C Acetato/Fenilalanina 38 mM/Sorbitolo/ PS20/pH 5,1	0,5	0,9	1,3
D Acetato/Fenilalanina 75 mM/Sorbitolo/ PS20/pH 5,1	0,5	0,8	1,2
E Acetato/Arginina 38 mM/Fenilalanina 38 mM/ Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,7	1,0	1,4

TABELLA 7C

Formulazione	Percentuale di HMWS		
	0	2 settimane	4 settimane
F Acetato 20 mM/Sorbitolo/ PS20/pH 5,1	0,67	1,44	1,96
G Acetato 20 mM/Fenilalanina 5 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,64	1,34	1,74
H Acetato 20 mM/Fenilalanina 10 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,60	1,26	1,68

	Formulazione	Percentuale di HMWS		
		0	2 settimane	4 settimane
I	Acetato 20 mM/Fenilalanina 20 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,53	1,12	1,51
J	Acetato 20 mM/Fenilalanina 40 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,48	1,02	1,37
K	Acetato 20 mM/Fenilalanina 60 mM/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,44	0,96	1,28

Tutte le formulazioni di fenilalanina (Formulazioni C, D, E, G - K), contenevano livelli inferiori di HMWS rispetto a entrambe le formulazioni di sorbitolo e arginina cloridrato/sorbitolo (Formulazioni A e B, rispettivamente). La formulazione della combinazione arginina cloridrato e fenilalanina aveva stabilità simile rispetto alla formulazione con arginina/sorbitolo (Formulazione B). Tutte le formulazioni erano superiori alla formulazione di controllo di sorbitolo (Formulazione A e F).

### **ESEMPIO 8**

Questo esempio mostra una valutazione di differenti inibitori di aggregazione amminoacidici.

Una valutazione di differenti inibitori di aggregazione amminoacidici è stata condotta preparando otto formulazioni con un amminoacido idrofobo, aromatico o polare/carico per determinare il loro

effetto sulla minimizzazione della quantità (%) di HMWS in una formulazione liquida di denosumab ad alta concentrazione (120 mg/mL), e sulla formazione di HMWS nel tempo. La formulazione includeva uno degli otto L-amminoacidi e una quantità ridotta di sorbitolo, rispetto a una formulazione di controllo non contenente alcun inibitore di aggregazione amminoacidico e una quantità superiore di sorbitolo per l'isotonicità (Formulazione 26).

Gli inibitori di aggregazione amminoacidici testati sono stati raggruppati in uno dei tre gruppi (Gruppi I-III) e contenevano la quantità dell'inibitore di aggregazione amminoacidico, come segue:

1. I. Amminoacidi aromatici:
  - (a) Fenilalanina 38 mM (Formulazione 27);
  - (b) Triptofano 38 mM (Formulazione 28);
2. II. Amminoacidi polari/carichi:
  - (a) Arginina HCl 75 mM (Formulazione 29);
  - (b) Lisina 75 mM (Formulazione 30);
  - (c) Istidina 75 mM (Formulazione 31);
3. III. Amminoacidi idrofobi:
  - (a) Leucina 38 mM (Formulazione 32);
  - (b) Isoleucina 38 mM (Formulazione 33);
  - (c) Valina 38 mM (Formulazione 34).

Per preparare le Formulazioni 26-34, un'aliquota di denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2, è stata dializzata contro il tampone DF descritto in TABELLA 8A, con un totale di 3 cambi di tampone per

ottenere una diluizione di 1 milione di volte della formulazione precedente per garantire il completo scambio di tampone. La dialisi della formulazione con istidina F ha usato un tampone con un pH di partenza di 4,0 ed è stato predetto che il pH si sposta verso il pH obiettivo di 5,1 alla concentrazione della proteina dovuto all'effetto di Donnan e alla co-concentrazione di acetato. Tuttavia, il pH non si spostava verso il pH obiettivo di 5,1 dopo che la proteina è stata concentrata fino a 120 mg/mL, ma rimaneva a pH 4,0. Per portare il pH della formulazione con istidina fino a pH 5,1, è stata necessaria una titolazione con NaOH diluito (0,1N). Le formulazioni rimanenti sono state sovraconcentrate usando unità di concentratore centrifugo, a cui ha fatto seguito una diluizione fino a 124-128 mg/mL e l'aggiunta di polisorbato 20 fino a concentrazione finale di 0,01% (p/v).

**TABELLA 8A**

<b>n. F</b>	<b>Formulazione finale stimata</b>	<b>Composizione del tampone di dialisi*</b>
26 (A)	Acetato 23 mM/Sorbitolo 4,6%(p/v)/PS20/pH 5,1 (controllo)	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), Polisorbato 20 0,01% (p/v), pH 4,0
27 (B)	Acetato 23 mM/Fenilalanina 35 mM/Sorbitolo 4%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Fenilalanina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0

<b>n. F</b>	<b>Formulazione finale stimata</b>	<b>Composizione del tampone di dialisi*</b>
28 (C)	Acetato 23 mM/Triptofano/Sorbitolo 4%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Triptofano 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0
29 (D)	Acetato 10 mM/Arginina 66 mM/Sorbitolo 2,2% (p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1
30 (E)	Acetato 10 mM/Lisina 66 mM/Sorbitolo 2,2%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Lisina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1
31 (F)	Acetato 10 mM/Istidina/Sorbitolo 2,2%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Istidina 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 4,0
32 (G)	Acetato 23 mM/Leucina/Sorbitolo 4%(p/v)/ PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Leucina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0
33 (H)	Acetato 23 mM/Isoleucina/Sorbitolo 4%(p/v)/PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Isoleucina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0

n. F	Formulazione finale stimata	Composizione del tampone di dialisi*
34 (I)	Acetato 23 mM/Valina/Sorbitolo 4%(p/v)/P S20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Valina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0
<p>*Le formulazioni finali comprendevano denosumab 120 mg/mL e PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e avevano il pH indicato. Le concentrazioni di sorbitolo e fenilalanina sono stimate a ~8,5% inferiori rispetto alla concentrazione di sorbitolo del tampone DF. Le concentrazioni di arginina sono stimate al -12,5% inferiori rispetto alla concentrazione di arginina del tampone DF. Le lettere in ( ) che appaiono dopo n. F corrispondono alle Figure 13-18</p>		

I contenitori sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1.0 mL. Le formulazioni sono state conservate a una temperatura di 37 °C per fino a 4 settimane. L'inibizione dell'aggregazione e la stabilità contro inibizione dell'aggregazione nel tempo, si basano sulla formazione di HMWS e specie dimeriche, sono state valutate usando SE-UHPLC. I profili di inibizione dell'aggregazione di queste formulazioni sono stati confrontati nelle condizioni iniziali e durante e dopo il periodo di conservazione.

Le Figure 13-15 rappresentano i grafici della percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione del tempo di

conservazione a 37 °C per ciascuna formulazione e la Tabella 8B fornisce i punti di dati per i grafici. Le Figure 16-18 mostrano le sovrapposizioni cromatografiche delle formulazioni elencate in Tabella 8A dopo conservazione a 37 °C per 1 mese. Le Figure 13 e 16 riguardano formulazioni comprendenti amminoacidi aromatici, le Figure 14 e 17 riguardano formulazioni comprendenti amminoacidi polari/carichi, e le Figure 15 e 18 riguardano formulazioni comprendenti amminoacidi idrofobi.

**TABELLA 8B**

Formulazione		Percentuale di HMWS			
		0 settim ane	2 setti mane	4 settima ne	Aumen to 0-4 settima ne
	<b>AMMINOACIDI AROMATICI (Figura 13)</b>				
26	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 (controllo)	0,9	1,9	2,3	1,4
27	Acetato/Fenilalanina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 (controllo)	0,5	0,9	1,2	0,7
28	Acetato/triptofano/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	0,7	0,9	0,4

Formulazione		Percentuale di HMWS			
		0 settim ane	2 setti mane	4 settima ne	Aumen to 0-4 settima ne
	<b>AMMINOACIDI AROMATICI (Figura 13)</b>				
	<b><u>AMMINOACIDI POLARI/CARICHI (Figura 14)</u></b>				
26	Acetato/Sorbitolo/PS 20/pH 5,1 (controllo)	0,9	1,9	2,3	1,4
29	Acetato/Arginina/Sor bitolo/PS20/pH 5,1 (controllo)	0,5	1,1	1,5	1,0
30	Acetato/Lisina/Sorbit olo/PS20/pH 5,1	0,6	1,2	1,6	1,0
31	Acetato/Istidina/Sorbi tolo/PS20/pH 5,1	1,7	2,1	2,7	1,0

<b>AMMINOACIDI IDROFOBI (Figura 15)</b>					
26	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 (controllo)	0,9	1,9	2,3	1,4

<b>AMMINOACIDI IDROFOBI (Figura 15)</b>					
27	Acetato/Fenilalanina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 (controllo)	0,5	0,9	1,2	0,7
32	Acetato/Leucina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	1,1	1,4	0,9
33	Acetato/Isoleucina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	1,1	1,3	0,8
34	Acetato/Valina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	0,5	1,0	1,3	0,8
n. F è fornito nella colonna di sinistra e corrisponde al n. F della Tabella 8A.					

Come mostrato nelle Figure 13-15, tutte le formulazioni contenenti un inibitore di aggregazione amminoacidico (Formulazioni 27-34) hanno dimostrato un certo miglioramento della stabilità, rispetto alla formulazione con acetato/sorbitolo (Formulazione 26). Le formulazioni contenenti un amminoacido aromatico (Formulazioni 27 e 28) hanno mostrato la riduzione maggiore della % di HMWS. La formulazione contenente fenilalanina (Formulazione 27) ha anche mostrato una grande riduzione di HMWS, e la formulazione contenente triptofano ha mostrato la riduzione maggiore, rispetto al controllo (Formulazione 26). Le formulazioni di denosumab contenenti amminoacidi polari/carichi (Formulazioni 29-31) hanno generalmente mostrato maggiori quantità di aggregati di ordine maggiore (Figura 17) rispetto ad altre formulazioni aventi stabilizzanti amminoacidici (Figure 16 e 18), e questa specifica formulazione con istidina ha mostrato quantità maggiori di HWMS



complessive rispetto alla formulazione con acetato/sorbitolo (Formulazione 26) (Figura 14). I risultati della formulazione con istidina potrebbero essere influenzati dal processo di dialisi, dalla durata maggiore a pH 4,0 e dalla titolazione della formulazione con NaOH diluito. Le formulazioni contenenti un amminoacido idrofobo (Formulazioni 32-34) hanno mostrato tutte un miglioramento costante della formazione di HMWS.

### **ESEMPIO 9**

Questo esempio mostra un possibile meccanismo di azione di arginina e fenilalanina nella stabilizzazione di denosumab. La spettrometria di massa a scambio idrogeno-deuterio (HDX-MS) è una tecnologia sensibile e affidabile per caratterizzare l'interazione proteina-proteina/ligando/eccipiente. Il metodo rileva variazioni nel legame idrogeno ammidico della catena principale dovute all'interazione con l'eccipiente.

La spettrometria di massa a scambio idrogeno-deuterio (HDX-MS) è stata eseguita con denosumab (alla concentrazione 3 mg/mL) in tampone acetato 10 mM (pH 5,2) ("A52") in presenza di L-arginina (Formulazione 35), L-fenilalanina (Formulazione 36), o L-glicina (Formulazione 37) e confrontata con una formulazione di denosumab senza alcun inibitore di aggregazione amminoacidico (Formulazione 38). Gli esperimenti sono stati eseguiti a 4 °C (con 75 mM di concentrazione di L-arginina, L-fenilalanina o L-glicina) e 37 °C (con 150 mM di concentrazione di L-arginina, L-fenilalanina o L-glicina). Dopo l'analisi di

più di 530 peptidi, è stato identificato un numero ridotto di regioni con cambiamento di conformazionale significativo. Alcuni peptidi rappresentativi di queste regioni sono riportati nelle Figure 19-30.

Le Figure 19-24 sono grafici della % di incorporazione di deuterio a 4 °C in funzione del tempo (log (sec)) per gli amminoacidi di catena leggera 28-33 (Figura 19), gli amminoacidi di catena leggera 108-116 (Figura 20), gli amminoacidi di catena leggera 125-132 (Figura 21), gli amminoacidi di catena pesante 47-59 (Figura 22), gli amminoacidi di catena pesante 243-253 (Figura 23), e gli amminoacidi di catena pesante 392-399 (Figura 24) per ciascuna delle Formulazioni 35-38.

Le Figure 25-30 sono grafici della % di incorporazione di deuterio a 37 °C in funzione del tempo (log (sec)) per gli amminoacidi di catena leggera 28-33 (Figura 25), gli amminoacidi di catena leggera 108-117 (Figura 26), gli amminoacidi di catena leggera 124-131 (Figura 27), gli amminoacidi di catena pesante 47-59 (Figura 28), gli amminoacidi di catena pesante 242-253 (Figura 29), e gli amminoacidi di catena pesante 392-399 (Figura 30) per ciascuna delle Formulazioni 35-38.

Questi dati supportano che Arg e Gly hanno un effetto di interazione simile su denosumab, sebbene Arg abbia un'impronta HDX leggermente più forte (cambiamenti conformazionali) su denosumab: forte stabilizzazione nella regione Fab LC 28-33; stabilizzazione discreta nelle regioni Fab LC 108-132 e HC 47-59, Fc CH3 HC 392-399; e destabilizzazione discreta nella regione Fc CH2 243-253. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria particolare, si ritiene che l'effetto

dell'arginina cloridrato sia dovuto all'esclusione preferenziale combinata tra le interazioni superficiali di denosumab e superficiali deboli, mentre la glicina funziona per esclusione preferenziale.

Tuttavia, la fenilalanina non ha mostrato alcuna perturbazione strutturale significativa su denosumab. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria particolare, si concepisce che l'effetto stabilizzante della fenilalanina potrebbe avvenire attraverso uno o più dei seguenti meccanismi: interazioni delle catene laterali poiché non vi è alcun effetto sulla catena principale del peptide (nessuna impronta HDX); e/o interazione catione-pi con le catene laterali di arginina/lisina senza influenzare la rete di legami idrogeno della catena principale.

#### **ESEMPIO 10**

Questo esempio dimostra un possibile meccanismo di azione della fenilalanina nella stabilizzazione denosumab.

Per studiare l'effetto specifico di Phe su denosumab, è stata eseguita una simulazione di dinamica molecolare. Nello specifico, il dominio Fab di denosumab è stato solvatato in una scatola di simulazione con Phe in eccesso e sono state condotte due simulazioni di 10 ns. Collettivamente, i residui di Phe legati a Fab per oltre il 90% del tempo sono stati selezionati per l'ulteriore analisi. Sono stati identificati nove tali casi. In 5 delle 9 osservazioni di residenza di lungo periodo, il residuo di Phe era legato all'interfaccia delle regioni VH/VL (pesante variabile/leggera variabile) e CH/CL (pesante costante/leggera costante). In un esempio, si ritiene che la catena laterale della Phe interagisse con

le catene laterali dei residui idrofobi (ad esempio, V93, Y95 e W112 della catena pesante e A44 e P45 della catena leggera), in corrispondenza dell'interfaccia di VH/VL. In un altro esempio, si ritiene che l'anello di catena laterale della Phe interagisse con i gruppi NH<sub>3</sub><sup>+</sup> e COO(-) dei residui (ad esempio, T165 della catena leggera e G 171, V172 e T174 della catena pesante) in corrispondenza dell'interfaccia di CH1 e CL. Senza voler essere vincolati da alcuna teoria particolare, questa osservazione ha portato all'idea che l'effetto specifico della Phe nel mitigare l'aggregazione di denosumab è dovuto all'interazione del gruppo fenile con i residui idrofobi (ad esempio, R30, G31, R32 e Y33 di CDR1 della catena leggera, A52 di CDR2 della catena leggera, e M106 di CDR3 della catena pesante) formando l'interfaccia delle catene pesanti costanti 1 (Hc) e leggere costanti (Lc). Si ipotizza che questa interazione sostituisca una superficie precedentemente idrofoba con una superficie relativamente più carica (di conseguenza idrofila) dei gruppi NH<sub>3</sub>(+) e COO(-) dell'eccipiente Phe.

#### **ESEMPIO 11**

È stata condotta una valutazione della stabilità di più costrutti degli anticorpi anti-RANKL (degli isotipi IgG1, IgG2 e IgG4). Come descritto sopra, sia l'arginina HCl che la fenilalanina riducono al minimo i livelli di partenza di HMWS, e di HWMS nel tempo, rispetto alla formulazione di controllo con acetato/sorbitolo di denosumab (che è un'immunoglobulina IgG2). Questa valutazione è stata eseguita per confrontare il potenziale di Arg-HCl e Phe per ridurre HMWS in

formulazioni contenenti diversi costrutti anticorpali anti-RANKL. I costrutti IgG1 e IgG4 testati in questo studio contenevano le stesse regioni determinanti la complementarità (CDR) rispetto a denosumab, ma contenevano diversi scaffold di dominio costante. Il diverso costrutto IgG2 testato in questo studio aveva diverse CDR rispetto a denosumab, ma conteneva lo stesso scaffold di dominio costante.

Ciascun costrutto anticorpale testato è stato purificato e concentrato da 8 mg/mL a 70 mg/mL usando la concentrazione per centrifugazione. Ciascun volume concentrato è stato diviso in tre aliquote e poi dializzato contro un tampone acetato formulato con sorbitolo, sorbitolo/fenilalanina e sorbitolo/arginina cloridrato per preparare le Formulazioni 39-47, come descritto in TABELLA 9. I campioni post-dialisi sono stati sovra-concentrati a più di 120 mg/mL con concentrazione per centrifugazione. La proteina anticorpo è stata diluita a 120 mg/mL con il rispettivo tampone.

**TABELLA 9**

<b>n. F</b>	<b>Formulazione finale stimata</b>	<b>Composizione del tampone DF</b>
39	Acetato 23 mM/4,6%(p/v)	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,0
	Sorbitolo/PS20/pH 5,1-IgG1	
40	Acetato 10 mM/66 mM	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina HCl 75 mM, pH 5,1
	Arginina/Sorbitolo 3,3%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG1	

<b>n.</b>	<b>Formulazione finale stimata</b>	<b>Composizione del tampone</b>
<b>F</b>		<b>DF</b>
41	Acetato 23 mM/35 mM	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,3% (p/v), Fenilalanina 38 mM, pH 4,0
	Fenilalanina/Sorbitolo 3%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG1	
42	Acetato 23 mM/4,6%(p/v)	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,0
	Sorbitolo/PS20/pH 5,1-IgG2	
43	Acetato 10 mM/66 mM	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina HCl 75 mM, pH 5,1
	Arginina/Sorbitolo 3,3%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG2	
44	Acetato 23 mM/35 mM	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,3% (p/v), Fenilalanina 38 mM, pH 4,0
	Fenilalanina/Sorbitolo 3%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG2	
45	23 mM	Acetato 10 mM, Sorbitolo 5% (p/v), pH 4,0
	Acetato/Sorbitolo 4,6%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG4	
46	Acetato 10 mM/66 mM	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,6% (p/v), Arginina HCl 75 mM, pH 5,1
	Arginina/Sorbitolo 3,3%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG4	
47	Acetato 23 mM/35 mM	

n. F	Formulazione finale stimata	Composizione del tampone DF
	Fenilalanina/Sorbitolo 3%(p/v)/PS20/pH 5,1-IgG4	Acetato 10 mM, Sorbitolo 3,3% (p/v), Fenilalanina 38 mM, pH 4,0
<p>*Le formulazioni finali comprendevano PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e avevano il pH indicato. Le concentrazioni di sorbitolo e fenilalanina sono stimate a ~8,5% inferiori rispetto alla concentrazione del tampone DF. Le concentrazioni di arginina sono stimate a ~12,5% inferiori rispetto alla concentrazione del tampone DF.</p>		

I contenitori fiale di vetro sono stati riempiti con le formulazioni a un volume di riempimento di 1,0 mL. Le formulazioni sono state conservate a una temperatura di 37 °C per fino a 1 mese. L'inibizione dell'aggregazione e la stabilità contro l'inibizione dell'aggregazione nel tempo, basata sulla formazione di HMWS, sono state valutate usando SE-UHPLC. I profili di inibizione dell'aggregazione di queste formulazioni sono stati confrontati nelle condizioni iniziali e dopo il periodo di conservazione. La stabilità di queste formulazioni dopo la conservazione è stata confrontata all'interno della classe di immunoglobuline.

Le Figure 31, 33 e 35 (e TABELLE 10, 12 e 14 correlate di seguito) mostrano la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C con le

immunoglobuline G (IgG1, IgG2 e IgG4, rispettivamente). Le Figure 32, 34 e 36 (e TABELLE 11, 13 e 15 correlate di seguito) mostrano la percentuale di specie a basso peso molecolare (LMWS, ad esempio frammentazione proteica) monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 37 °C con le immunoglobuline G (IgG1, IgG2 e IgG4, rispettivamente). Le Figure 37, 38 e 39 mostrano sovrapposizioni di cromatogrammi di esclusione dimensionale in funzione della formulazione dopo conservazione a 37 °C per t = 4 settimane.

TABELLA 10: % di HMW, IgG1 (confronto di A, B, C a 37 °C per 4 settimane

Formulazione		Percentuale di HMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
39	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG1	0,3	0,7	0,9
40	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG1	0,3	0,8	1,0
41	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG1	0,3	0,6	0,7

TABELLA 11: % di LMWS, confronto di IgG1 (A, B, C) a 37 °C per 4 settimane

Formulazione		Percentuale di LMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
39	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG1	1,2	2,4	3,1
40	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG1	1,2	2,8	4,3
41	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG1	1,2	2,1	3,0

TABELLA 12: % di HMW, confronto di IgG2 (D, E, F) a 37 °C per 4 settimane

Formulazione		Percentuale di HMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
42	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,4	1,7	2,0
43	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1-IgG2	0,4	2,8	3,1
44	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,3	1,8	2,4

TABELLA 13: % di LMWS, confronto di IgG2 (D, E, F) a 37 °C per 4 settimane

Formulazione		Percentuale di LMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
42	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,7	4,0	7,8
43	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,8	8,2	16,2
44	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG2	0,7	3,1	6,2

TABELLA 14: % di HMW, confronto di IgG4 (G, H, I) a 37 °C per 4 settimane

Formulazione		Percentuale di HMWS		
		0	2	4
			settimane	settimane
45	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,6	1,1	1,3
46	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,7	1,1	1,6
47	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,6	1,0	1,3

TABELLA 15: % di LMWS, confronto di IgG4 (G, H, I) a 37 °C per 4 settimane

Formulazione		Percentuale di LMWS		
		0	2 settimane	4 settimane
45	Acetato/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,7	1,6	1,9
46	Acetato/Arginina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,8	1,6	2,1
47)	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/PS20/pH 5,1 -IgG4	0,7	1,4	1,8

Come mostrato nelle Figure 31 e 32, la molecola IgG1, che ha una regione CDR simile ai campioni di denosumab precedenti, ha mostrato una riduzione di all'incirca lo 0,2% di HMWS con l'aggiunta di fenilalanina quando confrontata con la formulazione di controllo con acetato/sorbitolo. I campioni di IgG2 che hanno una diversa CDR e sono illustrati nelle Figure 33 e 34 hanno mostrato un aumento di HMWS nella formulazione con acetato/fenilalanina/sorbitolo rispetto alla formulazione di controllo con acetato/sorbitolo. Le formulazioni con acetato/sorbitolo e acetato/fenilalanina/sorbitolo avevano stabilità simile per il tipo di campione IgG4 con acetato/sorbitolo/arginina avente formazione di HMWS maggiore come mostrato nelle Figure 35 e 36. In tutti i casi con i tipi di campioni IgG1, IgG2 e IgG4, la formulazione contenente acetato/sorbitolo/arginina ha mostrato degradazione di HMWS

aumentata rispetto alle formulazioni con acetato/sorbitolo (controllo) e acetato/fenilalanina/sorbitolo.

A causa del grande aumento di frammentazione proteica nella formulazione con acetato/arginina/sorbitolo come illustrato nelle Figure 37 e 38, la relazione tra frammentazione e isoforma anticorpale è stata mostrata nelle Figure 32, 34 e 36. È stato dimostrato in letteratura che l'aggregazione mediata da frammentazione di anticorpo monoclonale può risultare per gli anticorpi conservati a 37 °C [Perico N. et al., J.Pharm.Sci. (2009) 98, pagine 3031 - 3042]. Questo meccanismo è possibile in questa valutazione poiché la frammentazione è maggiore nelle formulazioni di acetato/arginina/sorbitolo. La frammentazione è ridotta al minimo nella formulazione con acetato/fenilalanina/sorbitolo portando potenzialmente a meno specie HMWS. Il tipo di campione IgG4 non presenta frammentazione o aggregazione accelerata.

Dai dati raccolti anche in questo studio e dai dati precedenti, i dati di modellistica molecolare raccolti con denosumab, è possibile stabilire una forte correlazione tra la sequenza amminoacidica delle CDR e il relativo effetto di riduzione di HMWS con fenilalanina. È stata osservata una riduzione di specie HMW in denosumab (IgG2) e nella variante di IgG1 che aveva amminoacidi di CDR identici, ma nessuna riduzione di HMWS è stata osservata nella variante di IgG2 con diversi domini di CDR. Sembrerebbe che le sequenze amminoacidiche contenute all'interno dei domini di CDR siano suscettibili all'interazione con fenilalanina e alla successiva inibizione dell'aggregazione. La

molecola IgG4 aveva anche regioni CDR identiche rispetto a denosumab, ma è stato rilevato un cambiamento minimo nell'aggregazione nel corso dello studio. La molecola IgG4 differisce dalle versioni di IgG1 e IgG2 principalmente per la sua lunghezza amminoacidica della cerniera e la sua struttura funzionalmente attiva. Poiché le isoforme anticorpali IgG1 e IgG2 hanno una struttura estesa tipicamente descritta a forma di "Y", un dominio CH1 di Fab di IgG4 interagisce con il dominio CH2 formando una struttura più compatta [Aalberse R.C. et al., Immunology (2002), 105, pagine. 9-19]. Questa struttura compatta potrebbe inibire le reazioni di frammentazione e aggregazione tipicamente osservate con le modalità di IgG1 e IgG2.

#### **ESEMPIO 12**

Viene condotto uno studio per monitorare la stabilità di denosumab formulato come descritto di seguito e in relazione alla Tabella 16 (Formulazioni 51-55). I tamponi di diafiltrazione differiscono per la concentrazione di acetato e per il pH di partenza per produrre formulazioni finali con pH 5,1 a concentrazione di denosumab di 120 mg/ml. Inoltre, il livello di sorbitolo viene regolato per mantenere l'isotonicità del prodotto finale (~300 mOsm/Kg). Denosumab a 70 mg/mL viene diafiltrato contro ciascun tampone per più di 7 diavolumi, poi ultrafiltrato a circa 180 gm/mL e diluito con il tampone di diafiltrazione e polisorbato alla concentrazione di denosumab di 120 mg/mL e polisorbato 20 0,01%. La stabilità viene valutata usando SE-UHPLC dopo conservazione a 37 °C e si dimostra che la stabilità denosumab in

queste formulazioni è altamente simile. Le specie di HMW iniziali diminuiscono lievemente mentre la concentrazione iniziale di acetato aumenta. Al contrario, i tassi di aggregazione miglioramento lievemente nelle formulazioni con livelli inferiori di acetato.

**TABELLA 16**

<b>n. F</b>	<b>Tampone DF</b>	<b>Formulazione stimata*</b>	<b>finale</b>	<b>Osmolalità (mOSm/kG)</b>
51	Acetato 5 mM, Fenilalanina 40 mM, Sorbitolo 4,4%, pH 4,0	Acetato 16 mM, Fenilalanina 37 mM, Sorbitolo 4,1%		304
52	Acetato 10 mM, Fenilalanina 40 mM, Sorbitolo 4,2%, pH 4,4	Acetato 23 mM, Fenilalanina 37 mM, Sorbitolo 3,9%		300
53	Acetato 20 mM, Fenilalanina 40 mM, Sorbitolo 4,0%, pH 4,7	Acetato 32 mM, Fenilalanina 37 mM, Sorbitolo 3,7%		304
54	Acetato 20 mM, Fenilalanina 40 mM, Sorbitolo 4,2%, pH 4,7	Acetato 32 mM, Fenilalanina 37 mM, Sorbitolo 3,9%		315
55	Acetato 30 mM, Fenilalanina 40 mM, Sorbitolo 3,7%, pH 4,8	Acetato 41 mM, Fenilalanina 37 mM, Sorbitolo 3,4%		303

n. F	Tampone DF	Formulazione stimata*	finale	Osmolalità (mOSm/kG)
*Le formulazioni finali comprendevano denosumab 120 mg/mL e PS20 a una concentrazione finale di 0,01% (p/v) e un pH 5,1.				

### ESEMPIO DI RIFERIMENTO 13

Il seguente esempio riporta i risultati degli studi sull'effetto di arginina sulla stabilità della denaturazione chimica di denosumab a tre differenti valori di pH: 4,5, 4,8 e 5 (o 5,2).

Tutti gli esperimenti di denaturazione chimica sono stati eseguiti usando Unchained Labs instrument - HUNK con rivelatore di fluorescenza. La lunghezza d'onda di eccitazione era 280 nm e le scansioni di emissione sono state registrate tra 300 e 500 nm. Per ciascun esperimento di denaturazione, proteina, tampone e denaturante (guanidinio HCl) sono stati dispensati in 36 pozzetti con un aumento lineare in concentrazione denaturante, determinando una curva a 36 per ciascuna condizione. È stato usato il software per l'interpolazione della curva fornito dal produttore dello strumento (Unchained Labs) per interpolare i punti di dati. È stato usato un modello a due stati poiché c'era prova di una sola transizione (nativo ↔ denaturato). Gli esperimenti sono stati eseguiti usando urea 0 - 6 M in acetato 10 mM, sorbitolo 5,0% p/v e titolati al pH richiesto di 4,5, 4,8 o 5 (5,2). La concentrazione della proteina denosumab era 7 mg/mL in tutti gli esperimenti.

La Figura 40 mostra le curve di denaturazione chimica isotermica di denosumab in assenza di arginina, a pH 4,5, 4,8 e 5,0. In assenza di arginina, la  $C_{1/2}$  del denaturante chimico richiesto per il 50% di dispiegamento è simile nelle tre condizioni di pH testate.

La Figura 41 mostra le curve di denaturazione chimica isotermica di denosumab in presenza di arginina HCl 75 mM a pH 4,5, 4,8 e 5,2. Si è verificato un netto aumento della stabilità di denaturazione chimica a pH 5,2 rispetto a pH 4,8 e 4,5.  $C_{1/2}$  aumenta di 1M del denaturante guanidinio HCl a pH 5,2 vs pH inferiore. Pertanto, la natura protettiva di arginina è sorprendente e fortemente dipendente dal pH.

#### **ESEMPIO 14**

Il seguente esempio fornisce i risultati degli studi sull'effetto di arginina e fenilalanina sulla stabilità nel tempo di formulazioni di denosumab a concentrazione elevata in siringhe.

Negli studi precedenti, arginina cloridrato e fenilalanina sono state identificate per ridurre il livello iniziale di partenza e la velocità di formazione di HMWS di denosumab. In questo studio, le formulazioni contenenti arginina cloridrato, fenilalanina, e una combinazione di arginina cloridrato e fenilalanina sono state valutate per gli effetti stabilizzanti su soluzioni contenenti denosumab a 120 mg/mL e conservate in siringhe per fino a tre mesi e a due differenti temperature.

Le formulazioni testate sono descritte in TABELLA 17 di seguito. Per preparare le formulazioni 56-59, denosumab a 70 mg/mL in acetato, pH 5,2 è stato diafiltrato contro i tamponi di diafiltrazione (DF) descritti di

seguito, per 8 diavolumi per garantire il completo scambio di tampone. Il materiale è stato poi ultrafiltrato fino più di 180 mg/mL, a cui ha fatto seguito una diluizione fino a 120 mg/mL e l'aggiunta di polisorbato 20 fino a una concentrazione finale di 0,01%. La formulazione 56 è stata considerata la formulazione di controllo. I valori di acetato, arginina HCl e fenilalanina sono per il tampone DF e i livelli stimati nella composizione finale a 120 mg/mL di denosumab sono forniti, prendendo in considerazione l'esclusione di eccipiente e la co-concentrazione di acetato quando nessun altro controione è presente. La viscosità a 5 °C e 25 °C è stata misurata usando un reometro compatto modulare Paar a velocità di taglio fino a 1000 s<sup>-1</sup> (secondi inversi). Le siringhe pre-riempite (PFS) in vetro sono state riempite con le formulazioni a un volume di riempimento di 1,0 mL. Set paralleli di siringhe sono stati conservati a una temperatura di 25 °C per 3 mesi e 37 °C per 2 mesi, rispettivamente. La stabilità basata sulla formazione di HMWS è stata valutata usando SE-UHPLC.

**TABELLA 17**

	<b>Nome abbreviato della formulazione</b>	<b>Composizione del tampone DF*</b>	<b>Formula finale stimata*</b>	<b>Conducibilità (µS/cm)</b>	<b>Viscosità a 5C</b>	<b>Viscosità a 25C</b>
5	Acetato/Sorbitolo/P	Acetato	Acetato	600	5,2	3,1
6	S20/pH 5,0	20 mM, Sorbitolo	32 mM,			

	<b>Nome abbreviato della formulazione</b>	<b>Composizione del tampone DF*</b>	<b>Formula finale stimata*</b>	<b>Conducibilità (µS/cm)</b>	<b>Viscosità a 5C</b>	<b>Viscosità a 25C</b>
		5% (p/v), pH 4,7	Sorbitolo 4,4%			
5	Acetato/Arginina	Acetato	Acetato	5250	4,8	2,7
7	HCl/Sorbitolo/PS20/ pH 5,1	10 mM, L- Arginina HCl 75 mM, Sorbitolo 2,4% (p/v), pH 5,1	10 mM, Arginina HCl 66 mM, sorbitolo 2,2%			
5	Acetato/Arginina	Acetato	Acetato	3070	4,8	2,8
8	HCl/Fenilalanina/Sorbitolo/PS20/pH 5,1	10 mM, Arginina HCl 38 mM, Fenilalanina 38 mM,	10 mM, Arginina HCl 33 mM, Fenilalanina 35 mM,			

	<b>Nome abbreviato della formulazione</b>	<b>Composizione del tampone DF*</b>	<b>Formula finale stimata*</b>	<b>Conducibilità (µS/cm)</b>	<b>Viscosità a 5C</b>	<b>Viscosità a 25C</b>
		Sorbitolo 3,0% (p/v), pH 5,1	sorbitolo 2,8%			
59	Acetato/Fenilalanina /Sorbitolo/ PS20/pH 5,1	Acetato 10 mM, Fenilalanina 38 mM, Sorbitolo 4,4% (p/v), pH 4,0	Acetato 23 mM, Fenilalanina 35 mM, sorbitolo 4,2%	800	4,9	2,9

\*Ciascuna formulazione finale comprende denosumab 120 mg/mL e PS20 0,01% e il pH indicato nel nome abbreviato della formulazione

Le Figura 42 e 43 mostrano la percentuale di HMWS monitorata mediante SE-UHPLC in funzione della formulazione e del tempo a 25 °C per 3 mesi e 37 °C per 2 mesi, rispettivamente.

Le TABELLE 18-21 mostrano gli stessi dati in forma tabulare e anche l'aumento di HMWS rispetto ai livelli iniziali di HMWS.

**TABELLA 18: Livello di HMWS % a 25 °C per 12 settimane**

Denominazione della formulazione		Percentuale di HMWS					
		0	2	4	6	8	12
56	Acetato/Sorbitolo/pH 5,0	0,81	0,93	1,04	1,16	1,17	1,38
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitolo/pH 5,1	0,72	0,85	0,93	1,02	1,07	1,21
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1	0,59	0,75	0,85	0,93	0,97	1,12
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1	0,66	0,7	0,79	0,88	0,92	1,08

**TABELLA 19: Aumento di HMWS a 25 °C per 12 settimane**

Formulazione		Aumento di HMWS					
		0	2	4	6	8	12
56	Acetato/Sorbitolo/pH 5,0		0,12	0,23	0,35	0,36	0,57
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitolo/pH 5,1		0,13	0,21	0,3	0,35	0,49

Formulazione		Aumento di HMWS					
		0	2	4	6	8	12
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1		0,16	0,26	0,34	0,38	0,53
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1		0,04	0,13	0,22	0,26	0,42

TABELLA 20: Livello di HMWS % a 37 °C per 8 settimane

Formulazione		Percentuale di HMWS				
		0	2	4	6	8
56	Acetato/Sorbitolo/pH 5,0	0,81	1,3	1,66	1,94	2,49
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitolo/pH 5,1	0,72	1,2	1,5	1,94	2,23
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1	0,59	1,23	1,66	2,06	2,48
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1	0,66	1,09	1,4	1,73	2,21

TABELLA 21: Aumento di HMWS a 37 °C per 8 settimane

Formulazione		Aumento di HMWS			
		2	4	6	8
56	Acetato/Sorbitolo/pH 5,0	0,49	0,85	1,13	1,68
57	Acetato/Arginina HCl/Sorbitolo/pH 5,1	0,48	0,78	1,22	1,51

Formulazione		Aumento di HMWS			
		2	4	6	8
58	Acetato/Arginina HCl/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1	0,64	1,07	1,47	1,89
59	Acetato/Fenilalanina/Sorbitolo/pH 5,1	0,43	0,74	1,07	1,55

Questo esempio mostra che l'aggiunta di arginina, fenilalanina, e una relativa combinazione, riduce ciascuna il livello di HMWS iniziale (t=0) in formulazioni di denosumab a concentrazione elevata. A 25 °C, l'aumento di HMWS è ridotto nella Formulazione con fenilalanina 59, rispetto alla formulazione di controllo 56. A 37 °C, le formulazioni 57 e 59 hanno formazione di HMWS ridotta rispetto alla Formulazione con sorbitolo di controllo 56. La formulazione contenente sia arginina HCl che fenilalanina formava HMWS a una velocità più elevata a 37 °C rispetto alle altre formulazioni, a indicare che la combinazione di questi eccipienti è destabilizzante per denosumab a tali temperature superiori in questa formulazione.

Nel corso di questa descrizione e nelle rivendicazioni che seguono, salvo il contesto non richieda diversamente, la parola "comprendere" e variazioni come "comprende" e "comprendente/comprendendo" si intenderanno implicanti l'inclusione di un numero intero o passaggio o gruppo di numeri interi o passaggi

dichiarati ma non l'esclusione di qualsiasi altro numero intero o passaggio o gruppo di numeri interi o passaggi.

Nel corso di questa descrizione, dove le composizioni sono descritte come includenti componenti o materiali, è contemplato che le composizioni possono anche consistere essenzialmente in, o consistere in, qualsiasi combinazione dei componenti o materiali indicati, salvo altrimenti descritto. Analogamente, laddove i metodi sono descritti come includenti particolari passaggi, è contemplato che i metodi possono anche consistere essenzialmente in, o consistere in, qualsiasi combinazione dei passaggi indicati, salvo altrimenti descritto. La divulgazione descritta qui appropriatamente può essere praticata in assenza di qualsiasi elemento o elementi, limitazione o limitazioni che non sono specificamente divulgati qui.

La pratica di un metodo divulgato qui e i relativi singoli passaggi possono essere eseguiti manualmente e/o con l'aiuto di automazione fornita da apparecchiature elettroniche. Sebbene siano stati descritti processi con riferimento a particolari divulgazioni, un tecnico ordinario del ramo apprezzerà prontamente che altre modalità di esecuzione degli atti associati ai metodi possono essere usati. Per esempio, l'ordine dei vari passaggi può essere modificato, salvo altrimenti descritto. In aggiunta, alcuni dei singoli passaggi possono essere combinati, omessi o ulteriormente suddivisi in passaggi aggiuntivi.

## RIVENDICAZIONI

1. Formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- un anticorpo anti-RANKL o relativa porzione legante l'antigene, a una concentrazione in un intervallo da 100 a 140 mg/mL;

- sorbitolo da 1,0% (p/p) a 5,0% (p/p);

- polisorbato 20 o polisorbato 80 almeno 0,004% (p/v) e inferiore al 0,15% (p/v);

- tampone acetato o glutammato da 5 mM a 60 mM; e

- L-fenilalanina o L-triptofano da 5 mM a 180 mM;

in cui la formulazione farmaceutica acquosa ha un pH in un intervallo da 5,0 a 5,4; e

in cui l'anticorpo anti-RANKL, o la relativa porzione legante l'antigene, comprende (A) un dominio variabile di catena leggera comprendente una CDR1 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 5, una CDR2 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 6, e una CDR3 di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:7; e (B) un dominio variabile di catena pesante comprendente una CDR1 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 8, una CDR2 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 9, e una CDR3 di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO: 10.

2. Formulazione farmaceutica acquosa di rivendicazione 1, in cui l'anticorpo anti-RANKL, o la relativa porzione legante l'antigene, comprende una regione variabile della catena pesante comprendente SEQ ID NO: 2 e una regione variabile della catena leggera comprendente SEQ ID NO: 1.

3. Formulazione farmaceutica acquosa di rivendicazione 1 o 2, in cui l'anticorpo anti-RANKL, o la relativa porzione legante l'antigene, comprende una catena pesante comprendente SEQ ID NO: 4 o 14 e una catena leggera comprendente SEQ ID NO: 3 o 13.

4. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui l'anticorpo anti-RANKL è denosumab.

5. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui la concentrazione dell'anticorpo anti-RANKL è  $120 \text{ mg/mL} \pm 12 \text{ mg/mL}$ .

6. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente L-fenilalanina.

7. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente L-fenilalanina o L-triptofano, facoltativamente, L-fenilalanina da 20 mM a 50 mM.

8. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il tampone è acetato.

9. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, comprendente L-fenilalanina, e comprendente

tampone acetato in un intervallo da 2 mM a 30 mM, o da 16 mM a 41 mM, o da 25 mM a 39 mM, o da 30 mM a 34 mM.

10. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9, comprendente sorbitolo da 2,0% (p/p) a 5,0% (p/p).

11. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui il tensioattivo è polisorbato 20.

12. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è una formulazione acquosa avente un pH da 5,0 a 5,2.

13. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, avente (i) una viscosità che è non superiore a 6 cP a 5 °C, (ii) una conduttività in un intervallo da 500  $\mu$ S/cm a 2000  $\mu$ S/cm, (iii) un'osmolalità da 200 mOsm/kg a 500 mOsm/kg, (iv) meno del 2% di specie ad alto peso molecolare (HMWS) e/o più del 98% del picco principale di anticorpo, come misurato mediante SE-UHPLC, dopo conservazione a 2 °C - 8 °C per almeno 12 mesi.

14. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente meno del 2% di specie ad alto peso molecolare (HMWS) e/o più del 98% del picco principale di anticorpo, come misurato mediante SE-UHPLC, dopo conservazione a 2 °C - 8 °C per almeno 36 mesi.

15. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, comprendente meno del 2% di specie ad alto

peso molecolare (HMWS) e/o più del 98% del picco principale di anticorpo, come misurato mediante SE-UHPLC, dopo una prima conservazione a 2 °C - 8 °C per almeno 36 mesi a cui ha fatto seguito una seconda conservazione a 20 °C - 30 °C per 1 mese.

16. Formulazione farmaceutica acquosa di rivendicazione 1, in cui la formulazione comprende denosumab a una concentrazione da 108 mg/mL a 132 mg/mL, acetato da 28,8 mM a 35,2 mM, fenilalanina da 33,3 mM a 40,7 mM, sorbitolo da 3,51% (p/v) a 4,29% (p/v) e polisorbato 20 da 0,009% (p/v) a 0,011% (p/v), a pH 5,1.

17. Formulazione farmaceutica acquosa di rivendicazione 17, comprendente denosumab a una concentrazione di 120 mg/mL, acetato 32 mM, fenilalanina 37 mM, sorbitolo 3,9% (p/v) e polisorbato 20 0,01% (p/v), a pH 5,1.

18. Formulazione farmaceutica acquosa di una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, per uso in (a) trattamento o prevenzione di un evento scheletrico (SRE) in un soggetto con metastasi ossee da tumori solidi, (b) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto che è un adulto o un adolescente maturo a livello scheletrico con tumore a cellule giganti dell'osso che non è resecabile o in cui la resezione chirurgica è suscettibile di determinare grave morbilità, (c) trattamento di ipercalcemia di natura maligna refrattaria a terapia con bisfosfonato in un soggetto, (d) trattamento o prevenzione di un SRE in un soggetto con mieloma multiplo o con metastasi ossee da un tumore solido, (e) trattamento di osteoporosi di donne in post menopausa ad alto rischio di frattura, (f) trattamento per

aumentare la massa ossea in donne ad alto rischio di frattura che ricevono terapia con inibitore di aromatasi adiuvante per cancro della mammella, (g) trattamento per aumentare la massa ossea in uomini ad alto rischio di frattura che ricevono terapia di deprivazione androgenica per cancro della prostata non metastatico, (h) trattamento per aumentare la massa ossea in uomini con osteoporosi ad alto rischio di frattura, (i) terapia con calcio o vitamina D, (j) trattamento del tumore a cellule giganti dell'osso in un paziente che ne ha bisogno, (k) trattamento di ipercalcemia di natura maligna in un paziente che ne ha bisogno, (l) trattamento di osteoporosi in un paziente che ne ha bisogno, o (m) aumento della massa ossea in un paziente che ne ha bisogno.

Si attesta la perfetta accuratezza della traduzione che precede.

## LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

### TAVOLE 1-27/27

Figure 1-43

“FIGURE” = FIGURA

### TAVOLA 1/27

Figura 1

“% HMWS” = % di HMWS

“WEEKS” = SETTIMANE

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Proline” = Prolina

“Self-buffered” = Auto-tamponato

“Glutamate” = Glutammato

### TAVOLA 2/27

Figura 2

“WEEKS” = SETTIMANE

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

### TAVOLA 3/27

Figura 3

“Minutes” = Minuti

“acetate” = acetato

“arginine” = arginina

“sorbitol” = sorbitolo

“polysorbate” = polisorbato

#### **TAVOLA 4/27**

Figura 4

“% HMWS” = % di HMWS

“Weeks” = Settimane

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

#### **TAVOLA 5/27**

Figura 5A

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

Figura 5B

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

#### **TAVOLA 6/27**

Figura 6

“% HMWS” = % di HMWS

“Weeks” = Settimane

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

### **TAVOLA 7/27**

Figura 7

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“A) pH Solution 4.8” = A) pH della soluzione 4,8

“B) pH Solution 5.8” = B) pH della soluzione 5,8

### **TAVOLA 8/27**

Figura 8

“% HMWS” = % di HMWS

“Months” = Mesi

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

### **TAVOLA 9/27**

Figura 9

“% HMWS” = % di HMWS

“Weeks” = Settimane

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

Figura 10

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Arginine” = Arginina

“Phenylalanine” = Fenilalanina

### **TAVOLA 10/27**

Figura 11A

“% HMWS” = % di HMWS

“Weeks” = Settimane

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

Figura 11B

“% HMWS” = % di HMWS

“Weeks” = Settimane

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Phenylalanine” = Fenilalanina

### **TAVOLA 11/27**

Figura 12A

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Arginine” = Arginina

“Phenylalanine” = Fenilalanina

Figura 12B

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Phenylalanine” = Fenilalanina

**TAVOLA 12/27**

Figura 13

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“control” = controllo

“Phenylalanine” = Fenilalanina

“Tryptophan” = Triptofano

Figura 14

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“control” = controllo

“Arginine” = Arginina

“Lysine” = Lisina

“Histidine” = Istidina

**TAVOLA 13/27**

Figura 15

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“control” = controllo

“Phenylalanine” = Fenilalanina

“Leucine” = Leucina

“Isoleucine” = Isoleucina

“Valine” = Valina

Figura 16

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“control” = controllo

“Phenylalanine” = Fenilalanina

“Tryptophan” = Triptofano

#### **TAVOLA 14/27**

Figura 17

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“control” = controllo

“Arginine” = Arginina

“Lysine” = Lisina

“Histidine” = Istidina

Figura 18

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“control” = controllo

“Arginine” = Arginina

“Phenylalanine” = Fenilalanina

“Leucine” = Leucina

“Isoleucine” = Isoleucina

#### **TAVOLE 15-17/27**

Figure 19-24

“% of D<sub>2</sub>O incorporation @ 4C” = “% di incorporazione di D<sub>2</sub>O a 4 °C

“None” = Nessuno

#### **TAVOLE 18-20/27**

Figure 25-30

“% of D<sub>2</sub>O incorporation” = “% di incorporazione di D<sub>2</sub>O a 4 °C

“Time (Sec)” = Tempo (Sec)

#### **TAVOLE 21-23/27**

Figure 31-36

“% HMWS” = % di HMWS

“Weeks” = Settimane

“Acetate” = Acetato

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Arginine” = Arginina

“Phenylalanine” = Fenilalanina

**TAVOLE 24-25/27**

Figure 37-39

“Absorbance” = Assorbanza

“Time [min]” = Tempo [min]

“Acetate” = Acetato

“Arginine” = Arginina

“Sorbitol” = Sorbitolo

“Phenylalanine” = Fenilalanina

**TAVOLA 26/27**

Figure 40-41

“Fraction Denatured” = Frazione denaturata

“Denaturant Concentration” = Concentrazione di denaturante

**TAVOLA 27/27**

Figure 42-43

“% HMWS” = % di HMWS

“Time (months)” = Tempo (mesi)

“Acetate” = Acetato

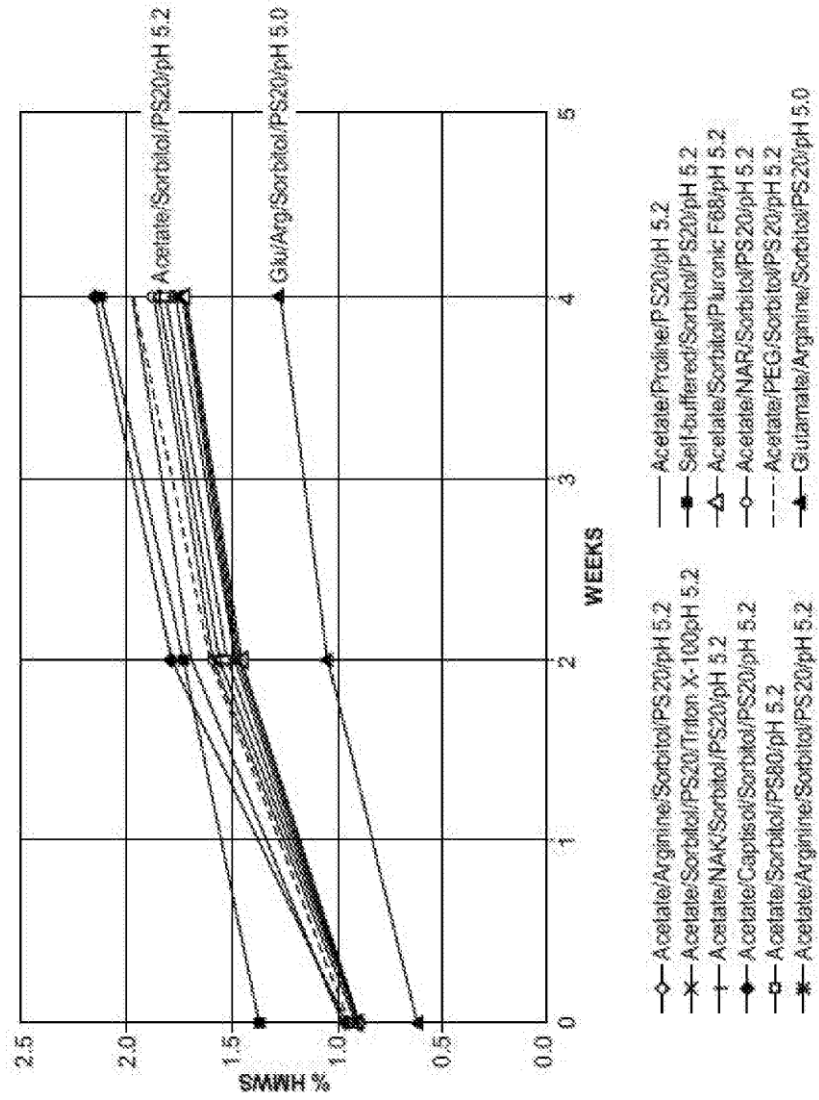
“Sorbitol” = Sorbitolo

“Arginine” = Arginina

“Phenylalanine” = Fenilalanina

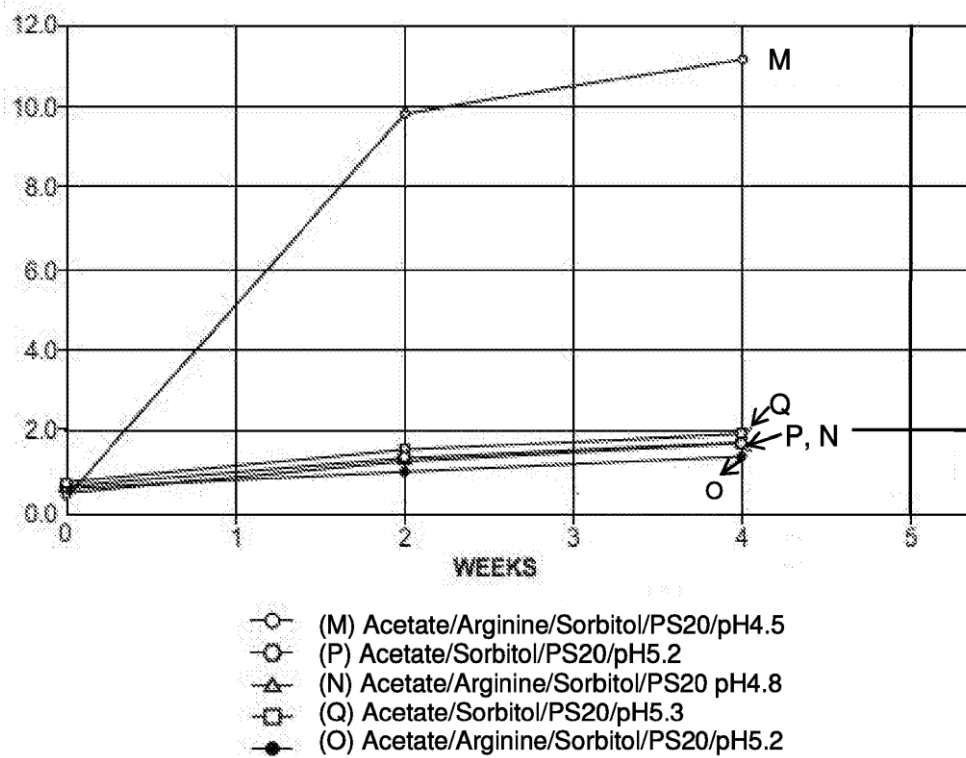
13

FIGURE 1



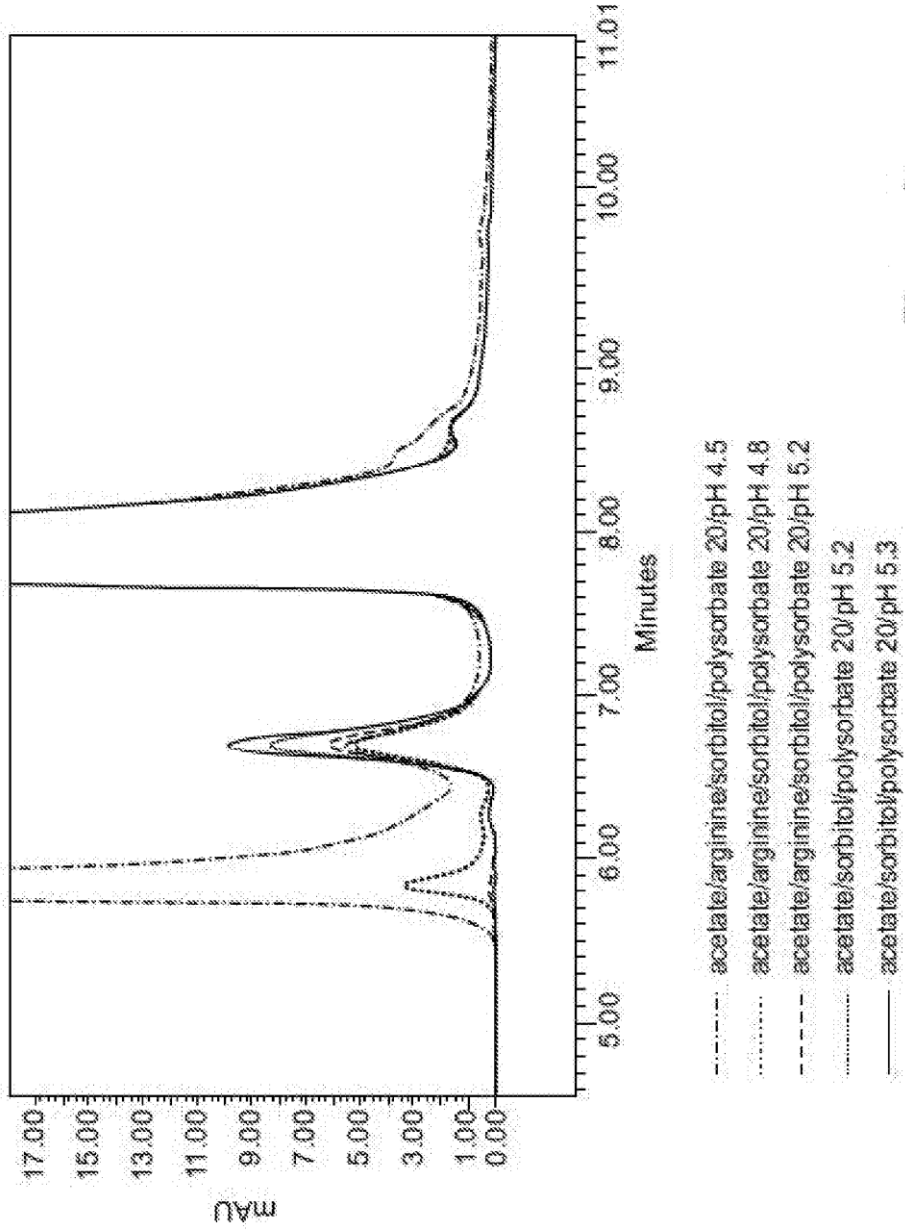
13

**FIGURE 2**



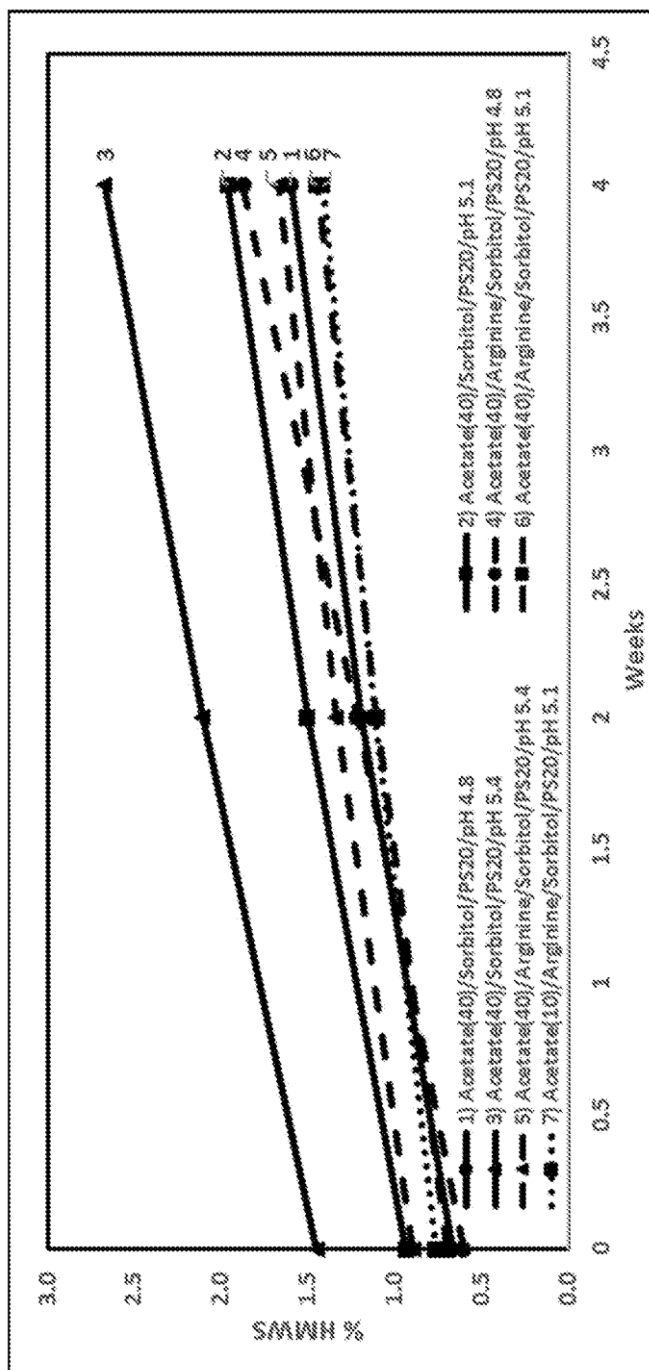
B

FIGURE 3



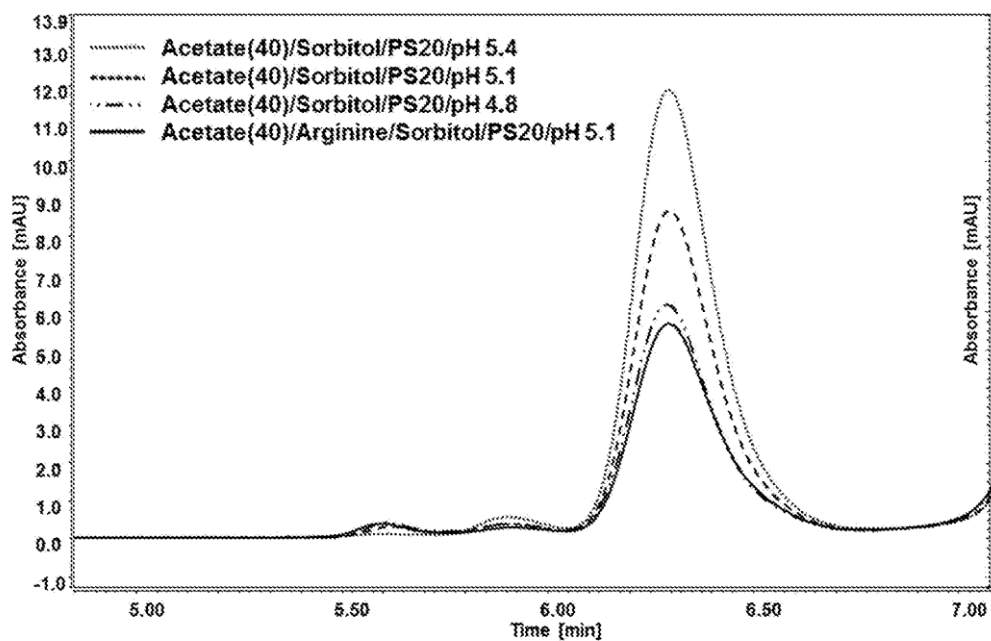
B

FIGURE 4

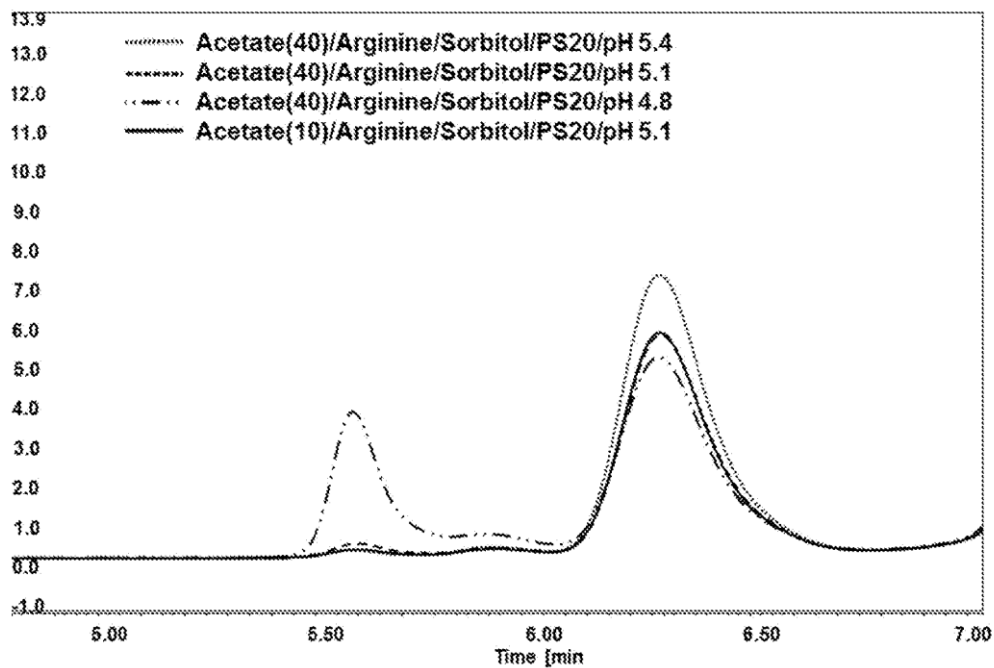


13

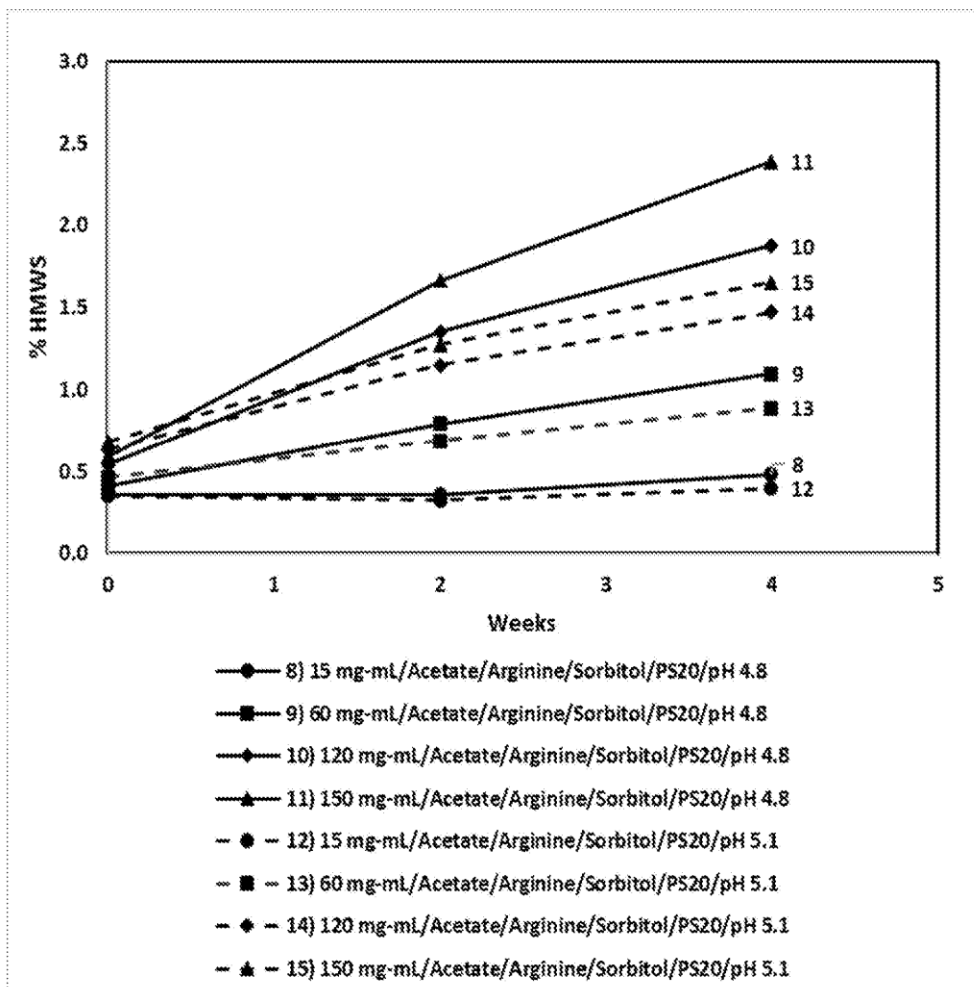
**FIGURE 5A**



**FIGURE 5B**

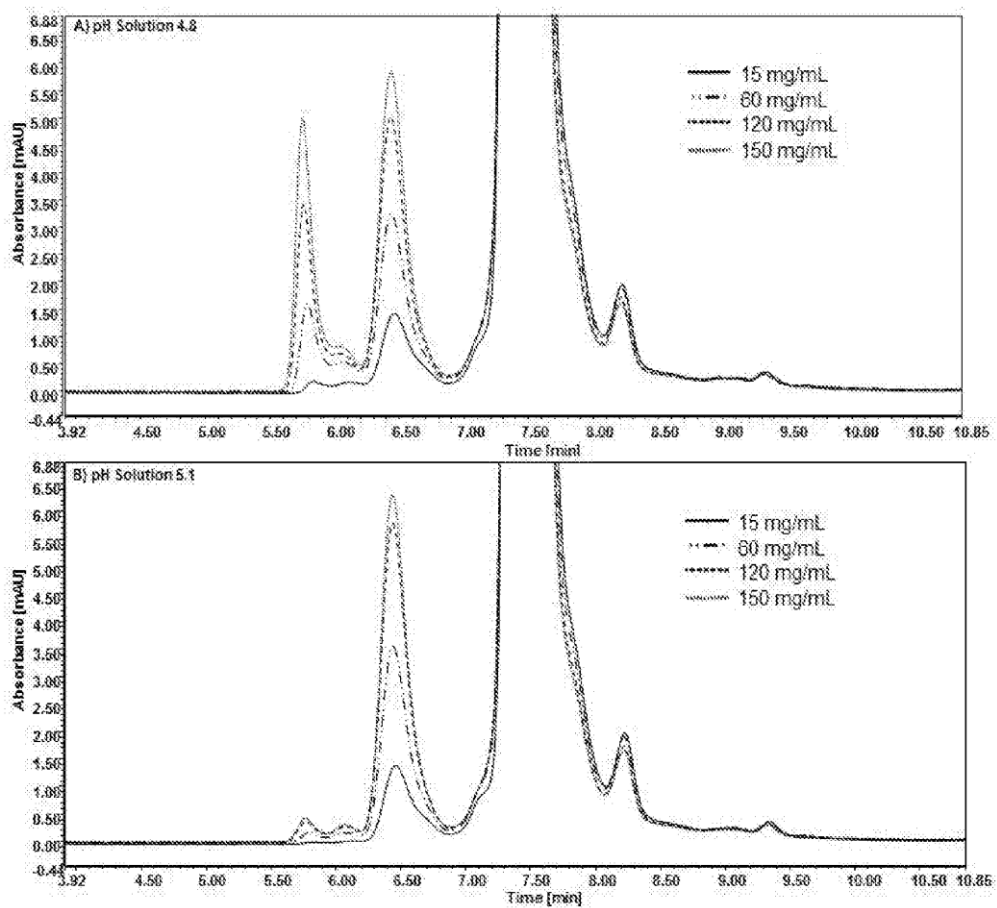


**FIGURE 6**

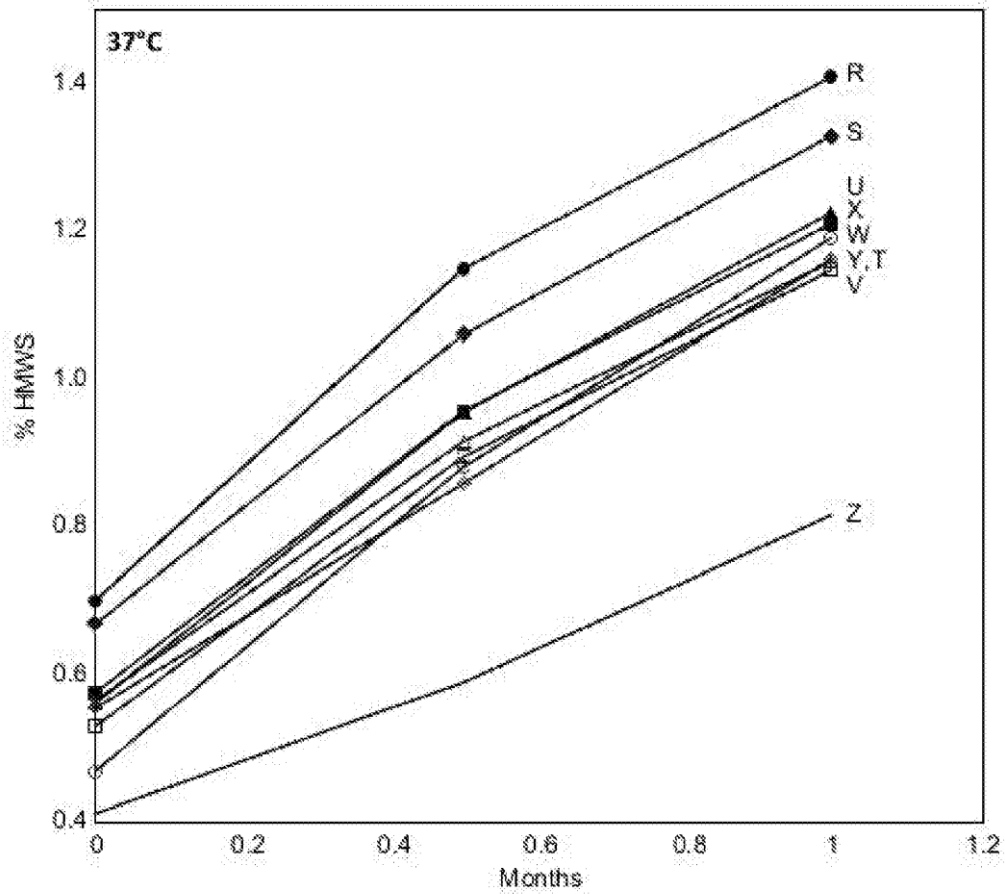


13

**FIGURE 7**

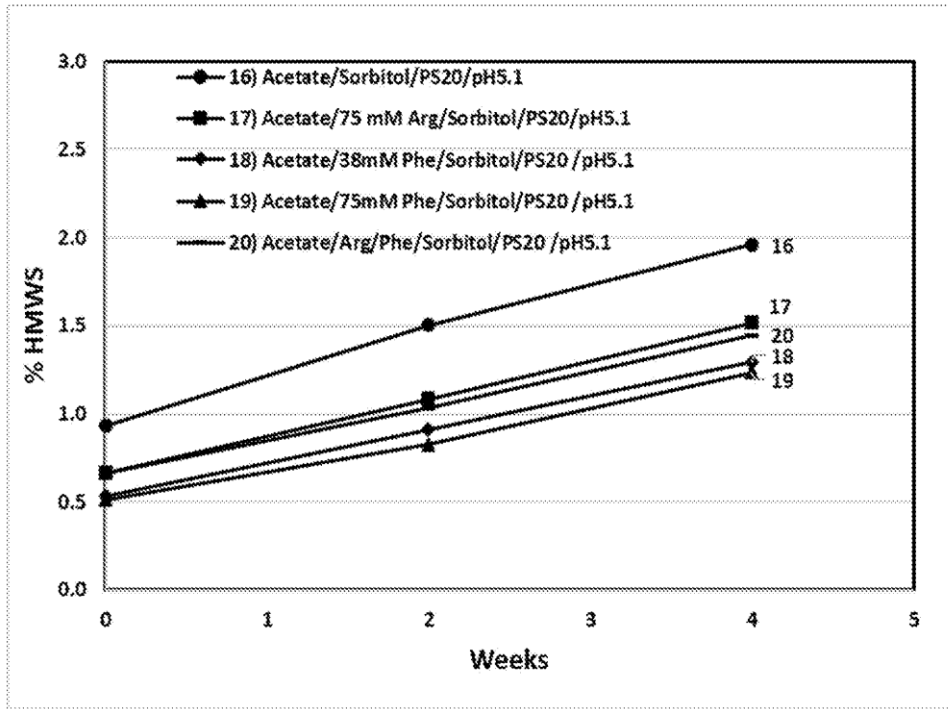


**FIGURE 8**

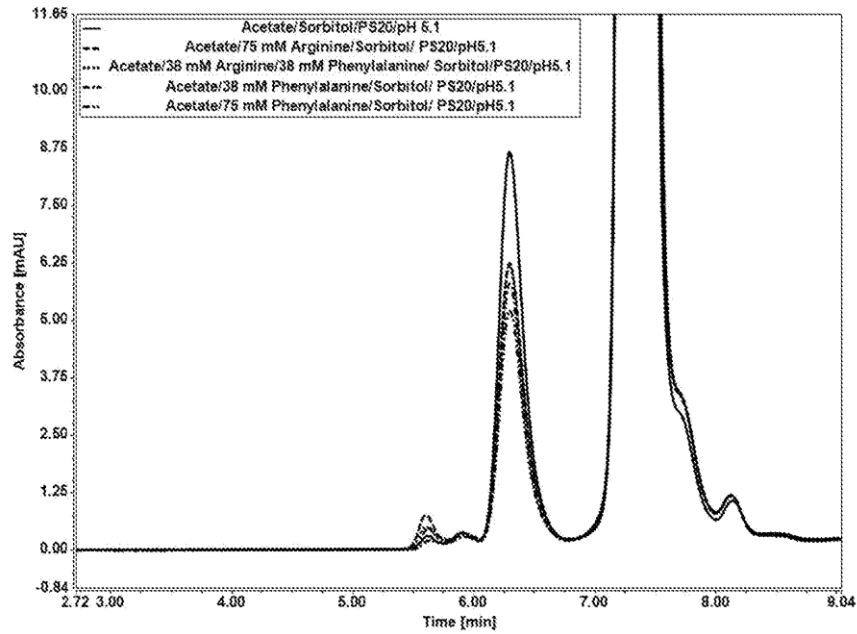


- R —●— Acetate/5% Sorbitol/PS20/pH 5.1
- T —▲— Acetate/2.4% Sorbitol/75mM Arg-HCl/PS20/pH 5.2
- V —□— Acetate/1.2% Sorbitol/113mM Arg-HCl/PS20/pH 5.2
- X —■— Acetate/150mM NAR/75mM Arg-HCl/PS20/pH 5.2
- Z ——— Acetate/3.6% Sorbitol/38mM Arg-Phe/PS20/pH 5.2
- S —◆— Acetate/3.6% Sorbitol/38mM Arg-HCl/PS20/pH 5.2
- U —▲— 18mM Acetate/2.4% Sorbitol/75mM Arg-HCl/PS20/pH 5.2
- W —○— Acetate/0% Sorbitol/150mM Arg-HCl/PS20/pH 5.1
- Y —◇— Acetate/3.6% Sorbitol/38mM Arg-Arg/PS20/pH 5.1
- Z ——— Acetate/3.6% Sorbitol/38 mM Arg-Phe/PS20/pH5.2

**FIGURE 9**



**FIGURE 10**



h

FIGURE 11A

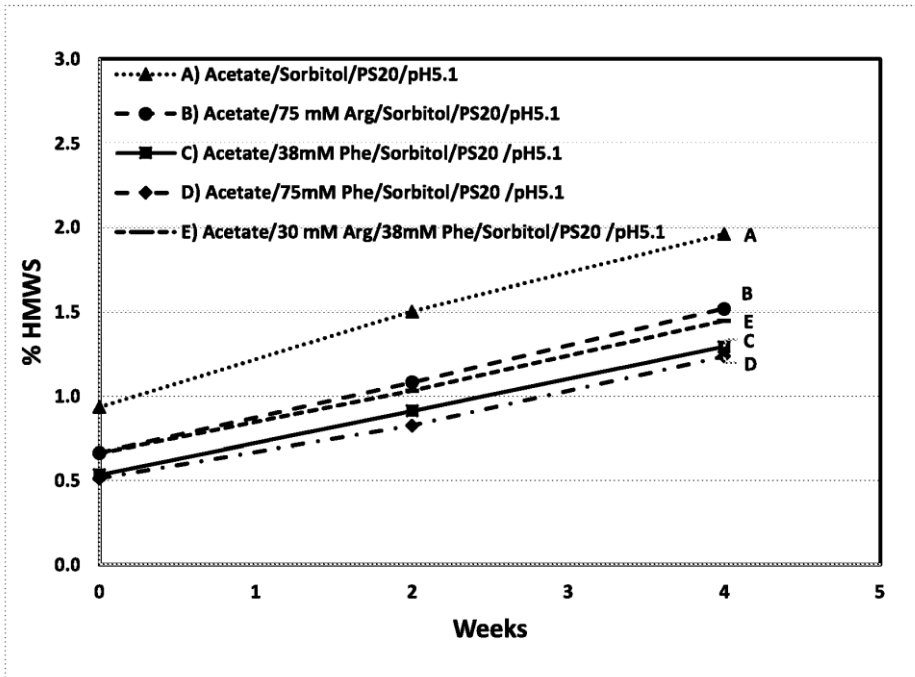
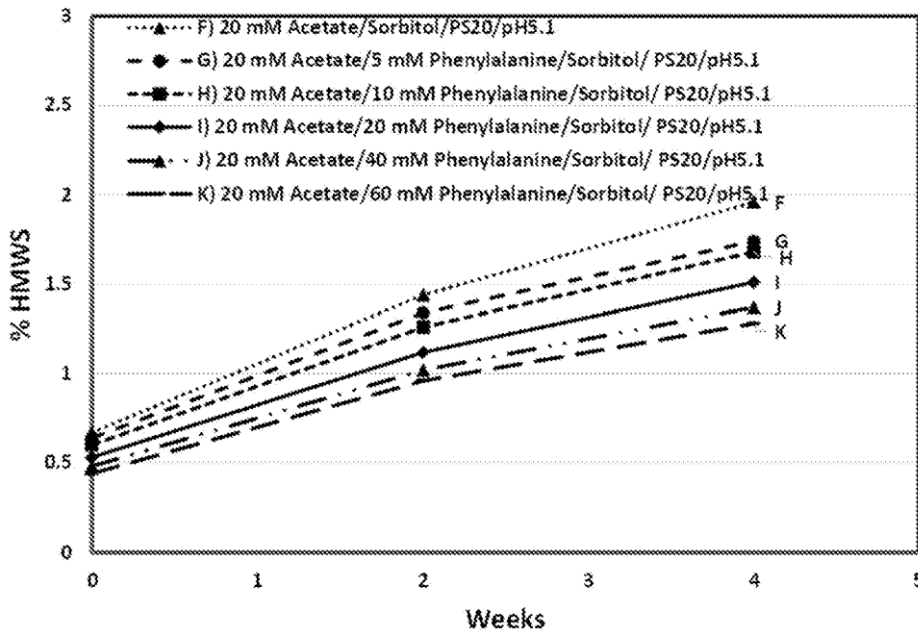


FIGURE 11B



B

FIGURE 12A

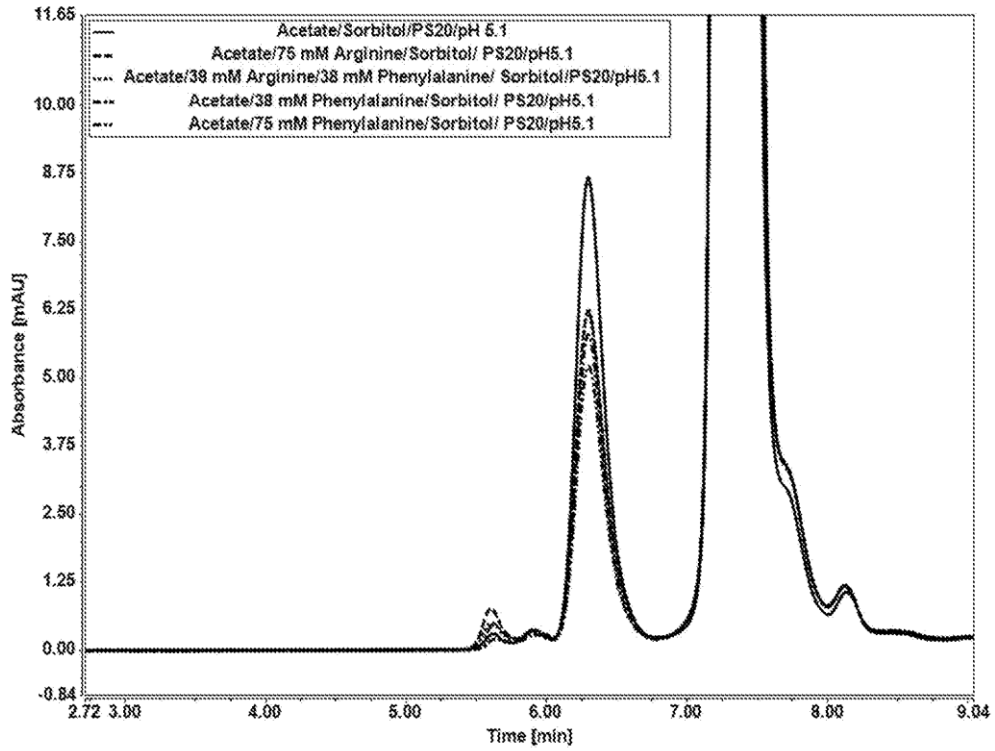
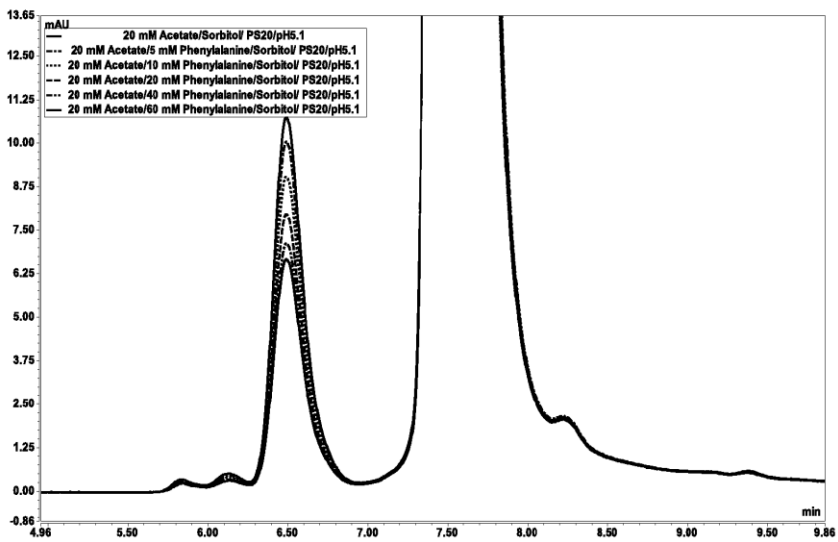
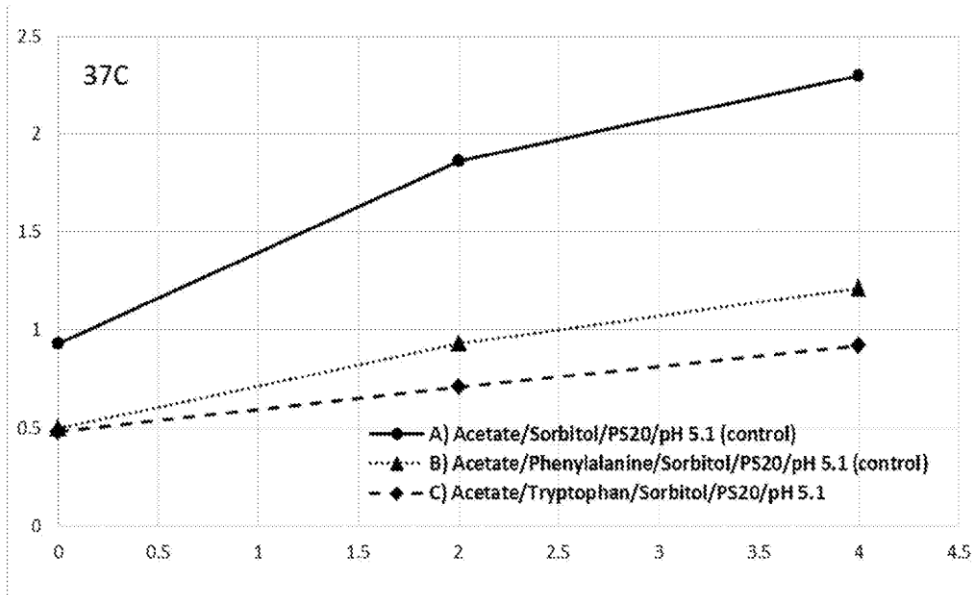


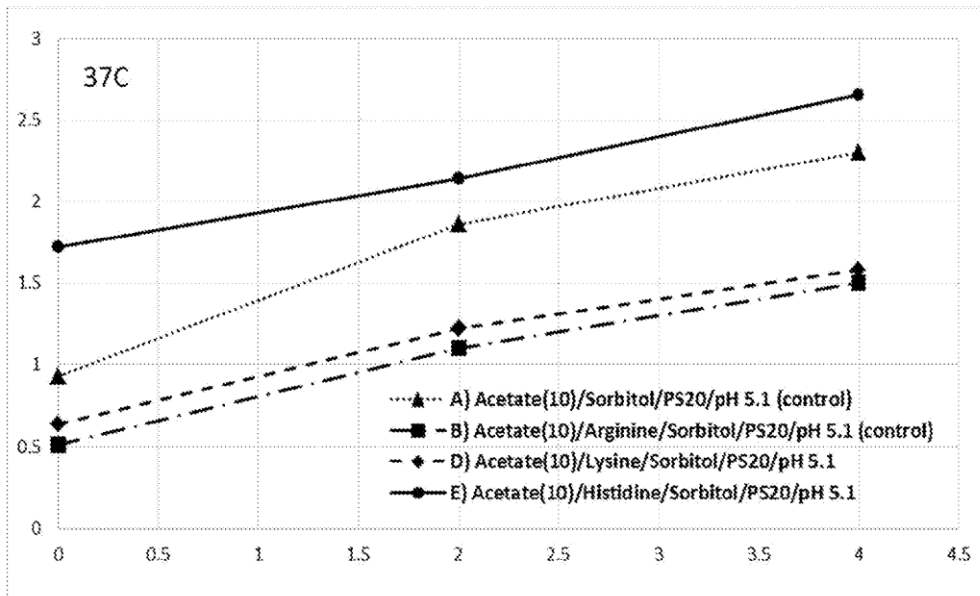
FIGURE 12B



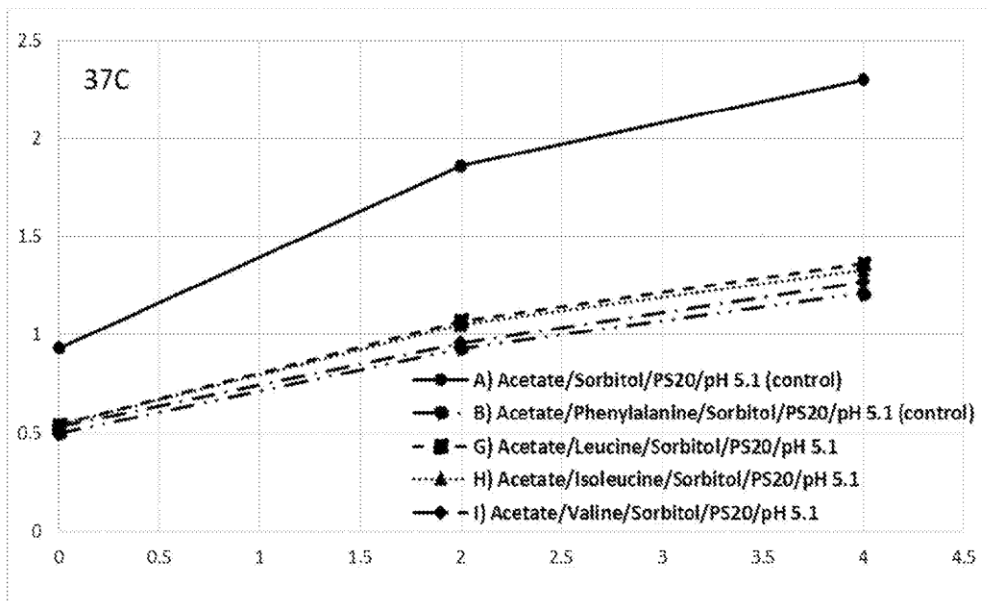
**FIGURE 13**



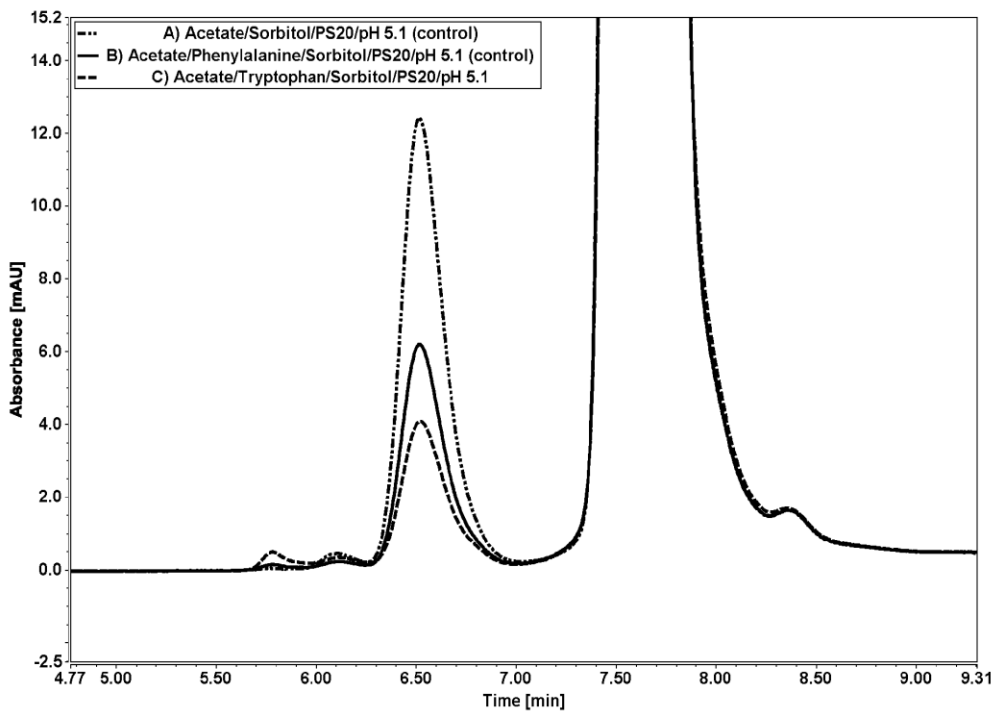
**FIGURE 14**



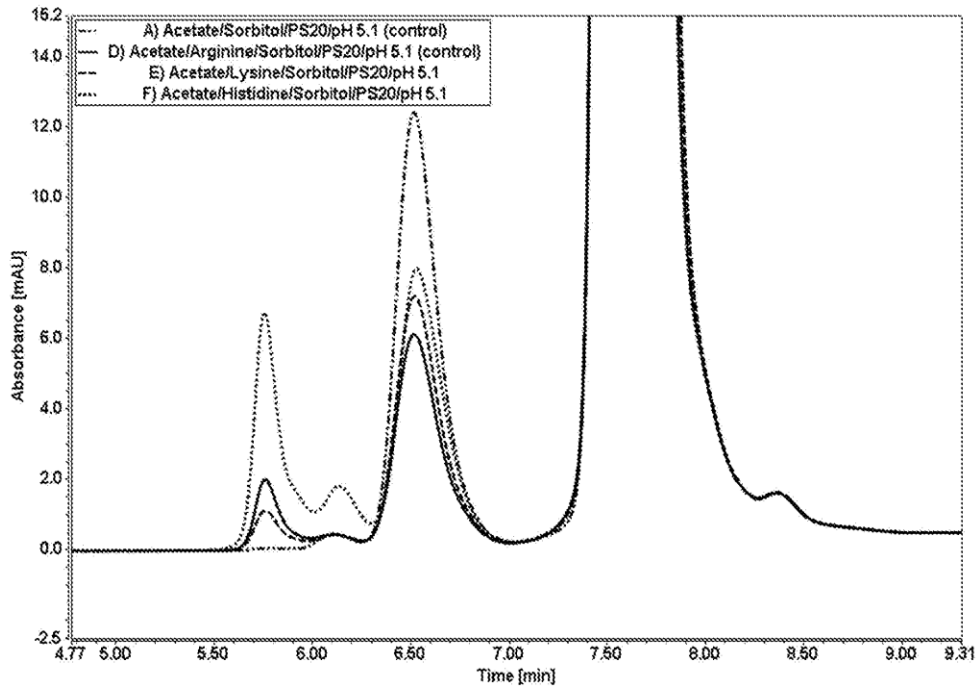
**FIGURE 15**



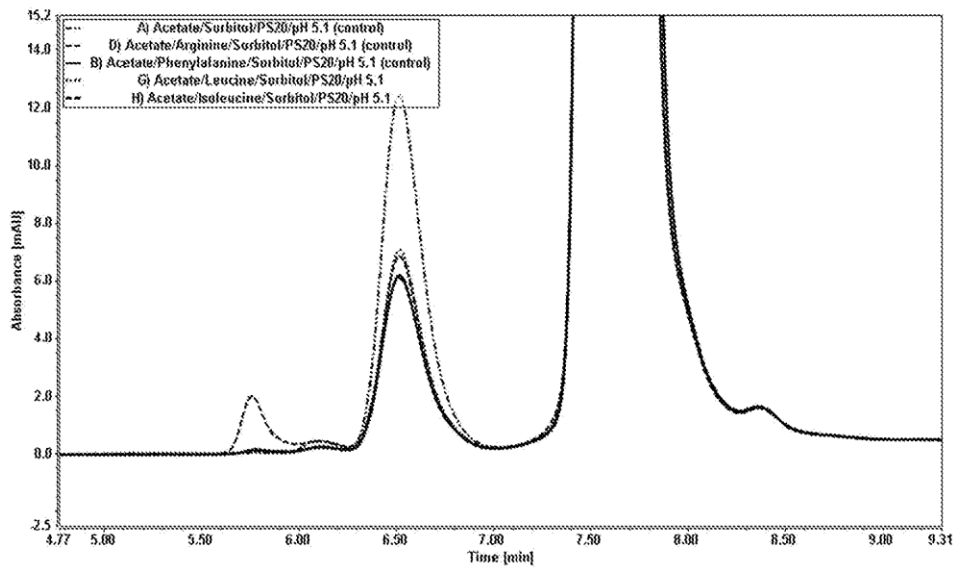
**FIGURE 16**



**FIGURE 17**



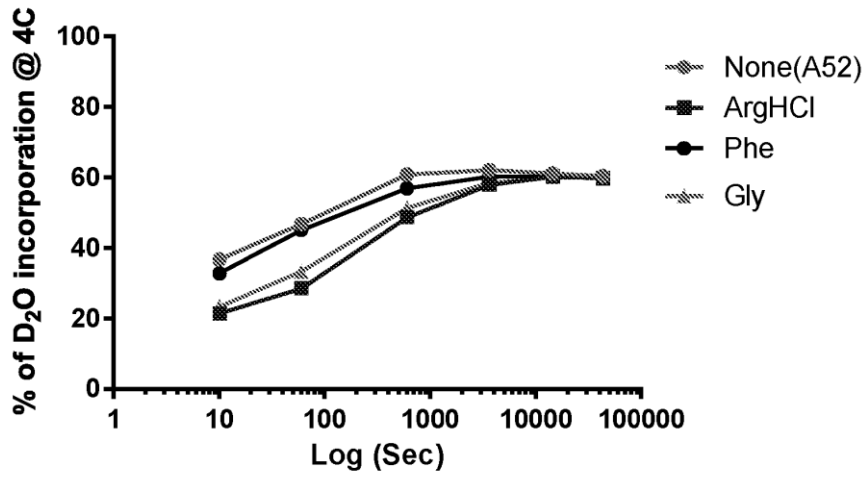
**FIGURE 18**



13

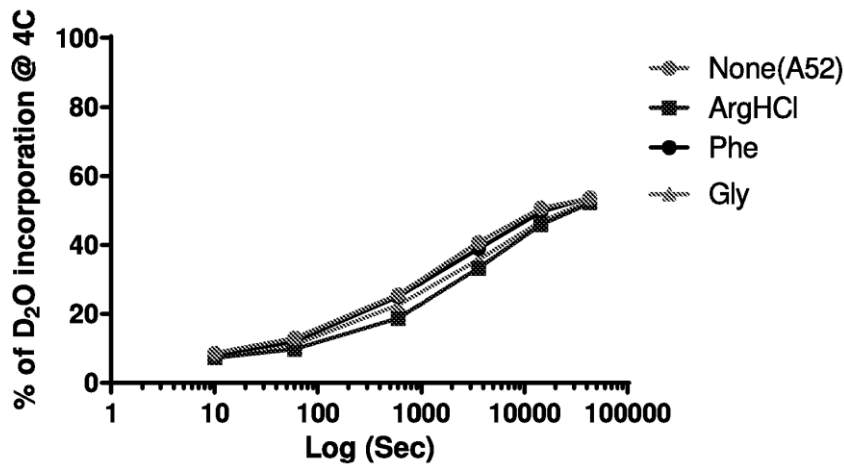
**FIGURE 19**

**LC 28-33  
QSVRGRY**



**FIGURE 20**

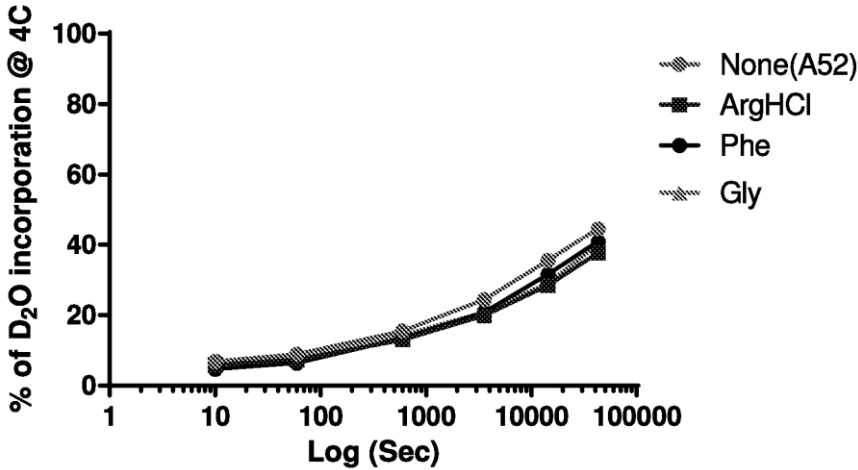
**LC 108-116(+2)  
KRTVAAPSV**



13

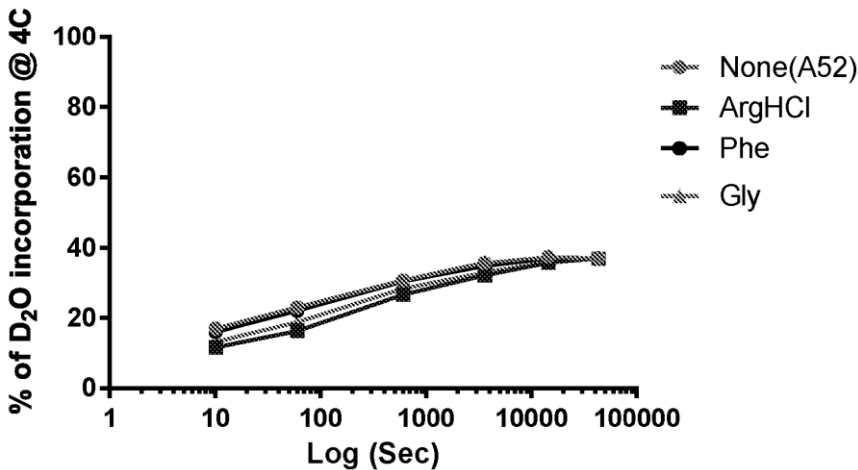
**FIGURE 21**

**LC 125-132(+2)  
QLKSGTAS**



**FIGURE 22**

**HC 47-59(+1)  
WVSGITGSGGSTY**



13

FIGURE 23

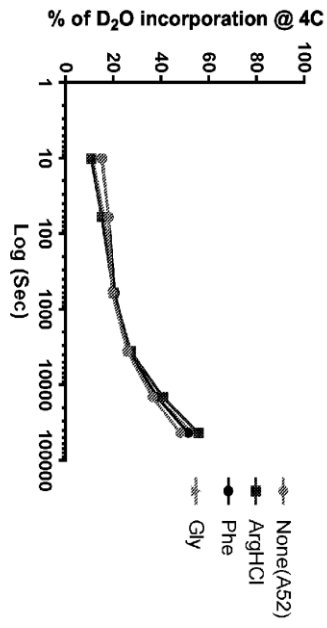
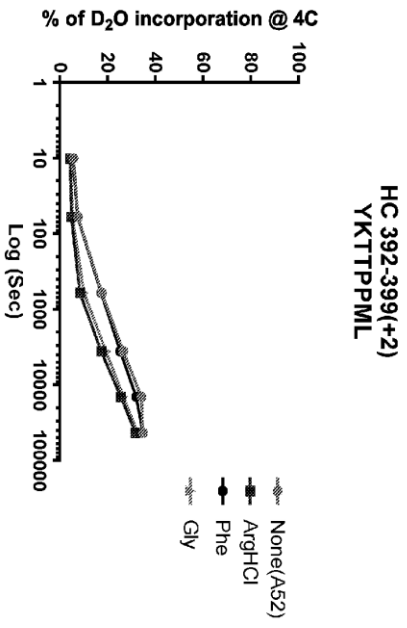
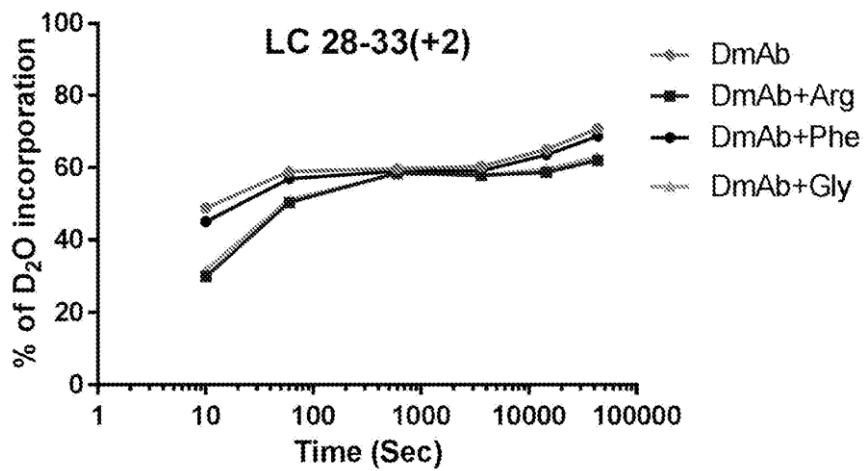


FIGURE 24

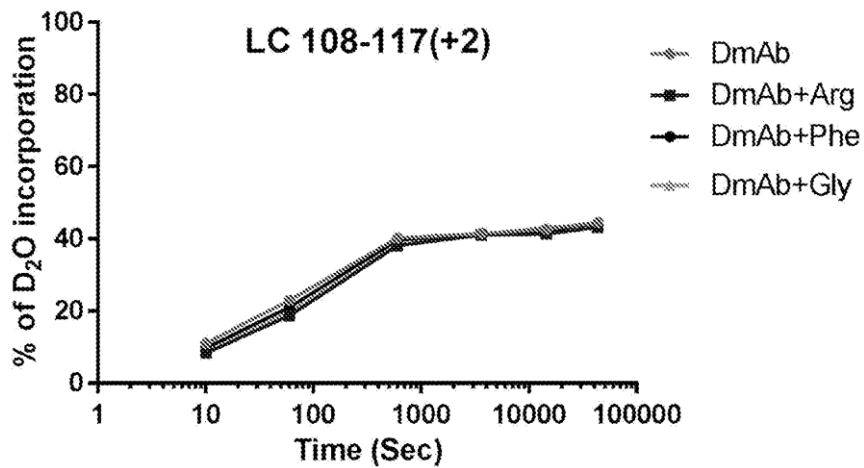


13

**FIGURE 25**

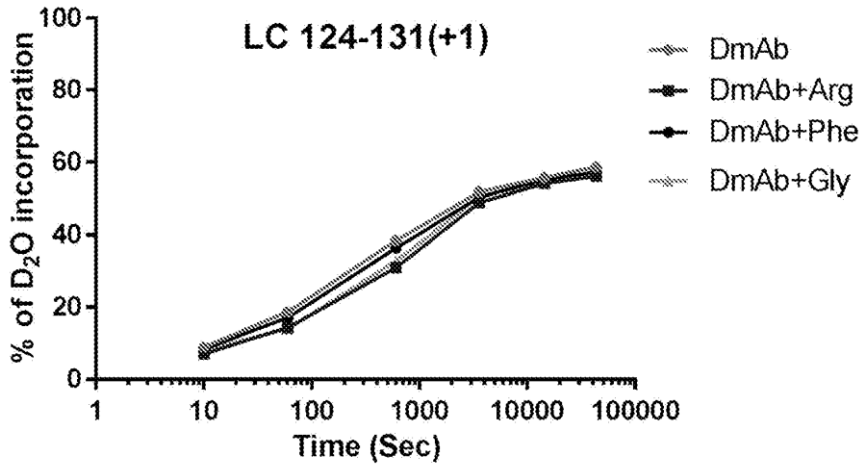


**FIGURE 26**

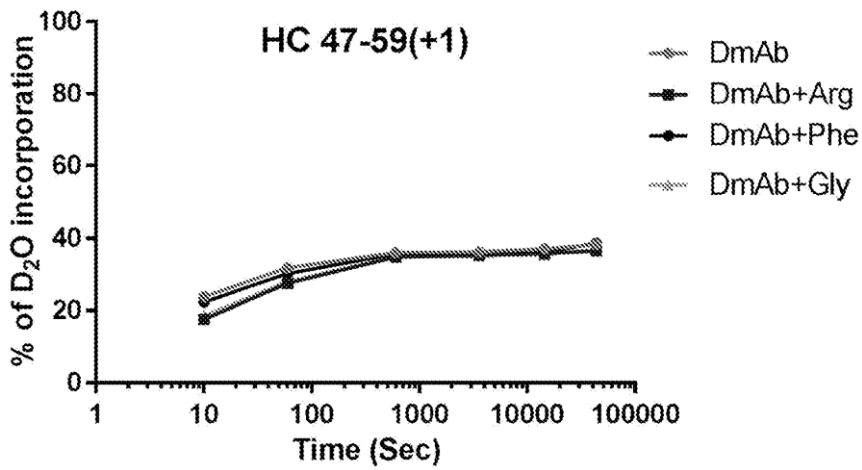


13

**FIGURE 27**

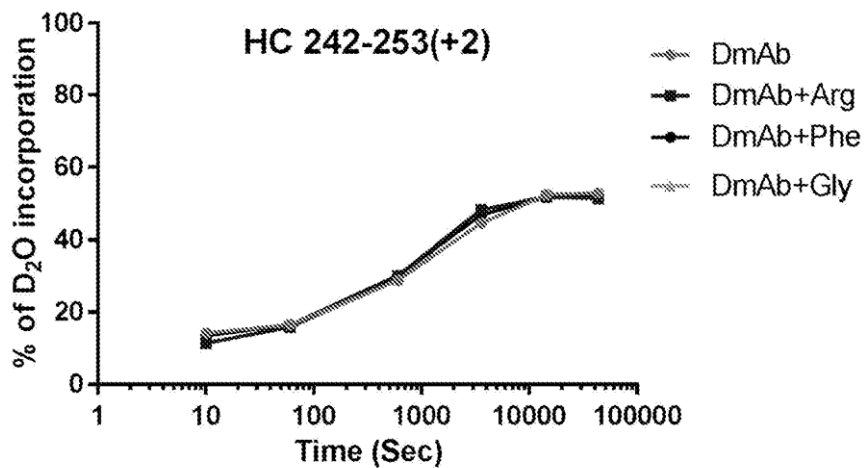


**FIGURE 28**

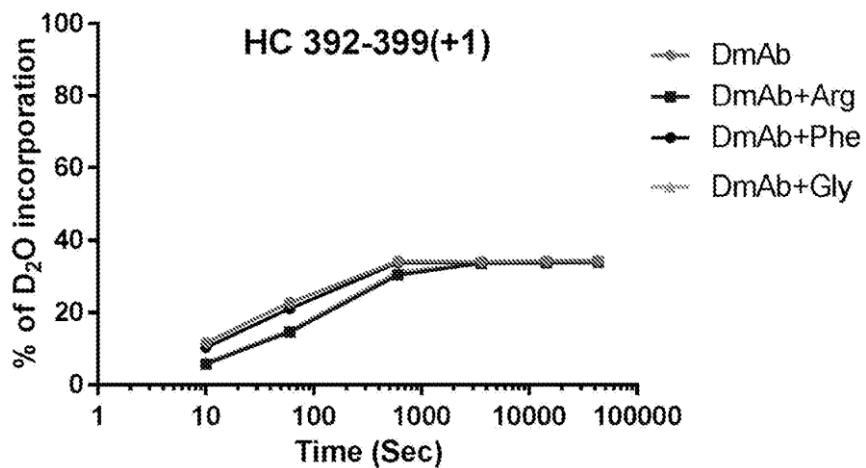


h

**FIGURE 29**



**FIGURE 30**



13

FIGURE 31

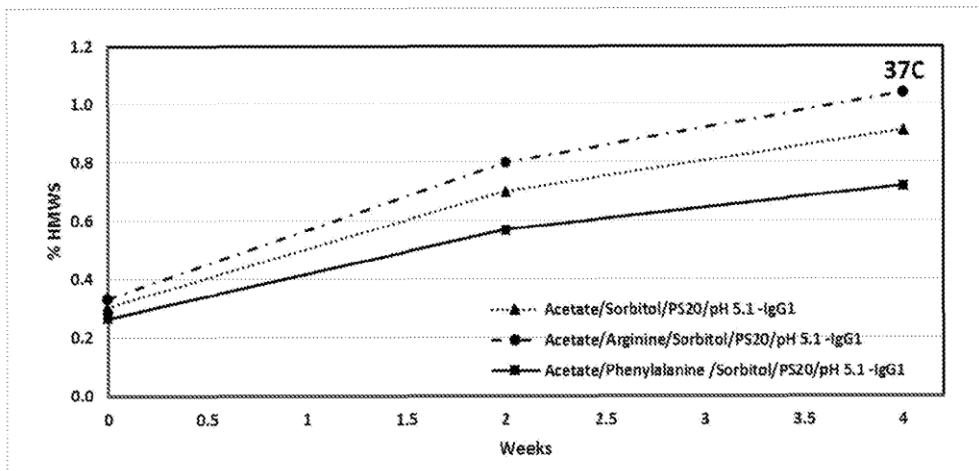
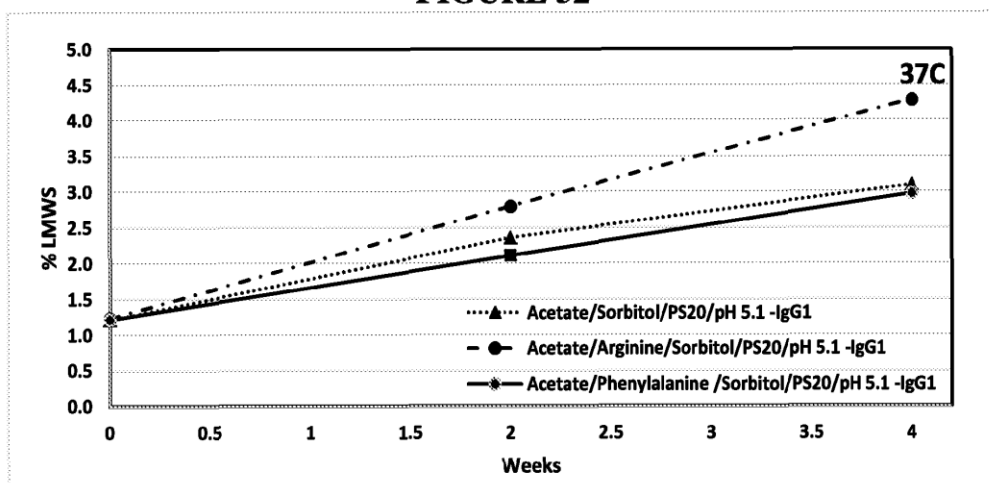
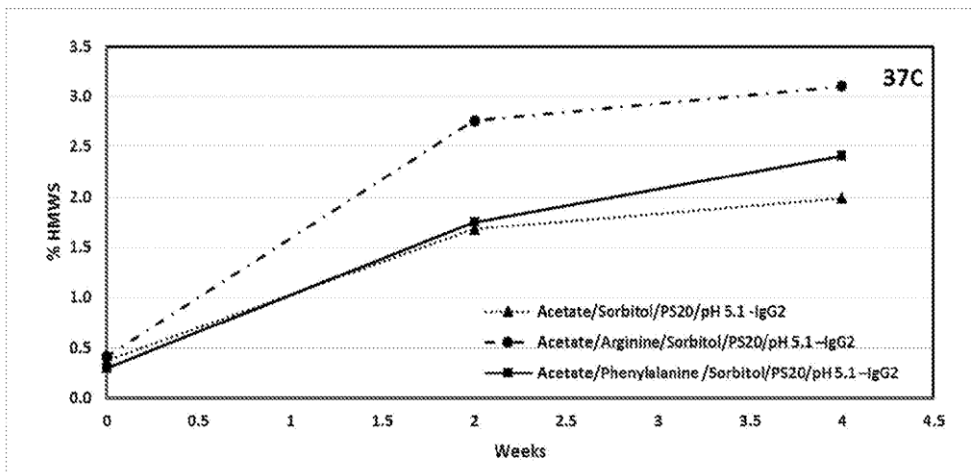


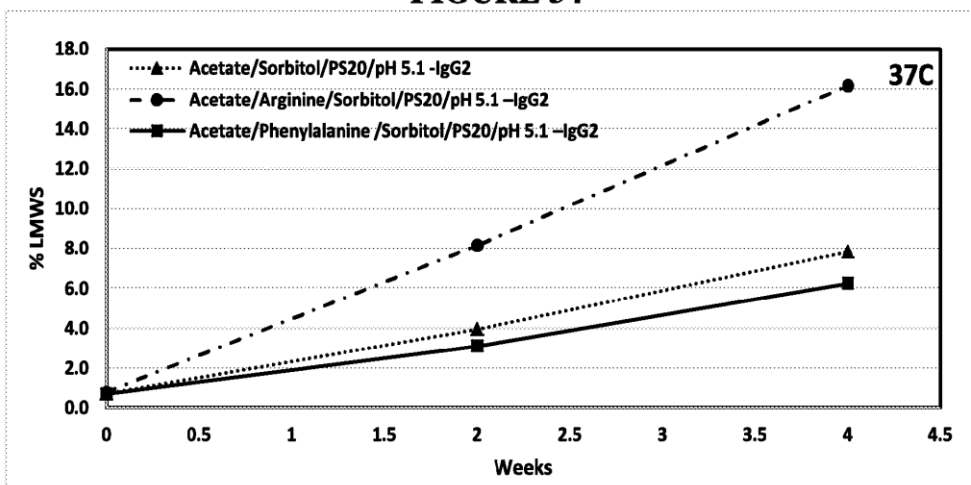
FIGURE 32



**FIGURE 33**

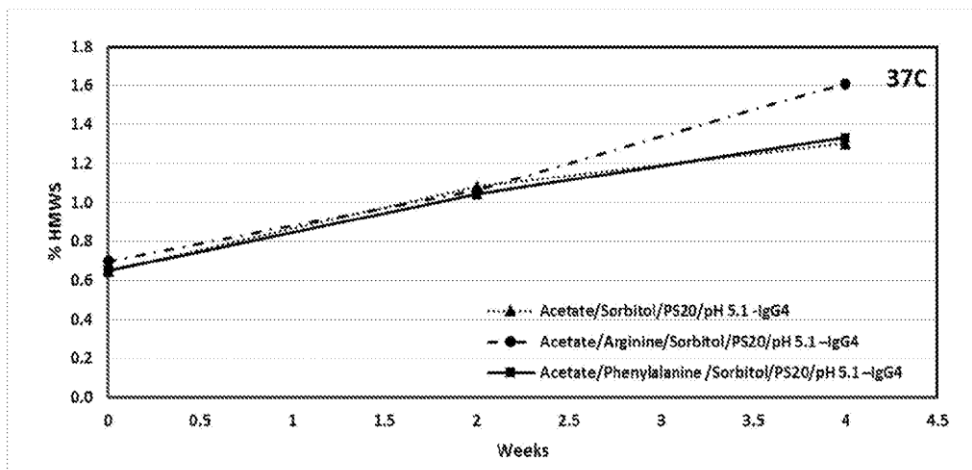


**FIGURE 34**

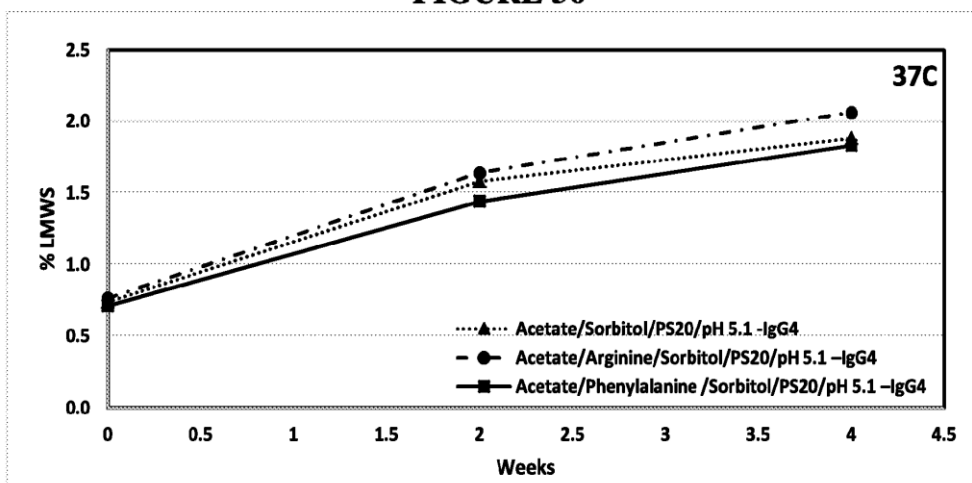


13

**FIGURE 35**

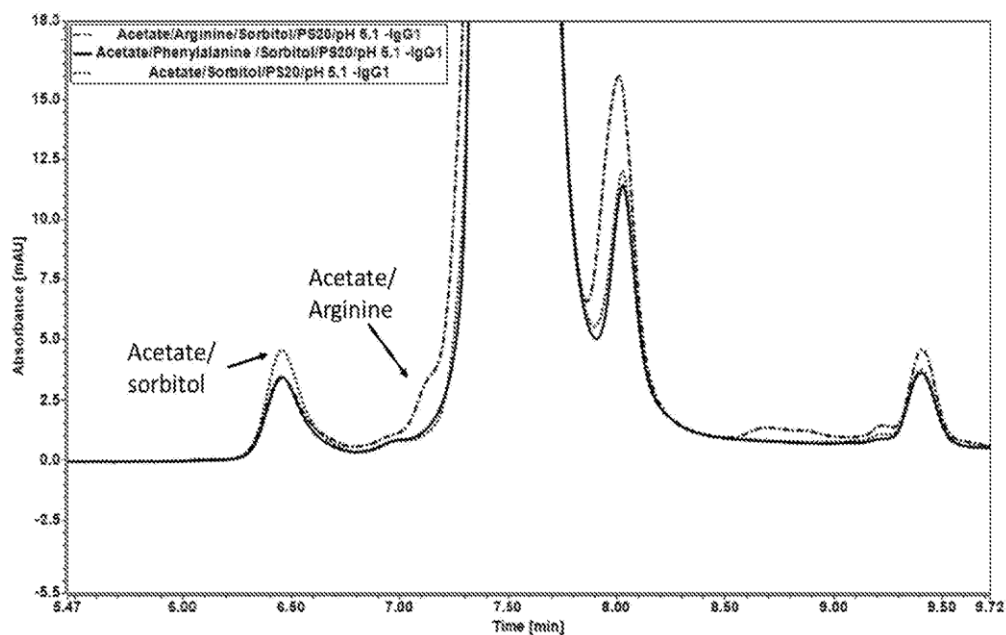


**FIGURE 36**

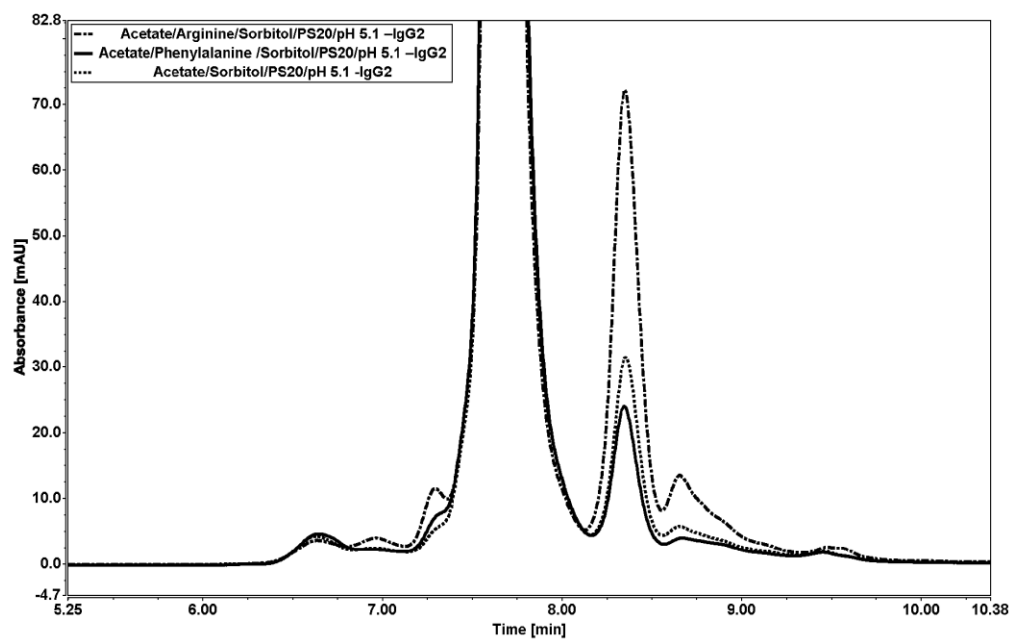


13

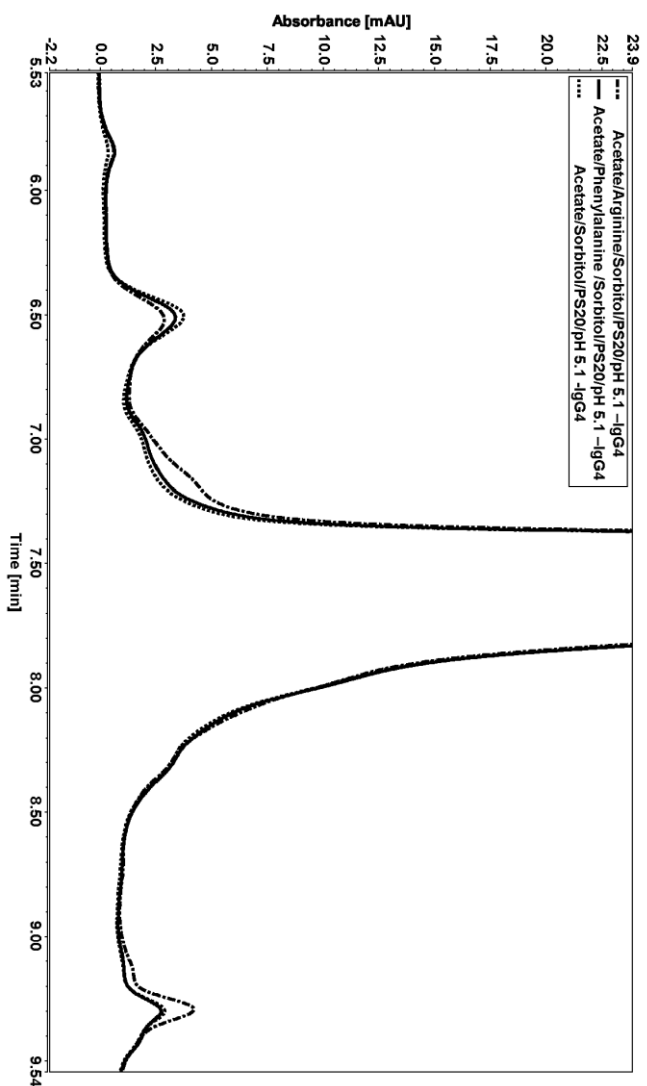
**FIGURE 37**



**FIGURE 38**



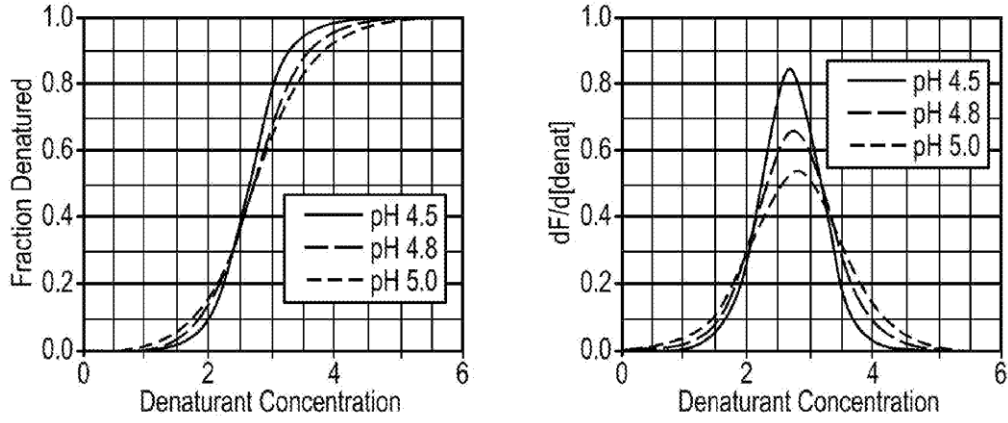
13



**FIGURE 39**

13

**FIGURE 40**



**FIGURE 41**

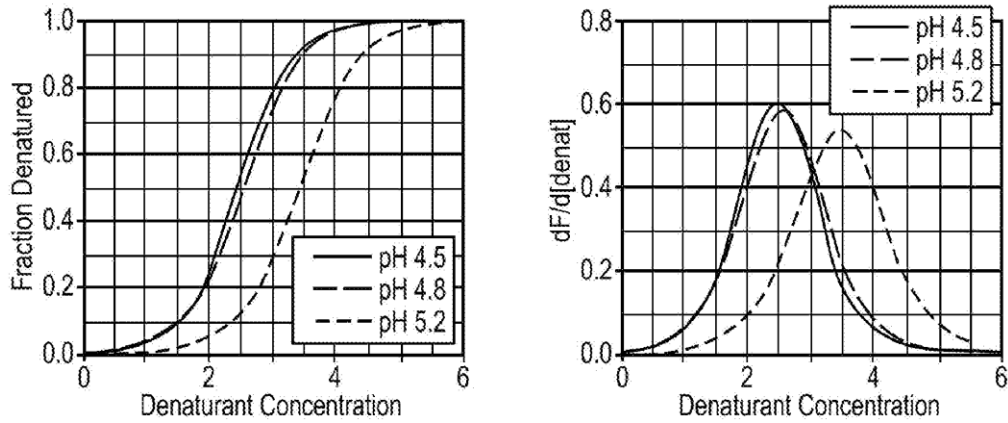


FIGURE 42

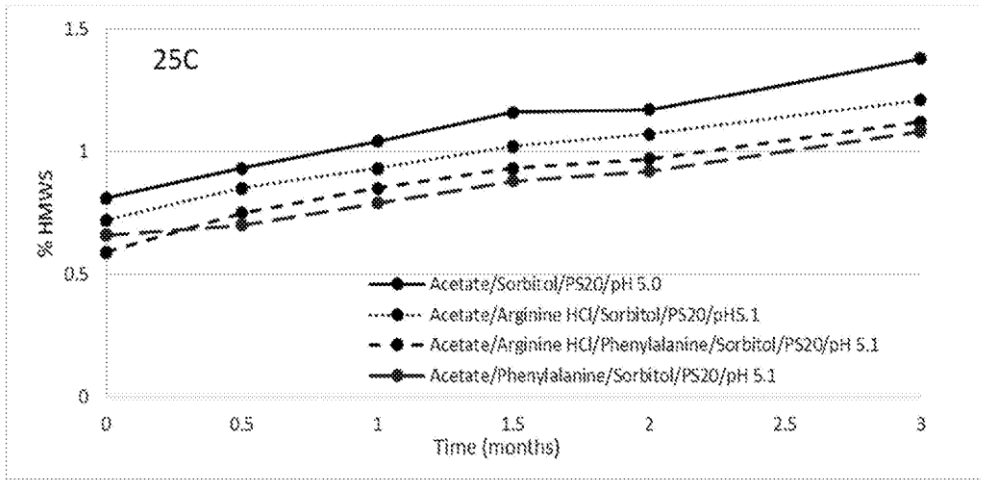


FIGURE 43

