

B

TRADUZIONE DEL BREVETTO EUROPEO N. 4121007 DAL TITOLO:
"FORMULAZIONI DI ANTICORPO ANTI-PROTOFIBRILLA DI PEPTIDE
BETA AMILOIDE AD ALTA CONCENTRAZIONE E RELATIVI METODI
DI UTILIZZO"

*** **

DESCRIZIONE

La presente domanda rivendica il beneficio di priorità della domanda provvisoria statunitense n. 62/992,746, depositata il 20 marzo 2020; e della domanda provvisoria statunitense n. 63/027,263, depositata il 19 maggio 2020.

La malattia di Alzheimer (AD) è un disturbo neurodegenerativo progressivo di eziologia sconosciuta e la forma di demenza la più comune tra gli anziani. Nel 2006, ci sono stati 26,6 milioni di casi di AD nel mondo (intervallo: 11,4-59,4 milioni) (Brookmeyer, R., et al., Forecasting the global burden of Alzheimer's Disease. Alzheimer Dement. 2007; 3:186-91), mentre ci sono stati più di 5 milioni di persone negli Stati Uniti secondo quanto riferito che convivono con AD (2010 Alzheimer's disease facts and figures. Alzheimer Dement. 2010;6:158-94). Entro l'anno 2050, la prevalenza mondiale di AD viene predetta crescere fino a 106,8 milioni (intervallo: 47,2-221,2 milioni), mentre solo negli Stati Uniti la prevalenza è stimata essere tra 11 e 16 milioni. (Brookmeyer, sopra, e 2010 Alzheimer's disease facts and figures, sopra).

La malattia generalmente comporta un declino globale delle funzioni cognitive che progredisce lentamente e lascia i soggetti in stadio terminale costretti a letto. I soggetti con AD sopravvivono tipicamente per solo da 3 a 10 anni dopo l'insorgenza di sintomi, sebbene siano noti estremi di 2 e 20 anni. (Hebert, L.E., et al., Alzheimer disease in the U.S. population: prevalence estimates using the 2000 census. Arch Neurol. 2003; 60:1119-1122.) L'Alzheimer è la settima causa principale di morte negli Stati Uniti e la quinta causa principale di morte negli americani di età superiore ai 65 anni, nonostante il fatto che la mortalità dovuta ad AD sia enormemente sottostimata dal momento che i certificati di morte raramente attribuiscono la causa di morte ad AD. (2010 Alzheimer's disease facts and figures, sopra.)

Istologicamente, la malattia è caratterizzata da placche neuritiche, trovate principalmente nella corteccia associativa, nel sistema limbico e nei gangli basali. Il principale costituente di queste placche è il peptide beta-amiloide ($A\beta$). L' $A\beta$ esiste in vari stati conformazionali - monomeri, oligomeri, protofibrille e fibrille insolubili. I dettagli della relazione meccanicistica tra l'insorgenza della malattia di Alzheimer e la produzione di $A\beta$ sono sconosciuti. Tuttavia, alcuni anticorpi anti- $A\beta$ sono attualmente in fase di studio clinico come potenziali agenti terapeutici per la malattia di Alzheimer.

Anticorpi anti- $A\beta$ e altre proteine possono essere somministrati a soggetti per via endovenosa, sottocutanea, intramuscolare e altri mezzi. Il dosaggio e/o la forma di dosaggio di un anticorpo possono presentare

numerose sfide per lo sviluppo di una formulazione farmaceutica adeguata. Ad esempio, ad alte concentrazioni di anticorpo, la stabilità dell'anticorpo può essere problematica a causa della formazione di aggregati proteina-proteina o di frammentazione. In generale, l'aggregazione aumenta con l'aumentare delle concentrazioni di anticorpo. Inoltre, le formulazioni di anticorpo ad alta concentrazione richiedono elevate concentrazioni di stabilizzanti e altri eccipienti al fine di ottenere stabilità proteica e durata di conservazione a lungo termine. Le formulazioni di anticorpo ad alta concentrazione sono spesso viscosi anche, complicando potenzialmente la produzione e la somministrazione della formulazione farmaceutica.

Qui vengono fornite formulazioni farmaceutiche comprendenti 80-300 mg/ml di un anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β o di un suo frammento che si lega alla protofibrilla di A β , in cui l'anticorpo è BAN2401 (noto anche come lecanemab). Le formulazioni farmaceutiche fornite qui sono state riscontrate essere vantaggiose. Ad esempio, nonostante le elevate concentrazioni dell'anticorpo anti-protofibrilla di A β (ad esempio, 100 mg/mL o 200 mg/mL), il tasso di aggregazione proteina-proteina è inaspettatamente basso e paragonabile a tassi di aggregazione tipicamente visti con concentrazioni di anticorpo molto più basse (ad esempio, 10 mg/mL). In alcune forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche attualmente divulgate presentano un tasso iniziale di aggregati inferiore rispetto a formulazioni aventi concentrazioni significativamente inferiori di anticorpo anti-protofibrilla di A β (ad

esempio, ~0,3% del livello iniziale di aggregati per 100 mg/mL di anticorpo anti-protofibrilla di A β rispetto a ~0,8% del livello iniziale di aggregati per 10 mg/mL di anticorpo anti-protofibrilla di A β). In alcune forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche attualmente divulgate presentano un tasso di generazione di particelle sub-visibili inferiore rispetto a formulazioni aventi concentrazioni significativamente inferiori dell'anticorpo anti-protofibrilla di A β (ad esempio, 10,6 particelle/mL per 100 mg/mL di anticorpo anti-protofibrilla di A β rispetto a 12,6 particelle/mL per 10 mg/mL di anticorpo anti-protofibrilla di A β). In alcune forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche attualmente divulgate presentano un tasso di aggregazione diminuito, un livello di aggregazione iniziale diminuito, un tasso di frammentazione proteica diminuito e/o una diminuzione nella formazione di particelle sub-visibili rispetto a formulazioni aventi concentrazioni significativamente inferiori dell'anticorpo anti-protofibrilla di A β . Bassi tasso di aggregazione, livello di aggregazione iniziale, tasso di frammentazione proteica e/o generazione di particelle sub-visibili possono consentire una maggiore stabilità e/o una maggiore durata di conservazione del prodotto. Inoltre, gli eccipienti nelle formulazioni farmaceutiche attualmente divulgate possono essere presenti in quantità inferiori rispetto ai prodotti endovenosi attualmente in commercio. In alcune forme di realizzazione, il pH e l'osmolalità delle formulazioni farmaceutiche attualmente divulgate sono accettabili per la somministrazione endovenosa dopo diluizione in fluidi endovenosi.

L'assegnazione di amminoacidi a ciascun dominio è, generalmente, conforme alle definizioni di SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (Kabat et al., 5a ed., U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91- 3242. 1991, di seguito riferito come "rapporto Kabat").

L'anticorpo anti-protofibrilla di A β secondo l'invenzione è BAN2401, noto anche come lecanemab. BAN2401 è una versione monoclonale di IgG1 umanizzata di mAb158, un anticorpo monoclonale murino prodotto per avere come bersaglio le protofibrille e divulgato in WO 2007/108756 e Journal of Alzheimer's Disease 43: 575-588 (2015). BAN2401 è un anticorpo anti-protofibrilla di A β , che dimostra una bassa affinità per il monomero di A β , pur legandosi con elevata selettività alle specie aggregate di A β solubili. Ad esempio, BAN2401 è stato riportato dimostrare una selettività approssimativamente 1000 volte e da 5 a 10 volte più elevata per le protofibrille di A β solubili rispetto rispettivamente ai monomeri di A β o alle fibrille in A β insolubili.

BAN2401 comprende (i) un dominio variabile di catena pesante comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:1 e (ii) un dominio variabile di catena leggera comprendente la sequenza amminoacidica di SEQ ID NO:2. Le sequenze di lunghezza intera di catena pesante e catena leggera di BAN2401 sono esposte in SEQ ID NO: 11 e 12 e sono descritte in WO 2007/108756 e in Journal of Alzheimer's Disease 43:575-588 (2015).

Altri esempi non limitativi di anticorpi da utilizzare come l'almeno un anticorpo anti-protofibrilla di A β nella presente divulgazione includono quelli divulgati in WO 2002/003911, WO 2005/123775, WO 2007/108756, WO 2011/001366, WO 2011/104696 e WO 2016/005466.

WO 2020/023530 si riferisce a metodi di trattamento e prevenzione della malattia di Alzheimer.

In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 85 mg/mL a 275 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 90 mg/mL a 250 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 95 mg/mL a 225 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 100 mg/mL a 200 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è presente in una concentrazione di 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 110 mg/mL, 120 mg/mL, 130 mg/mL, 140 mg/mL, 150 mg/mL, 160 mg/mL, 170 mg/mL, 180 mg/mL, 190 mg/mL, 200 mg/mL, 210 mg/mL, 220 mg/mL, 230 mg/mL, 240 mg/mL, 250 mg/mL, 260 mg/mL, 270 mg/mL, 280 mg/mL, 290 mg/mL, o 300 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è presente in una concentrazione di 100 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è presente in una concentrazione di 200 mg/mL. In alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è presente in una concentrazione di 250 mg/mL. In

alcune forme di realizzazione, l'anticorpo isolato è presente in una concentrazione di 300 mg/mL. La formulazione farmaceutica dell'invenzione comprende un tampone farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, il tampone è un tampone di citrato. In alcune forme di realizzazione, il tampone è un tampone di istidina. In alcune forme di realizzazione, l'almeno un componente aggiuntivo nella formulazione farmaceutica è scelto tra emulsionanti. In alcune forme di realizzazione, l'almeno un componente aggiuntivo nella formulazione farmaceutica è scelto tra acido citrico (o acido citrico monoidrato), cloruro di sodio e istidina (e/o cloridrato di istidina).

La concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica varia da circa 100 mM a circa 400 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica varia da circa 110 mM a circa 380 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica varia da circa 120 mM a circa 360 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica varia da circa 125 mM a circa 350 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica è di 125 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica è di 200 mM. In

alcune forme di realizzazione, la concentrazione di arginina (e/o cloridrato di arginina) nella formulazione farmaceutica è di 350 mM.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende istidina. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di istidina nella formulazione farmaceutica varia da circa 10 mM a circa 100 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di istidina nella formulazione farmaceutica varia da 10 mM a 100 mM, da 12 mM a 80 mM, da 14 mM a 60 mM, da 15 mM a 55 mM, da 15 mM a 35 mM, o da 15 mM a 25 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di istidina è 25 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di istidina è 50 mM.

La concentrazione di polisorbato 80 nella formulazione farmaceutica varia dallo 0,01 allo 0,1% in p/v, dallo 0,01 allo 0,08% in p/v, dallo 0,02 allo 0,08% in p/v, dallo 0,03 allo 0,07% in p/v, o dallo 0,04 allo 0,06% in p/v. In alcune forme di realizzazione, il polisorbato 80 è presente nella formulazione farmaceutica in una concentrazione dello 0,01% in p/v, 0,02% in p/v, 0,03% in p/v, 0,04% in p/v, 0,05% in p/v, 0,06% in p/v, 0,07% in p/v, o 0,08% in p/v. In alcune forme di realizzazione, il polisorbato 80 è presente nella formulazione farmaceutica in una concentrazione dello 0,02% in p/v. In alcune forme di realizzazione, il polisorbato 80 è presente nella formulazione farmaceutica in una concentrazione dello 0,05% in p/v.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende acido citrico monoidrato. In alcune forme di realizzazione, la

13

concentrazione di acido citrico monoidrato nella formulazione farmaceutica varia da circa 10 mM a 100 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di acido citrico monoidrato nella formulazione farmaceutica varia da 10 mM a 100 mM, da 10 mM a 90 mM, da 15 mM a 85 mM, da 20 mM a 80 mM, da 25 mM a 75 mM, da 30 mM a 70 mM, da 30 mM a 60 mM, o da 30 mM a 50 mM. In alcune forme di realizzazione, la concentrazione di acido citrico monoidrato nella formulazione farmaceutica è 50 mM.

La divulgazione fornisce una formulazione farmaceutica avente un pH nell'intervallo da 4,5 a 5,5. In alcune forme di realizzazione, il pH è 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 o 5,5. In alcune forme di realizzazione, il pH è 5,0.

In alcune forme di realizzazione, le formulazioni farmaceutiche qui divulgate possono essere sotto forma di una soluzione e/o di qualsiasi altra formulazione liquida idonea ritenuta appropriata da un tecnico del ramo di competenza ordinaria. La via di somministrazione delle composizioni della presente divulgazione può essere endovenosa o sottocutanea. In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica è formulata come un liquido sterile, apirogeno per somministrazione endovenosa. In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica è formulata come liquido sterile, apirogeno per la somministrazione sottocutanea. In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica è una soluzione salina.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende 100 mg/mL di BAN2401, acido citrico monoidrato 50 mM, arginina 110 mM, arginina cloridrato 240 mM, e 0,05% (in p/v) di polisorbato 80, ed ha un pH di $5,0 \pm 0,4$.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende 100 mg/mL o 200 mg/mL di BAN2401, istidina e istidina cloridrato 25 mM, arginina cloridrato 200 mM, e 0,05% (in p/v) di polisorbato 80, ed ha un pH di $5,0 \pm 0,4$.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende 200 mg/mL di BAN2401, istidina e istidina cloridrato 50 mM, arginina cloridrato 125 mM, e 0,02% (in p/v) di polisorbato 80, ed ha un pH di $5,0 \pm 0,4$.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica comprende 200 mg/mL di BAN2401, acido citrico 50 mM (e/o acido citrico monoidrato), arginina (e/o arginina cloridrato) 125 mM, e 0,02% (in p/v) di polisorbato 80, ed ha un pH di $5,0 \pm 0,4$.

BAN2401 e i metodi che comprendono l'uso di BAN2401 sono divulgati nella domanda provvisoria statunitense n. 62/749,614 e nella domanda internazionale PCT n. PCT/US2019/043067.

Breve descrizione dei disegni

La Figura 1 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 5 °C.

La Figura 2 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 5 °C.

La Figura 3 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 5 °C.

La Figura 4 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 5 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 6 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 7 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 a valori di pH di 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 5 °C.

La Figura 8 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 a valori di pH di 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 5 °C.

La Figura 9 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 a valori di pH di 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 5 °C.

La Figura 10 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 a valori di pH di 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 11 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 a valori di pH di 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 12 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 a valori di pH di 4,5, 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5 ai punti temporali 0, 1, 2 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 13 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1 e 2 mesi a 25 °C.

La Figura 14 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1 e 2 mesi a 25 °C.

La Figura 15 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 a 10 mg/mL, 100 mg/mL e 200 mg/mL ai punti temporali 0, 1 e 2 mesi a 25 °C.

La Figura 16 illustra la percentuale di aggregazione di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 in funzione della concentrazione di arginina.

La Figura 17 illustra un diagramma di flusso per il processo di produzione di un'iniezione di BAN2401 da 10 mg/mL.

La Figura 18 illustra un diagramma di flusso per il processo di produzione di un'iniezione di BAN2401 da 100 mg/mL.

La Figura 19 illustra i valori di pH delle formulazioni di BAN2401 a valori di pH ai punti temporali 0 e 12 mesi a 5 °C.

La Figura 20 illustra i valori di pH delle formulazioni di BAN2401 ai valori di pH ai punti temporali 0, 1 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 21 illustra i valori di pH delle formulazioni di BAN2401 ai valori di pH dopo un mese a 5 °C e con agitazione a 25 °C.

La Figura 22 illustra l'assorbanza a 405 nm delle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1, 3, 6, 9 e 12 mesi a 5 °C.

La Figura 23 illustra l'assorbanza a 405 nm delle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 24 mostra l'assorbanza a 405 nm delle formulazioni di BAN2401 a un mese a 5 °C e con agitazione a 25 °C.

La Figura 25 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 ai tempi 0, 1, 3, 6, 9 e 12 mesi a 5 °C.

La Figura 26 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1, 3, 6, 9 e 12 mesi a 5 °C.

La Figura 27 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1, 3, 6, 9 e 12 mesi a 5 °C.

La Figura 28 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 29 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 30 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 ai punti temporali 0, 1 e 3 mesi a 25 °C.

La Figura 31 illustra la percentuale di aggregazione nelle formulazioni di BAN2401 a un mese a 5 °C e con agitazione a 25 °C.

La Figura 32 illustra la percentuale di frammentazione nelle formulazioni di BAN2401 a un mese a 5 °C e con agitazione a 25 °C.

La Figura 33 illustra la percentuale di monomeri nelle formulazioni di BAN2401 a un mese a 5 °C e con agitazione a 25 °C.

Definizioni

Di seguito sono riportate le definizioni di termini utilizzati nella presente domanda.

Come utilizzato qui i termini singolari "uno/un", "una/un'", e "il/lo/la/l'" includono il riferimento plurale a meno che il contesto non indichi chiaramente diversamente.

La frase "e/o", come usata qui, significa "uno o entrambi" degli elementi così uniti, vale a dire elementi che sono presenti congiuntamente in alcuni casi e disgiuntamente presenti in altri casi. Pertanto, a titolo di esempio non limitativo, "A e/o B", quando utilizzato in combinazione con un linguaggio aperto come "comprendente", può riferirsi, in alcune forme di realizzazione, ad A solamente (includendo facoltativamente elementi diversi da B); in altre forme di realizzazione, a B solamente (includendo facoltativamente elementi diversi da A); in altre forme di realizzazione ancora, ad entrambi A e B (includendo facoltativamente altri elementi); eccetera.

Come utilizzato qui, "almeno uno" significa uno o più degli elementi nell'elenco di elementi, ma non necessariamente includendo almeno uno di ogni elemento specificamente elencato nell'elenco di elementi e non escludendo qualsiasi combinazione di elementi nell'elenco di elementi. Questa definizione consente inoltre che elementi possano facoltativamente essere presenti diversi dagli elementi specificamente identificati nell'elenco di elementi a cui si riferisce la frase "almeno uno", siano essi correlati o meno a quegli elementi specificamente identificati. Pertanto, come esempio non limitativo, "almeno uno tra A e B" (o, equivalentemente, "almeno uno tra A o B", o, equivalentemente "almeno uno tra A e/o B") può riferirsi, in una forma di realizzazione, ad almeno uno, facoltativamente comprendente più di uno, A, senza B presente (e facoltativamente includente elementi diversi da B); in un'altra forma di realizzazione, ad almeno uno, facoltativamente includente più di uno, B, senza A presente (e facoltativamente includente elementi diversi da A); in un'altra forma di realizzazione ancora, ad almeno uno, facoltativamente includente più di uno, A, e ad almeno uno, facoltativamente includente più di uno, B (e facoltativamente includente altri elementi); eccetera.

Quando un numero viene indicato, da solo o come parte di un intervallo numerico, dovrebbe essere inteso che il valore numerico può variare al di sopra e al di sotto del valore indicato con una variazione che è ragionevole per il valore descritto, come riconosciuto da un tecnico del ramo.

Come utilizzato qui, un " frammento " di un anticorpo comprende una porzione dell' anticorpo, ad esempio comprendente una sua regione legante l' antigene o variabile. Esempi non limitativi di frammenti includono frammenti Fab, frammenti Fab', frammenti F(ab')₂, frammenti Fv, diabody, anticorpi lineari e molecole di anticorpi a catena singola.

Come utilizzato qui, " frammentazione " o " formazione di frammenti " si riferisce alla degradazione di un anticorpo o di un suo frammento quando è in o aggiunto a una formulazione. Un frammento generato dalla frammentazione o dalla formazione di frammenti può o meno essere in grado di legarsi all' antigene a cui si lega l' anticorpo o il suo frammento.

Come utilizzato qui, " tampone di istidina " può comprendere istidina, istidina cloridrato o una loro combinazione, in cui l' istidina cloridrato può essere istidina cloridrato monoidrato.

Come utilizzato qui, " tampone di citrato " può comprendere acido citrico, suoi sali o una loro combinazione, in cui l' acido citrico può essere acido citrico monoidrato o acido citrico anidro.

Forme di realizzazione non limitative della divulgazione:

Alcune forme di realizzazione della presente divulgazione si riferiscono a formulazioni farmaceutiche acquose.

Concentrazione di anticorpo

Per qualsiasi delle formulazioni farmaceutiche acquose qui descritte, l' anticorpo può essere presente nelle seguenti concentrazioni.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione di 100 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione di 200 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 80 mg/mL a 300 mg/mL. In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 80 mg/mL a 240 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 100 mg/mL a 200 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 80 mg/mL a 300 mg/mL, da 85 mg/mL a 275 mg/mL, da 90 mg/mL a 250 mg/mL, da 95 mg/mL a 225 mg/mL, da 100 a 200 mg/mL. In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione che varia da 90 mg/mL a 220 mg/mL, da 100 mg/mL a 210 mg/mL, o da 110 mg/mL a 200 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione

di 80 mg/mL, 90 mg/mL, 100 mg/mL, 110 mg/mL, 120 mg/mL, 180 mg/mL, 190 mg/mL, 200 mg/mL, 210 mg/mL, 220 mg/mL, 230 mg/mL, 240 mg/mL, 250 mg/mL, 260 mg/mL, 270 mg/mL, 280 mg/mL, 290 mg/mL, o 300 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione di 100 mg/mL.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, l'anticorpo anti-protofibrilla di A β isolato è presente in una concentrazione di 200 mg/mL.

Arginina

Per qualsiasi delle formulazioni farmaceutiche acquose descritte qui, la formulazione comprende arginina. L'arginina è arginina, arginina cloridrato o una loro combinazione.

La concentrazione di arginina varia da circa 100 mM a circa 400 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di arginina varia da 110 mM a 380 mM, da 120 mM a 360 mM, da 125 mM a 350 mM, da 100 mM a 200 mM, da 125 mM a 200 mM o da 150 mM a 200 mM. In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di arginina varia da 150 mM a 250 mM, da 160 mM a 240 mM, da 170 mM a 230 mM, da 180 mM a 220 mM, da 190 mM a 210 mM di arginina, arginina cloridrato, o una loro combinazione.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di arginina è 125 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di arginina è 200 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di arginina varia da 200 mM a 400 mM, da 210 mM a 390 mM, da 220 mM a 380 mM, da 230 mM a 370 mM, da 240 mM a 360 mM, da 240 mM a 350 mM o da 250 mM a 350 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di arginina è 350 mM.

Polisorbato 80 (PS80)

Per qualsiasi delle formulazioni farmaceutiche acquose descritte qui, la formulazione comprende polisorbato 80 dallo 0,01% in p/v allo 0,1% in p/v.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione di polisorbato 80 varia da circa lo 0,01% in p/v allo 0,08% in p/v, dallo 0,02% in p/v allo 0,08% in p/v, dallo 0,03% in p/v allo 0,07% in p/v, o dallo 0,04% in p/v allo 0,06% in p/v.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il polisorbato 80 è presente in una concentrazione dello 0,01% in p/v, 0,02% in p/v, 0,03% in p/v, 0,04% in p/v, 0,05% in p/v, 0,06% in p/v, 0,07% in p/v, o 0,08% in p/v.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il polisorbato 80 è presente in una concentrazione dello 0,02% in p/v.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il polisorbato 80 è presente in una concentrazione dello 0,05% in p/v.

Tampone

Per qualsiasi delle formulazioni farmaceutiche acquose descritte qui, la formulazione comprende un tampone farmaceuticamente accettabile come di seguito.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone farmaceuticamente accettabile è tampone di citrato.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di citrato è presente in una concentrazione da circa 10 mM a circa 100 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione del tampone di citrato varia da 10 mM a 100 mM, da 10 mM a 90 mM, da 15 mM a 85 mM, da 20 mM a 80 mM, da 25 mM a 75 mM, da 30 mM a 70 mM, da 30 mM a 60 mM, o da 30 mM a 50 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di citrato è presente in una concentrazione di 50 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone farmaceuticamente accettabile è un tampone di istidina.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina è presente in una concentrazione da circa 10 mM a circa 100 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la concentrazione del tampone di istidina varia da 10 mM a 100 mM, da

12 mM a 80 mM, da 14 mM a 60 mM, o da 15 mM a 55 mM, da 15 mM a 35 mM, o da 15 mM a 25 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina è presente in una concentrazione di 25 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina è presente in una concentrazione di 50 mM.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina comprende istidina e cloridrato di istidina monoidrato. In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina comprende istidina e cloridrato di istidina monoidrato, in cui l'istidina è in una concentrazione da circa 0,1 a 0,3 mg/mL e l'istidina cloridrato monoidrato è in una concentrazione da circa 4 a 6 mg/mL. In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina comprende istidina e cloridrato di istidina monoidrato, in cui l'istidina è in una concentrazione di circa 0,26 mg/mL e l'istidina cloridrato monoidrato è in una concentrazione di circa 4,89 mg/mL. In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il tampone di istidina comprende istidina e cloridrato di istidina monoidrato, in cui l'istidina comprende 0,2-0,3 mg/mL di istidina e 4,4-4,9 mg/mL di cloridrato di istidina, facoltativamente in cui l'istidina cloridrato è monoidrato.

pH

Per qualsiasi delle formulazioni farmaceutiche acquose descritte qui, la formulazione ha un pH che varia da 4,5 a 5,5.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il pH è 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9, 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4 o 5,5.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, il pH è 5,0.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la formulazione farmaceutica è adeguata per iniezione endovenosa.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica, la formulazione farmaceutica è adeguata per iniezione sottocutanea.

In alcune forme di realizzazione della formulazione farmaceutica acquosa la formulazione farmaceutica comprende metionina.

In alcune forme di realizzazione, viene divulgata una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- (a) BAN2401 da 80 mg/mL a 240 mg/mL,
- (b) arginina cloridrato da 140 mM a 260 mM,
- (c) polisorbato 80 dallo 0,01% in p/v allo 0,1% in p/v, e
- (d) tampone di istidina da 15 mM a 35 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5.

In alcune forme di realizzazione, viene divulgata qui una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- (a) BAN2401 da 80 mg/mL a 120 mg/mL,
- (b) arginina da 240 mM a 360 mM,
- (c) polisorbato 80 dallo 0,03% in p/v allo 0,08% in p/v, e
- (d) tampone di citrato da 30 mM a 70 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5, e in cui l'arginina è arginina, arginina cloridrato o una loro combinazione.

In alcune forme di realizzazione, viene divulgata qui una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- (a) BAN2401 100 mg/mL,
- (b) arginina cloridrato 200 mM,
- (c) polisorbato 80 allo 0,05% in p/v, e
- (d) tampone di istidina 25 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5.

In alcune forme di realizzazione, viene divulgata qui una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- (a) BAN2401 200 mg/mL,
- (b) arginina cloridrato 200 mM,
- (c) polisorbato 80 allo 0,05% in p/v, e
- (d) tampone di istidina 25 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5.

In alcune forme di realizzazione, viene divulgata qui una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

- (a) BAN2401 100 mg/mL,
- (b) arginina 350 mM,
- (c) polisorbato 80 allo 0,05% in p/v, e

(d) tampone di citrato 50 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5, e in cui l'arginina è arginina, arginina cloridrato o una loro combinazione.

In alcune forme di realizzazione, viene divulgata qui una formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

(a) BAN2401 da 150 mg/mL a 250 mg/mL,

(b) arginina cloridrato da 100 mM a 150 mM,

(c) polisorbato 80 dallo 0,01% in p/v allo 0,05% in p/v, e

(d) tampone di istidina da 35 mM a 65 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5.

In alcune forme di realizzazione, la formulazione farmaceutica acquosa ha pH 5,0.

ESEMPI

Esempio 1: Studio sulla concentrazione di proteina

Campioni con tre concentrazioni proteiche (10, 100, 200 mg/mL) sono stati preparati ed esaminati nello studio sulla concentrazione. Il materiale da 10 mg/mL è stato sostanza farmacologica purificata (PDS) BAN2401, mentre i materiali da 100 e 200 mg/mL sono stati prodotti da PDS BAN2401 utilizzando filtri rotativi Amicon Ultra-15. I campioni sono stati tutti nello stesso tampone di formulazione (citrato di sodio 25 mM, cloruro di sodio 125 mM, pH 5,7), ad eccezione del fatto che ciascuno ha avuto un differente livello di PS80. Le percentuali di PS80 dei campioni

da 10, 100 e 200 mg/mL sono state rispettivamente 0,02%, 0,16% e 0,32%. Tutti i campioni sono stati filtrati a 0,2 μm e aliquotati in provette sterili in polipropilene (PP) per i test di stabilità. (Nota: Il processo di rimozione del PS80 non è stato disponibile al momento in cui lo studio è stato condotto.)

La stabilità del campione è stata valutata a due temperature (5 e 25 °C) per 3 mesi utilizzando HPLC-SEC nativa, pH e DLS. Ulteriori saggi di caratterizzazione, come la verifica del PS80, sono stati eseguiti sui campioni T = 0. I dettagli dei test sui campioni sono mostrati nella Tabella 1.

Tabella 1 Programma di test (Studio di concentrazione)

Punto temporale	T = 0	T=1 mo	T= 2 mese(i)	T= 3 mese(i)
Temperatura	N/A	5 °C	5 °C	5 °C
		25 °C	25 °C	25 °C
Numero di campioni	3	6	6	6
Test	SEC nativa	SEC nativa	SEC nativa	SEC nativa

Il pH è stato misurato utilizzando un pHmetro con una microsonda. Prima delle misurazioni, è stata eseguita una calibrazione utilizzando standard a pH 4,0 e 7,0.

L'aggregazione e la degradazione fisica del BAN2401 concentrato sono state valutate eseguendo HPLC-SEC nativa su campioni stabili conservati a 5 e 25 °C.

L'analisi HPLC-SEC (nativo) è stata eseguita utilizzando una colonna TSK G3000 SWXL con fase mobile di fosfato di sodio 0,2 M, pH 7,0 a una portata di 1,0 mL/min. I volumi di iniezione del campione sono

stati di 15, 1,5 o 0,8 μ l, per concentrazioni proteiche di 10, 100 o 200 mg/mL rispettivamente. Ciò garantisce che approssimativamente 150 pg di proteina siano iniettate nella colonna durante lo studio. Risultati delle aree di picco relative (%) per monomero, aggregato e frammento sono riportati nelle Figure 1-6.

A entrambe le temperature (5 e 25 °C), sono stati osservati tassi di aggregati e tassi di aggregazione più elevati con concentrazioni proteiche più elevate. Per i campioni da 100 e 200 mg/mL, le percentuali di aggregato di partenza sono state quasi il doppio di quelle del campione da 10 mg/mL. Ciò ha indicato che il processo di concentrazione da solo ha indotto proteine ad aggregarsi. Un'ulteriore aggregazione si è verificata durante la conservazione a 5 e 25 °C. Il tasso medio di aggregazione nell'arco di 3 mesi a 5 °C è stato dello 0,17% al mese per 100 mg/mL e dello 0,20% al mese per 200 mg/mL. A titolo di confronto, il campione da 10 mg/mL ha mostrato un tasso di aggregazione pari solo allo 0,07% al mese nelle stesse condizioni. In sintesi, è emerso che BAN2401 a 100 mg/mL o superiore non è stato fisicamente stabile nella formulazione.

La concentrazione di proteina è stata valutata mediante UV misurando l'assorbanza a 280 e 320 nm su uno spettrofotometro Beckman DU-800. I campioni sono stati diluiti 500 volte e sono stati preparati in duplicato. La concentrazione di proteina è stata calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione, ϵ , di 1,32, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Concentrazione} = (A_{280} - A_{320}) / \epsilon \times \text{Fattore di diluizione}$$

La concentrazione di proteina è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis. I risultati sono elencati in Tabella 2. Nel complesso, le concentrazioni sono rimaste invariate per tutti i 3 mesi a entrambe le temperature.

Tabella 2. Risultati della concentrazione di proteina (Studio di concentrazione)

ID di campione	Concentrazione di proteina (mg/ml)						
	T = 0	T = 1 mese(i)		T = 2 mese(i)		T = 3 mese(i)	
		5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
10 mg/ml	10.6	9.93	9.93	9.9	10.0	10.11	10.15
100 mg/ml	110.3	110.1	114.1	103.4	104.2	106.6	106.4
200 mg/ml	210.8	197.2	224.5	207.4	205.4	205.3	205.8

Esempio 2: Studio di screening del pH

La stabilità di BAN2401 a 200 mg/mL è stata valutata a cinque differenti valori di pH. Per preparare i campioni, BAN2401 PDS rimosso da PS80 è stato concentrato e diafiltrato in un tampone contenente citrato di sodio 50 mM, cloruro di sodio 100 mM pH 4,5. La regolazione della concentrazione finale è stata effettuata tramite una diluizione per ottenere una concentrazione di 200 mg/mL di proteina e 0,02% di PS80. Il materiale risultante è stato suddiviso in 5 aliquote; quattro delle aliquote sono state titolate con idrossido di sodio 10 N per produrre campioni a differenti pH (ovvero pH 5,0, 5,5, 6,0 e 6,5). I campioni risultanti sono stati filtrati a 0,2 µm e suddivisi in sotto-aliquote in provette sterili in polipropilene (PP) per la valutazione della stabilità.

La stabilità dei campioni è stata valutata a due temperature (5 e 25 °C) utilizzando HPLC-SEC nativa, pH e DLS per 3 mesi. Inoltre, è stato condotto uno studio di agitazione al punto temporale di un mese, in cui un sottoinsieme dei campioni a 5 °C è stato agitato orizzontalmente a 250 giri al minuto per 3 giorni in un incubatore a 25 °C. I dettagli dei test sui campioni sono mostrati nella Tabella 3.

Tabella 3. Programma di test (Studio di pH)

Punto temporale	T = 0	T = 1 mese	T = 2 mesi	T = 3 mesi
Temperatura	n/a	5 °C	5 °C	5 °C
		25 °C	25 °C	25 °C
Agitazione	n/a	Agitazione	Non richiesto	Non richiesto
Numero di campioni	5	15	10	10
Test	SEC nativa	SEC nativa	SEC nativa	SEC nativa
	pH	pH	pH	pH
	DLS	DLS	DLS	DLS
	DSC			

L'analisi di SEC-HPLC è stata eseguita utilizzando una colonna TSK G3000 SWXL con fase mobile di fosfato di sodio 0,2 M, pH 7,0, a una portata di 1,0 mL/min. I volumi di iniezione del campione sono stati di 15, 1,5 o 0,8 µL per concentrazioni proteiche di 10, 100 o 200 mg/mL rispettivamente. Questo garantisce che approssimativamente 150 µg di proteine vengano iniettati nella colonna durante lo studio. Sono stati riportati i risultati delle aree di picco relative (%) per monomero, aggregato e frammento.

L'aggregazione e la degradazione fisica del BAN2401 concentrato sono state valutate eseguendo HPLC-SEC nativa su

campioni stabili conservati a 5 e 25 °C. I risultati sono mostrati nelle Figure 7-12. BAN2401 è apparso essere più stabile a pH più bassi a entrambe le temperature (5 e 25 °C). Le formulazioni con pH 4,5 e 5,0 hanno iniziato con basse percentuali di aggregati e hanno mostrato un aumento più lento nella formazione di aggregati, a un tasso di -0,07% al mese a 5 °C. Oltre all'aggregazione, è stata analizzata anche la frammentazione della proteina. I risultati hanno suggerito che la frammentazione di BAN2401 è stata più pronunciata nelle formulazioni di BAN2401 a pH più basso. Sulla base di queste considerazioni, le formulazioni di BAN2401 a pH 5,0 sono state considerate le più stabili (ovvero, hanno mostrato una minore aggregazione e/o degradazione fisica di BAN2401 rispetto ad altre formulazioni a differenti valori di pH).

Esempio 3: Studio di screening di eccipienti

In questo studio sono stati vagliati dodici eccipienti. Per preparare i campioni con BAN2401 a 200 mg/mL, BAN2401 rimosso da PS80 è stato concentrato tramite un passaggio di TFF, seguito da un passaggio di diafiltrazione con il tampone di base (citrato 50 mM, 0,02% di PS80, pH 6,0). Il materiale concentrato è stato aliquotato in ventiquattro frazioni. Ogni frazione è stata addizionata con una soluzione madre contenente uno specifico eccipiente. Per la maggior parte degli eccipienti sono state esaminate due concentrazioni, ad eccezione del cloruro di sodio e dell'acido ascorbico, per i quali sono stati preparati campioni rispettivamente con tre e un livello di concentrazione. Un elenco

degli eccipienti utilizzati e delle relative concentrazioni è mostrato nella

Tabella 4.

Tabella 4. Elenco di eccipienti e concentrazioni corrispondenti

Eccipiente	Concentrazione (numero di formulazione)
Nessuno	Il campione di controllo (F0) ha contenuto la proteina nel tampone di base senza alcun eccipiente aggiunto.
Saccarosio	1% (F1), 6% (F2)
Trealosio	0.5% (F3), 3.5% (F4)
Mannitolo	0.5% (F5), 1.8% (F6)
Prolina	50 Mm (F9), 400 Mm (F10)
Glicina	50 Mm (F11), 400 Mm (F12)
Arginina	25 Mm (F13), 160 mM (F14)

NaCl	50 mM (F16), 150 mM (F17), 500 mM (F18)
PS80	0.05% in v/v (F19), 0.1% in v/v (F20)
PEG400	1% (F21), 6% (F22)
Destrano, LMW	1% (F23), 5% (F24)
Acido ascorbico	50 Mm (F15)
Sorbitolo	1% (F7), 6% (F8)

Tutti i campioni, incluso il controllo (ovvero il campione nel tampone di base senza eccipiente), sono stati filtrati a 0,2 µm e quindi inseriti in siringhe BD in condizioni asettiche utilizzando uno strumento per la tappatura manuale. I campioni di controllo sono stati inseriti anche in fiale di vetro. Le fiale e le siringhe BD sono state posizionate a 5 e 25

°C. La stabilità di campioni è stata valutata per 2 mesi utilizzando HPLC-SEC nativa e pH.

I campioni dello studio di screening degli eccipienti sono stati preparati in condizioni di tampone subottimali (50 mM di citrato, 0,02% di PS80, pH 6,0) al fine di amplificare gli effetti positivi degli eccipienti nella prevenzione della formazione di aggregati. Il profilo di stabilità (aggregazione) di ciascuna formulazione per 2 mesi a 25 °C è stato valutato effettuando HPLC-SEC nativa.

Come mostrato nelle Figure 13-15, la formulazione contenente arginina (F14) 160 mM ha prodotto il tasso di aggregazione più basso tra le formulazioni. A titolo di confronto, la formulazione con arginina 160 mM ha mostrato solo l'1,4% di aggregati a 25 °C dopo 2 mesi, mentre il controllo (ovvero la formulazione nel tampone di base senza eccipiente - F0) ha mostrato il 2,4% di aggregati allo stesso tempo e nelle stesse condizioni.

Inoltre, le formulazioni con arginina hanno avuto le percentuali di aggregati di partenza più basse, indicando che l'arginina è stata in grado di sopprimere la formazione di aggregati durante il passaggio di concentrazione di proteina. La frammentazione è stata leggermente più elevata con la formulazione con arginina (F14) rispetto al controllo (F0). Tuttavia, la differenza ha potuto essere stata all'interno della variabilità del saggio.

Il secondo miglior eccipiente in questo studio è stato la formulazione con prolina 400 mM (F10), sebbene il suo effetto nel

controllo dell'aggregazione non sia stato efficace quanto quello della formulazione con arginina (F14).

Le formulazioni con cloruro di sodio (F16-F18) non hanno mostrato alcun effetto sulla stabilità rispetto al campione di controllo. La stessa osservazione è stata fatta per le formulazioni con PS80 (F19 e F20): non è stato osservato alcun effetto sulla stabilità variando il contenuto di PS80. La formulazione con acido ascorbico (F15) ha mostrato un effetto drammatico, aumentando le percentuali di aggregati e frammenti dall'inizio dello studio.

Il pH delle due formulazioni di arginina (F13 e F14) è stato misurato per verificare che la presenza di arginina nelle formulazioni non avesse causato variazioni del pH nel tempo. Come mostrato nella Tabella 4, non è stata osservata alcuna variazione del pH. È stata misurata anche l'osmolalità delle due formulazioni. I campioni sono stati conservati a -20 °C prima che essi fossero scongelati allo stesso momento per le misurazioni.

Tabella 5. pH e osmolalità di formulazioni di arginina (F13 e F14)

Formulazione di arginina (F13 e F14; punto temporale)	pH	mOsm/kg
F13, T=0	senza campione	senza campione
F14, T=0	5.86	senza campione
F13, T=1 mese	5.97	231
F14, T=1 mese	5.88	477
F13, T=2 mesi	5.97	230
F14, T=2 mesi	5.89	459

Esempio 4: Studio sulla concentrazione di arginina

La relazione tra la concentrazione di arginina e gli aggregati nella formulazione è stata studiata mediante Design Expert® 7.0. I fattori scelti per lo studio e i livelli esplorati per ciascun fattore sono mostrati nella Tabella 6 di seguito.

Tabella 6. Fattori investigati nell'Esempio 4

Fattore	Intervallo di fattore	Livelli di fattore
BAN2401	da 30 a 120 mg/mL	30, 53, 75, 98, 120 mg/mL
pH	da 4.5 a 6.0	4.5, 4.9, 5.2, 5.6, e 6.0
Arginina	d 0 a 450 mM	0, 225, 338, e 450 mM
Polisorbato 80	d 0 a 0.1%	0, 0.025, 0.05, 0.075, e 0.1%

Una randomizzazione del campione è stata generata tramite il disegno D-ottimale in Design Expert® 7.0. Il set di campioni ottenuto ha contenuto 25 punti di dati, inclusi 4 replicati, come mostrato nella Tabella

7. Ciascuna formulazione è stata preparata e valutata.

Tabella 7. Formulazioni preparate per l'Esempio 4

Voce	BAN2401 (mg/mL)	pH	Arginina (mM)	Polisorbato 80 (%)
1	30	5.2	0	0.000
2	30	6.0	0	0.050
3	30	4.5	0	0.100
4	30	4.5	0	0.100
5	30	6.0	225	0.000
6	30	4.5	450	0.000
7	30	4.5	450	0.000
8	30	6.0	450	0.100

9	30	6.0	450	0.100
10	53	5.6	225	0.025
11	53	4.9	338	0.075
12	75	4.5	0	0.000
13	75	4.5	0	0.000
14	75	6.0	0	0.100
15	75	5.2	225	0.000
16	75	6.0	450	0.000
17	75	6.0	450	0.000
18	98	4.5	450	0.100
19	98	5.6	225	0.025
20	120	4.9	338	0.075
21	120	6.0	0	0.000
22	120	4.5	0	0.100
23	120	5.2	225	0.050
24	120	4.5	450	0.000
25	120	6.0	450	0.100

La relazione tra la concentrazione di arginina e i livelli di aggregati nelle formulazioni di BAN2401 da 100 mg/mL a pH 5,0 contenenti lo 0,02% di polisorbato 80 è stata stimata mediante Design Expert® 7.0. Il risultato della stima è stato mostrato nella Figura 16.

Esempio 5: Studio su PS80

Per valutare i cambiamenti nella qualità del prodotto farmacologico in condizioni di stress, sono stati condotti studi di agitazione e congelamento-scongelo utilizzando un tampone di

formulazione (pH 5,0, arginina 350 mM, acido citrico 50 mM). In questo esperimento, sono state studiate formulazioni con diverse concentrazioni di polisorbato 80 per confermare l'effetto del polisorbato 80 sulla generazione di particelle sub-visibili in tali condizioni di stress. Le formulazioni studiate e le condizioni di stress applicate sono mostrate nella Tabella 8.

Tabella 8. Formulazioni studiate per agitazione e studi su stress da congelamento-scongelo

Formulazione	Concentrazione di polisorbato 80	Condizione di stress
100 mg/mL BAN2401	• 0%	• Agitazione a 250 rpm per 3 giorni a 5 °C
Tampone di citrato 50 mM	• 0.02%	• Agitazione a 250 rpm per 3 giorni a temperatura ambiente
Arginina 350 mM	• 0,05%	• Tre cicli di congelamento-scongelo (da -20 °C a temperatura ambiente)
pH 5.0	• 0.1%	

I campioni sono stati preparati nello stesso modo come descritto nell'Esempio 4. È stata aggiunta una soluzione di PS80 al 10% per raggiungere la concentrazione bersaglio di PS80 nelle formulazioni e la regolazione della concentrazione di proteina finale è stata effettuata tramite diluizione con il tampone di formulazione. Le formulazioni sono state passate attraverso filtri da 0,2 µm e inserite in fiale da 2 mL con un volume di riempimento di 1,3 mL. I campioni sono stati posizionati su un agitatore orbitale in un orientamento orizzontale (con la fiala coricata sul lato) che è stata successivamente posta in un frigorifero o sul banco da laboratorio. I campioni sono stati agitati a 250 rpm per 3 giorni. Altri campioni sono stati congelati mediante posizionamento in una camera a -20 °C per 2 ore, quindi rimossi e lasciati a temperatura ambiente per 2

ore per lo scongelamento. Il ciclo di congelamento-scongelamento è stato ripetuto tre volte. I campioni provenienti dagli studi di agitazione e congelamento-scongelamento sono stati valutati per aspetto visivo, livelli di aggregati e frammenti mediante SEC-HPLC e particelle sub-visibili mediante Micro Flow Imaging (MFI).

I risultati degli studi di agitazione e congelamento-scongelamento su formulazioni di BAN2401 con livelli di PS80 variabili sono riassunti di seguito.

Analisi di SEC-HPLC

L'analisi di SEC-HPLC è stata eseguita utilizzando una colonna TSK G3000 SWXL con fase mobile di fosfato di sodio 0,2 M, pH 7,0, a una portata di 1,0 mL/min. I volumi di iniezione del campione sono stati di 5,0 μ L o 2,5 μ L per concentrazioni proteiche di 50 o 100 mg/mL rispettivamente. Questo garantisce che approssimativamente 250 μ g di proteine vengano iniettati nella colonna durante lo studio. Sono stati riportati i risultati delle aree di picco relative (%) per monomero, aggregato e frammento.

Nel livello di aggregati in formulazioni a pH 5 conservate a 25 °C per 3 mesi con concentrazioni di polisorbato 80 variabili, non c'è stata alcuna differenza significativa nei livelli di aggregati quando la concentrazione di PS80 è stata aumentata dallo 0% allo 0,06%, a un pH di formulazione di 5,0. Viene concluso che PS80 non influenza la formazione di aggregati, ovvero dimero e trimero, come misurato

mediante SEC-HPLC, durante la conservazione di formulazioni di BAN2401 a 25 °C.

Nell'effetto della concentrazione di polisorbato 80 su livelli di frammento nelle formulazioni a pH 5, la concentrazione di polisorbato 80 non influenza i livelli di frammento in BAN2401.

Nell'aspetto di formulazioni dopo agitazione a 250 rpm per 3 giorni a temperatura ambiente, il campione senza PS80 è stato torbido con proteine precipitate, mentre gli altri campioni (0,02%, 0,05% e 0,1% di polisorbato 80) sono stati soluzioni visibilmente limpide e prive di particelle. Tutti i campioni che sono stati agitati a 250 rpm per 3 giorni a 5 °C sono stati limpidi e privi di precipitato. Anche tutti i campioni sottoposti a cicli di congelamento/scongelo sono stati limpidi e privi di precipitato.

I livelli di aggregati e frammenti nelle formulazioni di BAN2401 sottoposte ad agitazione e congelamento-scongelo sono mostrati nella Tabella 9. La condizione di stress che ha causato la più grande instabilità è stata l'agitazione in condizioni ambientali. In queste condizioni, il campione senza PS80 ha mostrato la più grande formazione di specie ad alto peso molecolare e la più grande perdita di monomero. Questo effetto è stato annullato con l'aumento della concentrazione di PS80.

Tabella 9. Risultati di livelli di aggregati e frammento per gli studi di agitazione e congelamento-scongelamento

Condizione di stress	Polisorbato 80 (%)	purezza di HPLC (% di area)			
		HMW ₁ ^(a)	HMW ₂ ^(a)	Monomero	LMW ^(b)
controllo	0	-	0.4	99.4	0.2
	0.02	-	0.5	99.3	0.2
	0.05	-	0.5	99.4	0.2
	0.1	-	0.5	99.4	0.2
Agitazione a 5 °C	0	0.5	0.6	98.7	0.2
	0.02	-	0.5	99.3	0.2
	0.05	-	0.5	99.3	0.2
	0.1	-	0.5	99.3	0.2
Agitazione a temperatura ambiente	0 ^(c)	1.5	1.2	97.1	0.2
	0.02	4.0	0.8	95.1	0.2
	0.05	0.1	0.5	99.2	0.2
	0.1	-	0.5	99.3	0.2
Tre cicli di congelamento-scongelamento	0	-	0.4	99.4	0.2
	0.02	-	0.5	99.4	0.2
	0.05	-	0.4	99.4	0.2
	0.1	-	0.5	99.4	0.2

^(a) Specie ad alto peso molecolare; ^(b) Specie a basso peso molecolare; e ^(c) Il campione è stato torbido

Analisi di particelle sub-visibili

L'analisi di particelle sub-visibili è stata eseguita utilizzando un Micro Flow Imaging (microscopio a flusso DPA4100 e cella a flusso BP-4100-FC-400-UN). Il volume totale di campione è stato di 0,9 mL e i risultati sono stati riportati per intervalli di 2,25-100 µm, 5-100 µm, 10-100 µm e 25-100 µm.

Nei campioni senza PS80 che sono stati sottoposti ad agitazione e congelamento-scongelo è stato osservato un aumento di particelle sub-visibili (da 2 a 10 μm). La generazione di particelle sub-visibili è stata soppressa in maniera crescente come la concentrazione di PS80 nella formulazione è stata aumentata. Questo effetto è stato osservato in tutti gli intervalli di dimensione studiati. Non vi è stato alcun cambiamento significativo in particelle sub-visibili nelle formulazioni contenenti polisorbato 80 allo 0,05% e allo 0,1%. Pertanto, è stata scelta una concentrazione di PS80 dello 0,05% come ottimale per la formulazione.

I dati suggerirebbero che PS80 non ha alcun effetto sulla formazione di aggregati (dimeri e trimeri) e frammenti di BAN2401, come misurato mediante SEC-HPLC. Pertanto, la concentrazione di PS80 è stata selezionata in base ai risultati degli studi di agitazione e congelamento-scongelo. È stata scelta una concentrazione di PS80 dello 0,05% per prevenire una potenziale precipitazione durante il trasporto e ridurre al minimo la formazione di particelle sub-visibili.

Esempio 6: Preparazione di formulazioni endovenose (IV) di BAN2401

A. Formulazione di BAN2401 10 mg/mL

Una formulazione di BAN2401 10 mg/mL per iniezione endovenosa ("Iniezione da 10 mg/mL") è stata prodotta mediante un processo asettico cGMP convenzionale per la preparazione di una formulazione acquosa sterile. L'Iniezione di BAN2401 10 mg/mL è stata

prodotta a partire dalla corrispondente formulazione di sostanze farmacologiche BAN2401 di seguito, senza aggiunta di alcun eccipiente e senza diluizione. Una formulazione IV esemplificativa contenente BAN2401 10 mg/mL è mostrata nella Tabella 10.

Tabella 10. Formulazione IV da 10 mg/mL comparativa comprendente BAN2401

componente	composizione
BAN2401	10 mg/mL
Tampone di citrato di sodio/acido citrico	25 mM
Cloruro di sodio	125 mM

Polisorbato 80	0.02 % (in p/v)
Acqua per iniezione	QS
pH	5.7

La soluzione filtrata di sostanza farmacologica BAN2401 è stata riempita asetticamente in fiale come illustrato nella Figura 17 (riferita nella Figura 17 come "Formulazione A"). La sostanza farmacologica riunita è sottoposta a un passaggio di filtrazione per la riduzione della carica microbica attraverso un filtro da 0,2 µm. La filtrazione sterile finale è stata eseguita attraverso due filtri da 0,2 µm in serie e sono stati condotti test di integrità prima e dopo il filtro di filtrazione. Il prodotto farmacologico sterile sfuso è stato riempito asetticamente in fiale. Durante l'operazione di riempimento, l'accuratezza del riempimento è stata confermata misurando il peso di riempimento della fiala. Le fiale riempite sono state tappate e quindi sigillate con un sovrasisgillo di alluminio. Dopo la chiusura a crimpatura, il prodotto è stato conservato a 5±3 °C.

Le fiale sono state analizzate utilizzando il Metodo 1 (Oscuramento della Luce) secondo USP 788. Risultati sono mostrati nelle Tabelle 11 e 12.

Tabella 11. Distribuzione granulometrica (particelle/contenitore) per fiale da iniezione da 10 mg/mL

Numero di lotto	A1	A2	A3		A4	A5		A6	A7	A8	A9		A10	A11	A12
25 µm	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	5	5	2	1	1
10 µm	126	145	469	241	469	225	107	617	249	315	215	273	231	191	125
5 µm	-	-	-	2922	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 µm	-	-	-	16636	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 12. Distribuzione granulometrica (particelle/contenitore) per fiale da iniezione da 10 mg/mL

Numero di lotto	A1	A2	A3		A4	A5		A6	A7	A8	A9		A10	A11	A12
25 µm	0.1	0.1	0.1	0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.2	0.1	0.1
10 µm	12.6	14.5	46.9	24.1	46.9	22.5	10.7	61.7	24.9	31.5	21.5	27.3	23.1	19.1	12.5
5 µm	-	-	-	292.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 µm	-	-	-	1664	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Esempio 7: Preparazione di formulazioni endovenose (IV) e sottocutanee (SC) di BAN2401

A. Formulazioni di BAN2401 100 mg/mL

Una formulazione di BAN2401 100 mg/mL ("Iniezione da 100 mg/mL") è stata prodotta mediante un processo asettico cGMP convenzionale per la preparazione di una formulazione acquosa sterile. BAN2401 100 mg/mL è stato prodotto a partire dalle corrispondenti sostanze farmacologiche di BAN2401 senza aggiunta di eccipienti e diluizione (Tabella 13).

B

Tabella 13. Formulazione IV da 100 mg/mL esemplificativa comprendente BAN2401

componente	composizione
BAN2401	100 mg/mL
Tampone di acido citrico	50 mM
Arginina	110 mM
Arginina cloridrato	240 mM
Polisorbato 80	0.05 % (in p/v)
Acqua per iniezione	QS
pH	5.0

La soluzione filtrata di sostanza farmacologica BAN2401 (Iniezione da 100 mg/mL) è stata riempita asepticamente in fiale come illustrato nella Figura 18 (riferita nella Figura 18 come "Formulazione B"). La sostanza farmacologica è sottoposta a un passaggio di filtrazione per la riduzione della carica microbica attraverso un filtro da 0,2 µm. La filtrazione sterile finale è stata eseguita attraverso due filtri da 0,2 µm in serie e sono stati condotti test di integrità prima e dopo il filtro di filtrazione. Il prodotto farmacologico sterile sfuso è stato riempito asepticamente in fiale. Durante l'operazione di riempimento, l'accuratezza del riempimento è stata confermata misurando il peso di riempimento della fiala. Le fiale riempite sono state tappate e quindi sigillate con un sovrasingillo di alluminio. Dopo la chiusura a crimpatura, il prodotto è stato conservato a 5±3 °C.

Le fiale sono state analizzate utilizzando il Metodo 1 (Oscureamento della Luce) secondo USP 788. Risultati sono mostrati nelle Tabelle 14 e 15.

Tabella 14. Distribuzione granulometrica (particelle/fiale) per fiale da iniezione da 100 mg/mL

Numero di lotto	B1	B2	B3	B4
-----------------	----	----	----	----

25 µm	0	0	1	0
10 µm	53	8	9	9
5 µm	631	72	51	60
2 µm	1954	321	249	267

Tabella 15. Distribuzione granulometrica (particelle/mL) per fiale da iniezione da 100 mg/mL

Numero di lotto	B1	B2	B3	B4
25 µm	0	0	0.2	0
10 µm	10.6	1.6	1.8	1.8
5 µm	126.2	14.4	10.2	12
2 µm	390.8	64.2	49.8	53.4

È stata prodotta un'altra iniezione di BAN2401 100 mg/mL. I seguenti materiali possono essere utilizzati in una seconda formulazione esemplificativa contenente BAN2401 100 mg/mL, come mostrato nella Tabella 16.

Tabella 16. Un'altra formulazione IV da 100 mg/mL esemplificativa comprendente BAN2401.

componente	composizione
BAN2401	100 mg/mL
Istidina	25 mM totale
Istidina HCl	
Arginina HCl	200 mM
Polisorbato 80	0.05% (in p/v)
Acqua per iniezione	QS
pH	5.0 ± 0.4

B. Formulazione di BAN2401 200 mg/mL

I seguenti materiali possono essere utilizzati in una formulazione SC esemplificativa contenente BAN2401 200 mg/mL, come mostrato nella Tabella 17. La stabilità di BAN2401 in queste formulazioni (FSC1,

FSC2 e FSC3) è stata valutata congiuntamente a una valutazione della stabilità del materiale in tre chiusure per contenitori:

i) siringa pre-riempita (PFS) in vetro Becton-Dickenson Hypak Biotech e tappo

ii) PFS in plastica West Crystal Zenith e tappo

iii) fiala di vetro da 5 mL West e tappo

Tabella 17. Formulazione SC da 200 mg/mL esemplificativa comprendente BAN2401.

componente	composizione				
	FSC1a	FSC1b	FSC2	FSC3	FSC4
ID di campione	FSC1a	FSC1b	FSC2	FSC3	FSC4
BAN2401	200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL	200 mg/mL
Istidina	50 mM	50 mM	50 mM	--	25 mM
Istidina HCl	totale ¹	totale ¹	totale ¹		totale ¹
Acido citrico	--	--	--	50 mM	--
Arginina HCl	125 mM	125 mM	125 mM	125 mM	200 mM
Polisorbato 80	0.02%(in p/v)	0.02%(w/v)	0.02%(w/v)	0.02%(w/v)	0.05%(w/v)
Metionina	--	5 mM	--	--	--
Acqua per iniezione	QS	QS	QS	QS	QS
pH	5.0 ±0.4	5.0 ±0.4	5.5 ±0.4	5.0 ±0.4	5.0 ±0.4

¹ Concentrazione totale come istidina

BAN2401 a una concentrazione di proteina bersaglio di 200 mg/mL è stata preparata tramite TFF come riassunto di seguito. È stata eseguita un'operazione TFF separata per preparare il materiale di BAN2401 in ciascun tampone di formulazione, ad eccezione di FSC1a e FSC1b. Per due delle formulazioni, è stata eseguita un'operazione TFF e il materiale concentrato risultante è stato suddiviso in due metà lotti. Una piccola quantità di materiale filtrato sterile in ciascun tampone di formulazione finale non è stata riempita al tempo zero, ma è stata conservata congelata a -20 °C per essere riempita nelle apposite chiusure dei contenitori per i test con siringa.

(a) Preparazione di BAN2401

Il processo di concentrazione/diafiltrazione di proteina tramite TFF può essere suddiviso in 3 stadi:

1. Concentrazione del materiale a 100-150 mg/mL
2. Diafiltrazione (5X) contro il tampone di formulazione
3. Concentrazione a >200 mg/mL

Il passaggio di concentrazione/diafiltrazione è stato eseguito utilizzando un sistema Pall Centramate LV installato con un'area di membrana di 0,02 m². Il materiale di BAN2401 (proveniente dalla produzione di lotto GMP prima dell'aggiunta di PS80) è stato caricato nel sistema TFF ed è stata eseguita una concentrazione di 10-15 volte (stadio 1). Il materiale è stato quindi diafiltrato contro un massimo di 5 diavolumi del tampone di formulazione (stadio 2), con controlli di pH e conduttività del permeato essendo compiuti per monitorare la diafiltrazione. Dopo la diafiltrazione, il materiale è stato ulteriormente concentrato fino alla concentrazione di proteina bersaglio da 210 a 250 mg/mL (stadio 3). Il retentato è stato raccolto e sono stati prelevati campioni per la determinazione della concentrazione di proteina.

Nella preparazione di questa formulazione, la concentrazione di proteina bersaglio di 210-250 mg/mL non è stata raggiunta a causa dell'elevata pressione nel sistema TFF. Pertanto, la concentrazione di proteina bersaglio è stata raggiunta utilizzando unità filtranti centrifughe Millipore (30.000 MWCO). Per eseguire questo passaggio di concentrazione, le unità filtranti sono state equilibrate con il tampone di formulazione di BAN2401, seguito da centrifugazione del materiale di

BAN2401 a 3600 giri/min (~3000 x g) per intervalli di 30 minuti a 20 °C, fino a quando la concentrazione di proteina nel retentato non è stata prevista essere superiore a 200 mg/mL. Il retentato è stato recuperato dalle unità filtranti e riunito. Dopo un'accurata miscelazione, il retentato riunito è stato campionato per le misurazioni della concentrazione di proteina.

Dopo che la proteina è stata concentrata, un campione è stato prelevato dal pool e diluito 500 volte con il tampone di formulazione appropriato. L'assorbanza del campione diluito a 280 nm e 320 nm è stata misurata contro il tampone da solo. La regolazione della concentrazione di proteina finale è stata effettuata tramite diluizione con il tampone di formulazione appropriato. Infine, una soluzione di PS80 al 10% è stata aggiunta al BAN2401 per ottenere lo 0,02% di PS80 nella soluzione finale, e la soluzione proteica è stata accuratamente miscelata mediante rotazione sotto-sopra.

Il materiale formulato finale di BAN2401 è stato filtrato utilizzando filtri per siringa da 0,2 µm e successivamente riempito in fiale o PFS. Questo passaggio è stato eseguito in condizioni asettiche in una cappa di biosicurezza. Le fiale o i PFS risultanti sono stati posti in un congelatore a -20 °C. Le fiale sono state conservate capovolte e PFS sono stati conservati orizzontalmente al fine di simulare le condizioni del caso peggiore.

C. Esperimenti di stabilità su formulazioni SC esemplificative da 200 mg/mL comprendenti BAN2401.

La stabilità del campione è stata valutata a 5 °C (3 M, 6 M, 9 M, 12 M) e 25 °C (1 M, 3 M) utilizzando saggi per pH (Figure 19-21), assorbanza a 405 nm (Figure 22-24) (per rilevare aumenti dell'ingiallimento), cromatografia ad esclusione dimensionale (SEC) (Figure 25-33) e successivamente a 5 °C. Vedere la Tabella 17 per le formulazioni esemplificative FSC1-FSC4; si noti che nelle Figure 19-33, "F1a" si riferisce a FSC1a, "F1b" si riferisce a FSC1b, "F2" si riferisce a FSC2 e "F3" si riferisce a FSC3. Ulteriori saggi di caratterizzazione, tra cui concentrazione di proteina, calorimetria a scansione differenziale (DSC), PS80 e osmolalità, sono stati eseguiti su campioni t=0. Sono stati eseguiti test di particelle sub-visibili su campioni a t=0 e t=6 mesi. È stato condotto uno studio di agitazione di 3 giorni su campioni conservati per 1 mese a 5 °C. I campioni per lo studio di agitazione sono stati trasferiti dalla conservazione a 5 °C dopo 1 mese a 25 °C con agitazione per 3 giorni a 250 rpm.

I risultati dei test hanno mostrato che BAN2401 200 mg/ml in tutte le formulazioni FSC1a-FSC3 ha avuto livelli simili di aggregati e frammenti dopo la conservazione a 2-8 °C per 12 mesi. È stata valutata la stabilità di BAN2401 a 200 mg/ml nelle tre formulazioni FSC1a-FSC3. Nel complesso, la stabilità di BAN2401 in ciascuna formulazione testata è apparsa simile e ha mantenuto una percentuale di monomero superiore al 98,2% dopo la conservazione a 5 °C per 12 mesi, indipendentemente dalla chiusura del contenitore testata. Inoltre, dopo la conservazione a 5

°C per 12 mesi, il pH è rimasto stabile e non si è verificato alcun aumento apprezzabile dell'ingiallimento dovuto a A405.

(a) Concentrazione di proteina (Campioni T=0)

La concentrazione di proteina è stata misurata utilizzando uno spettrofotometro UV-Vis. I risultati sono elencati in Tabella 18.

Tabella 18. Risultati della concentrazione di proteina

ID di campione	Concentrazione di proteina (mg/ml)
FSC1a	206
FSC1b	204
FSC2	201
FSC3	189

La concentrazione di proteina è stata valutata mediante UV misurando l'assorbanza a 280 e 320 nm su uno spettrofotometro Beckman DU-800 utilizzando una cuvetta di quarzo da 1 cm. I campioni sono stati diluiti 500 volte e sono stati preparati in triplicato. La concentrazione di proteina è stata calcolata utilizzando un coefficiente di estinzione ϵ pari a 1,32, utilizzando la seguente formula:

$$\text{Concentrazione} = (A_{280} - A_{320}) / \epsilon \times \text{Fattore di diluizione}$$

(b) Polisorbato 80 (Campioni T=0)

Il contenuto di PS80 nei campioni è stato misurato tramite quantificazione di acido oleico. I risultati sono mostrati in Tabella 19.

AB

Tabella 19. Risultati di polisorbato 80

ID di campione	Polisorbato 80 (%)
FSC1a	0.016
FSC1b	0.022
FSC2	0.019
FSC3	0.019

La misurazione è stata effettuata mediante quantificazione di acido oleico, un prodotto di idrolisi di PS80. Utilizzando l'idrolisi basica, il PS80 rilascia acido oleico in un rapporto molare di 1:1. L'acido oleico può quindi essere separato dai altri prodotti di idrolisi di PS80 e dalle matrici utilizzando HPLC in fase inversa. L'acido oleico è stato monitorato senza derivatizzazione utilizzando l'assorbanza a 195 nm. [J. Chromatography B, 878 (2010) 1865-1870]. Sperimentalmente, i campioni sono stati miscelati con idrossido di sodio per rilasciare acido oleico, che è stato successivamente estratto con acetonitrile. L'estratto è stato diluito con una soluzione di fosfato di potassio e un volume di campione di 100 µL è stato iniettato in una colonna Waters Symmetry C18. La separazione è stata effettuata utilizzando un'eluizione isocratica contenente l'80% di fase A organica (acetonitrile) e il 20% di fase B acquosa (fosfato di potassio monobasico 20 mM, pH 2,8). La concentrazione di PS80 nel campione è stata calcolata dall'area del picco utilizzando una curva standard.

(c) Osmolalità (Campioni T=0)

L'osmolalità di campioni è stata determinata utilizzando un osmometro a punto di congelamento. I risultati sono mostrati in Tabella 20.

Tabella 20. Risultati di osmolalità

ID di campione	Osmolalit (mOsmol/kg H ₂ O)
FSC1a	294
FSC1b	309
FSC2	297
FSC3	327

L'osmolalità è stata misurata utilizzando un osmometro a punto di congelamento Precision Systems Osmette III. I campioni sono stati diluiti 3 volte con WFI e volumi di campione diluiti di 10 µL sono stati prelevati e caricati nello strumento utilizzando la pipetta di osmometro. Le misurazioni dell'osmolalità risultanti sono state corrette per la diluizione del campione.

(d) Particelle sub-visibili

L'analisi delle particelle sub-visibili è stata eseguita utilizzando uno strumento FlowCarn di Fluid Technologies. I risultati T=0 sono elencati nella Tabella 21. Sembra esserci un aumento della concentrazione totale di particelle e del numero di particelle superiori a 10 µm nel tempo quando il materiale viene conservato a 5 °C. Il grado

del cambiamento aumentato è stato piccolo, nel seguente ordine: FSC I
a < FSC1b < FSC2 < FSC3.

Tabella 21. Risultati di particella sub-visibile

ID di campione	Particelle/ mL Totale	Particelle/ mL $\geq 10\mu\text{m}$	Particelle/ mL $\geq 25\mu\text{m}$
FSC1a	1.2×10^4	9	0
FSC1b	2.6×10^4	0	0
FSC2	2.8×10^4	18	0
FSC3	3.9×10^4	63	0

L'analisi delle particelle sub-visibili è stata eseguita utilizzando una FlowCam Fluid Imaging Technologies con un obiettivo 20X e una cella a flusso da 50 μm . Prima di analizzare i campioni di BAN2401, la cella a flusso è stata lavata con H₂O dl ed è stata eseguita una misurazione su H₂O dl per assicurarsi che la cella fosse pulita. Se il numero totale di particelle contate per 0,2 mL di H₂O dl è stato ≤ 2 , la cella a flusso è stata considerata pronta per l'uso. I campioni sono stati equilibrati a temperatura ambiente, quindi diluiti 20 volte con acqua deionizzata. Campioni diluiti in duplicato sono stati analizzati utilizzando un volume di campione di 0,2 mL e una portata di campione di 0,02 mL/min. Il tasso di autoimmagine è stato 14, dando un'efficienza del 19,6% e un tempo di analisi di 10 minuti. Le concentrazioni di particella risultanti sono state corrette per la diluizione del campione.

(e) pH

Il pH di ciascuna formulazione è stato monitorato durante tutto il test di stabilità. Come mostrato nelle Figure 19-21, non è stato osservato alcun cambiamento apparente per i campioni in nessuna delle condizioni di conservazione testate.

(f) HPLC-SEC

L'analisi di cromatografia liquida ad elevate prestazioni cromatografia ad esclusione dimensionale (HPLC-SEC) è stata eseguita utilizzando una colonna TSK 03000 SWXL con fase mobile di fosfato di sodio 0,2 M, pH 7,0, a una portata di 1,0 mL/min. Il volume di iniezione del campione è stato di 0,8 µL per una concentrazione di proteina di 200 mg/mL. Questo garantisce che approssimativamente 150 µg di proteine siano iniettati nella colonna durante tutto lo studio. Risultati delle aree di picco relative (%) per monomero, aggregato e frammento sono stati riportati, come mostrato, nelle Figure 25-33.

La degradazione fisica del BAN2401 è stata valutata eseguendo HPLC-SEC sui campioni di stabilità conservati a 5 e 25 °C. Dopo una conservazione a 5 °C per 12 mesi, la percentuale di aggregato è stata simile per le 3 formulazioni, ad approssimativamente l'1,1%. La percentuale di frammenti generati per tutte le formulazioni testate è stata nell'intervallo di 0,4-0,5%. Il contenuto di monomero dopo 12 mesi di conservazione a 5 °C è stato nell'intervallo di 98,4-98,6% per tutte le formulazioni e le chiusure di contenitori testate. Agli attuali tassi di degradazione, è possibile che BAN2401 in tutte le formulazioni testate

possa avere una percentuale di monomero superiore al 97% dopo una conservazione di fino a 24 mesi a 5 °C.

Dopo una conservazione a 25 °C di fino a 3 mesi, la generazione di frammenti dopo 3 mesi è stata nell'intervallo di 0,4-0,8%. Il contenuto di monomero è stato leggermente superiore al 98% per tutte le formulazioni, ad eccezione di FSC3, che ha avuto un contenuto di monomero leggermente inferiore al 98% dopo 3 mesi a 25 °C.

Esempio 8: Selezione di concentrazioni di proteina, arginina e polisorbato 80

A. Preparazione di campione

Ciascuna formulazione candidata (F1-F12) è stata preparata come segue. L'intermedio di processo della sostanza farmacologica (DS) è stato concentrato ed equilibrato con i corrispondenti tamponi di formulazione (Tabella 22) mediante unità filtranti centrifughe. Dopo la concentrazione e l'equilibratura, è stato aggiunto PS80 disciolto nel tampone di formulazione per raggiungere concentrazioni pre-determinate e le concentrazioni di proteina sono state regolate alla concentrazione finale. Ciascuna formulazione candidata è stata riempita in fiale con un volume di riempimento di 0,5 mL. Le formulazioni candidate (F1-F12) sono mostrate nella Tabella 22. La formulazione F0 è stata valutata come controllo.

Tabella 22. Formulazione (F0) e formulazioni candidate F1-F12

Numero di formulazione	BAN2401	Tampono		Stabilizzante (Arginina)		Polisorbato 80		pH	Volume di riempimento mL
	mg/mL	mmol/L	mg/mL	mmol/L	mg/mL	(in p/v) %	mg/mL		
F0	100	Citrato 50	9.6	350	61.0	0.05	0.5	5.0	5/0.5 ^b
F1	200	Istidina 25	3.9	150	26.1	0.05	0.5	5.0	0.5
F2 ^a	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5.0	0.5
F3	200	Istidina 25	3.9	250	43.6	0.05	0.5	5.0	0.5
F4	200	Istidina 25	3.9	300	52.3	0.05	0.5	5.0	0.5
F5	200	Istidina 25	3.9	350	61.0	0.05	0.5	5.0	0.5
F6	250	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5.0	0.5
F7	300	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5.0	0.5
F8	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0	0	5.0	0.5
F9	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.02	0.2	5.0	0.5
F10 ^a	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5.0	0.5
F11	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.08	0.8	5.0	0.5
F12	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.10	1.0	5.0	0.5

a: F2 e F10 sono le stesse formulazioni, preparate per studi differenti.

b: Nella selezione della concentrazione di polisorbato 80, la soluzione farmacologica è stata prelevata dal prodotto farmacologico ed è stata riempita con 0,5 mL per allineare il volume di riempimento e il sistema di chiusura del contenitore.

B. Protocollo di stabilità

I protocolli di stabilità sono mostrati in Tabella 23, Tabella 24 e Tabella 25. Una volta rimosse dalla conservazione, le fiale sono state conservate a 5 °C fino al momento del test. Le condizioni di conservazione sono state le seguenti:

- Condizione a lungo termine: conservato a 5 °C±3 °C in posizione verticale
- Condizione accelerata: Conservato a 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH in posizione verticale
- Condizione stressata (congelamento-scongelamento): Congelato a -30 °C e scongelato a temperatura ambiente, in posizione verticale
- Condizione stressata (agitazione): 5 °C, coricato, in posizione orizzontale, a 250 rpm su un agitatore alternativo con ampiezza di agitazione di 50 mm

Tabella 23. Protocollo di stabilità (Condizione a lungo termine e accelerata)

Elemento di test	Punto di test				
	Iniziale	5 °C±3°C In posizione verticale		25 °C±2°C, 60%RH±5%RH In posizione verticale	
		3M	1M	3M	3M
Aspetto	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7
pH	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7
HPLC a esclusione dimensionale	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7
HPLC a scambio ionico	F0-F7	F0-F7	N/A	F0-F7	F0-F7
Polisorbato 80	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7

N/A: Non applicabile

Tabella 24. Protocollo di stabilità (Condizione stressata: F0-F7)

Elemento di test	Punto di test	
	Iniziale	Congelamento-scongelamento (-30 °C ↔ temperatura ambiente)
		3 cicli
Aspetto	F0-F7	F6-F7
pH	F0-F7	F0-F7
HPLC a esclusione dimensionale	F0-F7	F0-F7
HPLC a scambio ionico	F0-F7	F0-F7
Polisorbato 80	F0-F7	N/A
Concentrazione di proteina	F0-F7	N/A
Viscosità	F0-F7	N/A
Osmolarità	F0-F7	N/A

N/A: Non applicabile

Tabella 25. Protocollo di stabilità (Condizione stressata: F0, F8-F12)

Elemento di test	Punto di test		
	Iniziale	Congelamento-scongelamento (-30 °C ↔ temperatura ambiente)	
		3 cicli	Agitazione (5 °C, disteso, orizzontale, 250 giri/min)
Aspetto	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
pH	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
Concentrazione di proteina	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
Sostanze estranee insolubili (particelle visibili)	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
HPLC a esclusione dimensionale	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
Polisorbato 80 (PS80)	F0, F9-F12	F0, F9-F12	F0, F9-F12
Imaging a microflusso (MFI)	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12

N/A: Non applicabile.

Dal momento che la viscosità di soluzione è nota aumentare esponenzialmente in soluzioni proteiche altamente concentrate, la concentrazione di proteina di ciascuna formulazione candidata (F1-F5) è stata regolata a 200 ± 10 mg/mL con tampone di formulazione contenente lo 0,05% (in p/v) di PS80 per l'analisi. Le altre formulazioni non sono state diluite prima della misurazione.

C. Risultati e discussione

(a) Selezione di concentrazione di arginina

Per selezionare la concentrazione bersaglio di arginina nella formulazione, sono state valutate le proprietà fisiche e sono stati condotti studi di stabilità a congelamento-scongelo, a lungo termine e accelerata per formulazioni candidate con differenti concentrazioni di arginina (da 150 a 350 mmol/L, da F1 a F5) e confrontate con la formulazione F0 (vedere Tabella 22). Le proprietà fisiche e i risultati dello studio di congelamento-scongelo sono stati mostrati in Tabella 26. I risultati dello studio di stabilità a lungo termine e accelerata sono stati mostrati in Tabella 27 e in Tabella 28.

Tabella 26: Risultati dello studio sulle proprietà fisiche e sulla stabilità a congelamento-scongelo per il prodotto farmacologico BAN2401 (F0-F5)

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0 (Controllo)		F1 (Arg. 150mM)		F2 (Arg. 200mM)		F3 (Arg. 250mM)		F4 (Arg. 300mM)		F5 (Arg. 350mM)	
		Iniziale	Congelamento-scongelo (3 cicli)	Iniziale	Congelamento-scongelo (3 cicli)	Iniziale	Congelamento-scongelo (3 cicli)	Iniziale	Congelamento-scongelo (3 cicli)	Iniziale	Congelamento-scongelo (3 cicli)	Iniziale	Congelamento-scongelo (3 cicli)
Aspetto	Risultato di rapporto	CSYL	NS	CSYL	NS	CSYL	NS	CSYL	NS	CSYL	NS	CSYL	NS
F1	Risultato di rapporto	5,00	5,01	4,89	4,90	4,90	4,90	4,91	4,90	4,90	4,93	4,92	4,92
HPLC a esclusione dimensionale	Risultato di rapporto												
	Monomero	98,8%	98,8%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,7%	98,8%	98,8%	98,8%	98,8%	98,8%
	Aggregato	0,9%	0,9%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%	1,0%
HPLC a scambio ionico	Frangimento	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%	0,3%
	Risultato di rapporto												
	Picco principale	67,2%	67,2%	67,1%	70,6%	70,4%	70,2%	67,9%	67,3%	70,1%	67,3%	70,7%	70,5%
Polisorbato 80	Picco acido	27,3%	27,1%	24,5%	23,3%	23,2%	23,1%	24,2%	23,5%	23,5%	23,1%	23,5%	23,5%
	Picco basico	5,4%	5,7%	8,4%	6,2%	6,4%	6,2%	7,9%	8,3%	6,3%	6,3%	6,1%	6,1%
	Risultato di rapporto (% in p/v)	0,653%	N/A	0,054%	N/A	0,052%	N/A	N/A	0,050%	0,037%	N/A	0,052%	N/A
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto (mg/ml)	103	N/A	224	N/A	222	N/A	N/A	213	N/A	207	N/A	217
	Risultato di rapporto (g/l)	2,6	N/A	7,5	N/A	7,8	N/A	N/A	8,0	N/A	8,1	N/A	8,0
Viscosità	Concentrazione di proteina (mg/ml)	N/A	N/A	204	N/A	210	N/A	N/A	203	N/A	209	N/A	199
	Risultato di rapporto (mPa·s/mg)	5/6	N/A	3/6	N/A	4/5	N/A	N/A	5/3	N/A	6/5	N/A	6/1
Osmolalità													

mM: mM/L, CSYL: Liquido limpido leggermente giallo, Arg: Arginina, NS: Non programmato.

a: La concentrazione di proteina è stata regolata prima della misurazione della viscosità (F1-F5)

Tabella 27: Risultati dello studio di stabilità per il prodotto farmacologico BAN2401 (F0-F7), conservato a 5±3 °C, in posizione verticale

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0		F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7	
		Iniziale	3M	Iniziale	3M	Iniziale	3M	Iniziale	3M	Iniziale	3M	Iniziale	3M	Iniziale	3M	Iniziale	3M
Aspetto pH	Risultato di rapporto	CSYL	4,95	4,89	4,85	4,90	4,85	4,90	4,85	4,90	4,85	4,93	4,86	4,88	4,82	4,85	4,81
	Risultato di rapporto	CSYL	98,8%	98,7%	98,4%	98,8%	98,4%	98,7%	98,4%	98,8%	98,4%	98,8%	98,4%	98,5%	98,3%	98,5%	98,2%
	Risultato di rapporto	CSYL	0,9%	1,0%	1,2%	1,0%	1,2%	1,0%	1,2%	1,0%	1,2%	1,0%	1,2%	1,1%	1,3%	1,2%	1,3%
HPLC a esclusione dimensionale	Monomero	CSYL	0,3%	0,3%	0,4%	0,3%	0,4%	0,3%	0,4%	0,3%	0,4%	0,2%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%
	Aggregato	CSYL	67,2%	67,1%	69,0%	67,6%	69,4%	70,4%	69,4%	67,6%	69,0%	70,1%	69,9%	71,1%	69,5%	71,2%	70,1%
	Frammento	CSYL	27,3%	24,8%	23,6%	24,1%	23,9%	24,2%	24,2%	24,1%	23,9%	23,5%	23,2%	22,7%	23,6%	22,8%	23,1%
HPLC a scambio ionico	Picco principale	CSYL	5,4%	7,2%	7,4%	8,3%	6,7%	6,4%	6,4%	8,3%	6,9%	6,3%	6,5%	6,2%	6,8%	6,0%	6,8%
	Picco acido	CSYL	0,053%	0,054%	0,057%	0,050%	0,055%	0,052%	0,054%	0,050%	0,054%	0,053%	0,052%	0,050%	0,055%	0,051%	0,052%
	Picco basico	CSYL	0,053%	0,054%	0,057%	0,050%	0,055%	0,052%	0,054%	0,050%	0,054%	0,053%	0,052%	0,050%	0,055%	0,051%	0,052%

CSYL: liquido limpido leggermente giallo.

B

B

Tabella 28 Risultati dello studio di stabilità per il prodotto farmacologico BAN2401 (F0-F7) conservato a 25±2 °C, 60%±5% di RH, posizione verticale

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0		F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7		
		Ini	3M	Ini	3M	Ini	3M	Ini	3M	Ini	3M	Ini	3M	Ini	3M	Ini	3M	
Aspetto	CSYL	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	CSY	
		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
pH	5,68	4,97	4,96	4,89	4,85	4,90	4,85	4,84	4,90	4,86	4,85	4,93	4,87	4,86	4,84	4,82	4,85	4,81
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
SEC	Monomero	98,8%	98,1	98,7	98,2	98,2	97,5	98,8	98,2	97,6	98,8	98,8	98,3	97,6	98,5	97,3	98,5	97,1
		0,9%	1,0%	1,0%	1,4%	1,4%	1,7%	1,0%	1,3%	1,6%	1,0%	1,0%	1,3%	1,6%	1,1%	1,9%	1,2%	1,5%
SEC	Aggregato	0,9%	0,9%	1,4%	1,4%	1,4%	1,7%	1,0%	1,3%	1,6%	1,0%	1,0%	1,3%	1,6%	1,1%	1,9%	1,2%	1,5%
		0,3%	0,3%	0,3%	0,5%	0,5%	0,8%	0,3%	0,5%	0,8%	0,3%	0,3%	0,5%	0,8%	0,4%	0,5%	0,4%	0,5%
IEX	Principale	67,2%	59,6	67,1	63,0	70,4	63,1	67,6	63,1	70,4	63,3	70,7	63,9	71,1	63,0	71,2	63,1	63,1
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
IEX	Acido	27,3%	32,8	24,5	29,4	23,2	29,6	24,1	29,1	23,5	29,1	23,1	28,3	22,7	29,5	22,8	28,8	28,8
		%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
IEX	Basico	5,4%	6,6%	8,4%	7,6%	6,4%	7,4%	8,3%	7,8%	6,3%	7,5%	6,3%	7,8%	6,2%	7,5%	6,0%	7,5%	8,1%
		0,053	0,052	0,054	0,052	0,052	0,050	0,050	0,049	0,057	0,051	0,052	0,049	0,049	0,056	0,053	0,051	0,050
PSS80	Risultato di rapporto (% in pH)	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
		0,053	0,052	0,054	0,052	0,052	0,050	0,050	0,049	0,057	0,051	0,052	0,049	0,049	0,056	0,053	0,051	0,050

CSYL: Liquido limpido leggermente giallo, Ini: Iniziale, SEC: HPLC a esclusione dimensionale, IEX: HPLC a scambio ionico, PSS80: Polisorbato 80, NS: Non programmato.

(b) Proprietà fisiche

Come mostrato nella Tabella 26, i valori di osmolalità sono aumentati all'aumentare della concentrazione di arginina. F1, F2 e F3 hanno mostrato valori di osmolalità inferiori rispetto a F4 e F5. Pertanto, la concentrazione di arginina è stata limitata a 250 mmol/L o meno. I valori di viscosità di F1-F5 sono rientrati in un intervallo ristretto (7,3-8,1 cP) e non sono stati correlati con la concentrazione di arginina all'interno da 150 a 350 mmol/L. I risultati di aspetto, pH e concentrazione di PS80 e proteina sono stati quasi al bersaglio.

(c) Studio di stabilità al congelamento-scongelo

Non sono stati osservati cambiamenti significativi in tutti gli elementi di test dopo tre cicli di test di congelamento-scongelo, come mostrato nella Tabella 26.

(d) Studio di stabilità a lungo termine

Come mostrato nella Tabella 27, non sono stati osservati cambiamenti significativi in tutti gli elementi di test, ad eccezione dell'HPLC a esclusione dimensionale (SEC), dopo tre mesi di conservazione. Le quantità di aggregati e frammenti mediante SEC sono leggermente aumentate nelle formulazioni candidate F1-F5. Ogni tasso di aumento è stato simile a quello della formulazione F0.

(e) Studio di stabilità accelerata

Come mostrato nella Tabella 28, non sono stati osservati cambiamenti significativi in tutti gli elementi di test, ad eccezione di SEC e di HPLC a esclusione ionica (IEX). Sebbene la quantità di aggregati

mediante SEC sia aumentata in tutti i candidati (F1-F5, BAN2401 200 mg/mL) e il tasso sia stato più rapido rispetto alla formulazione F0, come previsto, tutti i candidati sono stati considerati essere fattibili considerando i risultati in condizioni a lungo termine e la stabilità di F0 con una lunga durata di conservazione. La più elevata concentrazione di arginina ha dato come risultato una formazione di aggregati leggermente più lenta, in linea con i risultati descritti nell'Esempio 4. Anche la quantità di frammenti mediante SEC è aumentata in tutti i candidati, ma il tasso è stato simile a quello della formulazione F0. Per quanto riguarda IEX, la quantità di picco acido è aumentata in tutti i candidati, ma il tasso è stato simile a quello di F0.

(f) Concentrazione di arginina

Come mostrato nella Tabella 26, F4 e F5 (a concentrazioni di arginina di 300 e 350 mmol/L) non sono stati considerati fattibili dal punto di vista dell'osmolalità. Tra i candidati fattibili F1, F2 e F3 (a concentrazioni di arginina di 150, 200 e 250 mmol/L), F1 è il più vicino all'isotonia. Come mostrato nella Tabella 28, le formulazioni con concentrazioni di arginina più elevate hanno mostrato un tasso di formazione di aggregati più basso negli studi di stabilità accelerata, ma la differenza in tasso non è stata significativa nell'intervallo di concentrazione di arginina valutato. Tenendo in considerazione sia l'isotonicità che il tasso di formazione di aggregati, è stata selezionata 200 mmol/L come concentrazione bersaglio di arginina sulla base della formulazione F2.

(g) Selezione della concentrazione di proteina

Per selezionare la concentrazione di proteina bersaglio nella formulazione, sono state valutate le proprietà fisiche e sono stati condotti studi di congelamento-scongelo, a lungo termine e di stabilità accelerata per formulazioni candidate con differenti concentrazioni proteiche (da 200 a 300 mg/mL, F2, F6, F7) e formulazione F0. Le proprietà fisiche e i risultati dello studio di congelamento-scongelo sono mostrati nella Tabella 29. I risultati degli studi di stabilità a lungo termine e accelerata sono stati mostrati in Tabella 27 e in Tabella 28.

Tabella 29 Risultati dello studio sulle proprietà fisiche e sulla stabilità al congelamento-scongelo per il prodotto farmacologico BAN2401 (F0, F6 e F7)

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0*		(Controllo)		F2*		BAN2401 200 mg/mL		F6		BAN2401 250 mg/mL		F7		BAN2401 300 mg/mL			
		Iniziale	CSYL	NS	5.01	Iniziale	CSYL	NS	4.90	Iniziale	CSYL	NS	4.88	Iniziale	CSYL	NS	4.85	Iniziale	CSYL
Aspetto	Risultato di rapporto	CSYL	5.00	NS	5.01	CSYL	4.90	NS	4.90	CSYL	4.88	NS	4.83	CSYL	4.85	NS	4.86	CSYL	4.86
	Risultato di rapporto																		
	Risultato di rapporto																		
	Monomero		98.8%		98.8%		98.7%		98.7%		98.5%		98.5%		98.5%		98.4%		98.4%
	Aggregato		0.9%		0.9%		1.0%		1.0%		1.1%		1.1%		1.2%		1.2%		1.2%
HPLC a scambio ionico	Frammento		0.3%		0.3%		0.3%		0.3%		0.4%		0.4%		0.4%		0.4%		0.4%
	Risultato di rapporto																		
	Picco principale		67.2%		67.2%		70.4%		70.7%		71.1%		71.2%		71.2%		71.4%		71.4%
	Picco acido		27.3%		27.1%		23.2%		23.1%		22.7%		22.6%		22.8%		22.5%		22.5%
	Picco basico		5.4%		5.7%		6.4%		6.2%		6.2%		6.2%		6.0%		6.1%		6.1%
Polisorbato 80	Risultato di rapporto (% in p/v)		0.053%		NS		0.052%		NS		0.056%		NS		0.051%		NS		NS
	Risultato di rapporto (mg/mL)		103		NS		222		NS		242		NS		299		NS		NS
Viscosità	Risultato di rapporto (cP)		2.6		NS		7.8 (210 mg/mL)		NS		21		NS		48		NS		NS
	Risultato di rapporto (mOsm/kg)		506		NS		455		NS		507		NS		554		NS		NS

CSYL: Liquido limpido leggermente giallo, NS: Non programmato.

a: I risultati sono gli stessi della Tabella 26

(h) Proprietà fisiche

Come mostrato nella Tabella 29, F2 e F6 hanno mostrato valori di osmolalità inferiori rispetto a F7. I valori di viscosità in F2, F6 e F7 sono stati rispettivamente di 7,8, 21 e 48 cP. Un'elevata viscosità superiore a 20 cP causerebbe difficoltà nella produzione di DS aumentando la contro-pressione della pompa e diminuendo il flusso transmembrana durante i passaggi di ultrafiltrazione e diafiltrazione. In aggiunta, una soluzione a concentrazione più elevata rende il processo di riempimento di DP più difficile a causa dell'intasamento degli aghi di riempimento, che porta a variazioni del peso di riempimento. Poiché la viscosità desiderata viene riportata essere non superiore a 20 cP³, F2 è stato fattibile. I risultati di aspetto, pH e concentrazione di PS80 e proteine sono stati quasi in linea con il bersaglio.

(i) Studio di congelamento-scongelo

Non sono stati osservati cambiamenti significativi in tutti gli elementi testati dopo tre cicli di test di congelamento-scongelo, come mostrato nella Tabella 29.

(j) Studio di stabilità a lungo termine

Come mostrato nella Tabella 27, non sono stati osservati cambiamenti significativi, a parte l'HPLC a esclusione dimensionale (SEC), dopo tre mesi di conservazione. La quantità di aggregato mediante SEC è leggermente aumentata nelle formulazioni candidate F2, F6 e F7, ma il tasso di aumento è stato simile a quello di F0.

(k) Studio di stabilità accelerata

Come mostrato nella Tabella 28, non sono stati osservati cambiamenti significativi, a parte SEC e HPLC a esclusione ionica (IEX). La quantità di aggregato mediante SEC è aumentata in tutti i candidati (F2, F6 e F7) a tassi simili al punto temporale di tre mesi (aumento dello 0,7-0,8%). Pertanto, tutti i candidati sono stati considerati fattibili. Anche la quantità di frammento mediante SEC è aumentata in tutti i candidati, ma il tasso è stato simile a quello di F0. Per quanto riguarda IEX, la quantità di picco acido di IEX è aumentata in tutti i candidati, ma il tasso è stato simile a quello di F0.

(l) Concentrazione di proteina

Considerando i risultati di osmolalità e viscosità mostrati nella Tabella 29 e i risultati di stabilità complessiva mostrati in Tabella 27 e in Tabella 28, è stata selezionata una concentrazione di proteina di 200 mg/mL.

(m) Selezione della concentrazione di PS80

Per selezionare la concentrazione bersaglio di PS80 nella formulazione, sono stati condotti studi di congelamento-scongelo e agitazione per formulazioni candidate con diverse concentrazioni di PS80 [da 0 a 0,10% (in p/v), F8-F12] e formulazione F0. I risultati dello studio di congelamento-scongelo e agitazione sono mostrati rispettivamente in Tabella 30 e in Tabella 31.

Tabella 30 Risultati dello studio di congelamento-scongeliamento per il prodotto farmacologico BAN2401 (F0, F8-F12)

Elemento di test	Aspetto	F0	F8		F9		F10		F11		F12		PS80 0.10 % in p/v
			Controllo	Iniziale	Congelamento- scongeliamento (g tid)	Iniziale	Congelamento- scongeliamento (g tid)	Iniziale	Congelamento- scongeliamento (g tid)	Iniziale	Congelamento- scongeliamento (g tid)	Iniziale	
pH	Risultato di rapporto	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL
	Risultato di rapporto	4.98	4.85	4.86	4.85	4.86	4.85	4.86	4.85	4.85	4.85	4.85	4.85
	Risultato di rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
	Risultato di rapporto												
HPLC a esclusione dimensionale	Monomero	98.3%	98.4%	98.0%	98.0%	97.9%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%
	Aggregato	1.0%	1.0%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%
	Frammento	0.7%	0.7%	0.9%	0.9%	1.1%	1.1%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
Polisorbato 80		0.051%	0.050%	<0.010%	<0.010%	0.019%	0.051%	0.053%	0.085%	0.082%	0.106%	0.104%	
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto (mg/mL)	105	104	187	190	187	190	190	187	189	190	191	
	MFI												
MF1	Risultato di rapporto (unit/mL)												
	≥ 25µm	1	0	4	1	1	0	0	3	5	1	0	
	10 - 25 µm	4	11	83	14	11	5	8	3	14	8	5	
	5 - 10 µm	27	73	1317	15	20	8	53	51	56	19	59	
	2 - 5 µm	150	308	1172	43	80	50	339	174	304	47	358	

CSYL: Liquido limpido leggermente giallo, FVP: Privo di particelle visibili.

Tabella 31 Risultati dello studio di agitazione per il prodotto farmacologico BAN2401 (F0, F8-F12)

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0 (Controllo)		F8		PS80 0 % in p/v		F9		PS80 0.02 % in p/v		F10		PS80 0.05 % in p/v		F11		PS80 0.08 % in p/v		F12		PS8 0.10 % in p/v	
		Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G	Iniziale	Agitazione 250 rpm/3 G
Aspetto	Risultato di rapporto	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL
pH	Risultato di rapporto	4.98	4.99	4.87	4.87	4.89	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.87	4.88	4.88	4.87	4.88	4.87	4.88	4.88	4.88	4.88	4.88
Particelle visibili	Risultato di rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
	Risultato di rapporto																						
HPLC a esclusione dimensionale	Risultato di rapporto																						
	Monomero	98.3%	98.3%	97.8%	97.9%	95.3%	97.9%	97.9%	97.9%	97.9%	97.9%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.1%	98.0%	98.0%
	Aggregato	1.0%	1.0%	1.1%	1.1%	3.8%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%
Polisorbato 80	Frammento	0.7%	0.7%	1.1%	1.1%	0.9%	1.1%	1.0%	1.1%	1.0%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%	0.9%
	Risultato di rapporto (% in p/v)	0.051%	0.049%	<0.010%	0.019%	<0.010%	0.019%	0.019%	0.019%	0.019%	0.019%	0.053%	0.054%	0.054%	0.054%	0.086%	0.084%	0.086%	0.084%	0.107%	0.108%	0.108%	0.108%
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto (mg/mL)	105	105	206	207	195	207	206	207	206	206	206	206	206	206	207	209	207	209	207	209	206	206
MFT	Risultato di rapporto																						
	≥ 25µm	1	3	24	3	NT ^a	3	1	3	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
	10 - 25 µm	4	10	555	4	NT ^a	4	5	5	3	3	5	3	5	6	3	6	6	3	6	3	6	6
	5 - 10 µm	27	27	1242	25	NT ^a	25	22	22	18	18	45	67	45	34	28	34	34	28	34	28	27	27
2 - 5 µm	150	75	3209	62	NT ^a	62	50	50	67	67	176	145	176	335	182	335	182	335	182	335	182	250	

CSYL: Liquido limpido leggermente giallo, OWL: Opalescente con liquido, FVP: Privo di particelle visibili, NT: Non testato.

a: I risultati non sono riportati dal momento che le particelle non hanno potuto essere misurate correttamente a causa della contaminazione da bolle dovuta a un volume di campione insufficiente.

(n) Studio di congelamento-scongelo

Come mostrato nella Tabella 30, non sono stati osservati cambiamenti significativi in tutti gli elementi testati dopo tre cicli di test di congelamento-scongelo. Le conte di particelle mediante MFI sono state relativamente elevate in F8 (senza PS80).

(o) Studio di agitazione

Come mostrato nella Tabella 31, le formulazioni contenenti dallo 0,02% (in p/v) allo 0,10% (in p/v) di PS80 (da F9 a F12) sono state stabili dopo l'agitazione. Sono stati osservati cambiamenti in F8 (senza PS80) per aspetto, concentrazione di proteina e quantità di aggregato mediante SEC dopo l'agitazione. L'aspetto è stato cambiato da un liquido limpido leggermente giallo a un liquido bianco opalescente. La concentrazione di proteina è leggermente diminuita da 206 a 195 mg/mL. La quantità di aggregato è aumentata dall'1,1% al 3,8%. Pertanto, F8 (senza PS80) non è stato considerato fattibile.

(p) Concentrazione di PS80

In base ai risultati mostrati nella Tabella 30 (studio di congelamento-scongelo) e nella Tabella 31 (studio di agitazione), le formulazioni contenenti dallo 0,02% (in p/v) allo 0,10% (in p/v) di PS80 sono state stabili dopo tre cicli di congelamento-scongelo e agitazione fino a tre giorni. Pertanto, è stata selezionata come bersaglio una concentrazione di PS80 dello 0,05% (p/v).

(q) Conclusione

In conclusione, per la formulazione di BAN2401 per gli studi successivi è stata selezionata la seguente formulazione.

Tabella 32. Formulazione per studi successivi

Numero di formulazione	BAN2401	Tampone		Stabilizzante (Arginina)		Polisorbato 80		pH
	mg/mL	mmol/L	mg/mL	mmol/L	mg/mL	(in p/v)%	mg/mL	
F2	200	Istidina 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5.0

Esempio 9: Studio di stabilità per formulazioni di BAN2401

200 mg/mL con pH differente

È stato condotto uno studio di stabilità per testare la stabilità delle formulazioni di BAN2401 a 200 mg/mL con pH differente. Inoltre, è stato testato l'impatto dell'aggiunta di metionina sulla stabilità del prodotto farmacologico (DP).

A. Preparazione di campione

Ciascuna formulazione candidata (Tabella 33) è stata preparata come segue. Le formulazioni sono state equilibrate con il corrispondente tampone di formulazione mediante unità filtranti centrifughe. Solo per la preparazione di F20, è stato utilizzato un tampone di formulazione a pH 3,5 fino a quando il pH della soluzione filtrata non ha raggiunto 4,0 dal momento che protoni vengono respinti dalla proteina carica concentrata in prossimità della membrana semipermeabile, noto come effetto Donnan. Dopo la concentrazione e l'equilibratura, è stato aggiunto PS80 disciolto nel tampone di formulazione per raggiungere la concentrazione predeterminata, quindi la concentrazione di proteina è stata regolata fino alla concentrazione finale. Ciascuna formulazione candidata è stata

riempita in fiale con un volume di riempimento di 0,5 mL. La formulazione

F0 (vedere Tabella 33) è stata valutata come controllo.

Tabella 33. Composizione di sostanza farmacologica e formulazioni SC candidate

Numero	BAN2401	Tampone		Stabilizzante		Polisorbato 80		pH ^a	Volume di riempimento mL /Fiala
	mg/mL	mmol/L	mg/mL	mmol/L	mg/mL	(in p/v)%	mg/mL		
F0	100	Citrato 50	9,6	Arg 350	61,0	0,05	0,5	5,0	5
F13	200	Istidina 25	3,9	Arg 200	34,8	0,05	0,5	4,5	0,5
F15	200	Istidina 25	3,9	Arg 200	34,8	0,05	0,5	5,0	0,5
F17	200	Istidina 25	3,9	Arg 200	34,8	0,05	0,5	5,5	0,5
F18	200	Istidina 25	3,9	Arg 200 Met 10	34,8 1,5	0,05	0,5	5,0	0,5
F20	200	Istidina 25	3,9	Arg 200	34,8	0,05	0,5	4,0	0,5
F21 ^b	200	Istidina 25	3,9	Arg 200	34,8	0,05	0,5	5,0	0,5
F22	200	Istidina 25	3,9	Arg 200	34,8	0,05	0,5	6,0	0,5

Arg: Arginina, Met: Metionina

a: Per regolare il pH, arginina e cloridrato di arginina sono stati combinati per F0 e il cloridrato è stato aggiunto per F13 fino a F22.

b: F21 è la stessa formulazione di F15

B. Protocollo di conservazione

I protocolli di conservazione sono mostrati in Tabella 34, in Tabella 35 e in Tabella 36. Una volta rimosse dal magazzino, le fiale sono state conservate a 5 °C fino a quando il test non è avviato. Le condizioni di conservazione sono le seguenti:

- Condizione a lungo termine: conservato a 5 °C±3 °C in posizione verticale
- Condizione accelerata: Conservato a 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH in posizione verticale
- Condizione stressata (congelamento-scongelamento): Congelato a -30 °C e scongelato a temperatura ambiente, in posizione verticale

1000 lx: 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH, disteso con esposizione alla luce di 1000 lx

Buio: $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $60\% \text{ di RH} \pm 5\% \text{ di RH}$, disteso senza esposizione alla luce, coprendo con un foglio di alluminio

Per confermare il livello di aggregato dopo tre mesi o più di conservazione, è stata inoltre valutata l'HPLC a esclusione dimensionale come campioni a conservazione prolungata a nove mesi per lo studio di stabilità a lungo termine e a tre mesi per stabilità accelerata. Questi ultimi campioni sono stati testati dopo essere stati conservati in frigorifero per sei mesi.

Tabella 34 Programma di campionamento per lo studio di stabilità a lungo termine (5 °C±3 °C in posizione verticale)

	F13, F17		F0, F15, F18				F20, F21, F22					
	Iniziale		5°C		Iniziale		5°C		Iniziale	5°C		
			2M		9M ^a				2M		9M ^a	3M
Colore	X		X		NT		X		NT		X	
Chiarezza	X		X		NT		X		NT		X	
Particelle	X		X		NT		X		NT		X	
pH	X		X		NT		X		NT		X	
Concentrazione di proteina	X		X		NT		X		NT		X	
ELISA	X		X		NT		X		NT		X	
FcR	X		X		NT		X		NT		X	
eSDS-R	X		X		NT		X		NT		X	
eSDS-NR	X		X		NT		X		NT		X	
SEC	X		X		X		X		X		X	
IEX	X		X		NT		X		NT		X	
Viscosità	X		NT		NT		NT		NT		NT	
Osmolarità	X		NT		NT		NT		NT		NT	
PS80	X		X		NT		X		NT		X	
MFI	X		X		NT		X		NT		X	
PMAP-R	NT		NT		NT		X		NT		NT	

X: Condotto. NT: Non testato

Colore: Grado di colorazione di liquidi, Chiarezza: Chiarezza e grado di opalescenza, Concentrazione di proteina: Concentrazione di proteina, ELISA: ELISA di legame dell'antigene, FcR: Saggio di legame (CD32a), eSDS: Elettroforesi su gel SDS capillare, R: Ridotto, NR: Non ridotto, SEC: HPLC a esclusione dimensionale, IEX: HPLC a scambio ionico, PS80: Contenuto di polisorbato 80, MFI: Imaging a micro-flusso, PMAP: Mappa peptidica^a

^a: Validazione estesa

Tabella 35 Programma di campionamento per lo studio di stabilità accelerata (25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH in posizione verticale)

Elementi di test	F13, F17			F0, F15, F18			F20, F21, F22		
	Iniziale	25°C		Iniziale	25°C		Iniziale	25°C	
		1M, 2M	Es.		1M	2M		Ex	1M
Colore	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
Chiarezza	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
Particelle	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
pH	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
Concentrazione di proteina	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
ELISA	X	X	NT	X	X	NT	X	X	NT
FeR	X	X	NT	X	X	NT	X	X	NT
cSDS-R	X	X	NT	X	X	NT	X	X	NT
cSDS-NR	X	X	NT	X	X	NT	X	X	NT
SEC	X	X	X	X	X	X	X	X	X
EX	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
Viscosità	X	NT	NT	X	NT	NT	X	NT	NT
Osmolalità	X	NT	NT	X	NT	NT	X	NT	NT
PS80	X	X	NT	X	X	NT	X	X	X
MFI	X	X	NT	X	X	NT	X	X	NT
PMAP-R	NT	NT	NT	X	NT	NT	X	NT	NT

Es.: Valutazione estesa, conservata per 3 M a 25 °C e per 6 M a 5 °C dopo il prelievo del campione

X: Condotto, NT: Non testato

Colore: Grado di colorazione di liquidi, Chiarezza: Chiarezza e grado di opalescenza, Concentrazione di proteina: Concentrazione di proteina, ELISA: ELISA di legame dell'antigene, FeR: Saggio di legame (CD32a), cSDS: Elettroforesi su gel SDS capillare, R: Ridotto, SEC: Non ridotto, SEC: HPLC a esclusione dimensionale, IEX: HPLC a scambio ionico, PS80: Contenuto di polisorbato 80, MFI: Imaging a micro-flusso, PMAP: Mappa peptidica

Tabella 36 Programma di campionamento per lo studio di congelamento-scongeliamento e fotostabilità

Elementi di test	F15		F18		F18		F18	
	Iniziale	FT 3 cicli	Buio 7D	1000lx 7D	Iniziale	FT 3 cicli	Buio 7D	1000lx 7D
Colore	X	X	X	X	X	X	X	X
Chiarezza	X	X	X	X	X	X	X	X
Particelle	X	X	X	X	X	X	X	X
Pro. conc.	X	X	X	X	X	X	X	X
pH	X	X	X	X	X	X	X	X
PS80	X	X	X	X	X	X	X	X
ELISA	X	X	X	X	X	X	X	X
FcR	X	X	X	X	X	X	X	X
eSDS-R	X	X	X	X	X	X	X	X
eSDS-NR	X	X	X	X	X	X	X	X
SEC	X	X	X	X	X	X	X	X
IEX	X	X	X	X	X	X	X	X
PMAP-R	X	NT	X	X	X	NT	X	X

FT: Congelamento-scongeliamento (Congelato a -30 °C e scongelato a temperatura ambiente. In posizione verticale). Buio: 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH, sdraiato senza esposizione alla luce coprendo con un foglio di alluminio. 1000 lx: 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH, sdraiato con esposizione alla luce di 1000 lx mediante luce fluorescente. X: Condotta
 Colore: Grado di colorazione di liquidi. Chiarezza: Chiarezza e grado di opalescenza. MFI: Imaging a micro-flusso. Pro conc: Concentrazione di proteina. PS80: Contenuto di polisorbitato 80, ELISA: ELISA di legame dell'antigene, FcR: Saggio di legame (CD32a), eSDS: Elettroforesi su gel SDS capillare, R: Ridotto, NR: Non ridotto, SEC: HPLC a esclusione dimensionale, IEX: HPLC a scambio ionico, PMAP: Mappa peptidica



C. Risultati e discussione

Sono state valutate le proprietà fisiche e sono stati condotti studi a lungo termine e accelerati per le formulazioni candidate, tra cui la variazione di pH (da pH 4,0 a pH 6,0) e l'aggiunta di metionina. Sono stati inoltre condotti studi di congelamento-scongelo e foto-stabilità per valutare l'efficacia dell'aggiunta di metionina.

D. Variazione del pH

Come mostrato in Tabella 37, in Tabella 38A e 38B, in Tabella 39 e in Tabella 40, non sono state osservate differenze significative tra le formulazioni candidate (F13, F15, F17 e da F20 a F22) per nessuno degli elementi di test, ad eccezione dell'HPLC a esclusione dimensionale (SEC). La formulazione di F20 (ovvero una formulazione con pH inferiore a 4,0), ha mostrato una quantità inferiore di aggregati mediante SEC al punto temporale iniziale. Inoltre, in uno studio di stabilità accelerata un tasso leggermente più basso di formazione di aggregati e un tasso di formazione di frammenti più elevato sono stati osservati. I risultati di formulazioni con pH da 4,5 a 5,5 sono stati confermati per essere comparabili.

Tabella 37 Risultati dello studio di stabilità per formulazioni di BAN2401 con pH da 4,0 a 6,0, conservate a 5 °C±3 °C, in posizione verticale

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0 (Controllo)		F13 pH4.5		F15 pH5.0		F17 pH5.5		F20 pH4.0		F21 pH5.0		F22 pH6.0	
		Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/3M	Iniziale	5°C/3M	Iniziale	5°C/3M
Colore	Risultato di rapporto	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
Chiarezza	Risultato di rapporto	≤ RS2	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3
Particelle	Risultato di rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
pH	Risultato di rapporto	4.95	4.98	4.63	4.64	4.94	4.96	5.73	5.68	4.03	4.05	4.91	4.92	5.90	5.91
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto (mg/mL)	104	102	200	201	197	195	204	204	197	195	200	195	207	195
ELISA	Risultato di rapporto	101.3%	102.6%	109.2%	104.5%	102.1%	123.1%	107.0%	125.7%	NT	NT	NT	NT	NT	NT
FcR	Risultato di rapporto	91.7%	93.8%	101.0%	100.4%	108.8%	99.0%	116.6%	103.4%	NT	NT	NT	NT	NT	NT
eSDS-R	Risultato di rapporto	98.3%	97.7%	98.8%	98.2%	98.9%	98.5%	98.8%	98.4%	NT	NT	NT	NT	NT	NT
eSDS-NR	Risultato di rapporto	91.2%	91.9%	91.5%	92.5%	91.2%	92.9%	91.3%	92.6%	NT	NT	NT	NT	NT	NT
SEC	Monomero ≥95.0%	98.6%	98.7%	99.2%	99.2%	99.1%	99.1%	98.8%	98.8%	99.3%	99.1%	99.2%	99.0%	98.8%	98.6%
	Aggregato ≤5.0%	1.0%	0.9%	0.8%	0.8%	0.9%	0.9%	1.2%	1.2%	0.7%	0.7%	0.8%	1.0%	1.2%	1.4%
	Frammento di rapporto	0.5%	0.4%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	0.1%	0.2%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%
IEX	Principale 50%-90%	71.5%	70.8%	77.2%	73.1%	76.7%	72.9%	76.8%	76.8%	76.8%	74.7%	76.7%	75.2%	76.6%	74.8%
	Acido	24.4%	25.2%	19.1%	19.5%	19.4%	19.7%	19.4%	19.4%	18.8%	21.6%	18.9%	21.1%	19.1%	21.3%
	Basico	4.2%	4.0%	3.7%	7.4%	3.9%	7.4%	3.8%	3.8%	4.4%	3.6%	4.3%	3.7%	4.3%	3.9%
Viscosità	Risultato di rapporto	2.6	NT	8.1	NT	7.9	NT	10.0	NT	8.0	NT	9.4	NT	11.6	NT
Osmolalità	Risultato di rapporto	512	NT	416	NT	407	NT	402	NT	420	NT	423	NT	396	NT
Poliscorbato 80	Risultato di rapporto (% in p/v)	0.048%	0.051%	0.044%	0.047%	0.044%	0.047%	0.043%	0.045%	0.052%	0.049%	0.052%	0.052%	0.051%	0.048%
MFI	Risultato di rapporto														
	≥ 25µm	1	5	3	3	7	3	0	0	0	0	0	0	0	0
	10-25µm	4	81	99	5	26	26	17	10	10	10	5	5	14	14
	5-10µm	27	283	537	67	335	170	214	207	152	152	5	5	76	76
2-5µm	150	1452	980	276	1246	977	1365	1273	698	698	95	95	322	322	

BY5: Uguali alla soluzione di riferimento BY5, RS2: Sospensione di riferimento II, RS3: Sospensione di riferimento III, FVP: Privo di particelle visibili, NT: non testato.

Tabella 38A Risultati dello studio di stabilità per formulazioni di BAN2401 con pH da 4.0 a 6.0, conservate a 25 °C±2 °C, 60% di RH±51% di RH, posizione verticale

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0 (Controllo)		F13 pH4.5		F15 pH5.0		F17 pH5.5		F20 pH4.0		F21 pH5.0		F22 pH6.0								
		Iniziale	25°C/2M	Iniziale	25°C/2M	Iniziale	25°C/2M	Iniziale	25°C/2M	Iniziale	25°C/3M	Iniziale	25°C/3M	Iniziale	25°C/3M	25°C/3M						
Colore	Rapporto	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5							
Chiarezza	Rapporto	≤ RS2	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3							
Particelle	Rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP							
pH	Rapporto	4.95	4.94	4.99	4.63	4.66	4.94	4.96	4.98	4.03	4.02	4.10	4.91	4.94	5.91							
Concentrazione di proteina (mg/mL)	Rapporto	104	103	101	200	201	199	194	192	204	204	207	203	198	193	200	198	194	207	204	194	
ELISA	Rapporto	101.3%	102.7%	91.8%	109.2%	104.3%	107.0%	102.1%	103.6%	96.9%	107.0%	107.4%	101.6%	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
FcR	Rapporto	91.7%	95.5%	93.5%	101.6%	99.4%	101.5%	108.8%	98.3%	102.2%	116.6%	103.8%	104.9%	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
cSDS-R	Rapporto	98.3%	98.1%	97.2%	98.8%	98.9%	97.9%	98.8%	98.0%	98.8%	98.8%	98.7%	98.1%	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
cSDS-NR	Rapporto	91.2%	89.7%	90.4%	91.5%	89.6%	90.1%	89.5%	90.0%	91.3%	89.7%	90.8%	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
Monomero ≥95.0%		98.6%	98.4%	98.4%	99.2%	98.6%	98.4%	98.4%	98.2%	98.8%	98.2%	98.2%	98.2%	99.3%	98.4%	97.4%	99.2%	98.6%	98.4%	98.8%	98.2%	98.1%
Aggregato ≤5.0%		1.0%	1.0%	0.9%	0.8%	1.1%	1.2%	1.4%	1.5%	1.2%	1.8%	1.7%	1.7%	0.7%	1.0%	0.9%	0.8%	1.3%	1.3%	1.2%	1.7%	1.7%
Frammento di rapporto		0.5%	0.5%	0.7%	<0.1%	0.2%	0.4%	0.1%	0.3%	<0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.6%	1.7%	<0.1%	0.1%	0.4%	<0.1%	0.1%	0.2%
Principale 50%-90%		71.3%	69.4%	67.7%	77.2%	75.4%	74.1%	76.7%	71.4%	76.8%	76.0%	72.9%	76.8%	76.7%	64.3%	71.2%	71.2%	67.5%	76.6%	71.2%	71.2%	67.6%
Acido		24.4%	26.3%	28.2%	19.1%	20.3%	22.0%	19.4%	20.6%	19.4%	20.2%	22.5%	18.8%	23.9%	32.0%	18.9%	21.9%	28.5%	19.1%	22.1%	22.1%	28.3%
Basico		4.2%	4.4%	4.1%	3.7%	4.3%	3.8%	4.2%	5.4%	3.8%	3.8%	4.6%	4.4%	7.2%	3.7%	4.3%	7.0%	4.0%	4.3%	4.3%	6.7%	4.0%

BY5: Uguali alla soluzione di riferimento BY5; RS2: Sospensione di riferimento II; RS3: Sospensione di riferimento III; FVP: Privo di particelle visibili; NT: non testato; Rapporto: Risultato di rapporto

Tabella 38B

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0 (Controllo)		F13 pH4.5		F15 pH5.0		F17 pH5.5		F20 pH4.0		F21 pH5.0		F22 pH6.0		
		Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 3M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 3M
Viscosità	Rapporto (cP)	2.6	NT	NT	8.1	NT	7.9	NT	10.0	NT	8.0	NT	9.4	NT	11.6	NT
Osmolalità	Rapporto (mOsm/kg)	512	NT	NT	416	NT	407	NT	402	NT	420	NT	423	NT	396	NT
Polisorbato 80	Rapporto (% in p/v)	0.048	0.052	0.050	0.044	0.047	0.044	0.047	0.043	0.041	0.052	0.053	0.052	0.051	0.051	0.043
MF3	≥ 2.5µm	1	5	0	3	0	7	0	0	10	5	0	0	0	0	0
	10-25µm	4	3	35	99	51	23	49	17	46	49	10	26	NT	5	3
	5-10µm	27	81	292	537	769	163	959	214	597	152	246	NT	5	7	NT
	2-5µm	150	457	1830	980	3139	647	2919	1365	2243	698	454	NT	95	69	NT

NT: Non testato, Rapporto: Risultato di rapporto

B

Tabella 39 Risultati dello studio di stabilità estesa per formulazioni con pH da 4,5 a 5,5, conservate a 5 °C±3 °C, in posizione verticale

Elemento di test	F0 (Controllo)		F13		pH4.5		F15		pH5.0		F17		pH5.5	
	Iniziale	5°C/ 2M	Iniziale	5°C/ 2M	Iniziale	5°C/ 2M	Iniziale	5°C/ 2M	Iniziale	5°C/ 2M	Iniziale	5°C/ 2M	Iniziale	5°C/ 2M
Monomero	98,6%	98,7%	98,6%	98,6%	99,2%	99,2%	98,8%	98,8%	99,1%	99,1%	98,6%	98,8%	98,8%	98,3%
Aggregato dimensionale	1,4%	0,9%	1,4%	1,4%	0,8%	0,8%	1,1%	1,1%	0,9%	0,9%	1,4%	1,2%	1,2%	1,7%
Frammento	0,5%	0,4%	0,5%	0,5%	<0,1%	<0,1%	0,1%	0,1%	<0,1%	<0,1%	0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%

B

Tabella 40 Risultati dello studio di stabilità estesa per la formulazione corrente e principale con pH da 4,5 a 5,5. Conservata a 25 °C±2 °C. 60% di RH±5% di RH, posizione verticale

Elemento di test	F0 (Controllo)				F13 pH4.5				F15 pH5.0				F17 pH5.5			
	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M +5°C/ 6M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M +5°C/ 6M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M +5°C/ 6M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M +5°C/ 6M
Monomero	98,6%	98,4%	98,4%	98,0%	99,2%	98,6%	98,4%	97,7%	99,1%	98,4%	98,2%	97,7%	98,8%	98,2%	98,2%	97,7%
Aggregato	1,0%	1,0%	0,9%	1,0%	0,8%	1,1%	1,2%	1,5%	0,9%	1,4%	1,5%	1,8%	1,2%	1,8%	1,7%	2,0%
Frammento dimensionale	0,5%	0,5%	0,7%	0,9%	<0,1%	0,2%	0,4%	0,8%	<0,1%	0,1%	0,3%	0,5%	<0,1%	0,1%	0,1%	0,3%

E. Aggiunta di metionina

Come mostrato nelle Tabelle 41A e 41B e da Tabella 42 a Tabella 46, non è stata osservata alcuna differenza significativa tra le formulazioni con o senza metionina (F18 e F15). La formulazione con metionina (F18) ha mostrato un tasso di formazione di aggregati leggermente inferiore in uno studio di stabilità a lungo termine esteso, in uno studio di stabilità accelerata e in uno studio di fotostabilità. F18 ha anche mostrato un'ossidazione leggermente inferiore del residuo di metionina (ad esempio, in posizione 259 nelle catene pesanti) in esposizione alla luce con 1000 lux fino a sette giorni. Lo studio di congelamento-scongelo non ha mostrato alcuna differenza. L'effetto di 10 mmol/L di metionina come stabilizzante è stato limitato.

Tabella 41A Risultati dello studio di stabilità per formulazioni con o senza Met, conservate a 5 °C±3 °C, posizione verticale

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0		(Controllo)		F15		Met(-)		F18		Met(+)	
		Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M	Iniziale	5°C/2M
Colore	Risultato di rapporto	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
Chiarezza	Risultato di rapporto	≤ RS2	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3
Particelle	Risultato di rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
pH	Risultato di rapporto (mg/mL)	4,95	4,98	4,94	4,96	4,94	4,96	4,95	4,95	4,95	4,95	4,98	4,98
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto	104	102	197	195	197	195	191	191	191	189	189	189
ELISA	Risultato di rapporto	101,3%	102,6%	102,1%	123,1%	102,1%	123,1%	108,2%	108,2%	108,2%	118,1%	118,1%	118,1%
FeR	Risultato di rapporto	91,7%	93,8%	108,8%	99,0%	108,8%	99,0%	92,4%	92,4%	92,4%	94,7%	94,7%	94,7%
sSDS-R	Risultato di rapporto	98,3%	97,7%	98,9%	98,5%	98,9%	98,5%	98,9%	98,9%	98,9%	98,5%	98,5%	98,5%
sSDS-NR	Risultato di rapporto	91,2%	91,9%	91,2%	92,9%	91,2%	92,9%	91,5%	91,5%	91,5%	92,7%	92,7%	92,7%
SEC	Monomero ≥95,0%	98,6%	98,7%	99,1%	99,1%	99,1%	99,1%	99,2%	99,2%	99,2%	99,1%	99,1%	99,1%
	Aggregato ≤5,0%	1,0%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,9%	0,8%	0,8%	0,8%	0,9%	0,9%	0,9%
	Frammento di rapporto	0,5%	0,4%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%	<0,1%
HEX	Principale 50%-90%	71,3%	70,8%	76,7%	72,9%	76,7%	72,9%	77,2%	77,2%	77,2%	75,9%	75,9%	75,9%
	Acido	24,4%	25,2%	19,4%	19,7%	19,4%	19,7%	19,0%	19,0%	19,0%	19,2%	19,2%	19,2%
	Basico	4,2%	4,0%	3,9%	7,4%	3,9%	7,4%	3,8%	3,8%	3,8%	4,9%	4,9%	4,9%

Met: Metionina, BY5: Uguale alla soluzione di riferimento BY5, RS2: Sospensione di riferimento II, RS3: Sospensione di riferimento III, FVP: Privo di particelle visibili

Tabella 41B

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0	(Controllo)	F15	Met(-)	F18	Met(+)
Viscosità	Risultato di rapporto (cP)	Iniziale 2.6	5°C/2M NT	Iniziale 7.9	5°C/2M NT	Iniziale 7.3	5°C/2M NT
Osmolarità	Risultato di rapporto (mOsm/kg)	512	NT	407	NT	416	NT
Polisorbato 80	Risultato di rapporto (% in pv)	0.048%	0.051%	0.044%	0.047%	0.045%	0.039%
MFI	≥ 25µm	1	5	7	3	0	0
	10-25µm	4	81	26	26	3	0
	5-10µm	27	283	335	170	131	159
	2-5µm	150	1452	1246	977	691	163

Met: Metionina, NT: non testato

B

Tabella 42 Risultati dello studio di stabilità per formulazioni con o senza Met, conservate a 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH, posizione verticale

Elemento di test	Criterio di accettazione	F0		(Controllo)		F15		Met(-)		F18		Met(+)	
		Iniziale	25°C/1M	25°C/2M	Iniziale	25°C/1M	25°C/2M	Iniziale	25°C/1M	25°C/2M	Iniziale	25°C/1M	25°C/2M
Colore	Risultato di rapporto	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
Chiarezza	Risultato di rapporto	≤ RS2	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3
Particelle	Risultato di rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
pH	Risultato di rapporto	4.95	4.94	4.99	4.94	4.94	4.94	4.96	4.98	4.95	4.94	4.97	4.97
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto	104	103	101	197	194	191	194	192	191	192	189	189
ELISA	Risultato di rapporto	101.3%	102.7%	91.8%	102.1%	103.6%	108.2%	103.6%	96.9%	108.2%	97.0%	97.8%	97.8%
FeR	Risultato di rapporto	91.7%	95.5%	93.5%	108.8%	98.3%	92.4%	98.3%	102.2%	92.4%	91.9%	92.9%	92.9%
eSDS-R	Risultato di rapporto	98.3%	98.1%	97.2%	98.9%	98.8%	98.9%	98.8%	98.0%	98.9%	98.8%	98.1%	98.1%
eSDS-NIR	Risultato di rapporto	91.2%	89.7%	90.4%	91.2%	89.5%	91.5%	89.5%	90.0%	91.5%	89.8%	90.6%	90.6%
	Monomero ≥95.0%	98.6%	98.4%	98.4%	99.1%	98.4%	99.2%	98.4%	98.2%	99.2%	98.6%	98.5%	98.5%
SEC	Aggregato ≤5.0%	1.0%	1.0%	0.9%	0.9%	1.4%	0.8%	1.4%	1.5%	0.8%	1.2%	1.2%	1.2%
	Frammento di rapporto	0.5%	0.5%	0.7%	<0.1%	0.1%	<0.1%	0.1%	0.3%	<0.1%	0.1%	0.3%	0.3%
BEX	Principale 50%-90%	71.3%	69.4%	67.7%	76.7%	75.2%	77.2%	75.2%	71.4%	77.2%	76.1%	72.9%	72.9%
	Acido	24.4%	26.3%	28.2%	19.4%	20.6%	19.0%	20.6%	23.2%	19.0%	20.2%	22.6%	22.6%
	Basico	4.2%	4.4%	4.1%	3.9%	4.2%	3.8%	4.2%	5.4%	3.8%	3.7%	4.4%	4.4%
Viscosità	Report result (cP)	2.6	NT	NT	7.9	NT	7.3	NT	NT	7.3	NT	NT	NT
Osmolalità	Risultato di rapporto (mOsm/kg)	512	NT	NT	407	NT	416	NT	NT	416	NT	NT	NT
Polisorbato 80	Risultato di rapporto (% in p/v)	0.048%	0.052%	0.050%	0.044%	0.047%	0.045%	0.047%	0.043%	0.045%	0.043%	0.038%	0.038%
MFI	≥ 25µm	1	5	0	7	0	0	0	0	0	0	3	3
	10-25µm	4	3	35	26	49	3	49	35	3	7	65	65

5-10µm	27	81	292	335	959	714	131	230	647
2-5µm	150	457	1830	1246	2919	1963	691	792	2516

Met: Metformina, BY5: Uguale alla soluzione di riferimento BY5, RS2: Sospensione di riferimento II, RS3: Sospensione di riferimento III, FVP: Privo di particelle visibili, NT: non testato

Tabella 43 Risultati dello studio di stabilità estesa per la formulazione attuale e principale con o senza Met, da DS1 o DS2, conservata a 5 °C±3 °C. Posizione verticale

Elemento di test	F0		(Controllo)		F15		Met(-)		F18		Met(+)	
	Iniziale	5°C/ 2M	5°C/ 9M	Iniziale	5°C/ 2M	5°C/ 9M	Iniziale	5°C/ 2M	5°C/ 9M	Iniziale	5°C/ 2M	5°C/ 9M
Monomero	98,6%	98,7%	98,6%	99,1%	99,1%	98,6%	99,2%	99,1%	98,6%	99,2%	99,1%	98,7%
Aggregato dimensionale	1,0%	0,9%	1,0%	0,9%	0,9%	1,4%	0,8%	0,9%	1,4%	0,8%	0,9%	1,2%
Frammento	0,5%	0,4%	0,5%	<0,1%	<0,1%	0,1%	<0,1%	<0,1%	0,1%	<0,1%	<0,1%	0,1%

Met: Meitonina

Tabella 44 Risultati dello studio di stabilità estesa per formulazioni con o senza Met, conservate a 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH, posizione verticale

Elemento di test	F0			(Controllo)			F15			Met(-)			F18			Met(+)				
	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M	25°C/ +5°C/ 6M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M	25°C/ +5°C/ 6M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M	25°C/ +5°C/ 6M	Iniziale	25°C/ 1M	25°C/ 2M	25°C/ 3M	25°C/ +5°C/ 6M
Monomero	98,6%	98,4%	98,4%	98,0%	98,0%	99,1%	98,4%	98,2%	97,7%	99,2%	98,6%	98,5%	98,0%	98,0%	98,0%	99,2%	98,6%	98,5%	98,0%	98,0%
Aggregato	1,0%	1,0%	0,9%	1,0%	1,0%	0,9%	1,4%	1,5%	1,8%	0,8%	1,2%	1,2%	1,2%	1,2%	1,2%	0,8%	1,2%	1,2%	1,2%	1,2%
Frammento	0,5%	0,5%	0,7%	0,9%	0,9%	<0,1%	0,1%	0,3%	0,5%	<0,1%	0,1%	0,3%	0,3%	0,3%	<0,1%	0,1%	0,3%	0,3%	0,5%	0,5%

Met: Metionina

Tabella 45 Risultati dello studio di stress (congelamento-scongelamento e fotostabilità) per formulazioni con o senza metionina

Elemento di test	Criterio di accettazione	F15			Met(-)			F18			Met(+)		
		Iniziale	3 cicli di FT	25°C Buro/G	25°C Buro/G	3 cicli di FT	25°C Buro/G	Iniziale	3 cicli di FT	25°C Buro/G	25°C Buro/G	3 cicli di FT	25°C Buro/G
Colore	Risultato di rapporto	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
Chiarezza	Risultato di rapporto	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3	≤ RS3
Particelle	Risultato di rapporto	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
pH	Risultato di rapporto	4.94	4.94	4.94	4.94	4.94	4.95	4.94	4.94	4.93	4.92	4.92	4.92
Concentrazione di proteina	Risultato di rapporto	197	197	190	193	193	191	190	190	189	190	190	190
ELISA	Risultato di rapporto	102.1%	107.7%	107.4%	100.0%	100.0%	108.2%	105.8%	105.6%	104.7%	109.1%	109.1%	109.1%
FeR	Risultato di rapporto	108.8%	107.5%	104.0%	117.6%	117.6%	106.0%	105.6%	105.6%	104.8%	109.4%	109.4%	109.4%
sSDS-R	Risultato di rapporto	98.0%	99.3%	99.3%	98.7%	98.7%	98.9%	99.1%	99.1%	99.3%	98.7%	98.7%	98.7%
sSDS-NR	Risultato di rapporto	91.2%	93.0%	92.6%	92.0%	92.0%	91.5%	92.8%	92.8%	92.9%	91.4%	91.4%	91.4%
HPLC a esclusione dimensionale	Monomero ≥95.0%	99.1%	99.0%	98.9%	97.5%	97.5%	99.2%	99.1%	99.1%	98.9%	97.9%	97.9%	97.9%
	Aggregato ≤3.0%	0.9%	1.0%	1.0%	2.4%	2.4%	0.8%	0.9%	0.9%	1.0%	2.0%	2.0%	2.0%
	Frammento di rapporto	<0.1%	<0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	0.1%	0.1%	0.1%	0.1%
	Principale 50%-90%	76.7%	73.5%	74.8%	65.5%	65.5%	77.2%	77.3%	77.3%	76.2%	62.7%	62.7%	62.7%
HEX	Acido	19.4%	20.8%	20.9%	20.3%	20.3%	19.0%	18.8%	18.8%	19.8%	20.0%	20.0%	20.0%
	Basico	3.9%	5.8%	4.4%	14.2%	14.2%	3.8%	3.9%	3.9%	3.9%	17.3%	17.3%	17.3%
Viscosità	Risultato di rapporto	7.9	NT	NT	NT	NT	7.3	NT	NT	NT	NT	NT	NT
	Risultato di rapporto	407	NT	NT	NT	NT	416	NT	NT	NT	NT	NT	NT
Osmolalità	Risultato di rapporto	0.044%	0.047%	0.046%	0.046%	0.046%	0.045%	0.047%	0.047%	0.042%	0.046%	0.046%	0.046%
	Risultato di rapporto (% in p/v)	7	0	NT	44	44	0	5	5	NT	14	14	14
MFI	≤ 25µm	26	76	NT	278	278	3	44	44	NT	99	99	99
	10-25µm	335	661	NT	1074	1074	131	294	294	NT	698	698	698
	5-10µm	1246	2704	NT	3293	3293	691	1289	1289	NT	2491	2491	2491

FT: Congelamento-scongelamento (congelato a -30 °C e scongelato a temperatura ambiente. In posizione verticale). 25 °C: 25 °C±2 °C, 60% di RH±5% di RH, 1000 lx; sdraiato con esposizione alla luce di 1000 lx; Buro: sdraiato con esposizione alla luce coprendo con un foglio di alluminio; Met: Metionina; BY5: Uguale alla soluzione di riferimento BY5; RS3: Sospensione di riferimento III; FVP: Privo di particelle visibili; NT: non testato

Tabella 46 Risultati di mappa peptidica ridotta

Numero di formulazione	F0				F15 Met (-)				F18 Met (+)				
	Iniziale	5°C		25°C	Iniziale	5°C		25°C	Iniziale	5°C		25°C	
		2M	100.0%	100.0%		2M	100.0%	100.0%		2M	100.0%	100.0%	2M
Copertura di sequenza	HC	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
	LC	99.5%	100.0%	100.0%	100.0%	98.6%	100.0%	98.6%	100.0%	98.6%	100.0%	98.6%	98.6%
Deamidazione	HC N332	8.7%	8.4%	8.3%	8.2%	7.6%	7.6%	7.8%	7.7%	7.2%	7.7%	7.6%	7.6%
	LC N333	11.0%	11.6%	12.3%	11.1%	10.4%	11.3%	10.5%	11.0%	10.9%	11.3%	10.3%	10.7%
Ossidazione	HC M259	<1%	4.5%	5.0%	3.5%	4.0%	5.8%	4.3%	2.7%	2.7%	2.8%	3.1%	9.4%
	HC M356	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	1.9%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
	HC M435	3.4%	2.4%	2.8%	1.9%	2.1%	2.7%	2.7%	1.7%	1.4%	1.5%	0.8%	8.2%
	LC M4	1.5%	1.5%	1.5%	1.6%	1.8%	1.7%	1.8%	1.6%	1.5%	1.4%	1.7%	1.7%
Perdita di Lys	HC K454	95.6%	96.0%	95.8%	98.7%	98.6%	98.6%	98.7%	98.5%	98.7%	98.6%	98.6%	98.6%
N-glicano HC N304	A2G0	3.1%	3.0%	2.8%	2.3%	2.3%	2.2%	2.2%	2.3%	2.3%	2.3%	2.3%	2.3%
	A2G0F	57.0%	55.5%	55.2%	52.2%	54.3%	53.0%	53.1%	52.9%	52.7%	53.8%	53.5%	53.6%
	A2G1F	34.8%	34.1%	34.6%	37.8%	38.1%	39.1%	38.1%	39.1%	39.4%	38.4%	39.1%	38.8%
	A2G2F	5.2%	5.1%	5.2%	5.7%	5.3%	5.7%	5.4%	5.6%	5.6%	5.4%	5.3%	5.4%
M5	M5	0.0%	1.2%	1.1%	1.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%
	M8	0.0%	1.2%	1.1%	1.0%	0.0%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%

Met: Metionina, 5°C: 5°C±3°C, 25°C: 25°C±2°C, 25°C: 25°C±2°C, 60% di RH±5% di RH, 1000 lx: sdraiato con esposizione alla luce di 1000 lx, Buio: sdraiato con esposizione alla luce coprendo con un foglio di alluminio, HC: catena pesante, LC: catena leggera

F. Conclusione

Gli attributi qualitativi sono stati comparabili tra le formulazioni di BAN2401 con variazioni di pH da pH 4,5 a pH 5,5. A pH 4,0 hanno mostrato un tasso di formazione di aggregati inferiore e, al contrario, un tasso di formazione di frammenti più rapido durante la conservazione. Non abbiamo riscontrato differenze significative tra le formulazioni con e senza metionina a una concentrazione di 10 mmol/L, sulla base di valutazioni di qualità e studi di stabilità, inclusi a lungo termine, accelerata, a congelamento-scongelamento e foto. Sebbene siano stati osservati un tasso di formazione di aggregati leggermente inferiore e una minore soppressione dell'ossidazione dei residui amminoacidici, le differenze non sono state significative. In conclusione, F15 e F21, che sono stati composti da 200 mg/mL di BAN2401, 25 mmol/L di L-istidina/istidina cloridrato, 200 mmol/L di L-arginina, 0,05% (in p/v) di polisorbato 80 a un pH di $5,0 \pm 0,5$ sono stati considerati buoni candidati per ulteriori sviluppi.

Esempio 10: Studio sull'effetto della concentrazione di arginina sulla stabilità della formulazione di BAN2401

È stato valutato l'effetto della concentrazione di arginina (0, 50, 100 e 200 mmol/L) sulla stabilità di BAN2401 a 200 mg/mL. I campioni di ciascun livello di concentrazione di arginina sono stati conservati in condizioni accelerate (25 °C/60% di RH) e testati a 0, 1 e 2 mesi.

A. Preparazione di campione

I campioni (F1-F4) sono stati preparati mediante scambio di tampone dell'intermedio di processo concentrato di sostanza farmacologica BAN2401 mediante ultrafiltrazione. Dopo filtrazione asettica, ogni campione da 0,4 mL è stato riempito nella fiala. Le informazioni sul campione sono mostrate in Tabella 47.

Tabella 47 Informazioni di campione

Numero di formulazione	BAN2401	Tampone	Stabilizzante (Arginina)	Polisorbato 80	pH
F1	200 mg/mL	Istidina 25 mmol/L	0 mmol/L	0.05 (in p/v)%	5.0
F2	200 mg/mL	Istidina 25 mmol/L	50 mmol/L	0.05 (in p/v)%	5.0
F3	200 mg/mL	Istidina 25 mmol/L	100 mmol/L	0.05 (in p/v)%	5.0
F4	200 mg/mL	Istidina 25 mmol/L	200 mmol/L	0.05 (in p/v)%	5.0

B. Risultati

I risultati di questo studio di stabilità per i campioni da F1 a F4 sono mostrati nelle Tabelle da 48 a 51. Non vi è stata alcuna differenza di pH e concentrazione di proteina tra i campioni e il livello di concentrazione di arginina è stato coerente con il bersaglio per campioni iniziali.

La % di aggregati per i campioni contenenti arginina (da F2 a F4) è stata inferiore a quella del campione senza arginina (F1).

Tabella 48 Risultati del test del campione F1 (Arginina 0 mmol/L bersaglio)

Elementi di test		Iniziale	1M	2M
pH		5.1	-	-
Concentrazione di proteina (mg/mL)		195	-	-
SEC	% di area di monomero	98.3%	98.0%	97.8%
	% di area di aggregati	1.6%	1.7%	1.9%
	% di area di frammenti	0.1%	0.2%	0.3%
Concentrazione di arginina (mmol/L)		1	-	-

Tabella 49 Risultati del test di campione F2 (Arginina 50 mmol/L bersaglio)

Elementi di test		Iniziale	1M	2M
pH		5.0	-	-
Concentrazione di proteina (mg/mL)		192	-	-
SEC	% di area di monomero	98.4%	98.1%	97.8%
	% di area di aggregati	1.5%	1.7%	1.8%
	% di area di frammenti	0.1%	0.2%	0.4%
Concentrazione di arginina (mmol/L)		47	-	-

Tabella 50 Risultati del test di campione F3 (Arginina 100 mmol/L bersaglio)

Elementi di test		Iniziale	1M	2M
pH		5.0	-	-
Concentrazione di proteina (mg/mL)		198	-	-
SEC	% di area di monomero	98.4%	98.1%	97.8%
	% di area di aggregati	1.5%	1.7%	1.8%
	% di area di frammenti	0.1%	0.2%	0.4%
Concentrazione di arginina (mmol/L)		87	-	-

Tabella 51 Risultati del test di campione F4 (Arginina 200 mmol/L bersaglio)

Elementi di test		Iniziale	1M	2M
pH		5.0	-	-
Concentrazione di proteina (mg/mL)		191	-	-
SEC	% di area di monomero	98.4%	98.1%	97.9%
	% di area di aggregati	1.5%	1.6%	1.7%
	% di area di frammenti	0.1%	0.2%	0.4%
Concentrazione di arginina (mmol/L)		173	-	-

C. Discussione e Conclusione

I risultati di questo studio hanno indicato che concentrazioni di arginina da 50 a 200 mmol/L prevengono gli aumenti di aggregati proteici nella formulazione di BAN2401 200 mg/mL. La variazione della concentrazione di arginina tra i lotti può dare come risultato una variazione nella % di aggregati tra lotti. Inoltre, la concentrazione di arginina può influenzare l'andamento di aumento della % di aggregati nello studio di stabilità.

La formulazione comprendente tampone di istidina è sembrata mostrare un effetto sulla riduzione della frammentazione di BAN2401,

rispetto alla percentuale di frammentazione nel campione F1 con la percentuale di frammentazione mostrata nella Figura 11 dell'Esempio 2, in cui sono stati utilizzati campioni comprendenti BAN2401 200 mg/mL, citrato di sodio 50 mM e cloruro di sodio 100 mM.

ELENCO DI SEQUENZE

Tabella 52. Sequenze amminoacidiche delle regioni variabili di mAb

mAb	Catena di IgG	SEQ ID NO	Sequenza amminoacidica
BAN2401	Catena pesante	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASGF TFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISS GSSTIYYGDTVKGRFTISRDNKNSLFL QMSSLRAEDTAVYYCAREGGYYYGRS YYTMDYWQGQTTVTVSS
BAN2401	Catena leggera	2	DVVMTQSPSLPVTTPGAPASISCRSSQSI VHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKV SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLRISRVE AEDVGIYYCFQGSHVPPTFGPGTKLEIK

Tabella 53. Sequenze amminoacidiche delle regioni costanti di mAb

mAb	Catena di IgG	Class	SEQ ID NO	Sequenza amminoacidica
BAN2401	Catena pesante	IgG1	3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSKVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVTPSSSLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKRVPEKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCFSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGK
BAN2401	Catena leggera	kappa	4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEEKHK VYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

Tabella 54. Sequenze amminoacidiche di CDR di mAb

mAb	Catena di IgG	SEQ ID NO	Sequenza amminoacidica
BAN2401	HCDR1	5	SFGMH
	HCDR2	6	YISSGSSTIYYGDTVKG
	HCDR3	7	EGGYYYGRSYYTMDY
BAN2401	LCDR1	8	RSSQSIVHSNGNTYLE
	LCDR2	9	KVSNRFS
	LCDR3	10	FQGSHPPT

Catena pesante (SEQ ID NO: 11):

evqlvesggglvqpggsfrlscsasgftfssfgmhwvrqapggglewvayissgsstiygdtvkgrftisrdnaknslflqmsslr
aedtavyycaegggyygrsyytmdywgqgtvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdylfepvvtvswngalts
gvhtfpavlgssgylsslsvvtvpssslgtqtyicvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtceppepapellggpsvflfppkpkdtf
mistrpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhaaktkpreeqyustyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapie
ktiskakgqprepvytlppsreemtknqvshclvkgfypsdiavewesngqpennyktppvldsdsfflyskitvdksrwq
qgnvfscsvmhealhnhytqkstsflspgk

Catena leggera (SEQ ID NO: 12):

dvmtqspislptvgapisicrssiivhsngntylewylqkpgqspklliykvsnrfsqvpdrfsgsgsgtdflrlrveaedv
giyycfqgshvpptfgpgtkleikrtvaapsvflfppsdeqlksgtasvcllmfyreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsd
dstylssstflskadyekhkvyacevthqglsspvtksfmrgec

RIVENDICAZIONI

1. Formulazione farmaceutica acquosa comprendente:

(a) un anticorpo isolato anti-protofibrilla A β che si lega a protofibrille di A β umane, a una concentrazione da 80 mg/mL a 300 mg/mL,

(b) arginina da 100 mM a 400 mM,

(c) polisorbato 80 dallo 0,01% in p/v allo 0,1% in p/v, e

(d) un tampone farmaceuticamente accettabile,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5,

in cui l'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β è lecanemab, e

in cui l'arginina è arginina, arginina cloridrato o una loro combinazione.

2. Formulazione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β è presente in una concentrazione da 100 mg/mL a 200 mg/mL.

3. Formulazione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β è presente in una concentrazione di 100 mg/mL.

4. Formulazione farmaceutica secondo la rivendicazione 1, in cui l'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β è presente in una concentrazione di 200 mg/mL.

5. Formulazione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, comprendente inoltre metionina.

6. Formulazione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui il tampone farmaceuticamente accettabile è tampone di citrato o tampone di istidina.

7. Formulazione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-6, comprendente tampone di citrato da 10 a 100 mM o tampone di istidina da 10 a 100 mM.

8. Formulazione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, comprendente arginina da 125 a 350 mM.

9. Formulazione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, comprendente arginina 200 mM, in cui l'arginina è cloridrato di arginina.

10. Formulazione farmaceutica secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-9, comprendente arginina 200 mM, in cui l'arginina è cloridrato di arginina, e tampone di istidina 25 mM.

11. Formulazione farmaceutica acquosa secondo la rivendicazione 1 comprendente:

(a) da 80 mg/mL a 240 mg/mL dell'anticorpo isolato anti-prototofibrilla di A β ,

(b) arginina cloridrato da 140 mM a 260 mM,

(c) polisorbato 80 dallo 0,02% in p/v allo 0,08% in p/v, e

(d) tampone di istidina da 15 mM a 35 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5.

12. Formulazione farmaceutica acquosa secondo la rivendicazione 1 comprendente:

(a) da 80 mg/mL a 120 mg/mL dell'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β ,

(b) arginina da 240 mM a 360 mM,

(c) polisorbato 80 dallo 0,02% in p/v allo 0,08% in p/v, e

(d) tampone di citrato da 30 mM a 50 mM,

in cui la formulazione farmaceutica ha un pH che varia da 4,5 a 5,5,

e in cui l'arginina è arginina, cloridrato di arginina o una loro combinazione.

13. Formulazione farmaceutica acquosa secondo la rivendicazione 1, comprendente:

(a) 100 mg/mL o 200 mg/mL dell'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β ,

(b) da 190 mM a 210 mM di arginina, cloridrato di arginina o una loro combinazione,

(c) polisorbato 80 dallo 0,04% in p/v allo 0,06% in p/v, e

(d) tampone di istidina da 15 mM a 35 mM.

14. Formulazione farmaceutica acquosa secondo la rivendicazione 1, comprendente:

(a) 100 mg/mL dell'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β ,

(b) arginina cloridrato 200 mM,

(c) polisorbato 80 allo 0,05% in p/v, e

(d) tampone di istidina 25 mM.

15. Formulazione farmaceutica acquosa secondo la rivendicazione 1, comprendente:

(a) 200 mg/mL dell'anticorpo isolato anti-protofibrilla di A β ,

(b) arginina cloridrato 200 mM,

(c) polisorbato 80 allo 0,05% in p/v, e

(d) tampone di istidina 25 mM.

16. Formulazione farmaceutica acquosa secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-15, in cui il tampone di istidina è una combinazione di istidina e istidina cloridrato monoidrato.

17. Formulazione farmaceutica acquosa secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 13-16, in cui la formulazione farmaceutica ha un pH di 5,0.

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 1-33/33

Figure 1-33

“Figure” = Figura

TAVOLE 1, 4, 7, 10/33

Figure 1, 4, 7, 10

“Aggregate” = Aggregato

“Aggregate %” = % di aggregato

“Time Point” = Punto temporale

“* mo” = * mese(i)

TAVOLE 2, 5, 8, 11/33

Figure 2, 5, 8, 11

“Fragment” = Frammento

“Fragment %” = % di frammento

“Time Point” = Punto temporale

“* mo” = * mese(i)

TAVOLE 3, 6, 9, 12/33

Figure 3, 6, 9, 12

“Monomer” = Monomero

“Monomer %” = % di monomero

“Time Point” = Punto temporale

“* mo” = * mese(i)

TAVOLA 13/33

Figura 13

“Aggregate (T0-T2 M at 25°C)” = Aggregato (T0-T2 M a 25 °C)

“Aggregate %” = % di aggregato

TAVOLA 14/33

Figura 14

“Fragment (T0-T2 M at 25°C)” = Frammento (T0-T2 M a 25 °C)

“Fragment %” = % di frammento

TAVOLA 15/33

Figura 15

“Monomer (T0-T2 M at 25°C)” = Monomero (T0-T2 M a 25 °C)

“Monomer %” = % di monomero

TAVOLA 16/33

Figura 16

“Aggregate (%)” = Aggregato (%)

“Arginine” = Arginina

“Arginine Concentration” = Concentrazione di arginina

TAVOLA 17/33

Figura 17

“Ingredient” = Ingrediente

“BAN2401 drug substance (Formulation A)” = Sostanza
farmacologica BAN2401 (Formulazione A)

“glass vials” = fiale di vetro

“stoppers” = tappi

“aluminum seals” = sigilli di alluminio

“Process” = Processo

“Pooling” = Raggruppamento

“Bioburden reducing filtration” = Filtrazione riducente la carica biologica

“Sterile filtration” = Filtrazione sterile

“Aseptic filling and stoppering” = Riempimento asettico e tappatura

“Crimp capping” = Chiusura per crimpatura

“Visual inspection” = Ispezione visiva

“In-process Control” = Controllo durante il processo

“Bioburden pre- and post-filtration” = Carica biologica prima e dopo la filtrazione

“0.2 µm filter integrity testing pre- and post-filtration” = test di integrità di filtro 0,2 µm prima e dopo la filtrazione

“Fill weight checks” = Verifiche di peso di riempimento

TAVOLA 18/33

Figura 18

“Ingredient” = Ingrediente

“BAN2401 drug substance (Formulation B)” = Sostanza farmacologica BAN2401 (Formulazione B)

“glass vials” = fiale di vetro

“stoppers” = tappi

“aluminum seals” = sigilli di alluminio

“Process” = Processo

“Bioburden reducing filtration” = Filtrazione riducente la carica biologica

“Sterile filtration” = Filtrazione sterile

“Aseptic filling and stoppering” = Riempimento asettico e tappatura

“Crimp capping” = Chiusura per crimpatura

“Visual inspection” = Ispezione visiva

“In-process Control” = Controllo durante il processo

“Bioburden pre- and post-filtration” = Carica biologica prima e dopo
la filtrazione

“0.2 µm filter integrity testing pre- and post-filtration” = test di integrità
di filtro 0,2 µm prima e dopo la filtrazione

“Fill weight checks” = Verifiche di peso di riempimento

TAVOLA 19/33

Figura 19

“12 mos.” = 12 mesi

“BD” = BD

“West” = West

“vial” = fiala

TAVOLA 20/33

Figura 20

“* mo.” = * mese(i)

“BD” = BD

“West” = West

“vial” = fiala

TAVOLA 21/33

Figura 21

B

“Agitation” = Agitazione

“1 mo.” = 1 mese

“Agit (3D @ 25C)” = Agitare (3 G a 25 °C)

“BD” = BD

“West” = West

“vial” = fiala

TAVOLE 22-23/33

Figure 22-23

“Absorbance at 405 nm” = Assorbanza a 405 nm

“* mo.” = * mese(i)

“BD” = BD

“West” = West

“vial” = fiala

TAVOLA 24/33

Figura 24

“Agitation” = Agitazione

“Absorbance at 405 nm” = Assorbanza a 405 nm

“1 mo.” = 1 mese

“Agit (3D @ 25C)” = Agitare (3 G a 25 °C)

“BD” = BD

“West” = West

“vial” = fiala

TAVOLE 25, 28/33

Figure 25, 28

“Aggregate” = Aggregato

“% Aggregate” = % di aggregato

TAVOLE 26, 29/33

Figure 26, 29

“Fragment” = Frammento

% di

TAVOLE 27, 30/33

Figure 27, 30

“Monomer” = Monomero

“% Monomer” = % di monomero

TAVOLE 31-32/33

Figure 31-32

“Aggregate, Agitation, HPLC-SEC” = Aggregato, Agitazione, HPLC-
SEC

“% Aggregate” = % di aggregato

“1 mo.” = 1 mese

“Agit (3D @ 25C)” = Agitare (3 G a 25 °C)

TAVOLA 33/33

Figura 33

“Monomer, Agitation, HPLC-SEC” = Monomero, Agitazione, HPLC-
SEC

“% Monomer” = % di monomero

“1 mo.” = 1 mese

“Agit (3D @ 25C)” = Agitare (3 G a 25 °C)

B

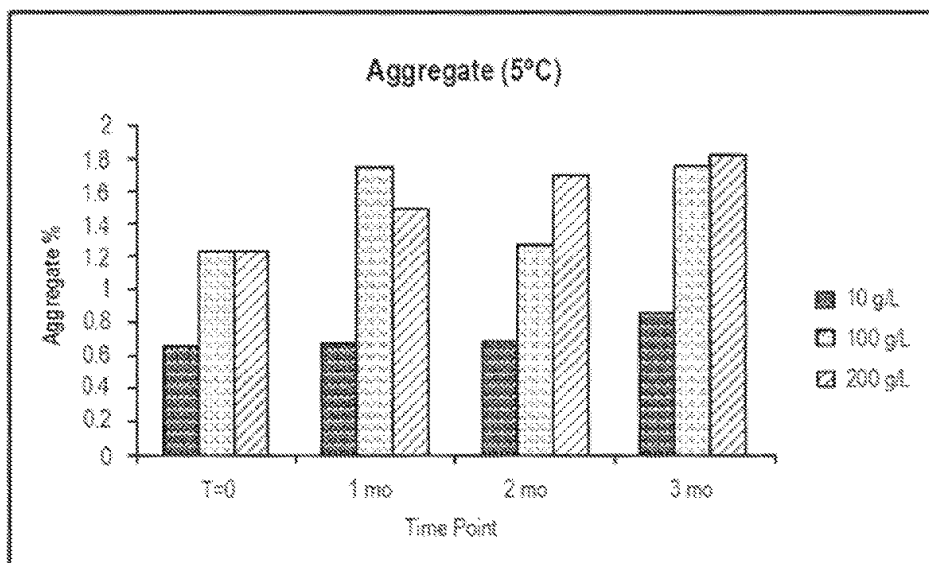


Figure 1

B

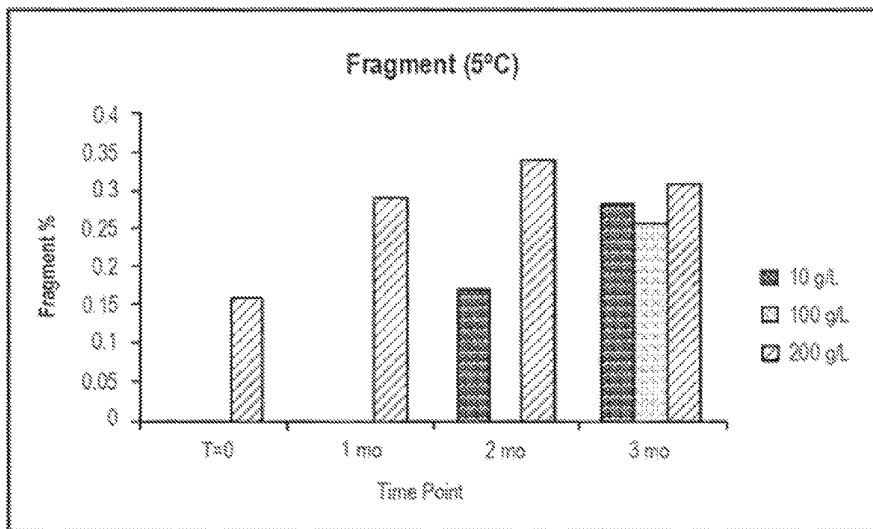


Figure 2

12

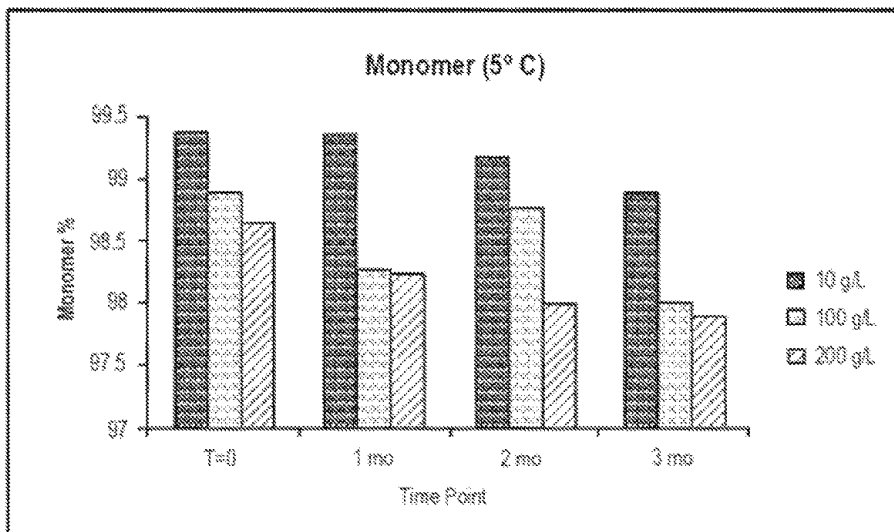


Figure 3

B

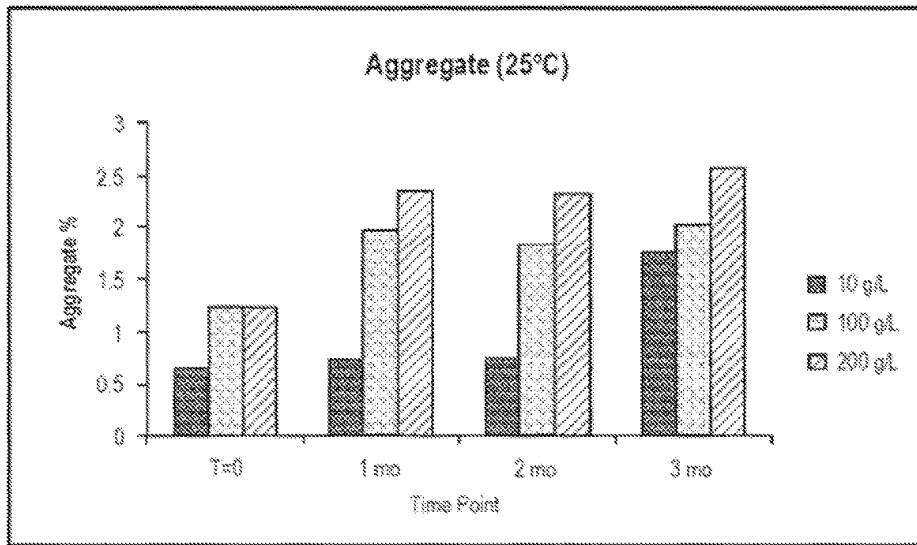


Figure 4

12

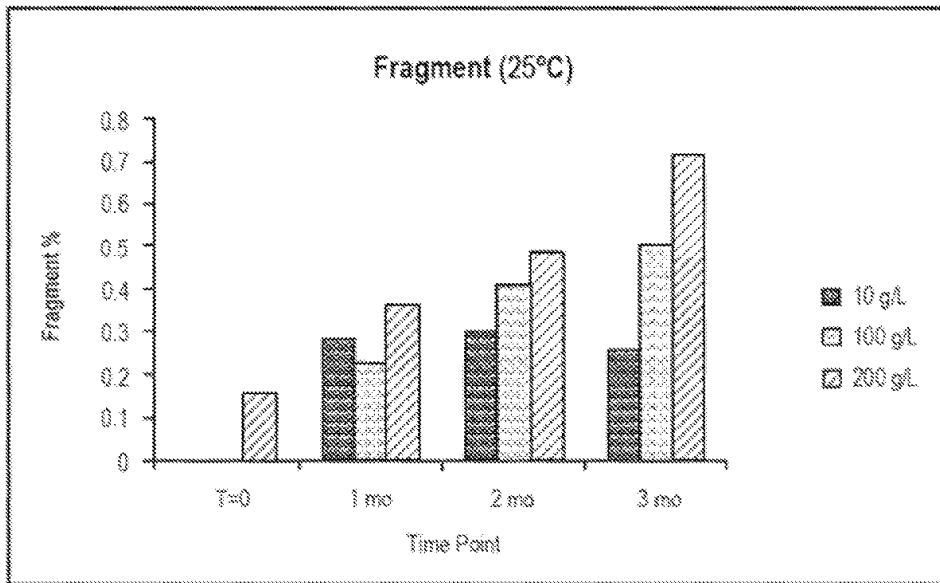


Figure 5

B

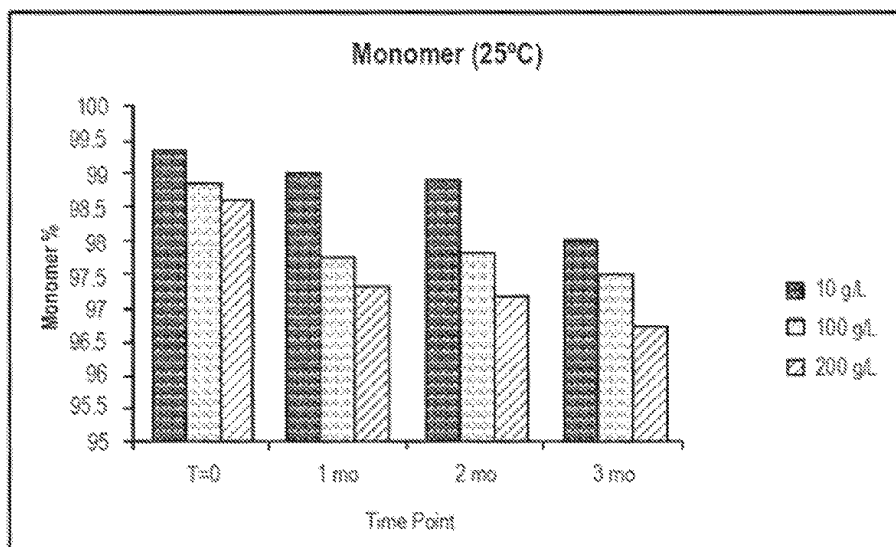


Figure 6

B

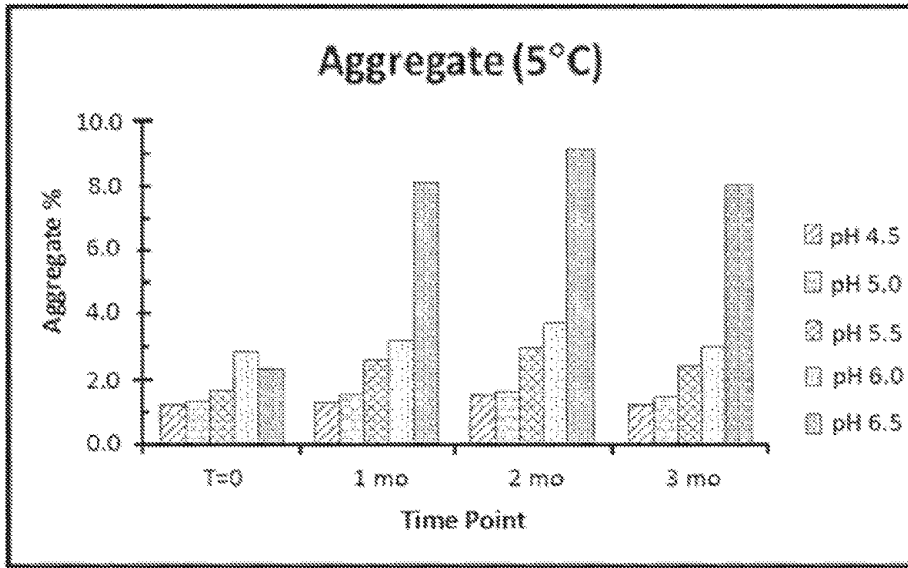


Figure 7

B

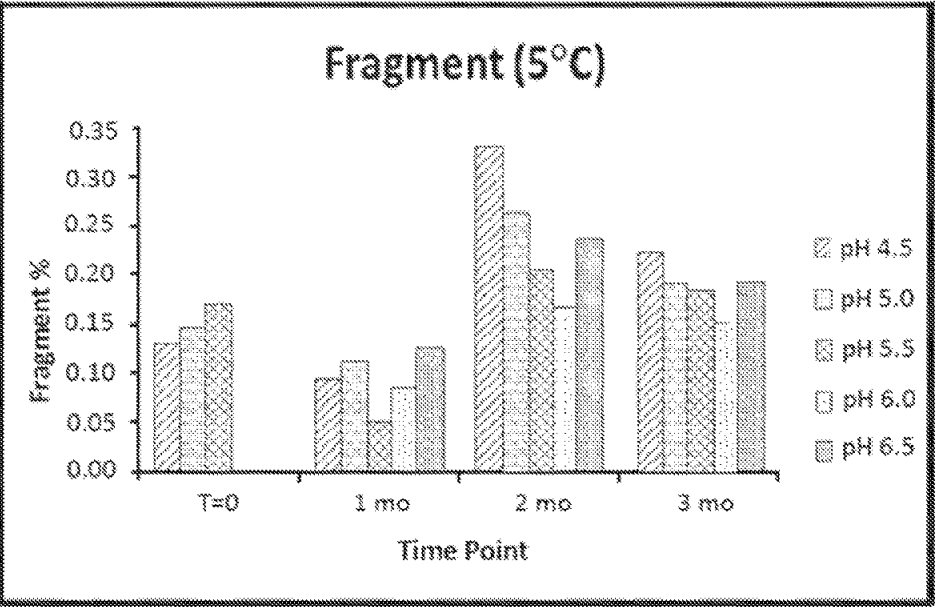


Figure 8

B

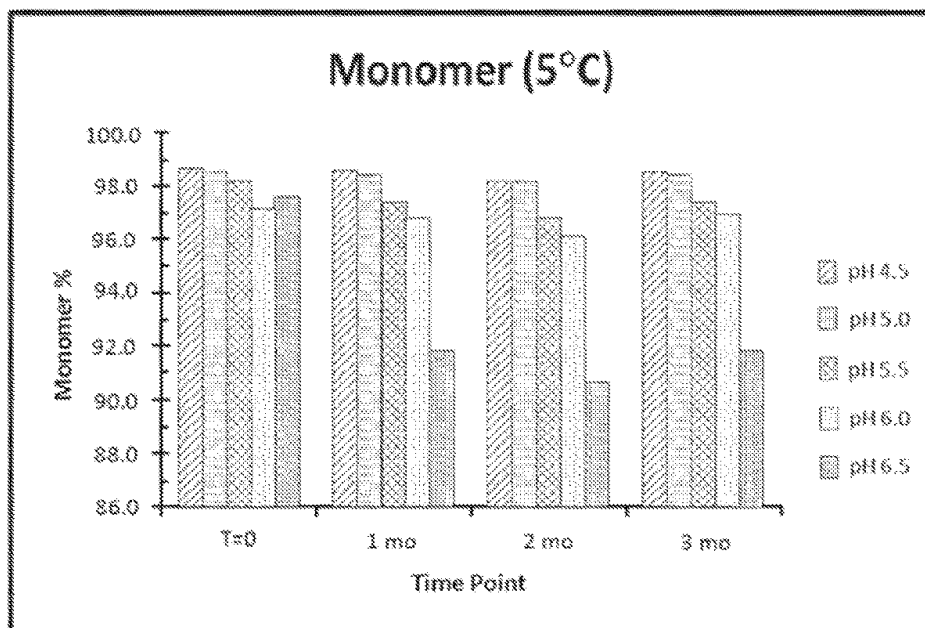


Figure 9

B

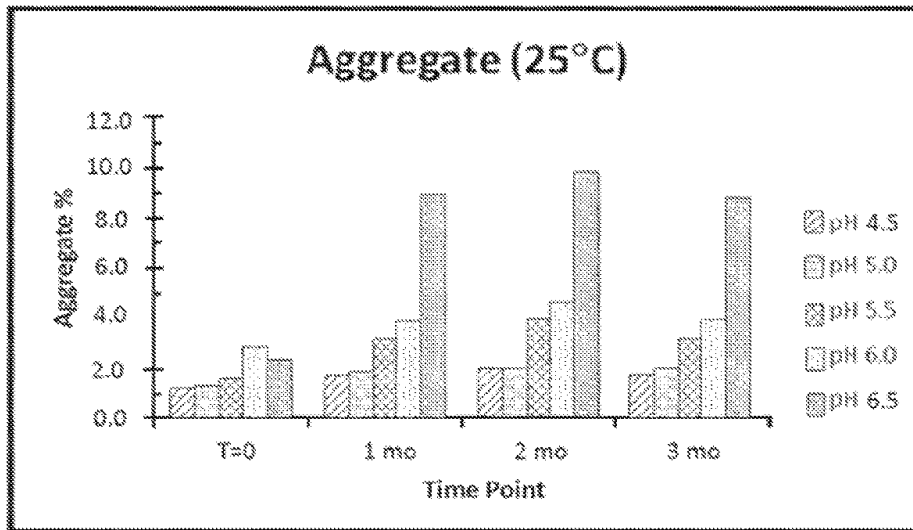


Figure 10

B

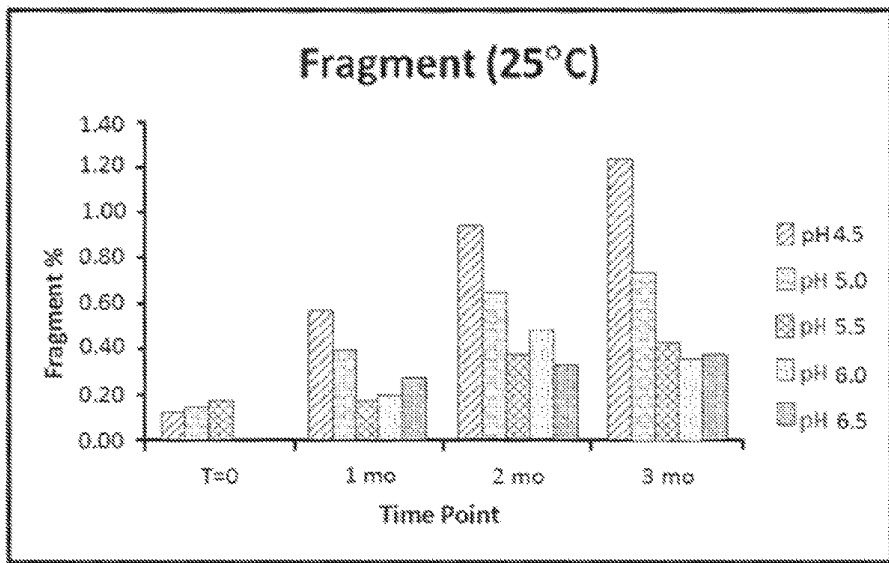


Figure 11

B

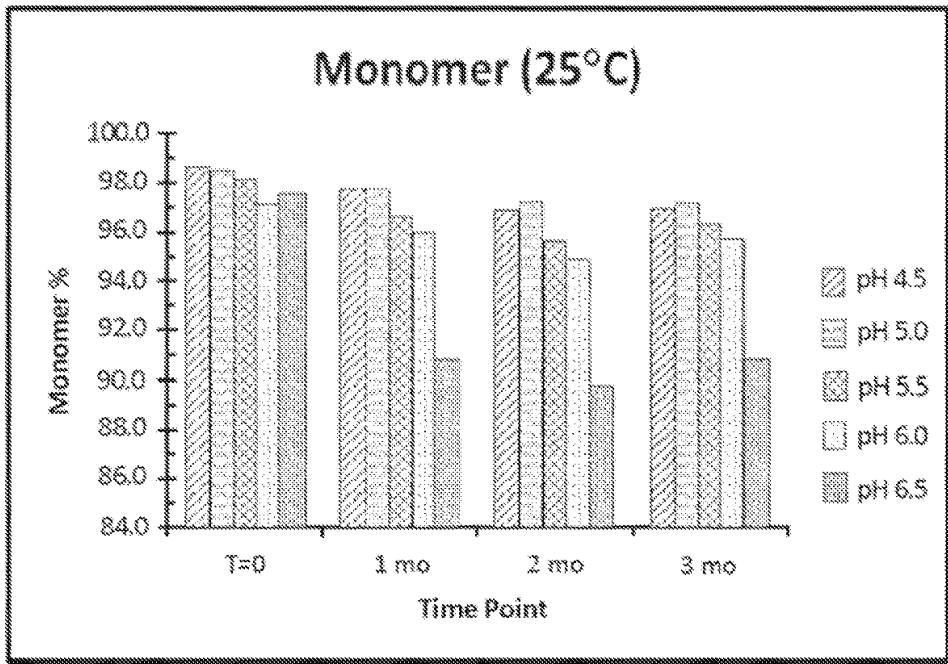


Figure 12

B

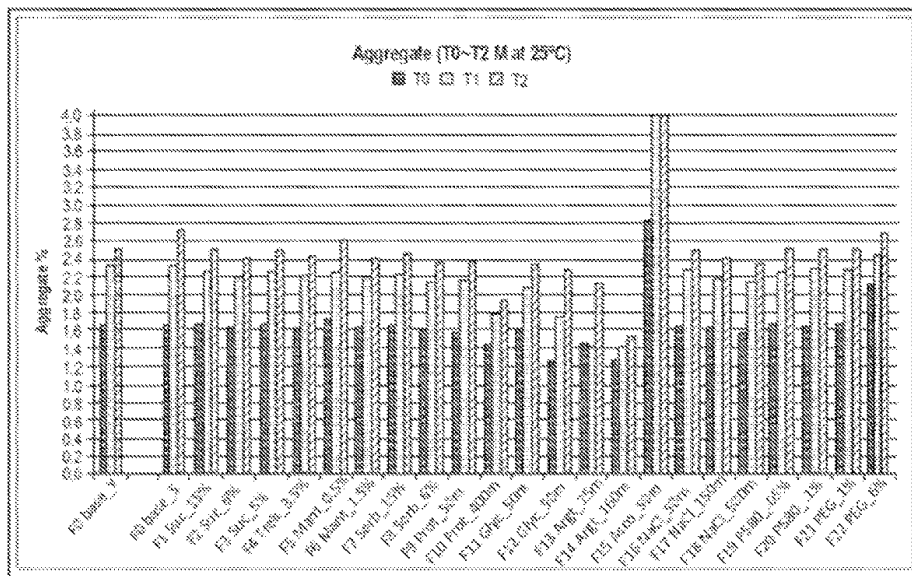


Figure 13

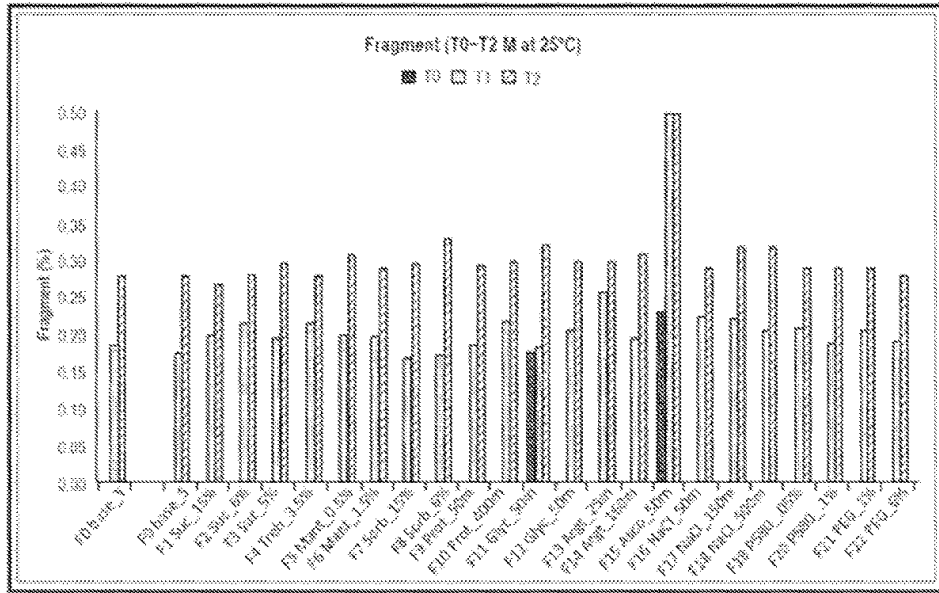


Figure 14

B

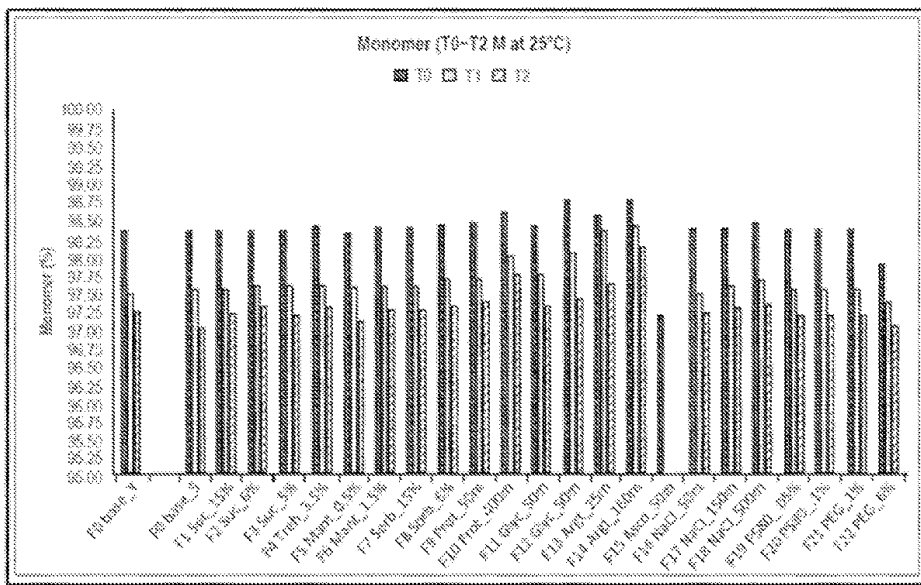


Figure 15

B

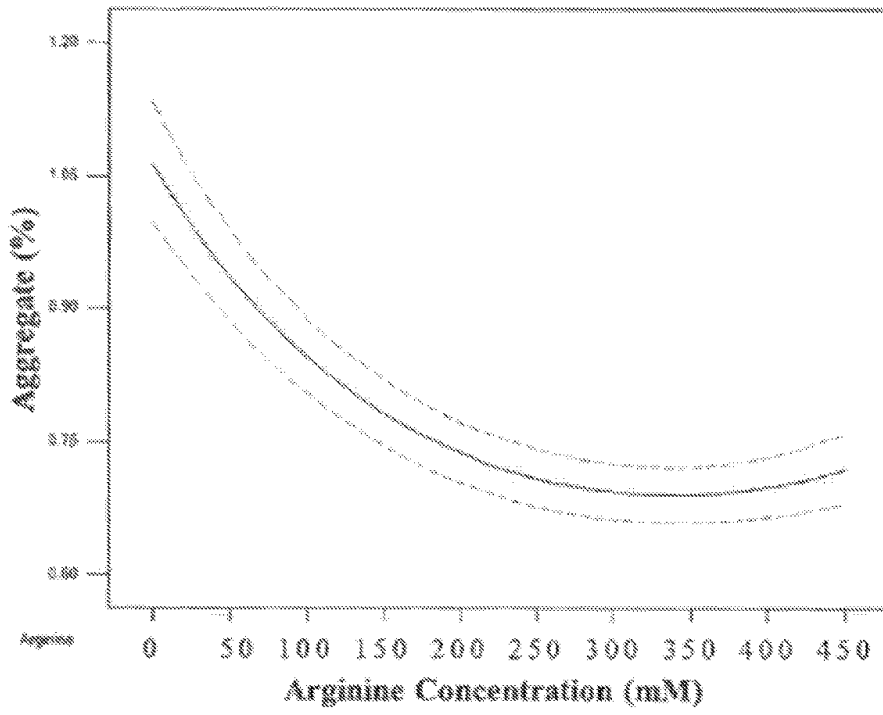


Figure 16

B

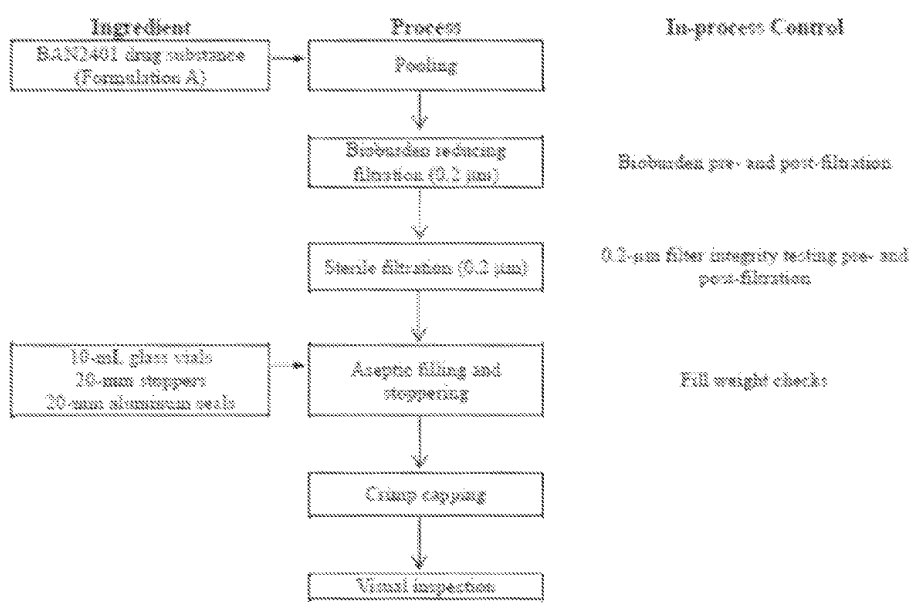


Figure 17

B

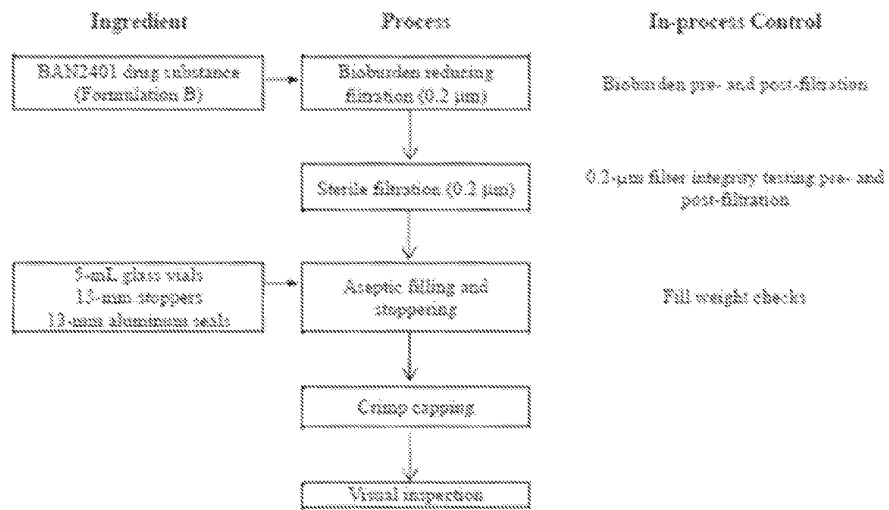


Figure 18

B

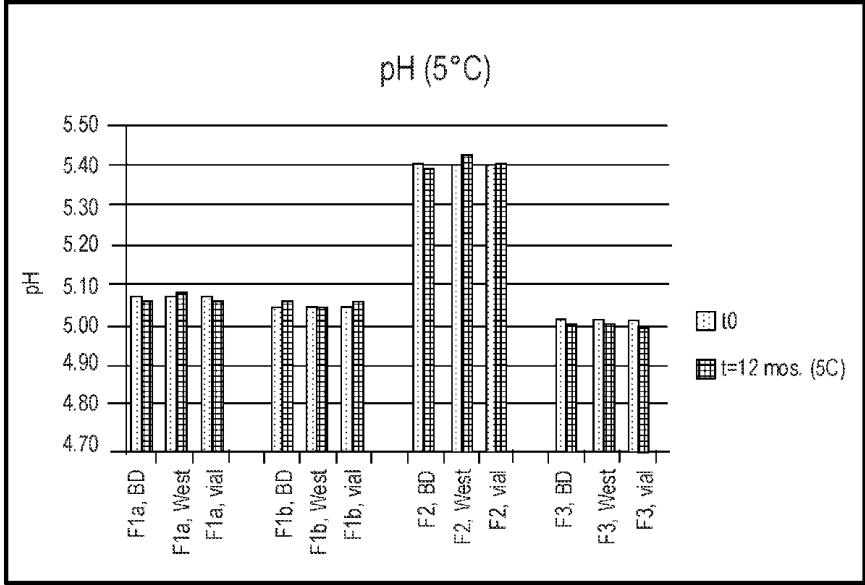


Figure 19

B

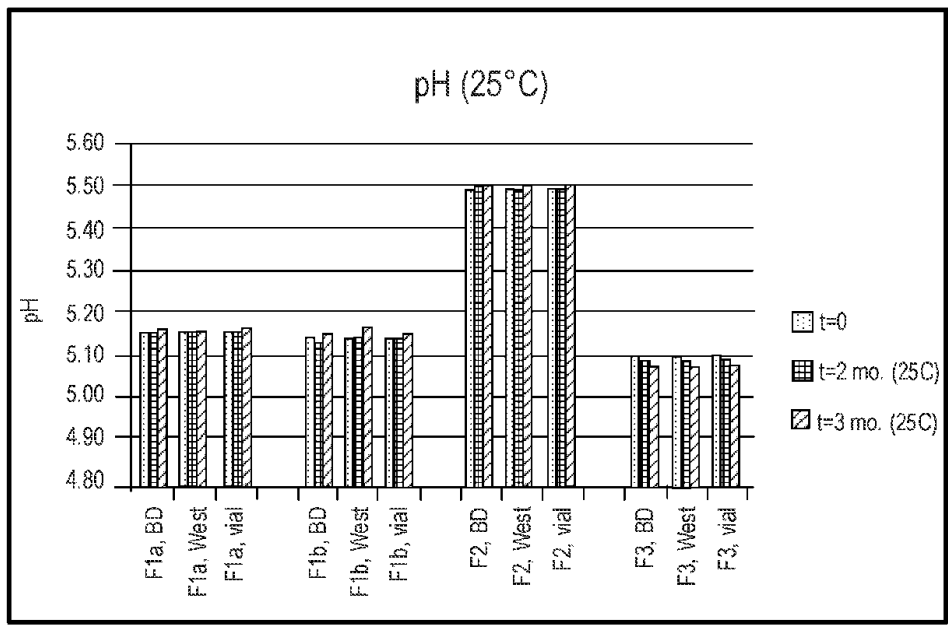


Figure 20

B

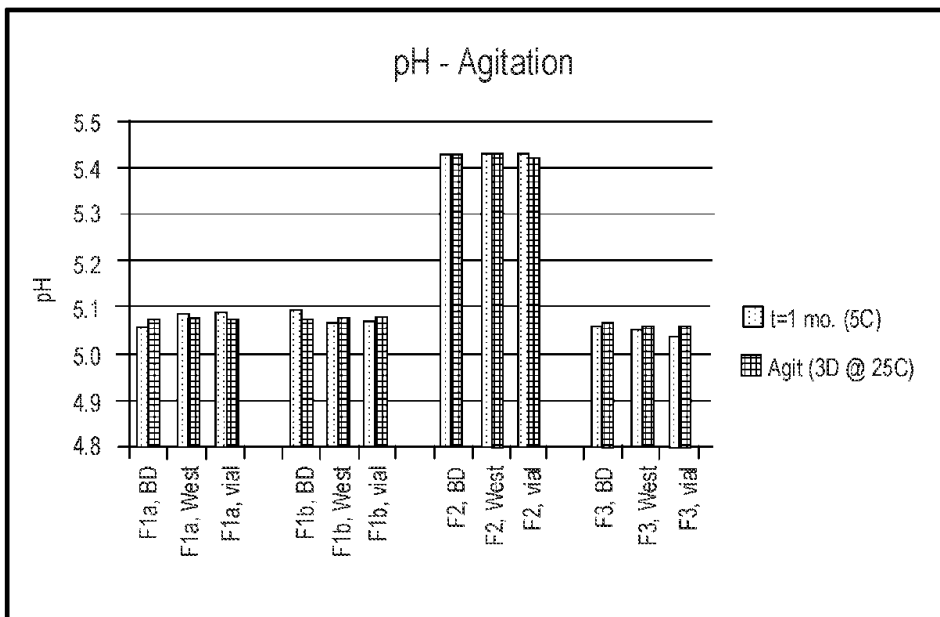


Figure 21

B

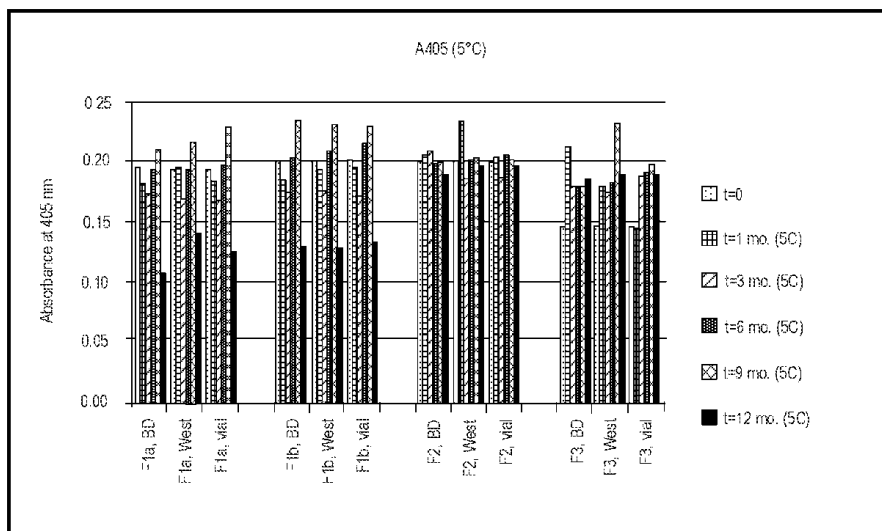


Figure 22

B

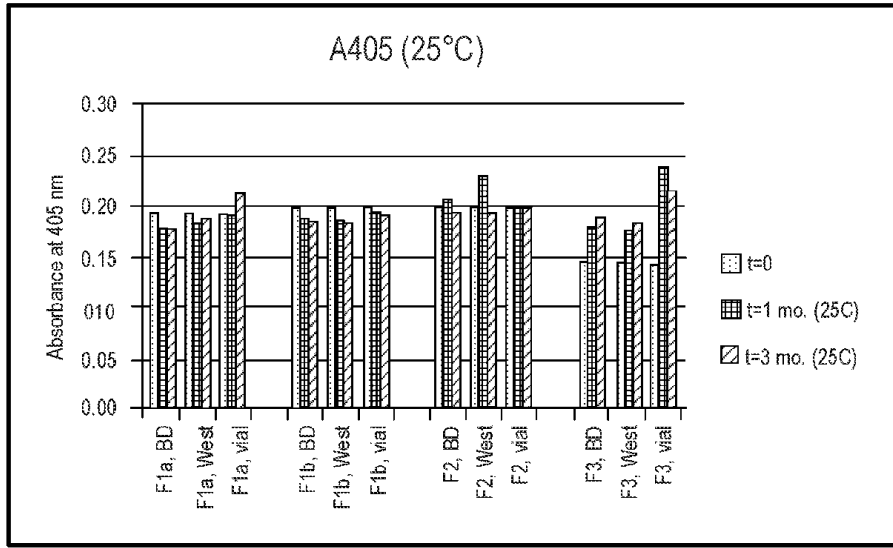


Figure 23

B

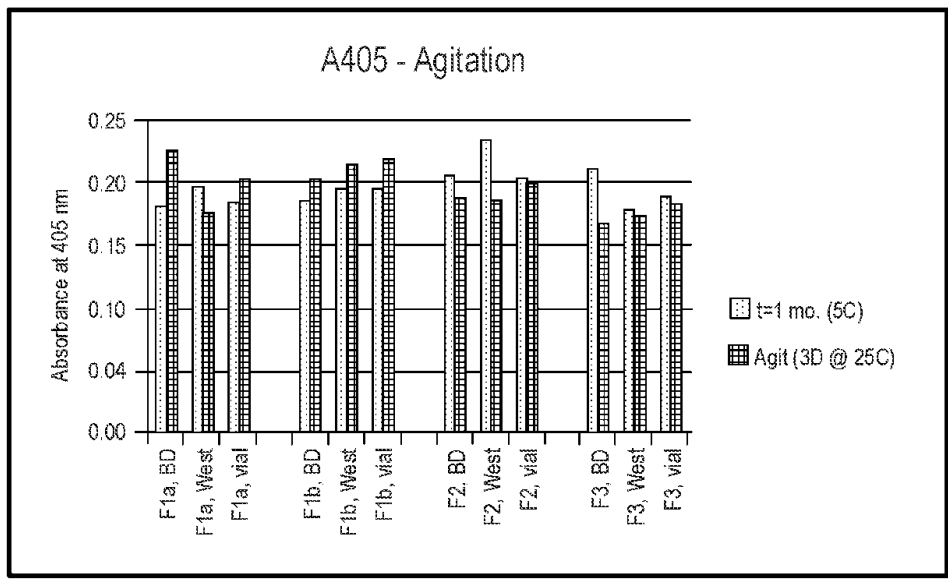


Figure 24

B

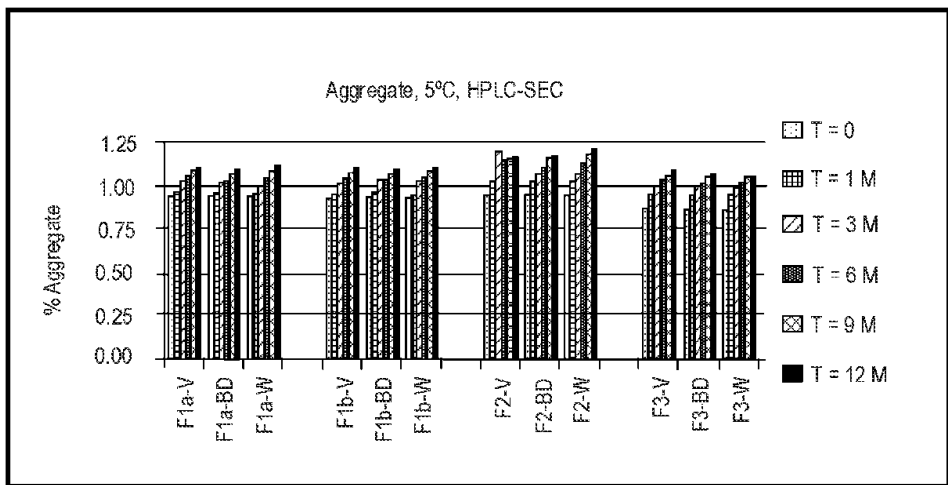


Figure 25

B

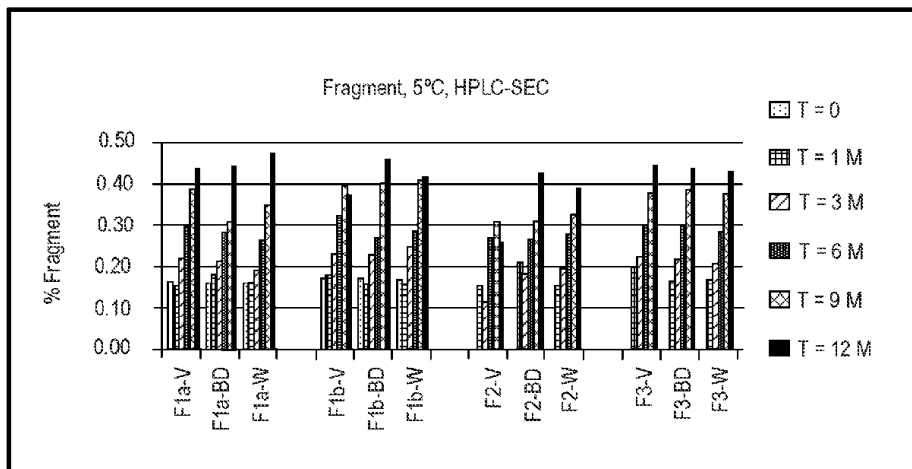


Figure 26

B

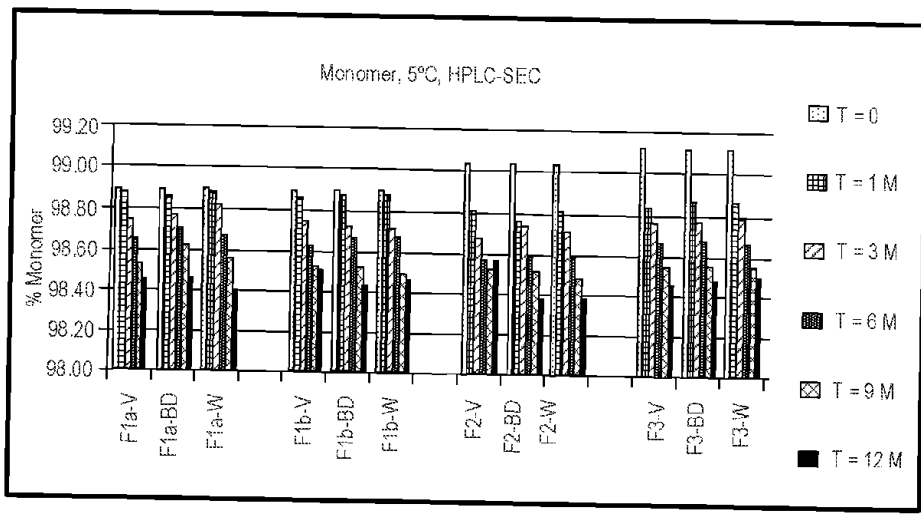


Figure 27

B

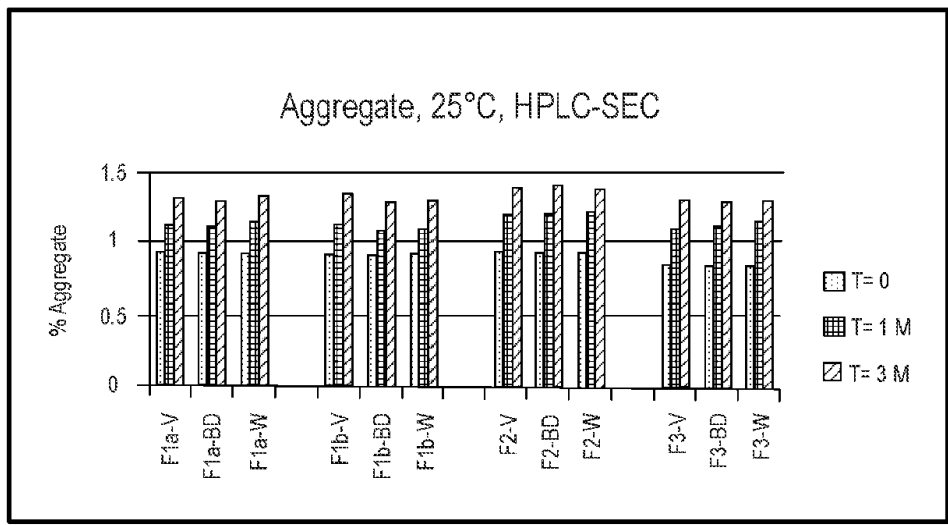


Figure 28

B

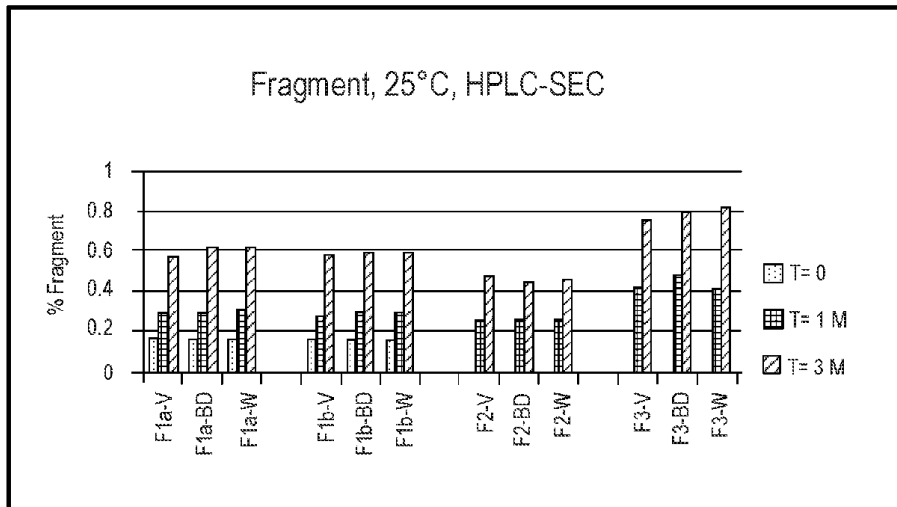


Figure 29

B

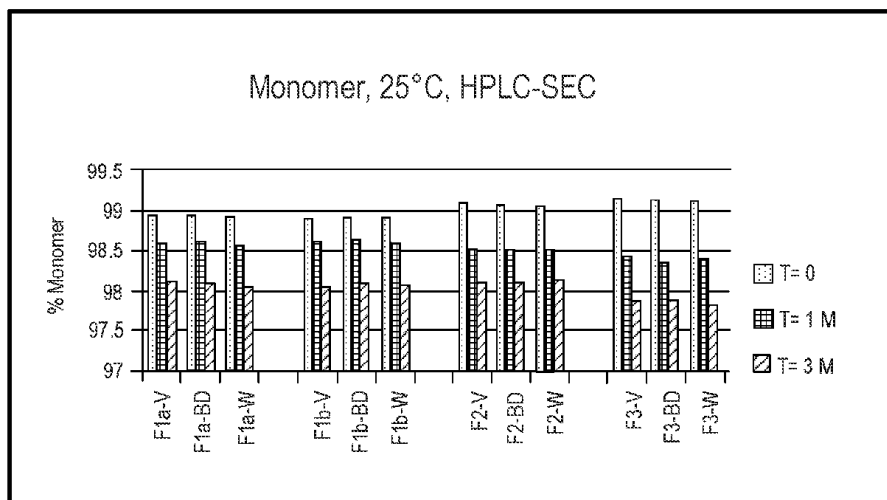


Figure 30

B

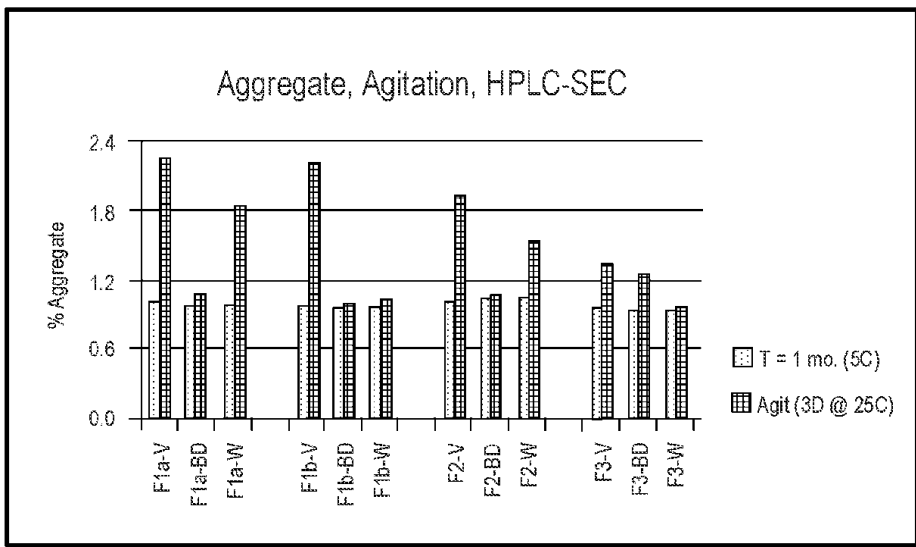


Figure 31

B

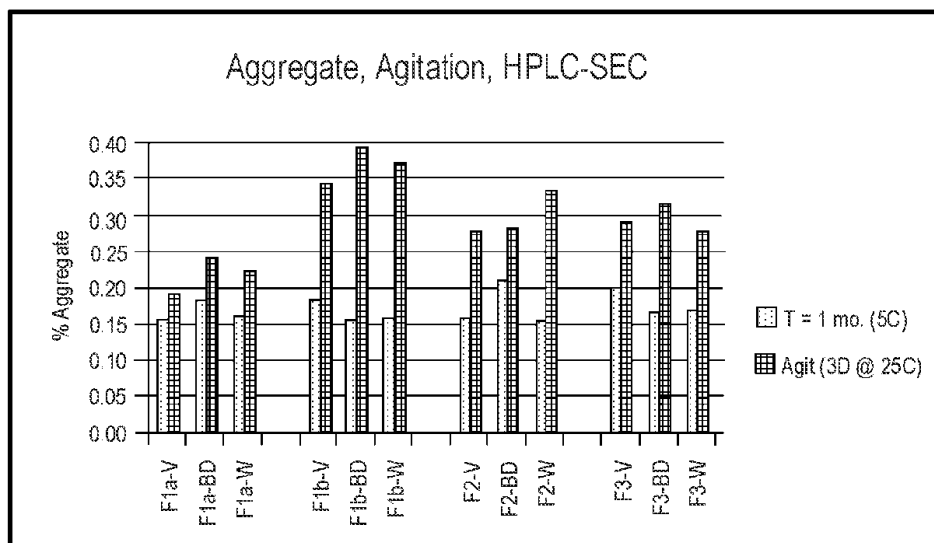


Figure 32

13

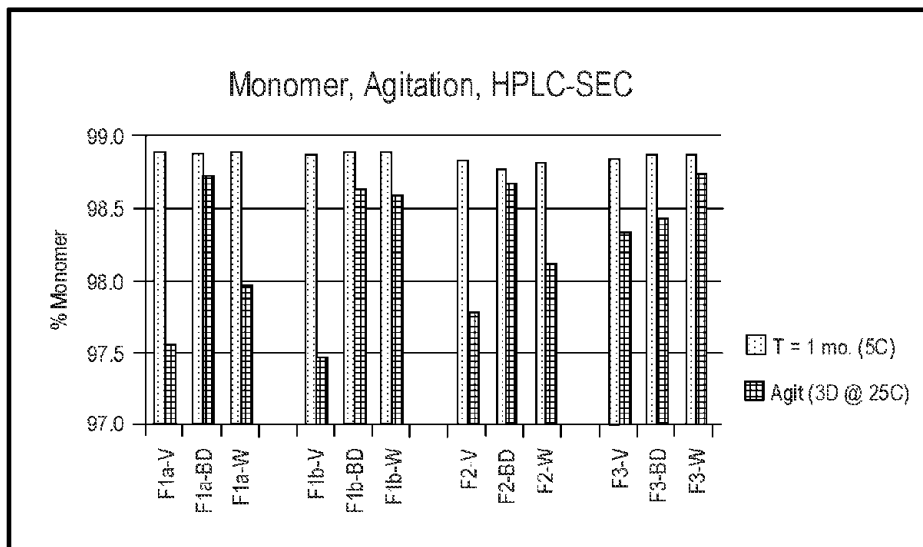


Figure 33