



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2473528 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2015.05.11
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2014.12.03
(86)	Europeisk søknadsnr	10747896.8
(86)	Europeisk innleveringsdag	2010.09.03
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2012.07.11
(30)	Prioritet	2009.09.03, US, 275816 P 2009.12.18, US, 284502 P
(84)	Utpekte stater	AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
(73)	Innehaver	Ablynx N.V., Technologiepark 21, 9052 Ghent-Zwijnaarde, BE-Belgia
(72)	Oppfinner	BRIGE, Ann, Biezenkouter 15, B-9940 Ertvelde, BE-Belgia LABEUR, Christine, Stijn Streuvelsstraat 28, B-8000 Brugge, BE-Belgia DE BRABANDERE, Veronique, Skiweg 1, B-9000 Gent, BE-Belgia
(74)	Fullmektig	Tandbergs Patentkontor AS, Postboks 1570 Vika, 0118 OSLO, Norge

(54)	Benevnelse	Stabile formuleringer av polypeptider og anvendelser av disse
(56)	Anførte publikasjoner	WO-A1-2008/020079 WO-A1-2008/071685 WO-A1-2010/060768 WO-A2-2004/041863 WO-A2-2006/040153 WO-A2-2006/074947 WO-A2-2007/002261 WO-A2-2007/104529 WO-A2-2008/142164 WO-A2-2010/077422

Beskrivelse

OPPFINNELSENS OMRÅDE

[0001] Den foreliggende oppfinnelsen vedrører formuleringer av enkle variable domener. Nærmere bestemt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen formuleringer som inneholder enkle variable domener med en god løselighet og god stabilitet under forskjellige lagrings- og belastningsforhold. Formuleringene ifølge oppfinnelsen er egnet for administrering til humane individer.

[0002] Oppfinnelsen vedrører videre beholdere og farmasøytiske enheter omfattende slike formuleringer og profylaktiske og terapeutiske anvendelser av formuleringene og farmasøytiske enheter ifølge oppfinnelsen.

[0003] Andre aspekter, utførelsesformer, fordeler og anvendelser ifølge oppfinnelsen vil fremgå av den videre beskrivelsen i dette dokumentet.

KJENT TEKNIKK

[0004] Nanolegemer (som ytterligere beskrevet i dette dokumentet) karakteriseres ved dannelsen av antigenbindingssetet av et enkelt variabelt domene, som ikke krever interaksjon med et ytterligere domene (f.eks. i form av VH/VL-interaksjon) for antigengjenkjennelse. Nanolegemer er beskrevet mot et bredt spekter av forskjellige mål (WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/040153, WO 06/122825, WO 07/104529, WO 08/020079, WO 08/074839, WO 08/071447, WO 08/074840, WO 08/074867, WO 08/077945, WO 08/101985, WO 08/142164, WO 09/068625, WO 08/142165, WO 09/068627) som kan være ideelle kandidater for legemiddelutvikling. Nanolegemer mot IL-6R som kan hemme IL-6/IL-6R-interaksjonen er beskrevet i WO 08/020079. Nanolegemer mot p19-underenheten til IL-23 som blokkerer interaksjonen mellom IL-23 og dens reseptor, er blitt beskrevet i WO 09/068627. Nanolegemer mot RANKL som kan hemme osteoklastdannelse er beskrevet i WO 08/142164. OPG/RANKL/RANK-systemet er nylig blitt oppdaget som dreiepunktregulatoriske faktorer i patogenesen av bensykdommer og forstyrrelser som f.eks. osteoporose.

[0005] Proteiner, så som terapeutiske antistoffer og nanolegemer transporteres ofte og/eller lagres for senere bruk. Det er derfor viktig at slike proteiner bevarer stabiliteten og den biologiske aktiviteten av proteinet under forskjellige forhold så som forskjellige temperaturregimer og mekaniske belastninger.

[0006] Visse tidligere kjente flytende antistoffpreparater har vist kort holdbarhet og tap av biologisk aktivitet av antistoffene som følge av kjemisk og/eller fysisk ustabilitet under transport og lagring. Kjemisk ustabilitet kan forårsakes av deamidering, racemisering, hydrolyse, oksidasjon, betaeliminering eller disulfidutveksling, og fysisk ustabilitet kan forårsakes av antistoffdenaturering, aggregering, utfelling eller adsorpsjon. Blant disse er aggregering, deamidering og oksidasjon kjent for å være de

mest vanlige årsakene til antistoffnedbrytning (Cleland et al., 1993, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems 10: 307-377). Lite er kjent om legemiddel-formuleringskomponenter som gir stabile flytende formuleringer av nanolegemer.

[0007] Det eksisterer et behov for stabile, flytende formuleringer som viser en god løselighet av nanolegemet og som viser økende stabilitet, lave til ikke-detekterbare nivåer av aggregering, lave til ikke-detekterbare nivåer av nanolegemenedbrytning og svært lite til intet tap av biologisk aktivitet av nanolegemet, selv under forskjellige transport- og lagringsforhold.

OPPSUMMERING AV OPPFINNELSEN

[0008] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer forbedrede formuleringer (også referert til som "*formulering(er) ifølge oppfinnelsen*") av polypeptider omfattende én eller flere enkle variable domener som viser god løselighet av de enkelte variable domenene og bibeholder økt stabilitet av de enkle variable domenene under en rekke forskjellige transport-, lagrings- og i-bruk-forhold. Den foreliggende oppfinnelsen er basert på funnet at nærværet i formuleringen av visse buffere kan øke løseligheten, smeltetemperaturen og/eller stabiliteten av de enkle variable domenene som er til stede i formuleringen.

[0009] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer løselighetsdata for formuleringer med polypeptider omfattende ett eller flere enkle variable domener (også referert til som "*polypeptid(er) ifølge oppfinnelsen*") opptil 150 mg/ml og høyere. Oppfinnelsen viser videre at slike formuleringer kan transporteres, manipuleres gjennom ulike administreringsanordninger og beholder aktiviteten, renheten og styrken under forskjellige belastningsforhold: mekaniske belastningsforholdene; lagring av formuleringen ved forskjellige belastningsforholdene så som forskjellige fryse/tine-sykluser, ved 2-8 °C, ved 25 ± 5 °C, og ved forhøyet temperatur.

[0010] Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0 og et polypeptid omfattende én eller flere enkle variable domener i en konsentrasjon på 1 mg/ml til 200 mg/ml, formuleringen formuleres for administrering til et menneske, og formuleringen er videre omfattende:

a) En buffer ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM valgt fra histidin pH 6,0-6,5 der formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere, og der polypeptidet velges fra én av SEQ ID NO: 1 til 6

[0011] De foreliggende oppfinnerne observerte at formuleringer som har 150 mM eller mindre av uorganisk salt viser en mye bedre stabilitet i de enkle variable domenene som inneholdes i formuleringen. Uorganiske salter som ofte anvendes i farmasøytisk formulering er NaCl og KCl. De enkle variable domenene til stede i formuleringer som inneholder 150 mM eller mindre av uorganisk salt har vist økt stabilitet (f.eks. mindre tendens til å danne aggregater, dimerer og/eller pyroglutamat,

eller til løs potens) ved forskjellige belastningslagringsforhold (så som f.eks. ved lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller 2 år eller mer)), en forbedret smeltetemperatur og/eller en økt løselighet. Fortrinnsvis inneholder formuleringen 100 mM eller mindre av uorganisk salt, mer foretrukket til og med 50 mM eller mindre av uorganisk salt. Mest foretrukket inneholder ikke formuleringen noe uorganisk salt.

[0012] Polypeptidet (også referert til som "*polypeptid ifølge oppfinnelsen*") omfattende ett eller flere enkle variable domener for anvendelse i formuleringen ifølge oppfinnelsen kan være terapeutisk eller profylaktisk, og kan være nyttig ved forebyggelse, behandling og/eller håndtering av én eller flere sykdommer og/eller forstyrrelser. I et bestemt aspekt har polypeptidet minst to enkle variable domener. I et annet spesifikt aspekt har polypeptidet minst tre enkle variable domener. Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan velges fra SEQ ID NO: 1 til 6.

[0013] Polypeptidet ifølge oppfinnelsen er til stede i formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen ved en konsentrasjon på 1 til 200 mg/ml, fortrinnsvis rundt 5 til 100 mg/ml eller mer, mer foretrukket rundt 5 til 50 mg/ml eller mer, mest foretrukket rundt 5 til 30 mg/ml eller mer, så som rundt 5 mg/ml, rundt 10 mg/ml, rundt 20 mg/ml, rundt 30 mg/ml, rundt 40 mg/ml, rundt 50 mg/ml, rundt 60 mg/ml, rundt 70 mg/ml, rundt 80 mg/ml, rundt 90 mg/ml, rundt 100 mg/ml, rundt 150 mg/ml eller til og med mer.

[0014] I et aspekt ifølge oppfinnelsen er formuleringen homogen. I et annet aspekt er formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen steril. I tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen minst en vandig bærer (f.eks. destillert vann, MilliQ-vann eller WFI) og en buffer.

[0015] pH-en av formuleringen ifølge oppfinnelsen bør være i området fra 5,5 til 8,0, fortrinnsvis er pH-en rundt 6,0 til 7,5, mer foretrukket rundt 6,2 til 7,5 eller rundt 6,2 til 7,0. Mest foretrukket er pH-en i området fra 6,5 til 7,0, så som f.eks. pH 6,5. Disse pH-områdene har vist seg å gi en øket smeltetemperatur til polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen.

[0016] Buffere for anvendelse i formuleringen ifølge oppfinnelsen er histidin pH 6,0-6,5. Formuleringer omfattende én av disse bufferne har vist en meget god løselighet (som definert i dette dokumentet) av polypeptidene ifølge oppfinnelsen, en forbedret smeltetemperatur for polypeptidene til stede i formuleringen, og økt stabilitet (f.eks. mindre tendens til å danne aggregater, dimerer og/eller pyroglutamat, eller til å tape styrke) ved forskjellige belastningslagringsforhold (så som f.eks. under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer)). Bufferen er fortrinnsvis i en konsentrasjon på rundt 10 til

20 mM, så som 10 mM eller 15 mM. I et bestemt aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en histidinbuffer-pH 6,5 ved en konsentrasjon på 15 mM eller en histidinbuffer pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM.

[0017] Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen stabile formuleringer av polypeptider omfattende ett eller flere enkle variable domener, formuleringene omfattende en vandig bærer, polypeptidet i en konsentrasjon fra rundt 1 til 200 mg/ml eller mer, fortrinnsvis rundt 5 til 100 mg/ml eller mer, mer foretrukket fra rundt 5 til 50 mg/ml eller mer, mest foretrukket rundt 5 til 30 mg/ml eller mer, så som rundt 5 mg/ml, rundt 10 mg/ml, rundt 20 mg/ml, rundt 30 mg/ml, rundt 40 mg/ml, rundt 50 mg/ml, rundt 60 mg/ml, rundt 70 mg/ml, rundt 80 mg/ml, rundt 90 mg/ml, rundt 100 mg/ml, rundt 150 mg/ml eller til og med mer, og en buffer, så som en histidinbuffer med en pH i området 6,0 til 7,0 ved en konsentrasjon på rundt 10 til 20 mM.

[0018] Fortrinnsvis er formuleringen ifølge oppfinnelsen isotonisk eller svakt hypotonisk, og/eller har en osmolalitet på rundt 290 ± 60 mOsm/kg, så som rundt 240 eller høyere, 250 eller høyere, eller 260 eller høyere. Isotonisiteten til formuleringen kan justeres ytterligere ved tilsetningen av én eller flere eksipienser og/eller tonisitetsmidler.

[0019] Foretrukne eksipienser/tonisitetsmidler for anvendelse i formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen er sakkarider og/eller polyoler. Følgelig, i et annet aspekt, omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen et sakkarid og/eller polyol. Formuleringer omfattende ett eller flere sakkarider og/eller polyoler har vist økt stabilitet (f.eks. mindre tendens til å danne aggregater, dimerer og/eller pyroglutamat, eller til å tape styrke) ved forskjellige lagringsforhold belastning (så som f.eks. under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller enda 2 år eller mer), og under mekaniske belastningsforhold) og/eller en forbedret smeltetemperatur for polypeptidene til stede i formuleringen. I et bestemt aspekt ifølge oppfinnelsen er eksipiensen til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen et ikke-reduserende sukker. I et annet spesifikt aspekt er eksipiensen til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen et disakkarid. I et annet spesifikt aspekt velges eksipiensen til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen fra sukrose, trehalose, sorbitol og mannitol. Sakkaridet og/eller polyolet er fortrinnsvis til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen ved en konsentrasjon på rundt 1 til 20 %, fortrinnsvis rundt 2,5 til 15 %, mer foretrukket fra 5 til 10 %, så som rundt 5 %, rundt 7,5 %, rundt 8 % eller rundt 10 %.

[0020] Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen stabile formuleringer av polypeptider omfattende ett eller flere enkle variable domener, formuleringene

omfattende en vandig bærer, polypeptidet i en konsentrasjon fra rundt 1 til 200 mg/ml eller mer, fortrinnsvis rundt 5 til 100 mg/ml eller mer, mer foretrukket rundt 5 til 50 mg/ml eller mer, mest foretrukket rundt 5 til 30 mg/ml eller mer, så som rundt 5 mg/ml, rundt 10 mg/ml, rundt 20 mg/ml, rundt 30 mg/ml, rundt 40 mg/ml, rundt 50 mg/ml, rundt 60 mg/ml, rundt 70 mg/ml, rundt 80 mg/ml, rundt 90 mg/ml, rundt 100 mg/ml, rundt 150 mg/ml eller til og med mer, og et sakkarid og/eller polyol ved en konsentrasjon på rundt 1 til 20 %, fortrinnsvis rundt 2,5 til 15 %, mer foretrukket rundt 5 til 10 %, så som rundt 5 %, rundt 7,5 %, rundt 8 % eller rundt 10 %.

[0021] I et annet spesifikt aspekt kan formuleringen ifølge oppfinnelsen omfatte én eller flere surfaktanter (f.eks. Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer). Formuleringer omfattende en surfaktant har vist en meget god løselighet (som definert i dette dokumentet) av polypeptidene ifølge oppfinnelsen og/eller økt stabilitet under mekaniske belastninger. Surfaktanten kan være til stede ved en konsentrasjon i området på rundt 0,001 til 1 % (fortrinnsvis mellom rundt 0,001 til 0,1 %, eller rundt 0,01 til 0,1 %, så som rundt 0,001 %, rundt 0,005 %, rundt 0,01 %, rundt 0,02 %, rundt 0,05 %, eller rundt 0,08 %, rundt 0,1 %, rundt 0,5 %, eller rundt 1 % av formuleringen, fortrinnsvis rundt 0,01 %).

[0022] Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen stabile formuleringer av polypeptider omfattende ett eller flere enkle variable domener, formuleringene omfattende en vandig bærer, polypeptidet i en konsentrasjon fra rundt 1 til 200 mg/ml eller mer, fortrinnsvis rundt 5 til 100 mg/ml eller mer, mer foretrukket rundt 5 til 50 mg/ml eller mer, mest foretrukket rundt 5 til 30 mg/ml eller mer, så som rundt 5 mg/ml, rundt 10 mg/ml, rundt 20 mg/ml, rundt 30 mg/ml, rundt 40 mg/ml, rundt 50 mg/ml, rundt 60 mg/ml, rundt 70 mg/ml, rundt 80 mg/ml, rundt 90 mg/ml, rundt 100 mg/ml, rundt 150 mg/ml eller til og med mer, og en surfaktant (f.eks. Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer) ved en konsentrasjon i området fra rundt 0,001 til 1 % (fortrinnsvis mellom rundt 0,001 til 0,1 %, eller rundt 0,01 til 0,1 % så som rundt 0,001 %, rundt 0,005 %, rundt 0,01 %, rundt 0,02 %, rundt 0,05 %, rundt 0,08 %, rundt 0,1 %, rundt 0,5 %, eller rundt 1 % av formuleringen, fortrinnsvis rundt 0,01 %).

[0023] En foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte:

- a) En histidinbuffer med pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM, så som 10 mM til 20 mM;
- b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 10 %; og
- c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 til 1 %.

[0024] En annen foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte:

- a) en histidinbuffer med pH 6,5 ved en konsentrasjon på 15 mM;
- b) sukrose ved en konsentrasjon på 8 %; og
- c) Tween 80 ved en konsentrasjon på 0,01 %.

[0025] En annen foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte:

- a) en histidinbuffer med pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM, så som 10 til 20 mM;
- 5 b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 10 %; og
- c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 til 1 %.

[0026] En annen foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte:

- a) en histidinbuffer med pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM;
- 10 b) sukrose ved en konsentrasjon på 10 %; og
- c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,005 %.

[0027] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer formuleringer av et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener som oppviser høy løselighet av polypeptidet, liten eller ingen aggregering av polypeptidet og høy stabilitet under lange perioder med lagring.

[0028] I ett aspekt har komponentene i formuleringene ifølge oppfinnelsen blitt valgt slik at polypeptidene ifølge oppfinnelsen har en løselighet på minst 20 mg/ml, minst 50 mg/ml, fortrinnsvis minst 90 mg/ml, minst 120 mg/ml, minst 150 mg/ml eller 200 mg/ml eller mer.

[0029] I et annet aspekt er komponentene i formuleringene ifølge oppfinnelsen blitt valgt slik at polypeptidet til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen har en smeltetemperatur på minst 59 °C eller mer (så som 59,5 °C eller mer), fortrinnsvis minst 60 °C eller mer (så som 60,5 °C eller mer), mer foretrukket minst 61 °C eller mer (så som 61,5 °C eller mer) eller minst 62 °C eller mer (så som 62,5 °C eller mer), mest foretrukket minst 63 °C eller mer (så som 63,5 °C eller mer), som målt ved den termiske skiftanalysen (TSA) og/eller differensielle skanningskalorimetrien (DSC).

[0030] I enda et annet aspekt oppviser formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen stabilitet under forskjellige belastningsforhold så som:

- flere (opptil 10) fryse/tine-sykluser;
- lagring ved en temperatur på 2-8 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- 35 • lagring ved en temperatur på 25 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);

- lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C, opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer); og/eller
- mekaniske belastninger.

5

[0031] Mekaniske belastninger som anvendt i den foreliggende oppfinnelsen kan være hvilken som helst form for ytre kraft påført på formuleringen som kan påvirke stabiliteten av polypeptidet til stede i formuleringen. Uten å være begrensende, kan de mekaniske belastningene påført løsningen være skjærbelastning, rørbelastning, ristbelastning, rotasjonsbelastning osv. Fortrinnsvis er formuleringen ifølge oppfinnelsen stabil under én eller flere av de følgende formene for mekanisk belastning:

10

- riste formuleringen i 10 s til 1 min;
- skyve formuleringen gjennom en kanyle (25G, fortrinnsvis 26G, mer foretrukket 27G, 28G enda mer foretrukket 28G, mest foretrukket 29 g eller mer) med en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml opptil 50 ml sprøyte);
- rotasjon i to dager ved 10 rpm; og/eller
- omrøring i 1 time ved romtemperatur og/eller 4-48 timer (så som 4-8 timer, 12 timer, 24 timer eller til og med 48 timer) ved 4 °C i minst 10 rpm (så som 50 rpm, 100 rpm, eller mer).

15

20

25

[0032] Fortrinnsvis er formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen stabile under mer enn en (så som to, tre, fire, fem, seks eller syv) av de ovennevnte belastningsforholdene, mest foretrukket under alle belastningsforholdene ovenfor.

[0033] Følgelig er polypeptidet ifølge oppfinnelsen til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen:

30

- stabil etter flere (opptil 10) fryse/tine-sykluser, idet stabiliteten er som bestemt ved OD320/OD280-måling, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, potensanalyse (så som Biacore eller ELISA) og/eller SDS-PAGE;
- stabil under lagring ved en temperatur på 2-8 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), idet stabilitet er som bestemt ved OD320/OD280-måling, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, potensanalyse (så som Biacore eller ELISA) og/eller SDS-PAGE;

35

- stabil under lagring ved en temperatur på 25 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), idet stabiliteten er som bestemt ved OD320/OD280-måling, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, potensanalyse (så som Biacore eller ELISA) og/eller SDS-PAGE;
- stabil under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), idet stabiliteten er som bestemt ved OD320/OD280-måling, SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, potensanalyse (så som Biacore eller ELISA) og/eller SDS-PAGE;
- stabil ved risting av formuleringen i 10 s til 1 min;
- stabil når man presser formuleringen gjennom en nål (25G, fortrinnsvis 26G, mer foretrukket 27G, enda mer foretrukket 28G, mest foretrukket 29G eller mer) med en sprøyte (den anvendte sprøyten kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml opptil 50 ml sprøyte);
- stabil når den roterer i to dager ved 10 rpm; og/eller
- stabil når den omrøres i 1 time ved romtemperatur og/eller 4-48 timer (så som 4-8 timer, 12 timer, 24 timer eller 48 timer) ved 4 °C ved minst 10 rpm (så som 50 rpm, 100 rpm eller mer).

[0034] Stabiliteten av formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan demonstreres ved det faktumet at mindre enn 10 % av polypeptidene danner pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) og/eller mindre enn 10 % av polypeptidene danner dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene. Fortrinnsvis danner mindre enn 10 % av polypeptidene pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) og mindre enn 10 % av polypeptidene danner dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring under én eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene.

[0035] I et bestemt aspekt danner mindre enn 10 % av polypeptidene til stede i formuleringen av oppfinnelsen pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer). I et annet spesifikt aspekt danner mindre enn 10 % av polypeptidene dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst

3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer). I enda et annet spesifikt aspekt danner mindre enn 10 % av polypeptidene til stede i formuleringen av oppfinnelsen danner pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), og mindre enn 10 % av polypeptidene danner dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer).

[0036] Bortsett fra dette og/eller i tillegg kan stabiliteten av formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen demonstreres ved det faktum at det bare viser lave til ikke-detekterbare nivåer av aggregeringen og/eller partikkeldannelsen (f.eks. som vurdert av SE-HPLC, undersynlig partikkeltelling, analytisk ultrasentrifugering, dynamisk lysspredning, OD320/OD280-forholdsmåling og/eller elastisk lysspredning) selv under lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene. I et bestemt aspekt kan formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen bare vise lave til ikke-detekterbare nivåer av aggregeringen og/eller partikkeldannelsen (f.eks. som vurdert av SE-HPLC, undersynlig partikkeltelling, analytisk ultrasentrifugering, dynamisk lysspredning og/eller OD320/OD280-måling) ved en temperatur på 37 ± 5 °C, og/eller 5 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer).

[0037] Bortsett fra dette og/eller i tillegg kan stabiliteten av formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen demonstreres ved det faktum at det bare viser lave til ikke-detekterbare nivåer av fragmentering og/eller nedbrytning av polypeptidene (f.eks. som bestemt ved SDS-PAGE, SE-HPLC, RP-HPLC og/eller IEX-HPLC), selv ved lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene. I et bestemt aspekt viser formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen bare lave til ikke-detekterbare nivåer av fragmentering og/eller nedbrytning av polypeptidene (f.eks. som bestemt ved SDS-PAGE, SE-HPLC, RP-HPLC og/eller IEX-HPLC) ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer).

[0038] Bortsett fra dette og/eller i tillegg kan stabiliteten av formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen demonstreres ved det faktum at det viser meget lite eller intet tap av de biologiske aktivitetene av polypeptidet ifølge oppfinnelsen (f.eks. som bedømt ved ELISA og/eller Biacore), selv ved lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene. I et bestemt aspekt viser formuleringene ifølge den

foreliggende oppfinnelsen meget lite til intet tap av de biologiske aktivitetene av polypeptidet ifølge oppfinnelsen (f.eks. som bestemt ved ELISA og/eller Biacore) ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst tre uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer).

[0039] Nærmere bestemt, i formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen beholder minst 80 % (fortrinnsvis minst 90 %, mer foretrukket minst 95 % eller til og med minst 99 %) av polypeptidene sin bindingsaktivitet til minst ett (fortrinnsvis til alle) målene sine (f.eks. som bestemt ved ELISA og/eller Biacore) etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring.

[0040] I et bestemt aspekt beholder minst 80 % (fortrinnsvis minst 90 %, mer foretrukket minst 95 % eller til og med minst 99 %) av polypeptidene deres bindingsaktivitet (f.eks. som bestemt ved ELISA og/eller Biacore) til minst ett (fortrinnsvis alle) av målene sine etter lagring ved 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 2 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer) sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring.

[0041] Følgelig tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen stabile formuleringer av polypeptider omfattende ett eller flere enkle variable domener, der:

- mindre enn 10 % av polypeptidene danner pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis ved minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- mindre enn 10 % av polypeptidene danner dimerer (f.eks. som vurdert av SE-HPLC) under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- minst 80 % av polypeptidene beholder bindingsaktiviteten sin (f.eks. som bestemt ved ELISA og/eller Biacore) til minst ett (fortrinnsvis alle) målene sine etter lagring ved 37 ± 5 °C i opptil 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 2 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer) i forhold til bindingsaktiviteten før lagring; og/eller
- polypeptidet er stabilt under mekaniske belastninger.

[0042] I et foretrukket aspekt er formuleringen ifølge oppfinnelsen en farmasøytisk formulering.

[0043] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer videre fremgangsmåter for fremstilling av de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen. Fremgangsmåtene ifølge

oppfinnelsen kan omfatte trinnene å konsentrere et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener og å bytte det ut med den foretrukne bufferen og/eller eksipiensen.

[0044] Det tilveiebringes også beholdere, sett og farmasøytiske enhetsdoser

omfattende formuleringene ifølge oppfinnelsen for anvendelse av f.eks. en helsearbeider. I spesifikke utførelsesformer formuleres settene eller de farmasøytiske enhetsdosene omfattende de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen for parenteral administrering (f.eks. intradermalt, intramuskulært, intraperitonealt, intravenøst og/eller subkutan) av polypeptidet ifølge oppfinnelsen til et menneske.

Formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og/eller settene kan anvendes i profylakse og/eller terapi. I et bestemt aspekt anvendes formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og/eller settene for forebyggelse og/eller behandling av én eller flere sykdommer og/eller forstyrrelser så som bensykdommer og/eller forstyrrelser (så som f.eks. osteoporose, kreftrelaterte bensykdommer, og/eller bentap forbundet med autoimmunitet og/eller virusinfeksjon) eller autoimmune sykdommer (så som f.eks. revmatoid artritt).

FIGURFORKLARINGER

[0045]

Figur 1. 280 nm SE-HPLC-kromatogrammene av RANKL008a formulert i fosfat (A)- eller (B)-histidinbuffer med enten 50 mM NaCl, 100 mM NaCl eller 10 % mannitol, før og etter 10 fryse/tine-sykluser. En zoom på hovedtoppen er vist som innfelt.

Figur 2. 280 nm RP-HPLC-kromatogrammene av RANKL008a formulert i fosfatbuffer med enten 50 mM NaCl, 100 mM NaCl eller 10 % mannitol, før og etter 10 fryse/tine-sykluser. En zoom på hovedtoppen er vist som innfelt.

Figur 3. 280 nm SE-HPLC-kromatogrammene av RANKL008a formulert i fosfatbuffer med enten 50 mM NaCl, 100 mM NaCl eller 10 % mannitol, etter inkubasjon i 2 uker ved 37 °C. En zoom på hovedtoppen er vist som innfelt.

Figur 4. Figuren viser den tidsavhengige reduksjonen (A), og økningen (B) av overflatearealet av henholdsvis hovedtoppen (A) og % dimerer (B) observert i SE-HPLC-analyse av RANKL008a formulert i forskjellige buffer og lagret i opptil 10 uker ved 37 °C.

Figur 5. 280 nm RP-HPLC-kromatogrammene av RANKL008a formulert i fosfatbuffer med enten 50 mM NaCl, 100 mM NaCl eller 10 % mannitol, etter inkubasjon i 2 uker ved 37 °C. En zoom på hovedtoppen er vist som innfelt.

Figur 6. Overlegging av 280 nm IEX-HPLC-kromatogrammene av RANKL008a formulert i fosfatbuffer med enten 50 mM NaCl, 100 mM NaCl eller 10 % mannitol, etter inkubasjon i 2 uker ved 37 °C. En zoom på hovedtoppen og ettertoppene er vist som innfelt.

Figur 7. De relative mengdene (%) av hovedtoppen og de to ettertoppene observert i IEX-HPLC-kromatogrammer av stabilitetsprøvene etter lagring i 10 uker ved 37 °C.

Figur 8. Bilde og visuell observasjon av vialene etter risting. RANKL008a-prøven, fortynnet (til 5 mg/ml) og ufortynnet med eller uten 0,01 % Tween 80 ble ristet sterkt (10 s - 1 min).

Figur 9. Oversikt over fortynninger og trinn fremstilt i sprøytebarhetsstudien som beskrevet i eksempel 1,6.

Figur 10. OD 320/278- og OD 350/278- forhold (n = 3) etter passering/lagring av RANKL008a i sprøyter med forskjellige fortynningsmidler som beskrevet i eksempel 1,6.

Figur 11. Relativ HSA- og RANKL-styrken av RANKL008a etter fortynning i forskjellige fortynningsmidler og passasje/lagring i sprøyter som beskrevet i eksempel 1,6.

Figur 12. Oversikt over studie av nålstørrelse med fortynnet RANKL008a som beskrevet i eksempel 1,7.

Figur 13. Oversikt over ytterligere studie av nålstørrelse med fortynnet og ufortynnet RANKL008a som beskrevet i eksempel 1,7.

Figur. 14 Oversikt over resultatene oppnådd for termisk stabilitetstesting av IL6R304 (A, C, E) og IL6R305 (B, D, F) og som funksjon av NaCl-konsentrasjon (A, B), tilsatt mannitol (C, D) og buffer/eksipiens (E, F).

Figur 15. Oversikt over resultatene oppnådd i termisk stabilitetstesting av IL6R304 i Tris-buffer pH 7,2 eller histidin pH 6,5, med sukrose, glycin eller mannitol tilsatt som eksipiens.

Figur 16. Termogrammer (oppnådd etter subtrahering av baselinjene) av IL6R304 i bufferne som indikert i grafen.

Figur 17. PAMAS-analyse av IL6R304 formulert i PBS, sammenlignet med IL6R304 formulert i PBS + 0,01 % eller 0,02 % Tween 80. Tellingene av partiklene: >10 µm, >25 µm, >50 µm, >100 µm og >200 µm.

Figur 18. SE-HPLC for IL6R304-molekylet i nærværet av forskjellige konsentrasjoner av Tween 80.

Figur 19. (A)-(C): Loggverdier av den løselige IL-6R-nanolegemekonsentrasjonen (Y-aksen) mot PEG6000-konsentrasjonen (%) (X-aksen), sammen med de beregnede løselighetsverdiene. (D) representerer et eksempel på hvordan den lineære regresjonsanalysen utføres på de oppnådde datapunktene for å bestemme skjæringspunktet med X-aksen (hvorfra den teoretiske løseligheten ved null % PEG6000 kan avledes).

Figur 20. Overlegging av SE-HPLC-kromatogrammene av IL6R304 formulert ved 10 mg/ml lagret i 3 uker ved 37 °C. Innlegg, zoom på hovedtoppen for å demonstrere de bufferavhengige forskjellene i % aggregater.

Figur 21. Figuren viser de bufferavhengige forskjellene i % aggregater (toppareal i SE-HPLC) som ble observert i stabilitetsprøvene av IL6R304 og IL6R305 lagret i 1 uke ved 37 °C.

Figur 22. Figuren viser de bufferavhengige forskjellene i % aggregater (toppareal i SE-HPLC) som ble observert i stabilitetsprøvene av IL6R304 og IL6R305 lagret i 3 uker ved 37 °C.

Figur 23. Overlegg av RP-HPLC-kromatogrammene fra IL6R304 inkubert i 3 uker ved 37 °C i forskjellige formuleringsbuffer. En zoom på hovedtoppen er vist som innfelt. Legg merke til økningen av to mindre førtopper og en ettertopp i IL6R304-prøvene lagret i 3 uker.

Figur 24. Osmolalitätsdata fra IL6R304 (10 mg/ml) i de 12 forskjellige bufferne indikert i grafen. Den horisontale linjen definerer det isotoniske området.

Figur 25. Figuren viser den tidsavhengige økningen av % oligomerene/aggregatene (Y-aksen) observert i SE-HPLC-analysen av IL6R304 lagret i opptil 5 uker ved 37 °C (A) og 5 °C (B) i bufferne indikert i grafen. % oligomerene/aggregatene uttrykkes som summen av % toppoverflatearealene av førtopp1a, førtopp 1b og førtopp 2 i forhold til det totale toppflatearealet.

Figur 26. (A): % oligomerene (% toppareal) observert i histidinbufferne etter lagring i 3 uker ved 37 °C sammenlignet med den tilsvarende prøven i PBS-buffer.

(B): tidsavhengig og bufferavhengig økning i % oligomerene observert i IL-6R-stabilitetsprøvene lagret i opptil 5 uker ved 37 °C, ved en konsentrasjon på 10 mg/ml i bufferne indikert i grafen.

Figur 27. SE-HPLC-profil av IL6R304 i de forskjellige bufferne som vist i tabell 21. IL6R304 var mindre utsatt for oligomerisering i L-histidinbuffer sammenlignet med fosfatbuffer. (A) Mindre oligomerer, som ble sett på som førtopper under SE-HPLC-analysen, var til stede i IL6R304-prøver lagret i 8 uker ved 37 °C i L-histidinbuffer (bufferne 1-5) sammenlignet med fosfatbuffer (6-10 bufferne). Mengden av oligomerer var lavest i buffer 3. (B) Effekten av de forskjellige ekspiensene på oligomerisering i enten L-histidin versus fosfat. Legg merke til at overflatearealet av førtoppen var høyere i fosfat sammenlignet med L-histidin.

Figur 28. Kinetikk av oligomerdannelse ved lagring av IL6R304 i de forskjellige bufferne. Oligomeriseringen var betydelig tregere i L-histidin (bufferne 1-5) sammenlignet med fosfatbuffer (bufferne 6-10).

Figur 29. Overlegging av RP-HPLC-kromatogrammene fra IL6R304 etter lagring i inntil 8 uker ved + 37 °C i 10 forskjellige formuleringsbuffer. En zoom på hovedtoppen og sidetoppene er vist som innfelt.

Figur 30. Kinetikk av dannelsen for pyroglutamatvarianten av IL6R304 ved lagring under belastningsforhold i de forskjellige bufferne. Det dannes mindre pyroglutamat i L-histidin, sammenlignet med fosfatbuffer.

Figur 31. Aggregeringsindeksen før og etter omrøring av IL6R304.

Figur 32. Grafisk fremstilling av T_m -verdier for 23IL0064 som en funksjon av NaCl-konsentrasjon (A) og mannitolkonsentrasjon (B). T_m -er ble oppnådd i den termiske skiftanalysen ved 0,1 mg/ml.

5 **Figur 33.** Grafisk fremstilling av smeltetemperaturerne målt for 231L0075 som en funksjon av pH-en, i 10 mM acetat, i 10 mM histidin, og i 10 mM fosfatbuffer. Proteinkonsentrasjonen var 0,2 mg/ml. Skanningen ble utført ved 1 °C/min, med start på 30 °C.

Figur 34. SE-HPLC-kromatogrammer (OD280) av 23IL0064 i 40 mM histidin (pH 6,0)/50 mM NaCl. Startprøven ble sammenlignet med prøver etter konsentrasjon. Det ble ikke observert noen aggregatdannelse på grunn av konsentrasjonen av prøven i histidinbufferen. SE-HPLC ble kjørt med en Phenomenex BioSep SEC S-2000-kolonne, med D-PBS som mobilfase ved 0,2 ml/min.

15 **Figur 35.** Loggverdier av den løselige proteinkonsentrasjonen (Y-aksen) vs. PEG6000-konsentrasjonen (% , X-aksen). Det øvre høyre panelet viser et eksempel på hvordan den lineære regresjonsanalysen utføres på de oppnådde datapunktene for å bestemme skjæringspunktet med X-aksen (hvorfra den teoretiske løseligheten ved null % PEG6000 kan utledes). I histidinbufferen ble forsøket utført ved to konsentrasjoner som er presentert i de to nederste grafene. Ingen regresjon var mulig for disse to

20 grafene.
Figur 36. Loggverdier av den løselige proteinkonsentrasjonen (Y-aksen) av p23IL0064 og 231L0075 i 10 mM fosfatbuffer pH 7 med 50 mM NaCl vs. PEG6000-konsentrasjon (X-aksen). Ved regresjonsanalyse og ekstrapolering til en nullkonsentrasjon av PEG6000, ble de teoretiske maksimale proteinkonsentrasjonene (tilsynelatende løselighetsverdier) beregnet, og var for begge proteiner ca. 50 mg/ml. Dette nummeret skal bare anvendes etter bekreftelse med andre metoder.

Figur 37. Loggverdier av den løselige proteinkonsentrasjonen (Y-aksen) av p23IL0064 og p23IL0075 i 40 mM histidin pH 6,0-buffer med 50 mM NaCl- vs. PEG6000-konsentrasjon (X-aksen). I denne grafen var ikke regresjon mulig ettersom det ikke

30 skjedde noen utfelling i det utforskede PEG-vinduet.
Figur 38. SE-HPLC-kromatogrammer (280 nm) av 25 µg 23IL0064 ikke-belastet og 37 °C (3w og 4w)-belastede prøver i D-PBS. SE-HPLC ble kjørt på TSK-GEL G2000SWXL med D-PBS.

Figur 39. RP-HPLC-kromatogrammene (280 nm) av 25 µg 23IL0064 ikke-belastet og 37 °C (4w) - belastet prøve i D-PBS. RP-HPLC ble kjørt på Zorbax C-3-kolonne med en 0,1 % vann/acetonitril-TFA-gradient.

35 **Figur 40.** Grafisk fremstilling av % topparealet av de forskjellige RP-HPLC-toppene av 23IL0064 og produktrelaterte stoffer etter 6 ukers belastning ved 37 °C i forskjellige formuleringsbuffere. Den første stolpen representerer referanseprøven, lagret ved

-80 °C inntil analyse. Førtoppen 2 var til stede i startprøven og økte ikke under lagring ved 37 °C.

Figur 41. Overlegg av RP-HPLC-kromatogrammer (280 nm) av 23IL0064 i 20 mM histidin, pH 6,5 (kons. 22,4 mg/ml). Sammenligning av 6 uker ved 37 °C, 6 uker ved 25 °C, 6 uker ved 4 °C og -80 °C som referanse. RP-HPLC ble kjørt på Zorbax 300SB-C3-kolonne med en 0,1 % TFA-gradient med vann/acetonitril ved 0,3 %/min) ved 75 °C.

Figur 42. SDS-PAGE av stabilitetsprøver av 23IL0064 i 20 mM histidin pH 6,5 KONS. belastet i 6 uker ved 4 °C, 25 °C, 37 °C og dens -80 °C referanse.

Figur 43. Elastisk lysspredning som målt ved 500 nm som en funksjon av temperaturen for 23IL0075-prøver med forskjellige konsentrasjoner (som angitt i tegnforklaringene).

Figur 44. Elastisk lysspredning som målt ved 500 nm som en funksjon av temperaturen for 250 µg/ml 23IL0075 i 10 mM fosfat pH 6,0. Temperaturen av utbruddet av aggregatdannelsen bestemmes ved hjelp av lineær tilpasning.

Figur 45. Elastisk lysspredning som målt ved 500 nm som en funksjon av temperaturen for 250 µg/ml 23IL0075 i 10 mM acetat ved pH 6,0. Temperaturen ved utbruddet av aggregatdannelsen bestemmes ved hjelp av lineær tilpasning.

Figur 46. Elastisk lysspredning som målt ved 500 nm som en funksjon av temperaturen for 250 µg/ml 231L0075 i 10 mM histidin ved pH 6,0. Temperaturen ved utbruddet av aggregatdannelse bestemmes ved hjelp av lineær tilpasning.

Figur 47. Grafisk fremstilling av opalescensen (målt ved OD500) (A) og % oligomerer (% førtopp) detektert i SE-HPLC (B) etter fryse/tine-belastning. Prosentandelen av oligomerer i referanseprøven var omtrent 0,4 %. I denne studien ble en acetat-, histidin- og fosfatbuffer sammenlignet, i kombinasjon med mannitol eller en blanding av mannitol og glycin som eksipienser, og Tween 80 eller poloksamer i to forskjellige konsentrasjoner som surfaktanter.

Figur 48. Grafisk fremstilling av opalescensen (målt ved OD500) (A) og % oligomerer detektert i SE-HPLC (B) etter skjærbelastning. Prosentandelen av oligomerene i referanseprøven var omtrent 0,4 %. I denne studien ble en acetat-, histidin- og fosfatbuffer sammenlignet, i kombinasjon med mannitol eller en blanding av mannitol og glycin som eksipienser, og Tween 80 eller poloksamer i to forskjellige konsentrasjoner som surfaktanter.

Figur 49. Grafisk fremstilling av opalescensen (målt ved OD500) (A), og % oligomerer detektert i SE-HPLC (B) i forskjellige histidinbuffer etter fryse/tine-belastning. Prosentandelen av oligomerer i referanseprøven var omtrent 0,4 %. *For én prøve ble tilstanden uten vaskemiddel inkludert.

Figur 50. Grafisk fremstilling av opalescensen (målt ved OD500) (A), % oligomerene detektert i SE-HPLC (B), og % aktiviteten (albuminbinding) av nanolegemet målt på

Biacore (C) etter skjærbelastning. Prosentandelen oligomerer i referanseprøven var omtrent 0,4 %. I denne studien ble ingen vaskemidler inkludert, for å etterligne situasjonen under sluttkonsentrasjonstrinnet av DSP-prosessen.

Figur 51. SE-HPLC-kromatogrammene (280 nm) av 231L0075 ved 25 mg/ml i 10 mM histidin pH 6,0, 10 % sukrose, 0,005 % Tween 80: referanseprøven sammenlignet med 6 ukers lagring ved 25 °C og 37 °C.

DETALJERT BESKRIVELSE

[0046] Med mindre indikert eller definert på annen måte, har alle uttrykkene sin vanlige betydning på området, noe som vil være klart for fagmannen. Det er f.eks. foretatt referanse til standardhåndbøkene, så som Sambrook et al, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (2. utg.), bind 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); F. Ausubel et al, utg., "Current protocols in molecular biology", Green Publishing and Wiley Interscience, New York (1987); Lewin, "Genes II", John Wiley & Sons, New York, N.Y., (1985); Old et al., "Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering", 2. utgave, University of California Press, Berkeley, CA (1981); Roitt et al., "Immunology" (6. utg.), Mosby/Elsevier, Edinburgh (2001); Roitt et al., Roitt's Essential Immunology, 10. utg. Blackwell Publishing, UK (2001); og Janeway et al., "Immunobiology" (6. utg.), Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York (2005), så vel som den generelle bakgrunnen sitert i dette dokumentet.

[0047] Som anvendt i dette dokumentet refererer uttrykket "isolert" i forbindelse med et polypeptid til et polypeptid som i det vesentlige er fritt for cellulært materiale eller forurensende proteiner fra cellen eller vevskilden som det kan avledes fra, eller i det vesentlige fritt for kjemiske forløpere eller andre kjemikalier når det syntetiseres kjemisk. Språket "i det vesentlige fritt for cellemateriale" inkluderer preparater av et polypeptid der polypeptidet separeres fra cellulære komponenter av cellene som de isoleres eller produseres rekombinant fra. Dermed inkluderer et polypeptid som er vesentlig fritt for cellemateriale preparater av et polypeptid som har mindre enn rundt 30 %, 20 %, 10 % eller 5 % (i tørrvekt) av heterologt protein, polypeptid, peptid eller antistoff (også referert til som et "forurensende protein"). Når polypeptidet fremstilles rekombinant, kan det også være i det vesentlige fritt for dyrkningsmedium, dvs. at dyrkningsmediumet representerer mindre enn ca. 20 %, 10 %, eller 5 % av volumet av polypeptidpreparatet. Når polypeptidet produseres ved kjemisk syntese, er det fortrinnsvis i det vesentlige fritt for kjemiske forløpere eller andre kjemikalier, dvs. at det separeres fra kjemiske forløpere eller andre kjemikalier som er involvert i syntesen av polypeptidet. Følgelig har slike preparater av et polypeptid mindre enn rundt 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (i tørrvekt) av kjemiske forløpere eller andre forbindelser enn polypeptidet av interesse. I en spesifikk utførelsesform renses et "isolert" polypeptid

renset ved hjelp av en flertrinnsrenseprosess som omfatter to kromatografiske trinn (f.eks. kationebytte og anionbytte), et 100K ultrafiltreringstrinn, etterfulgt av en bufferutveksling og konsentrasjonstrinn i

5 **Ultrafiltrerings/diafiltrerings-modus.**

[0048] Som anvendt i dette dokumentet anvendes uttrykkene "individ" og "pasient" om hverandre. Som anvendt i dette dokumentet refererer uttrykkene "individ" og "individer" til et dyr, fortrinnsvis et pattedyr, inkludert et ikke-primat (f.eks. en ku, gris, hest, katt, hund, rotte og mus) og en primat (f.eks. en ape, så som en cynomolgus-ape, sjimpanse, bavian og et menneske), og mer foretrukket et menneske. I en bestemt utførelsesform er individet et pattedyr, fortrinnsvis et menneske, med én eller flere sykdommer eller forstyrrelser. I en annen utførelsesform er individet et pattedyr, fortrinnsvis et menneske, med risiko for å utvikle én eller flere sykdommer og/eller forstyrrelser.

15 **[0049]** Uttrykkene "stabilitet" og "stabil" som anvendt i dette dokumentet i sammenheng med en formulering omfattende et polypeptid omfattende én eller flere enkle variable domener refererer til motstanden av polypeptidet i formuleringen til aggregering, til dannelsen av nedbrytningsprodukter og/eller til dannelsen av fragmenteringsprodukter under gitte transport- og/eller lagringsforhold. Bortsett fra dette og/eller i tillegg beholder de "stabile" formuleringene ifølge oppfinnelsen biologisk aktivitet under gitte transport- og/eller lagringsforhold. Stabiliteten til polypeptidet kan vurderes ved grader av aggregering, nedbrytning og/eller fragmentering (som målt f.eks. ved SE-HPLC, RP-HPLC, IEX-HPLC, undersynlig partikkeltelling, analytisk ultrasentrifugering, dynamisk lysspredning, OD320/OD280-
25 forholds måling, elastisk lysspredning osv.), og/eller ved % av biologisk aktivitet (som målt f.eks. ved ELISA, Biacore osv.) sammenlignet med en referanseformulering. For eksempel kan en referanseformulering være en referansestandard frosset ved -20 °C eller under -65 °C (så som f.eks. - 80 °C) som består av det samme polypeptidet i samme konsentrasjon i D-PBS eller består av det samme polypeptidet ved den samme
30 konsentrasjonen og i den samme bufferen som de belastede prøvene, men uten påføring av belastningsforholdene, der referanseformuleringen regelmessig gir en enkelttopp med SE-HPLC, RP-HPLC og/eller IEX-HPLC og/eller beholder sin biologiske aktivitet i Biacore og/eller ELISA.

[0050] "Løselighet" beskrives ofte som den maksimale oppnåelige
35 proteinkonsentrasjonen der alt proteinet forblir i løsning. Ved denne konsentrasjonen bør proteinet fortsatt være monomerisk og fri for aggregater. For å bestemme proteinløseligheten er bare et begrenset antall (for det meste empiriske) metoder for tiden tilgjengelig. En første og populær metode består av å konsentrere prøven ved hjelp av sentrifugal ultrafiltrering inntil det punktet der det dannes en opaliserende

løsning. Deretter fjernes den uløselige fraksjonen og proteininnholdet i supernatanten måles. Sentrifugale konsentrerende enheter så som for eksempel Vivaspin-konsentratorer med en molekylvektterskel på 5 kDa kan anvendes, men krever rimelige mengder av protein. Løseligheten kan også overvåkes ved hjelp av en inert makromolekyl så som polyetylenglykol (PEG; $M_r > 6000$), som utfeller proteiner primært gjennom en utelatt volumeffekt, en prosess som generelt kan forstås i form av en enkel kolloidal faseseparasjon. En logaritmisk lineær sammenheng mellom proteinløseligheten og vektprosenten av polyetylenglykol kan oppnås, og fra dette plottet gir terskelen løselighetsverdien. Uttrykket "god løselighet" av polypeptidet ifølge oppfinnelsen, som anvendt i dette dokumentet, betyr at det observeres liten eller ingen utfelling av polypeptidet ifølge oppfinnelsen ved nedstrømsprosessering (DSP), og/eller under lagring for en kortere eller lengre tid ved 5 °C eller -20 °C ved konsentrasjoner i området fra 20-200 mg/ml eller mer. Dannelsen av bunnfall (oligomerer eller andre partikler) kan måles ved f.eks. SE-HPLC, OD320/OD280-forholdsmåling og/eller elastisk lysspredning. Fortrinnsvis har polypeptidene som er til stede i formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen en løselighet på minst 20 mg/ml, minst 30 mg/ml, minst 40 mg/ml, minst 50 mg/ml, minst 60 mg/ml, minst 65 mg/ml, minst 70 mg/ml, minst 80 mg/ml, minst 90 mg/ml, minst 100 mg/ml, minst 110 mg/ml, minst 120 mg/ml, minst 130 mg/ml, minst 140 mg/ml, minst 150 mg/ml, minst 200 mg/ml eller til og med mer. Fortrinnsvis er OD320/OD280-forholdet mellom formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen 0,05 eller lavere, så som 0,01 eller lavere, eller 0,005 eller lavere. Spredningen i formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen bør være innenfor deteksjonsgrensen og fortrinnsvis lavere enn 1000 abs, så som 750 abs eller lavere eller 500 abs eller lavere.

[0051] Uttrykket "lave til ikke-detekterbare nivåer av aggregering" som anvendt i dette dokumentet refererer til prøver som ikke inneholder mer enn 5 %, ikke mer enn 4 %, ikke mer enn 3 %, ikke mer enn 2 %, ikke mer enn 1 %, eller ikke mer enn 0,5 % aggregering ved vektprosent protein. Med mindre annet er uttrykkelig henvist til forskjellig, betyr aggregering som anvendt i den foreliggende oppfinnelsen utviklingen av høymolekylære vektaggregater, dvs. aggregater med en tilsynelatende molekylvekt på mer/høyere enn det tilsynelatende molekylvekt observert i SE-HPLC-analyse for dimerer av polypeptidet ifølge oppfinnelsen (så som f.eks. 44 kDa som observert for SEQ ID NO: 4; 36-38 kDa som observert for SEQ ID NO 1-3; og 36 kDa som observert for SEQ ID NO: 5 i SE-HPLC) i sammenligning med molekylvekt-markører. Aggregeringen kan vurderes ved hjelp av forskjellige fremgangsmåter kjent innen teknikken. Uten å være begrensende inkluderer eksempler høyytelsesstørrelses-utelukkende kromatografi (SE-HPLC), undersynlig partikkeltelling, analytisk ultrasentrifugering (AUC), dynamisk lysspredning (DLS), statisk lysspredning (SLS), elastisk lysspredning, OD320/OD280-måling, Fourier Transform-infrarød spektroskopi

(FTIR), sirkulærdikroisme (CD), ureainduserte proteinutfoldesmetoder, intrinsisk tryptofanfluorescens og/eller differensialskanningskalorimetrimetoder.

[0052] Uttrykket "lave til ikke-detekterbare nivåer av fragmentering og/eller nedbrytning" som anvendt i dette dokumentet refererer til prøver som inneholder likt eller mer enn 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % eller 99 % av det totale proteinet, for eksempel i en enkelt topp som bestemt av SE-HPLC, RP-HPLC og/eller IEX-HPLC, som representerer det ikke-nedbrutte polypeptidet, og som ikke inneholder noen andre enkle topper som har mer enn 5 %, mer enn 4 %, mer enn 3 %, mer enn 2 %, mer enn 1 %, eller mer enn 0,5 % av det totale proteinet i hver.

[0053] Uttrykket "meget lite til intet tap av biologisk aktivitet" som anvendt i dette dokumentet refererer til enkle variable domeneaktiviteter, inkludert, men ikke begrenset til, spesifikke bindingsevner av det enkle variable domenet til målet av interesse målt ved forskjellige immunologiske analyser, inkludert, men ikke begrenset til, ELISA-er og/eller ved overflateplasmonresonans (Biacore). I én utførelsesform beholder de enkle variable domenene til formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen minst 50 %, fortrinnsvis minst 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % eller 99 % eller mer av evnen til spesifikt å binde til et antigen sammenlignet med en referanseformulering, som målt ved en immunologisk analyse kjent for fagfolk på området eller beskrevet i dette dokumentet. For eksempel kan en ELISA-basert analyse (f.eks. som beskrevet i eksempeldelen) anvendes for å sammenligne evnen til det enkle variable domenet for spesifikt å binde til sitt mål. En "referanseformulering" som anvendt i dette dokumentet refererer til en formulering som fryses ved en temperatur på -20 ± 5 °C eller ved under -64 °C (så som f.eks. ved -80 °C) bestående av det samme enkle variable domenet ved den samme konsentrasjon i D-PBS, eller som består av de samme enkle variable domenene ved den samme konsentrasjonen i den samme bufferen/eksiplensene som de belastede prøvene, men uten påføring av belastningsforholdene, der referanseformuleringen regelmessig gir en enkelttopp av SE-HPLC, RP-HPLC og/eller IEX-HPLC og/eller beholder sin biologiske aktivitet i Biacore og/eller ELISA.

[0054] Uttrykket "farmasøytisk akseptabelt" som anvendt i dette dokumentet betyr godkjent av et tilsynsorgan for den føderale eller en statsregjering, eller oppført i den amerikanske farmakopé, europeiske farmakopé eller annen generelt anerkjent farmakopé for anvendelse i dyr, og nærmere bestemt i mennesker. I denne forstand bør det være forenlig med de andre bestanddelene i formuleringen og ikke fremskaffe en uakseptabel skadelig virkning på individet.

[0055] Ifølge den europeiske farmakopé anses en løsning isotonisk hvis den har en osmolalitet på 290 ± 30 mOsm/kg. Osmolalitetsmålingene ble derfor utført på de forskjellige formuleringene som anvendes i stabilitetsstudiene. Isotonisiteten kan måles ved for eksempel et damptrykk eller isfrysetypeosmometer.

[0056] Som anvendt i dette dokumentet refererer uttrykket "effektiv mengde" til mengden av et middel (f.eks. et profylaktisk eller terapeutisk middel) som er tilstrekkelig til å redusere og/eller forbedre alvorlighetsgraden og/eller varigheten av én eller flere sykdommer og/eller forstyrrelser.

5 **[0057]** Uttrykket "polyol" som anvendt i dette dokumentet refererer til sukker som inneholder mange hydroksylgrupper (-OH-grupper) i forhold til et normal sakkarid. Polyoler inkluderer alkoholer og karbohydrater så som mannitol, sorbitol, maltitol, xylitol, isomalt, erytritol, laktitol, sakkarose, glukose, galaktose, fruktose, fukose, ribose, laktose, maltose og cellubiose.

10 **[0058]** Som anvendt i dette dokumentet refererer uttrykkene "terapeutisk middel" og "terapeutiske midler" til hvilket som helst middel som kan anvendes ved forebyggelse, behandling og/eller styring av én eller flere sykdommer og/eller forstyrrelser. I sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen refererer uttrykket "terapeutisk middel" til et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener. I visse andre
15 utførelsesformer refererer uttrykket "terapeutisk middel" til et middel forskjellig fra polypeptidet ifølge oppfinnelsen som kan anvendes i formuleringen.

[0059] Som anvendt i dette dokumentet refererer uttrykket "terapeutisk effektiv mengde" refererer til mengden av et terapeutisk middel (f.eks. et polypeptid omfattende én eller flere enkle variable domener), som er tilstrekkelig til å redusere
20 alvorlighetsgraden av én eller flere sykdommer og/eller forstyrrelser.

[0060] Uttrykket "eksipiens" som anvendt i dette dokumentet refererer til et inert stoff som vanligvis anvendes som et fortynningsmiddel, en vehikkel, konserveringsmiddel, bindemiddel eller stabiliseringsmiddel for legemidler som bibringer en gunstig fysisk egenskap til en formulering, så som økt proteinstabilitet, økt proteinløselighet og/eller
25 redusert viskositet. Eksempler på hjelpestoffer eksipienser, men er ikke begrenset til, proteiner (f.eks. serumalbumin), aminosyrer (f.eks. asparaginsyre, glutaminsyre, lysin, arginin, glysin), surfaktanter (f.eks. SDS, Tween 20, Tween 80, poloksamerer, polysorbat og ikke-ioniske surfaktanter), sakkarider (f.eks. glukose, sukrose, maltose og trehalose), polyoler (f.eks. mannitol og sorbitol), fettsyrer og fosfolipider (f.eks.
30 alkylsulfonater og kaprylat). For ytterligere informasjon om eksipienser, se Remington's Pharmaceutical Sciences (fra Joseph P. Remington, 18. utg., Mack Publishing Co., Easton, PA), som innføres i dette dokumentet i sin helhet.

[0061] Uttrykket "variabelt domene" eller "immunglobulinvariabelt domene" refererer til delen eller domenet av et immunglobulinmolekyl eller antistoff som helt eller delvis
35 er ansvarlig for antigenbinding. Uttrykket "enkeltvariabelt domene" eller "immunglobulinenkeltvariabelt domene" (begge uttrykkene anvendes om hverandre i dette dokumentet), definerer molekyler, der det antigenbindingssetet er til stede på, og dannes av et enkelt immunoglobulindomene. Dette setter enkle variable domener, bortsett fra "konvensjonelle" immunglobuliner eller deres fragmenter, der to

immunoglobulindomener, spesielt to "variable domener" interagerer for å danne et antigenbindende sete. Vanligvis, i konvensjonelle immunoglobuliner, interagerer et tungkjedevariabelt domene (VH) og et lett kjedevariabelt domene (VL) for å danne et antigenbindende sete. I dette tilfellet vil de komplementaritetsbestemmende områdene (CDR-ene) av både VH og VL bidra til det antigenbindende setet, dvs. at totalt 6 CDR-er vil være involvert i antigenbindingssetedannelse.

[0062] I motsetning dannes bindingssetet for et enkelt variabelt domene av et enkelt VH- eller VL-domene. Derfor dannes antigenbindingssetet av et enkelt variabelt domene av ikke mer enn tre CDR-er. Uttrykket "enkelt variabelt domene" omfatter fragmenter av konvensjonelle immunoglobuliner, der antigenbindingssetet dannes av et enkelt variabelt domene

[0063] Generelt vil enkle variable domener være aminosyresekvenser som i det vesentlige består av 4 rammeverkkregioner (henholdsvis FR1 til FR4) og 3 komplementaritetsbestemmende regioner (henholdsvis CDR1 til CDR3); eller hvilket som helst passende fragment av en slik aminosyresekvens (som da vanligvis vil inneholde minst noen av aminosyrerestene som danner minst én av CDR-ene). Slike enkle variable domener og fragmenter er mest foretrukket slik at de omfatter en immunoglobulinbrett eller er i stand til å danne, under egnede forhold, en immunoglobulinbrett. Som sådan kan det enkle variable domenet for eksempel omfatte en lett kjedevariabel domenesekvens (f.eks. en V_L -sekvens) eller et egnet fragment av denne; eller en tungkjedevariabel domenesekvens (f.eks. en V_H -sekvens eller V_{HH} -sekvens) eller et egnet fragment av denne; så lenge det er i stand til å danne en enkelt antigenbindende enhet (dvs. en funksjonell antigenbindende enhet som i det vesentlige består av det enkle variable domenet, slik at det enkle antigenbindende domenet ikke behøver å interagere med et annet variabelt domene for å danne en funksjonell antigenbindende enhet, som for eksempel er tilfellet for de variable domenene som er til stede i for eksempel konvensjonelle antistoffer og scFv-fragmenter som har behov for å interagere med et annet variabelt domene - f.eks. gjennom en V_H/V_L -interaksjon - for å danne et funksjonelt antigenbindende domene).

[0064] I ett aspekt av oppfinnelsen er de enkelte variable domenene lett kjedevariable domenesekvenser (f.eks. en V_L -sekvens) eller tungkjedevariable domenesekvenser (f.eks. en V_H -sekvens); nærmere bestemt kan de enkelte variable domenene være tungkjedevariable domenesekvenser som avledes fra et konvensjonelt firekjedet antistoff eller tungkjedevariable domenesekvenser som avledes fra et tungkjedeantistoff.

[0065] Det enkle variable domenet kan være et domeneantistoff (eller en aminosyresekvens som er egnet for anvendelse som et domeneantistoff), et enkeltdomeneantistoff (eller en aminosyresekvens som er egnet for anvendelse som et enkeltdomeneantistoff) en "dAb" (eller en aminosyresekvens som er egnet for

anvendelse som et dAb) eller et Nanobody[®] (som definert i dette dokumentet, og inkludert, men ikke begrenset til, en V_{HH}-sekvens) [*Bemerk: Nanobody[®] og Nanobodies[®] er registrerte varemerker for Ablynx N.V.*]; andre enkle variable domener, eller hvilket som helst egnet fragment av hvilket som helst av disse. For en generell beskrivelse av (enkle) domeneantistoffer, vises det også til teknikkens stand nevnt i dette dokumentet, så vel som til EP 0 368 684. For uttrykket "dAb-er" foretas referanse for eksempel til Ward et al. 1989 (Nature 341 (6242): 544-546), til Holt et al. 2003 (Trends Biotechnol. 21(11): 484-490); så vel som til for eksempel WO 04/068820, WO 06/030220, WO 06/003388 og andre publiserte patentsøknader fra Domantis Ltd. Det bør også bemerkes at selv om det er mindre foretrukket i sammenheng med den foreliggende oppfinnelsen, fordi de ikke er av pattedyr-opprinnelse, kan enkle variable domener avledes fra visse arter av hai (for eksempel de såkalte "IgNAR-domenene", se for eksempel WO 05/18629).

[0066] Nærmere bestemt kan polypeptidene ifølge oppfinnelsen omfatte ett eller flere nanolegemer eller et egnet fragment av disse. For en nærmere beskrivelse av V_{HH}-er og nanolegemer, vises det til gjennomgangsartikkelen til Muyldermans 2001 (Reviews in Molecular Biotechnology 74: 277-302); så vel som de følgende patentsøknadene, som er nevnt som dagens generelle teknikk: WO 94/04678, WO 95/04079 og WO 96/34103 ved Vrije Universiteit Brussel; WO 94/25591, WO 99/37681, WO 00/40968, WO 00/43507, WO 00/65057, WO 01/40310, WO 01/44301, EP 1134 231 og WO 02/48193 av Unilever; WO 97/49805, WO 01/21817, WO 03/035694, WO 03/054016 og WO 03/055527 fra Vlaams institutt for bioteknologi (VIB); WO 03/050531 fra Algonomics N.V. og Ablynx N.V.; WO 01/90190 fra National Research Council of Canada; WO 03/025020 (= EP 1 433 793) fra instituttet for antistoffer; så vel som WO 04/041867, WO 04/041862, WO 04/041865, WO 04/041863, WO 04/062551, WO 05/044858, WO 06/40153, WO 06/079372, WO 06/122786, WO 06/122787 og WO 06/122825, av Ablynx N.V. og de ytterligere publiserte patentsøknadene ved Ablynx N.V. Referanse foretas også til teknikkens stand nevnt i disse søknadene, og nærmere bestemt til listen over referanser nevnt på sidene 41-43 i den internasjonale søknaden WO 06/040153, der listen og referansene er innført i dette dokumentet ved referanse. Som beskrevet i disse referansene kan særlig nanolegemer (særlig V_{HH}-sekvenser og delvis humaniserte nanolegemer) karakteriseres ved nærværet av en eller flere "Hall-rester" i én eller flere av rammesekvensene. En ytterligere beskrivelse av nanolegemene, inkludert humanisering og/eller kamelisering (eng.: camelization) av nanolegemer, så vel som andre modifikasjoner, deler eller fragmenter, derivater eller "nanolegemefusjoner", flerverdige konstruksjoner (inkludert noen ikke-begrensede eksempler på linkersekvenser), og forskjellige modifikasjoner for å øke halveringstiden for nanolegemene og deres preparat kan finnes i f.eks. WO 08/101985 og WO 08/142164.

[0067] Det totale antallet aminosyrerester i et nanolegeme kan være i området fra 110-120, er fortrinnsvis 112-115, og mest foretrukket 113. Det skal imidlertid bemerkes at deler, fragmenter, analoger eller derivater (som ytterligere beskrevet i dette dokumentet) av et nanolegeme ikke er spesielt begrenset med hensyn til deres
 5 lengde og/eller størrelse, så lenge slike deler, fragmenter, analoger eller derivater oppfyller de ytterligere kravene som er skissert i dette dokumentet, og også fortrinnsvis er egnet for formålene beskrevet i dette dokumentet.

[0068] I betydning av den foreliggende oppfinnelsen omfatter uttrykket "enkelt variabelt domene" dermed polypeptider som avledes fra en ikke-human kilde,
 10 fortrinnsvis et kamelid, fortrinnsvis et kamelidtungkjedeantistoff. De kan humaniseres, som tidligere beskrevet. Videre omfatter uttrykket polypeptider avledet fra ikke-kamelidkilder, f.eks. mus eller menneske, som er blitt "kamelisert", som tidligere beskrevet.

[0069] Uttrykket "enkelt variabelt domene" omfatter også variable domener av
 15 forskjellig opprinnelse, omfattende mus-, rotte-, kanin-, esel-, menneske- og kamelidvariable domener; så vel som fullstendig humane, humaniserte eller kimære variable domener. For eksempel omfatter oppfinnelsen kamelidvariable domener og humaniserte kamelidvariable domener, eller kameliserte variable domener, f.eks. kamelisert dAb som beskrevet av Ward et al (se for eksempel WO 94/04678 og Davies
 20 and Riechmann (1994, FEBS Lett. 339(3): 285-290) og (1996, Protein Eng,9(6): 531-537)). Videre omfatter oppfinnelsen fuserte variable domener, f.eks. flerverdige og/eller multispesifikke konstrukter (for multivalente og multispesifikke polypeptider inneholdende ett eller flere V_{HH} -domener, og deres fremstilling, det vises dessuten til Conrath et al. 2001 (J. Biol. Chem. 276: 7346-7350) så vel som til for eksempel
 25 WO 96/34103 og WO 99/23221).

[0070] Med mindre annet er angitt, refererer uttrykket "immunglobulinsekvens" -om det anvendes i dette dokumentet for å referere til et tungkjedeantistoff eller et konvensjonelt 4-kjedet antistoff - anvendes som et generelt uttrykk for å inkludere både fullstørrelsesantistoffet, de enkle kjedene av det, så vel som alle deler, domener eller
 30 fragmenter av det (inkludert, men ikke begrenset til antigenbindende domener eller fragmenter så som henholdsvis V_{HH} -domener eller V_H/V_L -domener). Uttrykkene antigenbindende molekyler eller antigenbindende protein anvendes om hverandre med immunglobulinsekvens, og inkluderer nanolegemer.

[0071] De enkle variable domenene tilveiebragt av oppfinnelsen er fortrinnsvis i det vesentlige isolert form (som definert i dette dokumentet), eller utgjør en del av et polypeptid ifølge oppfinnelsen (som definert i dette dokumentet), som kan omfatte eller
 35 i det vesentlige bestå av ett eller flere enkle variable domener og som eventuelt kan omfatte ytterligere én eller flere ytterligere aminosyresekvenser (alle eventuelt bundet via én eller flere egnede linkere). For eksempel, og uten begrensning, kan det ene eller

de flere enkle variable domenene anvendes som en bindingsenhet i et slikt polypeptid, som eventuelt kan inneholde ett eller flere ytterligere aminosyresekvenser som kan tjene som en bindingsenhet (dvs. mot ett eller flere andre mål), for derved å tilveiebringe et enverdig, flerverdig eller flerspesifikt polypeptid ifølge oppfinnelsen, henholdsvis som f.eks. beskrevet i WO 08/101985, WO 08/142164, WO 09/068625, WO 09/068627 og WO 08/020079. Et slikt protein eller polypeptid kan også være i det vesentlige isolert form (som definert i dette dokumentet) og fremgangsmåtene ifølge den foreliggende oppfinnelsen for uttrykkingen og/eller produksjonen av enkle variable domener gjelder på samme måte polypeptider omfattende ett eller flere enkle variable domener.

[0072] Ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan uttrykket "enkelt variabelt domene" omfatte konstrukter omfattende to eller flere antigenbindende enheter i form av et enkelt variabelt domene, som beskrevet ovenfor. For eksempel kan to (eller flere) variable domener med samme eller forskjellig antigenspesifisitet kobles for å danne f.eks. en toverdig, treverdig eller flerverdig konstruksjon. Ved å kombinere variable domener av to eller flere spesifisiteter, kan det dannes bispesifikke, trispesifikke osv. konstruksjoner. For eksempel kan et variabelt domene ifølge oppfinnelsen omfatte to variable domener rettet mot mål A, og ett variabelt domene mot målet B. Slike konstruksjoner og modifikasjoner av disse, som fagmannen lett kan tenke seg, er alle omfattet av uttrykket variabelt domene som anvendt i dette dokumentet, og er også referert til som "*polypeptid ifølge oppfinnelsen*" eller "*polypeptider ifølge oppfinnelsen*".

[0073] Som beskrevet i punkt m) på side 53 i WO 08/020079, hevdes en aminosyresekvens (så som et nanolegame, et antistoff, et polypeptid ifølge oppfinnelsen, eller generelt et antigenbindende protein eller polypeptid eller et fragment av disse) som kan (spesifikt) binde til, som har affinitet for og/eller som har spesifisitet for en bestemt antigen-determinant, epitop, antigen eller protein (eller for minst en del, fragment eller epitop av disse) å være "*mot*" eller "*rettet mot*" den antigeniske determinanten, epitopen, antigenet eller proteinet.

[0074] Polypeptidet omfattende én eller flere enkle variable domener for anvendelse i formuleringen ifølge oppfinnelsen kan være terapeutisk eller profylaktisk, og kan være nyttig ved behandling og/eller håndtering av én eller flere sykdommer. I et bestemt aspekt har polypeptidet minst to enkle variable domener. I et annet spesifikt aspekt har polypeptidet minst tre enkle variable domener. Fortrinnsvis omfatter polypeptidet minst ett enkelt variabelt domene rettet mot HSA. I et annet spesifikt aspekt omfatter polypeptidet minst et enkelt variabelt domene mot RANKL. I et annet spesifikt aspekt omfatter polypeptidet minst et enkelt variabelt domene mot IL-6R. I et annet spesifikt aspekt omfatter polypeptidet minst et enkelt variabelt domene mot IL-23. Mer foretrukket rettes polypeptidet mot og/eller binder spesifikt RANKL og HSA, IL-6R og

HSA og/eller IL-23 og HSA. I enda et annet aspekt omfatter polypeptidet minst et enkelt variabelt domene mot RANKL og minst ett enkelt variabelt domene mot HSA. I enda et annet aspekt, omfatter polypeptidet minst et enkelt variabelt domene mot IL-6R og minst ett enkelt variabelt domene mot HSA. I nok et annet aspekt omfatter

5 polypeptidet minst et enkelt variabelt domene mot IL-23 og minst ett enkelt variabelt domene mot HSA. I nok et annet aspekt, omfatter polypeptidet minst to enkle variable domener mot RANKL og minst ett enkelt variabelt domene mot HSA. I nok et annet aspekt omfatter polypeptidet minst to enkle variable domener mot IL-6R og minst ett enkelt variabelt domene mot HSA. I nok et annet aspekt omfatter polypeptidet minst to

10 enkle variable domener mot IL-23, og minst et enkelt variabelt domene mot HSA. Polypeptidene ifølge oppfinnelsen velges fra SEQ ID NO: 1 til 6.

[0075] Konsentrasjonen av polypeptidet ifølge oppfinnelsen til stede i formuleringen er fra 1 til 200 mg/ml, så som rundt 1 mg/ml, rundt 2 mg/ml, rundt 5 mg/ml, rundt 10 mg/ml, rundt 15 mg/ml eller rundt 20 mg/ml, rundt 30 mg/ml, rundt 40 mg/ml,

15 rundt 50 mg/ml, rundt 60 mg/ml, rundt 65 mg/ml, rundt 70 mg/ml, rundt 80 mg/ml, rundt 90 mg/ml eller rundt 100 mg/ml eller mer. I visse utførelsesformer kan konsentrasjonen av polypeptidet ifølge oppfinnelsen være 110 mg/ml eller mer, 120 mg/ml eller mer, 130 mg/ml eller mer, 140 mg/ml eller mer, 150 mg/ml eller mer, eller til og med 200 mg/ml eller mer. I et spesifikt aspekt omfatter en formulering

20 ifølge oppfinnelsen rundt 10 mg/ml av polypeptidet ifølge oppfinnelsen.

[0076] Formuleringen ifølge oppfinnelsen omfatter en vandig bærer som har en pH på 5,5 til 8,0 og et polypeptid som definert ovenfor ("*polypeptid ifølge oppfinnelsen*") omfattende ett eller flere enkle variable domener i en konsentrasjon på 1 mg/ml til 200 mg/ml, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, der

25 formuleringen ytterligere omfatter:

a) En buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM valgt fra histidin pH 6,0 til 6,5; og idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere.

[0077] De stabile formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter

30 polypeptider ifølge oppfinnelsen som har en god løselighet og en høy stabilitet selv under transport og/eller lange lagringsperioder, og som oppviser liten eller ingen aggregering. I tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen minst én vandig bærer og en buffer. Bæreren som anvendes i formuleringen ifølge oppfinnelsen bør være en flytende bærer. Fortrinnsvis

35 er bæreren en vandig bærer så som f.eks. destillert vann, MilliQ-vann eller vann for injeksjon (WFI).

[0078] Formuleringen bør ikke inneholde uorganisk salt ved en konsentrasjon på mer enn 150 mM. Uten å være begrenset kan uorganiske salter for anvendelse i formuleringen ifølge oppfinnelsen velges fra NaCl og KCl. Følgelig har formuleringen

ifølge oppfinnelsen en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere, fortrinnsvis 120 mM eller lavere, eller 100 mM eller lavere, mer foretrukket 90 mM eller lavere, 80 mM eller lavere, 75 mM eller lavere, så som 50 mM eller lavere, eller til og med 40 mM eller lavere, 25 mM eller lavere, 10 mM eller lavere, eller 5 mM eller lavere. Mest foretrukket inneholder ikke formuleringen noe uorganisk salt.

[0079] pH-en i formuleringen ifølge oppfinnelsen bør generelt ikke være lik det isoelektriske punktet for det bestemte polypeptidet ifølge oppfinnelsen til stede i formuleringen og kan variere fra 5,5 til rundt 8,0, eller fra rundt 6,0 til rundt 7,5, fortrinnsvis fra rundt 6,2 til 7,5, fra rundt 6,5 til 7,5, mest foretrukket fra rundt 6,5 til 7,0. I et bestemt aspekt har formuleringen ifølge oppfinnelsen en pH på rundt 6,5. I et annet spesifikt aspekt har formuleringen ifølge oppfinnelsen en pH på rundt 7,0. I nok et annet spesifikt aspekt har formuleringen ifølge oppfinnelsen en pH på rundt 6,0.

[0080] Formuleringen bufres ved en buffer valgt fra gruppen bestående av histidin pH 6,0 til 6,5.

[0081] Konsentrasjonen av bufferen til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen kan være i området fra 10 mM til 100 mM, 10 mM til 50 mM, 10 mM til 25 mM, 10 mM til 20 mM. I et bestemt aspekt er konsentrasjonen av bufferen i formuleringene ifølge oppfinnelsen 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM eller 100 mM. Fortrinnsvis er konsentrasjonen mellom 10 og 20 mM, så som 10 mM eller 15 mM.

[0082] Enhver form for histidin egnet for formulering og parenteral administrering kan anvendes i formuleringen ifølge oppfinnelsen. Renheten av histidin bør være minst 98 %, minst 99 %, eller minst 99,5 %. I et bestemt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 15 mM histidinbuffer, pH 6,5. I et annet spesifikt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 10 mM histidin, pH 6,0.

[0083] I tillegg til histidin kan hepesbufferer med pH 7,0 anvendes i formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Enhver form for hepes egnet for formulering og parenteral administrering kan anvendes i formuleringen ifølge oppfinnelsen. Renheten av hepes bør være minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 %. I et bestemt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 15 mM hepesbuffer pH 7,0.

[0084] Det vil forstås av en fagmann på området at formuleringen ifølge oppfinnelsen kan være isotonisk eller svakt hypotonisk med menneskeblod, dvs. at formuleringen ifølge oppfinnelsen har i det vesentlige det samme eller et litt lavere osmotisk trykk som humant blod. En slik isotonisk eller svakt hypotonisk formulering har generelt et osmotisk trykk fra rundt 240 mOsm/kg til rundt 320 mOsm/kg, så som rundt 240 mOsm/kg eller høyere, 250 mOsm/kg eller høyere, eller 260 mOsm/kg eller høyere.

[0085] Tonisiteten av en formulering justeres ved anvendelsen av tonisitetsmodifiserende midler. "Tonisitetsmodifiseringsmidler" er de farmasøytisk akseptable, inerte stoffene som kan tilsettes til formuleringen for å tilveiebringe en isotonisitet til

formuleringen. Et foretrukket tonisitetsmodifiseringsmiddel i formuleringen ifølge oppfinnelsen er eksipienser. Foretrukne eksipienser for anvendelse i formuleringen ifølge oppfinnelsen kan velges fra sukkere, polyoler og surfaktanter.

[0086] Følgelig, i et annet aspekt, omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en eksipiens. Foretrukne eksipienser inkluderer polyoler og/eller sukker. Polyolen og/eller sukker kan være et monosakkarid så som glukose eller mannose, eller et polysakkarid, inkludert disakkarider så som (uten å være begrensende) sukrose og laktose, så vel som sukkerderivater inkludert sukkeralkoholer og sukkersyrer. Polyoler og sukkeralkoholer inkluderer (uten å være begrensende) mannitol, xylitol, erytritol, treitol, sorbitol og glyserol. Et ikke-begrensende eksempel på en sukkersyre er L-glukonat. Andre eksempler på sukker inkluderer (uten å være begrensende) trehalose, glysin, maltose, raffinose osv. Konsentrasjonen av eksipiensen kan være i området fra rundt 1 til 10 % (vekt:volum), fortrinnsvis fra rundt 2,5 til 10 % (vekt:volum), mer foretrukket fra rundt 5 til 10 % (vekt:volum), så som f.eks. 5 % (vekt:volum), 7,5 % (vekt:volum), 8 eller 10 % (vekt: volum). Gjennom den foreliggende oppfinnelsen vil konsentrasjonen av eksipiensen bli gitt som % (vekt:volum). I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen sukrose, fortrinnsvis ved en konsentrasjon på rundt 5 til 10 % (vekt:volum), så som rundt 8 % (vekt:volum).

[0087] I et annet aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en surfaktant. En surfaktant refererer til et overflateaktivt middel omfattende en hydrofob del og en hydrofil del. I et foretrukket aspekt er surfaktanten ikke-ionisk. Visse eksempler på ikke-ioniske surfaktanter inkluderer (uten å være begrensende) PEG8000, og polysorbat, inkludert, uten å være begrensende, polysorbat 80 (Tween 80) og polysorbat 20 (Tween 20), Triton X-100, polyoksypropylen-polyoksyetylenestere (Pluronic[®]), og NP-40. I et bestemt aspekt velges surfaktanten fra Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer. Konsentrasjonen av surfaktanten kan ligge fra rundt 0,001- til 1 volum-% (fortrinnsvis fra rundt 0,001- til 0,1 volum-%, eller 0,01- til 0,1 volum-% så som 0,001 volum-%, 0,005 volum-%, 0,01 volum-%, 0,02 volum-%, 0,05 volum-%, 0,08 volum-%, 0,1 volum-%, 0,5 volum-% eller 1 volum-% av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 volum-%. Gjennom den foreliggende oppfinnelsen vil konsentrasjonen av surfaktanten bli gitt som volum-%. I en spesifikk utførelsesform er surfaktanten Tween 20 eller Tween 80, som er ved en konsentrasjon på 0,001 volum-%, 0,005 volum-%, 0,01 volum-%, 0,02 volum-%, 0,05 volum-%, 0,08 volum-%, 0,1 volum-%, 0,5 volum-% eller 1 volum-% av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 volum-%.

[0088] I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0 og et polypeptid som definert ovenfor ("*polypeptid ifølge oppfinnelsen*") omfattende ett eller flere enkle variable domener i en konsentrasjon på 1 mg/ml til 200 mg/ml, idet formuleringen formuleres

for administrering til et menneske, og formuleringen omfatter ytterligere minst to komponenter valgt fra:

- a) En buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM valgt fra gruppen bestående av histidin pH 6,0 til 6,5, hepes pH 7,0-8,0, MES pH 6,0, suksinat pH 6,0-6,5 og acetat pH 5,5-6,0;
 - b) En eksipiens ved en konsentrasjon på 1 til 20 %;
 - c) En surfaktant ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % valgt fra Tween 80, Tween 20 eller poloksamerer;
- der formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere.

[0089] I ett aspekt, i tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen omfatter formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen minst en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0, en buffer valgt fra histidin pH 6,0-6,5, og en eksipiens. Mest foretrukket er bufferen histidin pH 6,5 eller histidin pH 6,0. Bufferen har fortrinnsvis en konsentrasjon i området fra 10 til 50 mM, 10 til 25 mM, 10 til 20 mM. I et bestemt aspekt er konsentrasjonen av bufferen i formuleringene ifølge oppfinnelsen 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM eller 100 mM. I et foretrukket aspekt, er konsentrasjonen mellom 10 og 20 mM, så som 10 mM eller 15 mM. I et bestemt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 15 mM histidin pH 6,5. I et annet spesifikt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0. Foretrukne eksipienser er polyoler så som mannitol, sorbitol osv., sakkarider så som f.eks. sukrose, mannose, trehalose osv. Konsentrasjonen av eksipiensen kan være i området fra rundt 1 til 20 %, fortrinnsvis fra rundt 2,5 til 15 %, mer foretrukket fra rundt 5 til 10 %, så som f.eks. 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen sukrose, foretrukket ved en konsentrasjon på rundt 5 % til 10 %, så som rundt 8 %, eller rundt 10 %. Følgelig kan en foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen omfatte 15 mM histidin pH 6,5 og 8 % sukrose. En annen foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte 10 mM histidin ved pH 6,0 og 10 % sukrose.

[0090] I et annet aspekt, i tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen, kan formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatte minst en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0, en buffer valgt fra histidin ved pH 6,0-6,5, og en surfaktant. Mest foretrukket er bufferen er histidin pH 6,5 eller histidin pH 6,0. Bufferen har fortrinnsvis en konsentrasjon i området fra 10 til 50 mM, 10 til 25 mM, 10 til 20 mM. I et bestemt aspekt er konsentrasjonen av bufferen i formuleringen ifølge oppfinnelsen 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM eller 100 mM. I et foretrukket aspekt er konsentrasjonen mellom 10 og 20 mM, så som 10 mM eller 15 mM. I et bestemt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 15 mM histidin ved pH 6,5. I et annet spesifikt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 10 mM

histidinbuffer ved pH 6,0. Surfactanten kan velges fra Tween 20, Tween 80 eller poloksamerer. Konsentrasjonen av surfaktanten kan ligge i området fra 0,001 % til 1 % (fortrinnsvis fra rundt 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 0,1 %, så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, 5 fortrinnsvis 0,01 %). I en spesifikk utførelsesform er surfaktanten Tween 20 eller Tween 80, som er ved en konsentrasjon på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, så som f.eks. 0,01 % Tween 80 eller 0,005 % Tween 80. Følgelig kan en foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen omfatte 15 mM histidin ved pH 6,5, og 0,01 % Tween 80. En annen foretrukket 10 formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte 10 mM histidin ved pH 6,0 og 0,005 % Tween 80.

[0091] I nok et annet aspekt, i tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen, kan formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatte minst en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0, en eksipiens og en surfaktant. Foretrukne eksipienser er 15 polyoler så som mannitol, sorbitol osv. sakkarider så som f.eks. sukrose, mannose, trehalose osv. Konsentrasjonen av eksipiensen kan være i området fra rundt 1 til 20 %, fortrinnsvis fra rundt 2,5 til 15 %, mer foretrukket fra rundt 5 til 10 %, så som f.eks. 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen sukrose, fortrinnsvis ved en konsentrasjon på rundt 5 til 10 %, så som rundt 8 eller 10 %.

20 Surfactanten kan velges fra Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer. Konsentrasjonen av surfaktanten kan ligge i området fra 0,001 % til 1 % (fortrinnsvis fra rundt 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 10,1 %, så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 %). I en spesifikk utførelsesform er surfaktanten Tween 20 eller Tween 80, som er ved en konsentrasjon 25 på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, så som f.eks. 0,01 % Tween 80 eller 0,005 % Tween 80. Følgelig kan en foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen omfatte 8 % sukrose og 0,01 % Tween 80. En annen foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen kan omfatte 10 % sakkarose og 0,005 % Tween 80.

30 **[0092]** Følgelig kan en formulering ifølge oppfinnelsen, i tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen, omfatte for eksempel:

a) En buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5, histidinbuffer ved pH 6,0 og hepesbuffer ved pH 7,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og
b) En eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 35 1 til 20 % eller

a) En buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5, histidinbuffer ved pH 6,0 og hepesbuffer ved pH 7,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og
c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller

5 a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5, og hepesbuffer ved pH 7,0 ved en konsentrasjon på 15 mM; og

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 % eller

10 a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5 og hepesbuffer ved pH 7,0 ved en konsentrasjon på 15 mM; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5 og hepesbuffer ved pH 7,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og

15 b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 8 % eller

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 8 %; og

20 c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5 og hepesbuffer ved pH 7,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,01 % eller

25 b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,01 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM; og

30 b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller

35 a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 10 % eller

- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 10 %; og
- c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller
- 5 a) en buffer valgt fra en histidinbuffer pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og
- c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,005 % eller
- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1
- 10 til 20 %; og
- c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,005 % eller
- a) histidinbuffer ved pH 6,5 eller pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM; og
- b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 20 % eller
- 15 a) histidinbuffer ved pH 6,5 eller pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM; og
- c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller
- b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
- c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller
- 20 a) 15 mM histidinbuffer ved pH 6,5; og
- b) 8 % sukrose eller
- a) 15 mM histidinbuffer ved pH 6,5; og
- c) 0,01 % Tween 80 eller
- b) 8 % sukrose; og
- 25 c) 0,01 % Tween 80 eller
- a) 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0; og
- b) 10 % sukrose eller
- a) 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0; og
- c) 0,005 % Tween 80 eller
- 30 b) 10 % sukrose; og
- c) 0,005 % Tween 80.

[0093] Formuleringen ifølge oppfinnelsen omfatter et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6. Følgelig kan formuleringen ifølge oppfinnelsen omfatte:

- 35 a) 15 mM histidinbuffer pH 6,5;
- b) 8 % sukrose; og
- d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 10 mg/ml) eller
- a) 15 mM histidinbuffer ved pH 6,5;

c) 0,01 % Tween 80; og

d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 10 mg/ml) eller

b) 8 % sukrose;

5 c) 0,01 % Tween 80; og

d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 10 mg/ml) eller

a) 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0;

b) 10 % sukrose; og

10 c) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 10 mg/ml) eller

a) 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0;

c) 0,005 % Tween 80; og

d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 15 10 mg/ml) eller

b) 10 % sukrose;

c) 0,005 % Tween 80; og

d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 20 10 mg/ml).

[0094] Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatter en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0 og et polypeptid som definert ovenfor ("*polypeptid ifølge oppfinnelsen*") omfattende ett eller flere enkle variable domener i en konsentrasjon på 1 mg/ml til 200 mg/ml, idet formuleringen formuleres for administrering til et 25 menneske, og omfatter komponentene valgt fra:

a) en buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM valgt fra histidin ved pH 6,0-6,5 idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere.

[0095] Følgelig, i tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen, kan formuleringene 30 ifølge den foreliggende oppfinnelsen omfatte minst en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0, en buffer valgt fra gruppen bestående av histidin pH 6,0-6,5, en eksipiens og en surfaktant. Mest foretrukket er bufferen histidin ved pH 6,5 eller histidin ved pH 6,0. Bufferen har fortrinnsvis en konsentrasjon i området fra 10 mM til 50 mM, 10 mM til 25 mM, 10 mM til 20 mM. I et bestemt aspekt er konsentrasjonen av bufferen i 35 formuleringene ifølge oppfinnelsen 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 50 mM, 75 mM eller 100 mM. I et foretrukket aspekt er konsentrasjonen mellom 10 og 20 mM, så som 10 mM eller 15 mM. I et bestemt aspekt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 15 mM histidin ved pH 6,5. I et annet spesifikt omfatter en formulering ifølge oppfinnelsen 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0. Foretrukne eksipienser er polyoler så

som mannitol, sorbitol osv., sakkarider så som f.eks. sukrose, mannose, trehalose osv. Konsentrasjonen av eksipiensen kan være i området fra rundt 1 til 20 %, fortrinnsvis fra rundt 2,5 til 15 %, mer foretrukket fra rundt 5 til 10 %, så som f.eks. 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen sukrose, fortrinnsvis ved

5 en konsentrasjon på rundt 5 til 10 %, så som rundt 8 eller 10 %. Surfaktanten kan velges fra Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer. Konsentrasjonen av surfaktanten kan ligge i området fra rundt 0,001 % til 1 % (fortrinnsvis fra rundt 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 0,1 % så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 eller 0,005 %). I en

10 spesifikk utførelsesform er surfaktanten Tween 20 eller Tween 80, som er ved en konsentrasjon på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, så som f.eks. 0,01 % Tween 80 eller 0,005 % Tween 80. Følgelig kan en foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen omfatte 15 mM histidin ved pH 6,5, 8 % sukrose og 0,01 % Tween 80. En annen foretrukket formulering ifølge

15 oppfinnelsen kan omfatte 10 mM histidin ved pH 6,0, 10 % sukrose og 0,005 % Tween 80.

[0096] Følgelig kan en formulering ifølge oppfinnelsen, i tillegg til polypeptidet ifølge oppfinnelsen, omfatte for eksempel:

- 20 a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,5, en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;
- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
- c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en
- 25 konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller
- a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 15 mM;
- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol ved en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
- c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en
- 30 konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller
- a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;
- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 8 %; og
- c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en
- 35 konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller
- a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;
- b) en eksipens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,01 % eller

a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 15 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 8 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller

a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 8 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,01 % eller

a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 15 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,01 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 10 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poioxamer ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,005 % eller

a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM;

b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 10 %; og

c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller

- a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;
- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 10 %; og
- 5 c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,005 % eller
- a) en buffer valgt fra en histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 15 mM;
- b) en eksipiens valgt fra sukrose, sorbitol, trehalose og mannitol i en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
- 10 c) en surfaktant valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer ved en konsentrasjon på 0,005 % eller
- a) histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;
- b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
- c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 til 1 % eller
- 15 a) 15 mM histidinbuffer ved pH 6,5;
- b) 8 % sukrose; og
- c) 0,01 % Tween 80 eller
- a) histidinbuffer ved pH 6,0 ved en konsentrasjon på 10 mM til 100 mM;
- b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
- 20 c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % eller
- a) 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0;
- b) 10 % sukrose; og
- c) 0,005 % Tween 80.
- 25 **[0097]** Formuleringen ifølge oppfinnelsen omfatter et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6. Følgelig kan formuleringen ifølge oppfinnelsen omfatte:
- a) 15 mM histidinbuffer ved pH 6,5;
- b) 8 % sukrose;
- c) 0,01 % Tween 80; og
- 30 d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 10 mg/ml) eller
- a) 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0;
- b) 10 % sukrose;
- c) 0,005 % Tween 80; og
- 35 d) et polypeptid valgt fra SEQ ID NO: 1 til 6 (f.eks. ved en konsentrasjon på 10 mg/ml).

[0098] Komponentene som er til stede i formuleringene ifølge oppfinnelsen er blitt valgt slik at polypeptidene ifølge oppfinnelsen har en god løselighet (som definert tidligere). Fortrinnsvis har polypeptidene som er til stede i formuleringene ifølge den

foreliggende oppfinnelsen en løselighet på minst 0,7 mM, minst 0,8 mM, minst 0,9 mM, minst 1,0 mM, minst 1,1 mM, minst 1,2 mM, minst 1,3 mM, minst 1,4 mM, minst 1,5 mM, minst 1,6 mM, minst 1,7 mM, minst 1,8 mM, minst 1,9 mM, minst 2,0 mM, minst 2,1 mM, minst 2,2 mM, minst 2,3 mM, minst 2,4 mM, minst 2,5 mM, minst 2,6 mM, minst 2,7 mM, minst 2,8 mM, minst 2,9 mM, minst 3,0 mM, minst 3,2 mM, minst 3,4 mM, minst 3,6 mM eller mer og/eller minst 20 mg/ml, minst 30 mg/ml, minst 40 mg/ml, minst 50 mg/ml, minst 60 mg/ml, minst 65 mg/ml, minst 70 mg/ml, minst 80 mg/ml, minst 90 mg/ml, minst 100 mg/ml, minst 110 mg/ml, minst 120 mg/ml, minst 130 mg/ml, minst 140 mg/ml, minst 150 mg/ml eller til og med 200 mg/ml eller mer som bestemt ved PEG-utelukkelsesmetoden eller ved sentrifugal ultrafiltrering. En meget god løselighet av polypeptidene ifølge oppfinnelsen er blitt oppnådd med en formulering omfattende en histidinbuffer ved pH 6,5, eller med en formulering omfattende Tween 80. Følgelig vedrører den foreliggende oppfinnelsen en formulering som angitt omfattende en vandig bærer og et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, der formuleringen ytterligere omfatter minst én av:

a) en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 mM til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM);

c) Tween 80 i en konsentrasjon på 0,001 til 1 % (fortrinnsvis fra rundt 0,001 til 0,1 % eller 0,01 til 0,1 %, så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 %);

idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der løseligheten av polypeptidet er minst 20 mg/ml, minst 50 mg/ml, fortrinnsvis minst 90 mg/ml, minst 120 mg/ml, minst 150 mg/ml eller til og med 200 mg/ml eller mer som bestemt ved PEG-utelukkelsesmetoden eller ved sentrifugal ultrafiltrering. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,5 ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 mM til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM) og Tween 80 ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % (fortrinnsvis fra rundt 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 0,1 % så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 %).

[0099] Bortsett fra dette og/eller i tillegg, bør polypeptidene ifølge oppfinnelsen som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen fortrinnsvis ha en smeltetemperatur på minst 59 °C eller mer (så som 59,5 °C eller mer), fortrinnsvis minst 60 °C eller mer (så som 60,5 °C eller mer), mer foretrukket minst 61 °C eller mer (så som 61,5 °C eller mer) eller minst 62 °C eller mer (så som 62,5 °C eller mer), mest foretrukket minst 63 °C eller mer (så som 63,5 °C eller mer), som målt ved den termiske skiftanalysen (TSA) og/eller differensiell skanningskalorimetri (DSC).

[0100] Uten å være begrensende, kan smeltepunktbestemmelsen gjøres ved fluorescensbasert termisk skiftanalyse som er basert på det faktum at ved termisk utbretting blir de hydrofobe regionene av proteiner, vanligvis skjult i kjernen av proteinfoldingen, tilgjengelige for binding til et hydrofobt fluorescerende fargestoff.

5 Fluorescensemisjonen av dette fargestoffet quenches i vandig løsning, mens ved binding til de hydrofobe flekkene av et utbrettet protein observeres det en skarp økning i fluorescensutbyttet av proben. Temperaturindusert utfolding er vanligvis en tilstandsprosess med en skarp overgang mellom den brettede og ubrettede tilstanden, der smeltetemperaturen (T_m) er definert som temperaturen hvorved halvparten av
10 proteinet er i den ubrettede tilstanden, dvs. at det første derivatet av fluorescenssignalet ved gradvis oppvarming av prøven plottes, og den observerte toppen (eller topper når flere domener og/eller varianter av det samme domenet er til stede) utgjør smeltetemperaturen. Den termiske skiftanalysen kan utføres i et typisk sanntids-PCR-instrument der smeltekurvene kan registreres nøyaktig i høy gjennomstrømningsmodus
15 der bare små mengder av protein er nødvendig.

[0101] Under et differensielt skanningskalorimetrieforsøk varmes prøven opp ved en konstant rate i et adiabatisk miljø ($\Delta T = 0$). Energien som kreves for å holde temperaturforskjellen mellom en referanse og prøvecellen ved null måles og gir varmekapasiteten som en funksjon av temperaturen ($C_p(T)$). Temperaturen som svarer
20 til den maksimale varmekapasiteten representerer smeltetemperaturen (T_m). Hvis den temperaturavhengige utfoldingsprosessen er reversibel kan andre termodynamiske parametere så som utfoldingsentalpien ($\Delta H_{\text{utfolding}}$) bestemmes.

[0102] De økte smeltetemperaturene er blitt observert for polypeptidene ifølge oppfinnelsen når de er til stede i en formulering med en pH på rundt 6,0 til 8,0,
25 fortrinnsvis 6,2 til 7,5, mer foretrukket 6,5 til 7,5, mest foretrukket 6,5-7,0. Økt smeltetemperatur er også blitt oppnådd for polypeptidene ifølge oppfinnelsen når de er til stede i en formulering som omfatter hepes ved pH 7,0, histidin ved pH 6,0-6,5, MES ved pH 6,0 eller acetat ved pH 6,0, eller en formulering som omfatter en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol, trehalose, sorbitol eller
30 sukrose. I dette dokumentet er det følgelig også offentliggjort en formulering omfattende en vandig bærer ved en pH på 6,0 til 8,0 og et polypeptid omfattende én eller flere enkle variable domener, idet formuleringen som formuleres for administrering til et menneske, der formuleringen ytterligere omfatter minst én av:
a) en buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer
35 foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 eller 10 mM) valgt fra gruppen bestående av histidin ved pH 6,0-6,5, hepes ved pH 7,0-8,0, MES ved pH 6,0, suksinat ved pH 6,0-6,5 og acetat ved pH 5,5-6,0;
b) en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol, så som mannitol, sorbitol, trehalose eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer

foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %), der formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der smeltetemperaturen for polypeptidet ifølge oppfinnelsen er minst 59 °C eller mer (så som 59,5 °C eller mer), fortrinnsvis minst 60 °C eller mer (så som 60,5 °C eller mer), mer foretrukket minst 61 °C eller mer (så som 61,5 °C eller mer) eller minst 62 °C eller mer (så som 62,5 °C eller mer), mest foretrukket minst 63 °C eller mer (så som 63,5 °C eller mer) målt ved hjelp av den termiske skiftanalysen (TSA) og/eller differensiell skanningskalorimetri (DSC).

[0103] I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en buffer i en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM) valgt fra gruppen bestående av histidin pH 6,0-6,5, hepes pH 7,0-8,0, MES ved pH 6,0, suksinat ved pH 6,0-6,5 og acetat ved pH 5,5-6,0, og en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol, sorbitol, trehalose eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %).

[0104] Bortsett fra dette og/eller i tillegg kan formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen utvise stabilitet under minst ett eller flere av de følgende belastningsforholdene:

- flere (opptil 10) fryse/tine-sykluser;
- lagring ved en temperatur på 2-8 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- lagring ved en temperatur på 25 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- mekaniske belastninger.

[0105] Fortrinnsvis er formuleringen ifølge oppfinnelsen stabil under én eller flere av de følgende formene for mekanisk belastning:

- å riste formuleringen i 10 s til 1 min;
- å skyve formuleringen gjennom en kanyle (25G, fortrinnsvis 26G, mer foretrukket 27G, enda mer foretrukket 28G, mest foretrukket 29 g eller mer) med en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml opptil 50 ml sprøyte);

- å rotere den i to dager ved 10 rpm; og/eller
- å omrøre den i 1 time ved romtemperatur og/eller 4-48 timer ved 4 °C i minst 10 rpm (så som 50 rpm, 100 rpm eller mer).

5 **[0106]** Fortrinnsvis er formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen stabil under mer enn ett av de ovennevnte belastningsforholdene, så som minst to, minst tre, minst fire, minst fem, minst seks, minst syv eller mest foretrukket under alle de ovennevnte belastningsforholdene.

10 **[0107]** I ett aspekt utviser formuleringen ifølge oppfinnelsen stabilitet under en eller flere former av mekanisk og/eller skjærbelastning. Mekanisk belastning som anvendt i den foreliggende oppfinnelsen kan være hvilken som helst form for ytre kraft påført på formuleringen som kan påvirke stabiliteten på polypeptidet til stede i formuleringen.

Uten å være begrensende inkluderer de mekaniske belastningene påført løsningen skjærbelastning, rørbelastning, ristebelastning, rotasjonsbelastning osv. Formuleringen 15 ifølge oppfinnelsen kan for eksempel ristes i minst 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s opptil 1 minutt eller mer. Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan presses gjennom en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml opptil 50 ml sprøyte) med nål en gang, to ganger, tre ganger, fire ganger, fem ganger opptil 10 20 ganger eller mer. Fortrinnsvis har kanylen en størrelse på 25G (så som 26G, 27G, 28G, 29G, 30G) eller mer. Mer foretrukket er størrelsen på nålene 27G eller mer. I tillegg eller alternativt, kan formuleringen ifølge oppfinnelsen roteres i 1 time, 2 timer, 6 timer, 12 timer, 1 dag til to dager eller mer ved 10 rpm. Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan omrøres i 1 time ved romtemperatur og/eller i 4 timer, 8 timer, 25 12 timer, 24 timer eller 48 timer eller mer ved 2-8 °C. Rotasjonshastigheten er fortrinnsvis over 10 rpm, så som f.eks. 50 rpm, 100 rpm eller mer.

[0108] Stabiliteten av formuleringen under mekanisk belastning kan vurderes f.eks. ved visuell inspeksjon av formuleringen eller ved måling av OD320/OD280- 30 forholdet. Fortrinnsvis er OD320/OD280-forholdet 0,05 eller lavere, så som 0,01 eller 0,005.

[0109] En god stabilitet av polypeptidene ifølge oppfinnelsen under mekanisk belastning er blitt oppnådd med en formulering omfattende en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose eller omfattende Tween 80. I dette dokumentet er det følgelig også offentliggjort en formulering omfattende en 35 vandig bærer og et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener, der formuleringen formuleres for administrering til et menneske, der formuleringen ytterligere omfatter minst én av:

b) en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 10 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %);

c) en surfaktant ved en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % (foretrukket fra rundt 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 0,1 %, så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 %) valgt fra Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer,

idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der polypeptidet er stabilt under mekanisk belastning, som bestemt ved OD320/OD280-

forholdsmålingen. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %) og en surfaktant i en konsentrasjon på 0,001 % til 1 % (fortrinnsvis rundt 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 0,1 %, så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 % eller 0,005 %) valgt fra Tween 20 og Tween 80. En foretrukket formulering omfatter 8 % sukrose og 0,01 % Tween 80. En annen foretrukket formulering omfatter 10 vekt-% sukrose og 0,005 % Tween 80.

[0110] I et bestemt aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %) og/eller Tween 20, Tween 80 eller en poloksamer (ved en konsentrasjon som strekker seg fra 0,001 % til 0,1 % eller 0,01 % til 0,1 % så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 %), og karakteriseres ved at polypeptidene som er til stede i formuleringen er stabile under mekanisk belastning.

[0111] I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %) og/eller Tween 80 (ved en konsentrasjon på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 % eller 0,005 %), og karakteriseres ved at polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen er stabile ved risting av formuleringen i minst 10 s, 20 s, 30 s, 40 s, 50 s opptil 1 minutt av mer. I et annet foretrukket aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %) og/eller Tween 80 (ved en konsentrasjon på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 % eller 0,005 %), og karakteriseres ved at

polypeptidene til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen er stabile når formuleringen skyves gjennom en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml opptil 50 ml sprøyte) med nålestørrelse på 25 G eller mer (så som 26G, 27G, 28G, 29G, 30G eller mer, fortrinnsvis 27G eller mer) en gang, to ganger, tre ganger, fire ganger, fem ganger opptil 10 ganger eller mer. I et annet foretrukket aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %) og/eller Tween 80 (ved en konsentrasjon på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 %, eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 % eller 0,005 %), og karakteriseres ved at polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen er stabile når de roterer formuleringen i 1 time, 2 timer, 6 timer, 12 timer, 1 dag opptil to dager eller mer ved 10 rpm. I et annet foretrukket aspekt omfatter formuleringen ifølge oppfinnelsen en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %) og/eller Tween 80 (ved en konsentrasjon på 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 % eller 0,005 %), og karakteriseres ved at polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen er stabile ved omrøring av formuleringen i 1 time ved romtemperatur og/eller i 4 timer, 8 timer, 12 timer, 24 timer eller til og med 48 timer eller mer ved 2-8 °C i minst 10 rpm (så som 50 rpm, 100 rpm eller mer).

[0112] En "fryse/tine-syklus" eller "F/T-syklus" er definert som frysingen av en prøve i en fryser (-20 ± 5 °C) eller ultrafryser (under -64 °C (så som f.eks. ved -80 °C)) til faststoff, etterfulgt av tining ved romtemperatur inntil alle iskrystallene er visuelt forsvunnet. I ett aspekt utviser formuleringen ifølge oppfinnelsen stabilitet under flere (opptil 10) fryse/tine-sykluser. Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan oppvise stabilitet under minst 1, minst 2, minst 3, minst 5 til opptil minst 10 fryse/tine-sykluser, så som f.eks. 10 sykluser ved -20 °C, 2 sykluser ved -80 °C + 1 syklus ved -20 °C eller 2 sykluser ved -80 °C + 6 sykluser ved -20 °C.

[0113] I nok et annet aspekt utviser formuleringen ifølge oppfinnelsen stabilitet når den lagres ved en temperatur på 5 ± 5 °C. Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan utvise stabilitet når den lagres ved en temperatur på 5 ± 5 °C i minst 2 uker, 3 uker, 4 uker, 8 uker og 10 uker, opptil 3 måneder, 6 måneder, 11 måneder, 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år og mer.

[0114] I et annet aspekt utviser formuleringen ifølge oppfinnelsen stabilitet ved lagring ved en temperatur på 25 ± 5 °C. Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan utvise

stabilitet ved lagring ved en temperatur på 25 ± 5 °C i minst 2 uker, 3 uker, 4 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer.

[0115] I nok et annet aspekt utviser formuleringen ifølge oppfinnelsen stabilitet når den lagres ved en temperatur på 37 ± 5 °C. Formuleringen ifølge oppfinnelsen kan utvise stabilitet når den lagres ved en temperatur på 37 ± 5 °C i minst 2 uker, 3 uker, 4 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer.

[0116] Som det er kjent for en fagmann på området kan temperaturene indikert i denne teksten være gjenstand for normale variasjoner.

[0117] Fortrinnsvis, i de formuleringene som er stabile under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene:

- danner mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidet ifølge oppfinnelsen pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) under lagring under (ett av de ovennevnte) belastningsforholdene, så som f.eks. ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- danner mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidet ifølge oppfinnelsen dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring under (ett av de ovennevnte) belastningsforholdene, så som f.eks. ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- minst 80 % (minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 %, eller minst 99,5 %) av polypeptidene ifølge oppfinnelsen beholder deres bindingsaktivitet (f.eks. som vurdert ved hjelp av ELISA og/eller Biacore) til minst ett av deres (fortrinnsvis til alle deres) mål etter lagring under (ett av de ovennevnte) belastningsforholdene, så som f.eks. ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), sammenlignet med bindingsaktiviteten før belastningstilstanden.

[0118] Stabiliteten av formuleringene kan bestemmes ved forskjellige analytiske og/eller immunologiske fremgangsmåter kjent innen teknikken. Proteininnholdet av

polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan for eksempel detekteres ved spektrofotometriske fremgangsmåter.

[0119] SDS-PAGE tillater visualiseringen av polypeptidene i en gitt prøve via direkte farging. SDS-PAGE anvendes til å separere proteiner ifølge deres størrelse. Både

5 reduserende og ikke-reduserende SDS-PAGE-analyse kan utføres.

[0120] Den molekylære størrelsesfordelingen og de relative mengdene av polypeptidet ifølge oppfinnelsen og proteinurenheter kan bestemmes ved

størrelsesutelukkelseshøyttelsesvæskerkromatografi (SE-HPLC). Den relative mengden av en spesifikk proteinurenheter, uttrykt som areal-%, kan beregnes ved å dele

10 topparealet som svarer til forurensningen av det totale integrerte området. SE-HPLC-fremgangsmåtene er kjent for fagmannen og er også beskrevet i eksempeldelen.

[0121] Reversfasehøyttelsesvæskerkromatografi (RP-HPLC) separerer molekyler med hensyn på forskjeller i hydrofobisitet, og er basert på den reversible samvirkningen mellom molekylet, og den hydrofobe stasjonære fasen. I denne analysen kan det

15 anvendes en Zorbax 300SB-C3-kolonne (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Den relative mengden av en spesifikk proteinurenheter, uttrykt som areal-%, kan beregnes ved å dele topparealet som tilsvarer forurensningen av det totale integrerte området.

RP-HPLC-fremgangsmåtene er kjent for fagmannen og er også beskrevet i eksempeldelen.

20 **[0122]** Polypeptidene ifølge oppfinnelsen og deres ladningsvarianter kan separeres ved ionebyttedyttelsesvæskerkromatografi (IEX-HPLC). Også potensielle urenheter kan påvises med denne fremgangsmåten. Den relative mengden av en spesifikk proteinurenheter, uttrykt som areal-%, kan beregnes ved å dele topparealet som tilsvarer forurensningen på det totale integrerte området. IEX-HPLC-fremgangsmåtene er kjent

25 for fagmannen og er også beskrevet i eksempeldelen.

[0123] Polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen danner fortrinnsvis ikke pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren. Dannelsen av

pyroglutamat i prøven kan f.eks. måles ved RP-HPLC. For eksempel viste analyse av RP-HPLC av en formulering inneholdende SEQ ID NO: 4 etter lagring i 10 uker ved

30 en temperatur på 37 °C dannelsen av pyroglutamat som en separat topp ved 18-19 minutter. I formuleringen ifølge oppfinnelsen danner fortrinnsvis mindre enn 10 %

(mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest

foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidene pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt av RP-HPLC) under ett eller flere av de ovennevnte

35 belastningsforholdene.

[0124] Liten til ingen pyroglutamatdannelse av polypeptidene ifølge oppfinnelsen er blitt observert i formuleringer med en pH på 7,0 eller lavere, fortrinnsvis 6,5 eller lavere, så som 6,5, 6,0 eller 5,5, i f.eks. histidinbuffer og acetatbuffer. I dette dokumentet er det følgelig også offentliggjort en formulering omfattende en vandig

bærer ved en pH på 7,0 eller lavere, og et polypeptid omfattende én eller flere enkle variable domener, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, der formuleringen videre omfatter:

a) En buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM eller 10 mM) valgt fra gruppen bestående av histidin ved pH 6,0 til 6,5 og acetat ved pH 5,5 til 6,0, idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der mindre enn 10 % (fortrinnsvis mindre enn 8 %, mer foretrukket mindre enn 7 %, mest foretrukket mindre enn 5 %) av polypeptidene danner pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene (som f.eks. under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer)), % av pyroglutamatet som målt av RP-HPLC. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,5 ved 15 mM. I et annet foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,0 ved 10 mM.

[0125] Polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen danner også fortrinnsvis ikke dimerer. Dannelsen av dimerer i prøven kan f.eks. måles ved hjelp av SE-HPLC. For eksempel viste analyse i SE-HPLC av en formulering inneholdende SEQ ID NO: 4 etter lagring i 10 uker ved en temperatur på 37 °C dannelsen av en separat topp ved eluering med en tilsynelatende molekylvekt på 44 kDa sammenlignet med molekylvektmarkører, mens det monomere polypeptidet ble eluert mellom molekylvektmarkørene på 44 og 17 kDa. Denne separate toppen ved 44 kDa representerte en dimer form av SEQ ID NO: 4. I formuleringen ifølge oppfinnelsen danner fortrinnsvis mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidene dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene.

[0126] Liten til ingen dimerdannelse av polypeptidene ifølge oppfinnelsen er blitt observert i formuleringer med en histidinbuffer eller en acetatbuffer, og i formuleringer som omfatter en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid og/eller polyol så som mannitol, trehalose, sorbitol eller sukrose. I dette dokumentet er det følgelig også offentliggjort en formulering omfattende en vandig bærer og et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, der formuleringen videre omfatter minst én av:

a) en buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 mM til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM eller 10 mM) valgt fra gruppen bestående av histidin ved pH 6,0, 6,5 og acetat pH 5,5-6,0;

b) en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid, et ikke-reduserende sukker og/eller polyol så som mannitol, trehalose, sorbitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %), idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der mindre enn 10 % (fortrinnsvis mindre enn 8 %, mer foretrukket mindre enn 7 %, mest foretrukket mindre enn 5 %) av polypeptidene danner dimerer under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene (som under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer)), % av dimerer som målt med SE-HPLC. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,5 ved 15 mM. I et annet foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,0 ved 10 mM. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en buffer i en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 eller 10 mM) valgt fra gruppen bestående av histidin ved pH 6,0-6,5, og acetat ved pH 5,5-6,0 og en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid, ikke-reduserende sukker og/eller polyol så som mannitol, trehalose, sorbitol eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %), så som f.eks. 15 mM histidin ved pH 6,5 og 8 % sukrose; eller 10 mM histidin ved pH 6,0 og 10 % sukrose.

[0127] I formuleringen ifølge oppfinnelsen danner fortrinnsvis mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidene pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som bestemt ved RP-HPLC) og mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidene danner dimerer (f.eks. som bestemt ved SE-HPLC) under lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene.

[0128] Bortsett fra dette og/eller i tillegg, bør formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen bare vise lave til ikke-detekterbare nivåer av aggregering selv under lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene. For eksempel, i formuleringen ifølge oppfinnelsen, danner ikke mer enn 5 %, ikke mer enn 4 %, ikke mer enn 3 %, ikke mer enn 2 %, ikke mer enn 1 %, og mest foretrukket ikke mer enn 0,5 % av polypeptidene et aggregat etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene.

[0129] Aggregering som anvendt i den foreliggende oppfinnelsen betyr utviklingen av høymolekylære aggregater, dvs. aggregater med en tilsynelatende molekylvekt i SE-HPLC-analyse av mer/høyere enn molekylvekten som observeres for dimerer. Som beskrevet ovenfor er 44 kDa den tilsynelatende molekylvekten observert i SE-HPLC-analyse for dimerer av SEQ ID NO: 4, 36- 38 kDa er den tilsynelatende molekylvekten

observert i SE-HPLC-analyse for dimerer av SEQ ID NO: 1-3 og 36 kDa er den tilsynelatende molekylvekten som observeres i SE-HPLC-analysen for dimerer ifølge SEQ ID NO: 5. Aggregering kan vurderes ved hjelp av forskjellige fremgangsmåter som er kjent innen teknikken. Uten å være begrensende inkluderer eksempler SE-
 5 HPLC, analytisk ultrasentrifugering, dynamisk lysspredning, undersynlig partikkeltelling og OD320/OD280-måling.

[0130] I en analytisk ultrasentrifuge kan en prøve som spinnes overvåkes i sanntid via et optisk deteksjonssystem, ved hjelp av ultrafiolett lysabsorpsjon og/eller forstyrrelser av det optiske brytningsindeksfølsomme systemet. Dette gjør det mulig for operatøren
 10 å observere utviklingen av prøvekonsentrasjonen versus rotasjonsprofilen som et resultat av det påførte sentrifugalfeltet. Med moderne instrumentering digitaliseres disse observasjonene elektronisk og lagres for videre matematisk analyse. To typer forsøk utføres ofte på disse instrumentene: sedimenteringshastighetsforsøk og sedimenteringslikevektsforsøk.

[0131] Sedimenteringshastighetsforsøk har som mål å tolke hele tidsløpet av sedimenteringen, og rapportere om formen og den molare massen av de løste makromolekylene, samt deres størrelsesfordeling (Perez-Ramirez and Steckert (2005) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols. C.M. Smales and D.C. James, utg. bind 308: 301-318. Humana Press Inc, Totowa, NJ, US.). Størrelsesløsningen til denne
 20 fremgangsmåten har omtrent samme målestokk som kvadratet av partikkelradiusen, og ved å justere rotorhastigheten av forsøket kan størrelsesområder fra 100 Da til 10 GDa dekkes. Sedimenteringshastighetsforsøk kan også anvendes til å studere reversible kjemiske likevekter mellom makromolekylære arter, enten ved å overvåke antallet og den molare massen av makromolekylære komplekser, ved å oppnå informasjon om den
 25 komplekse sammensetningen fra multisignalanalyse som utnytter forskjeller i hvert komponentspektroskopiske signal, eller ved å følge sammensetningsavhengigheten av sedimenteringshastigheter på det makromolekylære systemet, som beskrevet i Gilbert-Jenkins-teorien.

[0132] Sedimenteringslikevektsforsøk opptas bare med den endelige
 30 likevektstilstanden av forsøket, der sedimenteringen balanseres ved diffusjon motstående konsentrasjonsgradientene, noe som resulterer i en tidsuavhengig konsentrasjonsprofil. Sedimenteringslikevektsfordelinger i sentrifugalfeltet karakteriseres av Boltzmann-fordelinger. Dette forsøket er ufølsomt for formen på makromolekylet, og rapporterer direkte om den molare massen av makromolekylene, og, for kjemisk reagerende blandinger, på kjemiske likevektskonstanter.
 35

[0133] Den slags informasjon som kan oppnås fra et analytisk ultrasentrifugerør inkluderer den totale formen av makromolekyler, de konformasjonelle endringene i makromolekyler, og størrelsesfordelinger av makromolekylære prøver. For makromolekyler, så som proteiner, som finnes i kjemisk likevekt med forskjellige ikke-

kovalente komplekser, kan antallet og underenhetsstøkiometri av kompleksene og likevektskonstante konstanter studeres. (se også Scott D.J., Harding S.E. and Rowe A.J. Analytical Ultracentrifugation Techniques and Methods, RSC Publishing)

[0134] Dynamisk lysspredning (også kjent som fotonkorrelasjonsspektroskopi eller kvasielastisk lysspredning) er en metode i fysikken, som kan anvendes til å bestemme størrelsesfordelingsprofilen av små partikler i løsningen. Når en lysstråle passerer gjennom en kolloidal dispersjon, sprer partiklene eller dråpene noe av lyset i alle retninger. Når partiklene er svært små sammenlignet med bølgelengden til lyset, er intensiteten av det spredte lyset ensartet i alle retninger (Rayleigh-spredning); for større partikler (over tilnærmet 250 nm i diameter), er intensiteten vinkelavhengig (Mie-spredning). Hvis lyset er koherent og monokromatisk, som fra en laser for eksempel, er det mulig å observere tidsavhengige svingninger i den spredte intensiteten ved hjelp av en egnet detektor så som en fotomultiplikator i stand til å operere i fotontellingmodus.

[0135] Disse svingningene oppstår fra det faktum at partiklene er små nok til å undergå tilfeldig termisk (Brownsk) bevegelse og avstanden mellom dem er derfor stadig varierende. Konstruktiv og destruktiv interferens av lyset spredt av nabopartikler i den belyste sonen gir opphav til intensitetssvingninger på detektorplanet som, slik det oppstår fra partikkelbevegelse, inneholder informasjon om denne bevegelsen. Analyse av tidsavhengigheten av intensitetssvingningene kan derfor gi diffusjonskoeffisienten av partiklene fra disse, via Stokes Einsteins-ligningen, ved å vite viskositeten av mediet kan den hydrodynamiske radiusen eller diameteren av partiklene beregnes (se også Berne B. J. and Pecora R. Dynamic Light Scattering With Applications to Chemistry, Biology and Physics, Dover Publications)

[0136] Aggregering kan også måles ved Pamas SVSS-C-instrumentet (lite volum sprøytesystem-C) (PArtikelMess - und AnalyseSysteme GMBH), som er en partikkelstørrelsesfordelingsanalysator for lavviskøse væsker. Det anvender prinsippet for lysformørkelse for å detektere undersynlige partikler i størrelsesområdet 1 µm - 200 µm. Valideringskriteriet/spesifiserte grenser i den europeiske farmakopé (EP <2,9,19 partikkelforurensning: undersynlige partikler) for parenteraler av små og store volum defineres av *totaltellingene per beholder*:

- For partikler > 10 µm, ikke mer enn 6000 tellinger per beholder
- For partikler > 25 µm, ikke mer enn 600 tellinger per beholder

[0137] OD320/OD280-forholdet er også et mål for turbiditet eller nærværet av partikler i prøven. I et foretrukket aspekt bør OD320/OD280-forholdet til formuleringen ifølge oppfinnelsen være 0,05 eller lavere, fortrinnsvis 0,01 eller lavere, så som 0,005 eller lavere.

[0138] Tendensen til aggregatdannelse av et polypeptid i en bestemt formulering kan også måles ved elastisk lysspredning. Elastisk lysspredning kan måles i et

spektrofluorometer (f.eks. eksitasjon og emisjonsbølgelengde 500 nm) ved hjelp av temperaturindusert denaturering som målt f.eks. ved en vinkel på 90°. Fortrinnsvis vil den maksimale spredningen holde seg innenfor absorpsjonsdeteksjonsgrensen.

Spredningen bør være 1000 abs. eller lavere, fortrinnsvis 750 abs eller lavere, så som 500 abs eller lavere.

[0139] Det har ikke blitt observert noen partikkeldannelse i formuleringer omfattende en histidinbuffer ved pH 6,0-6,5 under forskjellige belastningsforhold (så som f.eks. lagring ved en temperatur på 5 ± 5 °C i inntil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer) eller lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst to uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer)). Den foreliggende oppfinnelsen vedrører følgelig en formulering omfattende en vandig bærer og et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, idet formuleringen videre omfatter:

a) en histidinbuffer ved pH 6,0-6,5, ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM), idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der ingen partikler er til stede i under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene (f.eks. når den lagres ved en temperatur på 5 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer) eller når de lagres ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer)) som målt ved OD320/OD280-forholdet måle- og/eller den elastiske lysspredningen. I et foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,5 ved 15 mM. I et annet foretrukket aspekt omfatter formuleringen en histidinbuffer ved pH 6,0 ved 10 mM.

[0140] Bortsett fra dette og/eller i tillegg kan formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen bare vise lave til ikke-detekterbare nivåer av fragmentering og/eller nedbrytning, selv under lagring ifølge ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene. Fragmentering og nedbrytning kan måles ved f.eks. SE-HPLC og/eller RP-HPLC. For eksempel viste analyse i SE-HPLC av en formulering inneholdende SEQ ID NO: 4 etter lagring i 10 uker ved en temperatur på 37 °C dannelsen av noen mindre ettertopper, som representerer nedbrytningsprodukter av SEQ ID NO: 4. Eksempel viste analyse ved RP-HPLC av en formulering inneholdende SEQ ID NO: 4 etter lagring i 10 uker ved en temperatur på 37 °C dannelsen av noen mindre topper ved 8-9 minutter, som representerer nedbrytningsprodukter. I

formuleringen ifølge oppfinnelsen viser fortrinnsvis ikke mer enn 5 %, ikke mer enn 4 %, ikke mer enn 3 %, ikke mer enn 2 %, ikke mer enn 1 %, ikke mer enn 0,5 %, ikke mer enn 0,1 %, ikke mer enn 0,05 %, og mest foretrukket ikke mer enn 0,01 % av polypeptidene nedbrytning og/eller fragmentering etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene.

[0141] Metodene for statisk lysspredning (SLS), tangentiell strømningsfiltrering (TFF), Fourier transform infrarød (FTIR), sirkulær dikroisme (CD), ureainduserte proteinutfoldelsesmetoder, iboende tryptofanfluorescens og/eller 1-anilino-8-naftalensulfonsyre (ANS)-proteinbinding kan også anvendes til å vurdere de fysiske egenskapene og stabiliteten til polypeptidene.

[0142] Bortsett fra dette og/eller i tillegg kan formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen vise meget liten eller intet tap av styrke og/eller biologisk aktivitet av deres polypeptider, selv ved lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene.

[0143] Styrken og/eller den biologiske aktiviteten til et biologisk produkt beskriver den spesifikke evnen eller kapasiteten til det biologiske produktet for å oppnå en definert biologisk virkning. Styrken og de biologiske aktivitetene til polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan vurderes ved forskjellige analyser, inkludert enhver egnet in vitro-analyse, cellebasert analyse, in vivo-analyse og/eller dyremodell kjent per se, eller hvilken som helst kombinasjon av disse, avhengig av den spesifikke sykdommen eller forstyrrelsen som er involvert. Egnede in vitro-analyser vil være klare for fagmannen og inkluderer for eksempel ELISA; FACS-bindingsanalyse; Biacore; konkurransebindingsanalyse (AlphaScreen[®], Perkin Elmer, Massachusetts, USA; FMAT); TRAP-analyse (osteoklastdifferensieringsanalyse; Rissanen et al. 2005, J. Bone Miner. Res. 20, Suppl. 1: S256); NF-kappaB-rapportørgenanalyse (Mizukami et al. 2002, Mol. Cell. Biol. 22: 992-1000). For eksempel interagerer SEQ ID NO: 4 med RANKL og blokkerer interaksjonen av denne liganden med RANK, som derved forebygger signalisering via denne reseptoren. SEQ ID NO: 1 til 3 interagerer med IL-6R og blokkerer interaksjonen av denne reseptoren med IL-6. SEQ ID NO: 5 og 6 interagerer med IL-23 og blokkerer interaksjonen av denne liganden med reseptoren sin. Styrken av SEQ ID NO: 1 til 6 for blokkering av den respektive liganden/reseptorinteraksjonen kan bestemmes ved f.eks. ELISA, Biacore, AlphaScreen[®].

[0144] For eksempel, i en utførelsesform anvender Biacore kinetisk analyse overflateplasmonresonans (SPR)-teknologi for å overvåke makromolekylære interaksjoner i sanntid og anvendes for å bestemme bindingen på- og av-rater av polypeptider i formuleringen ifølge oppfinnelsen til sine mål. Biacore kinetisk analyse omfatter å analysere bindingen og dissosiasjonen av målet fra brikker med immobiliserte polypeptider ifølge oppfinnelsen på deres overflate. En typisk Biacore

kinetisk undersøkelse involverer injeksjonen av 250 µl av polypeptidreagens i varierende konsentrasjon i HBS-buffer inneholdende 0,005 % Tween 20 over en sensorbrikkeoverflate, hvorpå det er immobilisert antigen. I BIAcore-3000-systemet immobiliseres liganden på karboksymetylert dekstran over en gulloverflate, mens den andre partneren (analytten) fanges ettersom den strømmer over den immobiliserte ligandoverflaten. De immobiliserte ligandene er bemerkelsesverdig elastiske og opprettholder sin biologiske aktivitet. De bundne analyttene kan stripes fra den immobiliserte liganden uten å påvirke dens aktivitet til å tillate mange sykluser av binding og regenerering på den samme immobiliserte overflaten. Interaksjonen detekteres i sanntid via SPR og ved høy sensitivitet. Siden den samme affiniteten kan reflektere forskjellige på-rater og av-rater, utmerker dette instrumentet seg over de fleste andre affinitetsmålemetoder ved at det måler på-rater (k_a) og av-rater (k_d). Konsentrasjonsbestemmelsesforsøk er også mulige.

[0145] Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen oppviser nesten intet tap av biologisk aktivitet av polypeptidet under langvarig lagring under forholdene som er beskrevet ovenfor, som vurdert ved forskjellige immunologiske analyser, inkludert, for eksempel enzymbundet immunosorbensanalyse (ELISA) og overflateplasmonresonans for å måle evnen av polypeptidet til spesifikt å binde til et antigen. Polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen beholder, selv under de ovennevnte definerte belastningsforholdene (så som lagring under visse temperaturbelastninger for definerte perioder) mer enn 80 %, mer enn 85 %, mer enn 90 %, mer enn 95 %, mer enn 98 %, mer enn 99 %, eller mer enn 99,5 % av deres opprinnelige biologiske aktiviteter (f.eks. evnen til å binde til RANKL, IL-6R, IL-23 og/eller HSA) av polypeptidene før lagringen. I noen utførelsesformer beholder polypeptidene i formuleringen ifølge oppfinnelsen de ovennevnte definerte belastningsforholdene på minst 80 %, minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 % av den biologiske aktiviteten (f.eks. evnen til å binde til RANKL, IL-6R, IL-23 og/eller HSA), sammenlignet med polypeptidene som er til stede i en referanseformulering før lagringen.

[0146] I en utførelsesform binder polypeptidene ifølge oppfinnelsen HSA. I formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelse beholder minst 80 % (fortrinnsvis minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 %, eller minst 99,5 %) av polypeptidene deres bindingsaktivitet til HSA under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene (så som lagring under visse temperaturbelastninger for definerte perioder) sammenlignet med bindingsaktiviteten før belastningstilstanden. Uten å være begrensende kan bindingen av polypeptidene til HSA bestemmes ved f.eks. ELISA og/eller Biacore.

[0147] I en annen utførelsesform binder polypeptidene ifølge oppfinnelsen RANKL. I formuleringen av den foreliggende oppfinnelsen beholder minst 80 % (minst 85 %,

minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 %) av polypeptidene bindingsaktiviteten sin til RANKL etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring.

[0148] I en annen utførelsesform binder polypeptidene ifølge oppfinnelsen IL-6R. Ved formulering av den foreliggende oppfinnelsen beholder minst 80 % (minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 %) av polypeptidene sin bindingsaktivitet til IL-6R etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring.

[0149] I en annen utførelsesform kan polypeptidene ifølge oppfinnelsen binde IL-23. Ved formulering av den foreliggende oppfinnelsen beholder minst 80 % (minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 %) av polypeptidene sin bindingsaktivitet til IL-23 etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring.

[0150] I et foretrukket aspekt beholder minst 80 % (minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 %) av polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen deres bindingsaktivitet til alle målene deres (så som f.eks. RANKL og HSA, IL-6R og HSA eller IL-23 og HSA) etter lagring under ett eller flere av de ovennevnte belastningsforholdene sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring.

[0151] Egnede dyremodeller for å bestemme styrken og/eller den biologiske aktiviteten av polypeptidene som er til stede i formuleringene ifølge oppfinnelsen vil være klare for fagmannen på området, og vil avhenge av den tiltenkte sykdommen og/eller forstyrrelsen som skal forebygges og/eller behandles av polypeptidet ifølge oppfinnelsen. Egnede dyremodeller for testing av styrken og/eller den biologiske aktiviteten av SEQ ID NO: 1 til 6 er f.eks. beskrevet i WO 08/020079, WO 09/068627 og WO 08/142164.

[0152] Lite eller intet tap av styrke av polypeptidene ifølge oppfinnelsen er blitt observert i formuleringer med en histidinbuffer og i formuleringer som omfatter en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid, ikke-reduserende sukker og/eller polyol så som mannitol, sorbitol, trehalose eller sukrose. Den foreliggende oppfinnelsen vedrører en formulering som angitt omfattende en vandig bærer og et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, der formuleringen videre omfatter minst én av:

a) en histidinbuffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM eller 10 mM);

b) en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid, ikke-reduserende sukker og/eller polyol, så som mannitol, sorbitol, trehalose eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 % (fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller 10 %),

idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere; og der minst 80 % (fortrinnsvis minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 % eller minst 99,5 %) av polypeptidene beholder sin bindingsaktivitet til minst ett (fortrinnsvis alle) av målene deres under ett eller flere av de ovennevnte

5 belastningsforholdene (som under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer))

sammenlignet med bindingsaktiviteten før belastningsforholdene, idet bindingsaktiviteten er som målt ved ELISA og/eller Biacore. I et foretrukket aspekt

10 omfatter formuleringen en histidinbuffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM (fortrinnsvis 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 15 mM eller 10 mM)

og en eksipiens, fortrinnsvis et sakkarid, ikke-reduserende sukker og/eller polyol så som mannitol, sorbitol, trehalose eller sukrose i en konsentrasjon på 1 til 20 %

(fortrinnsvis 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som 5 %, 7,5 %, 8 % eller

15 10 %), så som f.eks. 15 mM histidin ved pH 6,5 og 8 % sukrose; eller 10 mM histidin ved pH 6,0 og 10 % sukrose.

[0153] Følgelig, i de stabile formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen har fortrinnsvis:

- 20 • polypeptidet ifølge oppfinnelsen en løselighet på minst 20 mg/ml, minst 50 mg/ml, fortrinnsvis minst 90 mg/ml, minst 120 mg/ml, minst 150 mg/ml eller til og med 200 mg/ml eller mer) (f.eks. som vurdert av PEG-utelukkelsesmetoden eller ved sentrifugal ultrafiltrering);
- 25 • polypeptidet ifølge oppfinnelsen har en smeltetemperatur på minst 59 °C eller mer (så som 59,5 °C eller mer), fortrinnsvis minst 60 °C eller mer (så som 60,5 °C eller mer), mer foretrukket minst 61 °C eller mer (så som 61,5 °C eller mer) eller minst 62 °C eller mer (så som 62,5 °C eller mer), mest foretrukket minst 63 °C eller mer (så som 63,5 °C eller mer) (f.eks. som vurdert av TSA eller DSC);
- 30 • mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidet ifølge oppfinnelsen danner pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren (f.eks. som vurdert ved RP-HPLC) under lagring under ett eller flere (av de ovennevnte)
- 35 belastningsforholdene, så som f.eks. ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);

- mindre enn 10 % (mer foretrukket mindre enn 5 %, enda mer foretrukket mindre enn 3 %, mest foretrukket mindre enn 1 %) av polypeptidet ifølge oppfinnelsen danner dimerer (f.eks. som vurdert ved SE-HPLC) under lagring under ett eller flere (av de ovennevnte) belastningsforholdene, så som f.eks. ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer);
- minst 80 % (minst 85 %, minst 90 %, minst 95 %, minst 98 %, minst 99 %, eller minst 99,5 %) av polypeptidene ifølge oppfinnelsen beholder bindingsaktiviteten sin (f.eks. som vurdert av ELISA og/eller Biacore) til minst ett (fortrinnsvis alle) målene sine etter lagring under ett eller flere (av de ovennevnte) belastningsforholdene, så som f.eks. ved en temperatur på 37 ± 5 °C i opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), sammenlignet med bindingsaktiviteten før belastningstilstanden; og/eller
- polypeptidet ifølge oppfinnelsen er stabilt under ett eller flere av de følgende mekaniske belastningsforholdene:
 - risting av formuleringen i 10 s til 1 min;
 - presse formuleringen gjennom en kanyle (25G, fortrinnsvis 26G, mer foretrukket 27G, enda mer foretrukket 28G, mest foretrukket 29G eller mer) med en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml opptil 50 ml sprøyte);
 - rotering i to dager ved 10 rpm; og/eller
 - omrøring i 1 time ved romtemperatur og/eller 4-48 timer ved 4 °C i minst 10 rpm (så som 50 rpm, 100 rpm eller mer).

[0154] Et eksempel på en foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen med disse egenskapene omfatter 10 mg/ml av polypeptidet ifølge oppfinnelsen, 15 mM histidin, pH 6,5, 8 % sukrose og 0,01 % Tween 80. Et annet eksempel på en foretrukket formulering ifølge oppfinnelsen med disse egenskapene omfatter 10 mg/ml av polypeptidet ifølge oppfinnelsen, 10 mM histidin ved pH 6,0, 10 % sukrose og 0,005 % Tween 80.

[0155] Generelle fremgangsmåter for fremstilling av de enkle variable domenene og/eller polypeptidene som er til stede i formuleringen ifølge oppfinnelsen er kjent for fagmannen, og/eller er blitt beskrevet i teknikken. De enkle variable domenene og/eller polypeptidene kan fremstilles i hvilken som helst vert kjent for fagmannen. For eksempel, men uten å være begrensende, kan de enkle variable domenene og/eller

polypeptidene fremstilles i prokaryote verter, blant disse *E. coli* eller eukaryote verter, for eksempel eukaryot vert valgt fra insektceller, pattedyrceller og lavere eukaryote verter omfattende gjær så som *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*, *Torulaspora*, *Schizosaccharomyces*, *Citeromyces*, *Pachysolen*,
 5 *Debaromyces*, *Metschnikowia*, *Rhodospiridium*, *Leucosporidium*, *Botryosaccharus*, *Sporidiobolus*, *Endomycopsis*, fortrinnsvis *Pichia pastoris*. Produksjon av nanolegemer i prokaryoter og lavere eukaryote verter så som *Pichia pastoris* er blitt beskrevet i f.eks. WO 94/04678, WO 94/25591 og WO 08/142164. Innholdet i disse søknadene er eksplisitt nevnt i forbindelse med de generelle dyrkningsmetodene og
 10 fremgangsmåtene, deriblant egnede medier og forhold. Fagmannen kan også tenke seg egnede genetiske konstruksjoner for uttrykking av polypeptidene ifølge oppfinnelsen i forskjellige verter på grunnlag av den foreliggende søknaden, og vanlig kjent kunnskap. Den foreliggende oppfinnelse vedrører også forhold og genetiske konstruksjoner beskrevet i teknikken, for eksempel de generelle dyrkningsmetodene,
 15 plasmidene, promotorene og ledersekvensene beskrevet i WO 94/25591, WO 08/020079, Gasser et al. 2006 (Biotechnol. Bioeng. 94: 535); Gasser et al. 2007 (Appl. Environ. Microbiol. 73: 6499); eller Damasceno et al. 2007 (Microbiol. Biotechnol. 74: 381).

[0156] Nærmere bestemt omfatter fremgangsmåten for uttrykking og/eller produksjon av et polypeptid omfattede ett eller flere enkle variable domener trinnene:

- a) å dyrke en vert eller vertscelle (som definert i dette dokumentet) under forhold som er slik at verten eller vertscellen vil formere seg;
- b) å opprettholde verten eller vertscellen under forhold som er slik at verten eller vertscellen uttrykker og/eller produserer polypeptidet;
- 25 c) isolering og/eller rensing av det utskilte polypeptidet fra mediet.

[0157] For å fremstille/oppnå uttrykking av polypeptidet, kan den transformerte vertscellen eller transformerte vertsorganismen vanligvis holdes, vedlikeholdes og/eller dyrkes under forhold slik at (det ønskede) polypeptidet uttrykkes/produseres. Egnede
 30 forhold vil være klart for fagmannen, og vil vanligvis avhenge av vertscellen/vertsorganismen som anvendes, så vel som av de regulatoriske elementene som kontrollerer uttrykkingen av (den relevante) nukleotidsekvensen. Igjen vises det til håndbøkene og patentsøknadene nevnt ovenfor.

[0158] Generelt kan egnede forhold inkludere anvendelsen av et egnet medium, nærværet av en egnet kilde for mat og/eller egnede næringsstoffer, anvendelsen av en
 35 egnet temperatur, og eventuelt nærværet av en egnet induserende faktor eller forbindelse (f.eks. når nukleotidsekvensene ifølge oppfinnelsen er under kontroll av en induserbar promotor); som alle kan velges av fagmannen. Igjen, under slike forhold, kan aminosyresekvensene ifølge oppfinnelsen uttrykkes på en konstitutiv måte, i en

transient måte, eller bare når de hensiktsmessig induseres.

[0159] Polypeptidet ifølge oppfinnelsen kan deretter isoleres fra vertscellen/vertsorganismen og/eller fra mediet der vertscellen eller vertsorganismen ble dyrket ved å anvende proteinisolasjon og/eller rensemeter som er kjent per se, så som (preparativ) kromatografi og/eller elektroforesemetoder, differensielle utfellingsmetoder, affinitetsmetoder (f.eks. ved hjelp av en spesifikk, spaltbar aminosyresekvens fusjonert med polypeptidet ifølge oppfinnelsen) og/eller preparative immunologiske metoder (dvs. ved hjelp av antistoffer mot polypeptidet for å isoleres).

[0160] I den foreliggende oppfinnelsen kan verten fjernes fra kulturmediet ved rutinemessige midler. For eksempel kan verten fjernes ved sentrifugering eller filtrering. Løsningen som oppnås ved fjerning av verten fra kulturmediet refereres også til som kultursupernatant eller klaret kultursupernatant. Polypeptidene ifølge oppfinnelsen kan renses fra kultursupernatanten ved hjelp av standard metoder. Standardmetoder inkluderer, men er ikke begrenset til, kromatografiske metoder, inkludert størrelsesutelukkelseskromatografi, hydrofobisk interaksjonskromatografi, ionebytterkromatografi og affinitetskromatografi. Disse fremgangsmåtene kan utføres alene eller i kombinasjon med andre rensemeter, f.eks. utfelling eller gelelektroforese. Fagmannen på området kan utarbeide egnede kombinasjoner av rensemeter for polypeptidene ifølge oppfinnelsen på grunnlaget av vanlig generell kunnskap. For spesifikke eksempler henvises det til teknikken sitert i dette dokumentet.

[0161] I ett utførelseseksempel kan polypeptidene ifølge oppfinnelsen renses fra kultursupernatanten ved en kombinasjon av affinitetskromatografi på protein A, ionebytterkromatografi og størrelsesutelukkelseskromatografi. Referanse til et "rensetrinn" inkluderer, men er ikke begrenset til disse spesielle fremgangsmåtene.

[0162] Nærmere bestemt kan polypeptidene ifølge oppfinnelsen renses fra kultursupernatanten ved hjelp av en prosess der den utskilte supernatanten (oppnådd ved sentrifugering) fanges på hvilken som helst kombinasjon av kolonner valgt fra (uten å være begrensende) affinitetskromatografiharpiks så som protein-A-harpiks, kationbytterkromatografi (CIEC) eller en anionbytterkromatografi (AIEC) ved anvendelse av for eksempel Poros 50HS (POROS), SOURCE 30S eller SOURCE 15S (GE Healthcare), SP Sepharose (GE Healthcare), Capto S (GE Healthcare), Capto MMC (GE Healthcare) eller Poros 50HQ (POROS), SOURCE 30Q eller SOURCE 15Q (GE Healthcare), Q Sepharose (GE Healthcare), Capto Q og DEAE Sepharose (GE Healthcare), størrelsesutelukkelseskromatografi (SE-HPLC) ved anvendelse av for eksempel Superdex 75 eller Superdex 200 (GE Healthcare), hydrofob interaksjonskromatografi (HIC) ved anvendelse av for eksempel oktyl-, butylsefaroze eller ekvivalenter, eventuelt også inkludert et tangentialfiltreringstrinn (TFF-trinn). En kombinasjon av kolonner kan anvendes for rensingen av polypeptidene ifølge oppfinnelsen, så som f.eks. protein-A-harpiks, etterfulgt av kationbytterkromatografi

eller to kationebytterkromatografitrinn.

[0163] Den foreliggende oppfinnelsen tilveiebringer også fremgangsmåter for fremstilling av de stabile formuleringene ifølge oppfinnelsen omfattende polypeptidene ifølge oppfinnelsen. Nærmere bestemt tilveiebringer den foreliggende oppfinnelsen fremgangsmåter for fremstilling av stabile formuleringer av slike polypeptider, idet fremgangsmåtene er omfattende å konsentrere en fraksjon som inneholder det rensede polypeptidet til den endelige polypeptidkonsentrasjonen ved hjelp av f.eks. en semipermeabel membran med en hensiktsmessig molekylvektterskel (MW-terskel) (f.eks. en 5 kD terskel for enkle variable domener; en 10 kD avkjæring for toverdige polypeptider omfattende to enkle variable domener; eller en 15 kD terskel for treverdige polypeptider omfattende tre enkle variable domener) og diafiltrering og/eller ultrafiltrering til bufferutveksling og videre å konsentrere polypeptidfraksjonen inn i formuleringsbufferen ved anvendelse av den samme membranen. Som utførlig beskrevet ovenfor kan formuleringsbufferen i den foreliggende oppfinnelsen videre omfatte minst én av:

- a) en buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM valgt fra gruppen bestående av hepes ved pH 7,0-8,0, histidin ved pH 6,0-6,5, MES ved pH 6,0 og acetat ved pH 5,5-6,0;
- b) en eksipiens i en konsentrasjon på 1 til 20 %;
- c) en surfaktant ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % valgt fra Tween 80, Tween 20 eller en poloksamer.

[0164] pH-en i formuleringen kan variere fra rundt 5,5 til rundt 8,0, eller kan være i området fra rundt 6,0 til rundt 7,5, fortrinnsvis fra rundt 6,2 til 7,5, fra rundt 6,2 til 7,0, mest foretrukket fra rundt 6,5 til 7,0.

[0165] Surfactant (f.eks. Tween 20, Tween 80 eller poloksamer) tilsettes etter det endelige diafiltrerings/ultrafiltrerings-trinnet ved en konsentrasjon i området fra rundt 0 til 1 %, fortrinnsvis 0,001 til 0,1 % eller 0,01 til 0,1 % så som 0,001 %, 0,005 %, 0,01 %, 0,02 %, 0,05 %, 0,08 %, 0,1 %, 0,5 % eller 1 % av formuleringen, fortrinnsvis 0,01 % eller 0,005 %.

[0166] Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan steriliseres ved hjelp av forskjellige steriliseringsmetoder, inkludert sterilfiltrering, bestråling osv. I en spesifikk utførelsesform filtersteriliseres polypeptidformuleringen med et forhåndssterilisert 0,2 mikronfilter.

[0167] Fortrinnsvis leveres formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen i en hermetisk lukket beholder. Flytende formuleringer kan omfatte en mengde på mellom 1 og 20 ml, fortrinnsvis rundt 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml eller 20 ml.

[0168] Formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan fremstilles som

enhetsdoseformer ved fremstilling av en ampulle som inneholder en alikvot av formuleringen for en gangs bruk. For eksempel kan en enhetsdose av flytende formulering per vial inneholde 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 6 ml, 7 ml, 8 ml, 9 ml, 10 ml, 15 ml eller 20 ml av formuleringen. De farmasøytiske enhetsdoseringsformene kan gjøres egnet for hvilken som helst form for avlevering av polypeptidet ifølge oppfinnelsen, inkludert (uten å være begrensende) parenteral levering, topisk levering, pulmonal levering, intranasal levering, vaginal levering, enteral levering, rektal levering, oral levering og/eller sublingual levering. I ett aspekt vedrører den foreliggende oppfinnelsen en farmasøytisk enhetsdoseform som er egnet for parenteral (så som f.eks. intravenøs, intraarteriell, intramuskulær, intracerebral, intraosseøs, intradermal, intratekal, intraperitoneal, subkutan osv.) administrering til et individ, omfattende en formulering ifølge oppfinnelsen i en egnet beholder. I et annet foretrukket aspekt er individet et menneske. I en spesifikk utførelsesform formuleres formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen til enkeltdosebeholdere som en steril væske som inneholder 10 mg/ml av en av SEQ ID NO: 1 til 6, 15 mM histidinbuffer ved pH 6,5, 8 % sukrose og 0,01 % Tween 80. I en annen spesifikk utførelsesform formuleres formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen til enkeltdosebeholdere som en steril væske som inneholder 10 mg/ml av en av SEQ ID NO: 1 til 6, 10 mM histidinbuffer ved pH 6,0, 10 % sukrose og 0,005 % Tween 80.

[0169] Mengden av en formulering ifølge den foreliggende oppfinnelsen som vil være effektiv ved forebyggelse, behandling og/eller håndtering av en bestemt sykdom eller forstyrrelse kan bestemmes ved standard kliniske metoder som er godt kjente i teknikken eller beskrevet i dette dokumentet. Den nøyaktige dosen som skal benyttes i formuleringen vil også avhenge av administreringsveien, og bør avgjøres ifølge vurderingen til den praktiserende legen, og hver pasients omstendigheter. De effektive dosene kan ekstrapoleres fra doseresponskurver avledet fra in vitro- eller dyremodelltestsystemer. For formuleringer av polypeptidet, omfattet av oppfinnelsen, kan dosen som administreres til en pasient videre beregnes ved hjelp av pasientens vekt i kilo (kg) multiplisert med den dosen som skal administreres i mg/kg.

[0170] Det nødvendige volumet (i ml) som skal gis bestemmes deretter ved å ta den nødvendige mg dosen og dele den på konsentrasjonen av polypeptidformuleringen. Det endelige beregnede ønskede volumet vil oppnås ved å slå sammen innholdet i så mange flasker som nødvendig til sprøyt(er) for å administrere polypeptidformuleringen til oppfinnelsen.

[0171] Den foreliggende oppfinnelsen omfatter også et ferdig pakket og merket farmasøytisk produkt. Denne produksjonsartikkelen eller settet inkluderer den hensiktsmessige enhetsdoseringsformen i et hensiktsmessig kar eller beholder, så som en glassflaske eller annen beholder som er hermetisk forseglet. I én utførelsesform er enhetsdoseringsformen egnet for intravenøs, intramuskulær, intranasal, oral, topisk

eller subkutan levering. Dermed omfatter oppfinnelsen formuleringer, fortrinnsvis sterile, egnet for hver leveringsrute. I tilfellet med doseringsformer egnet for parenteral administrering (så som f.eks. subkutan administrering) er den aktive bestanddelen, f.eks. polypeptidet ifølge oppfinnelsen, steril og egnet for administrering som en partikkelfri løsning.

[0172] Som med hvilket som helst farmasøytisk produkt, utformes pakningsmaterialet og beholderen for å beskytte stabiliteten av produktet under lagring og forsendelse. Videre inkluderer produktene ifølge oppfinnelsen instruksjoner for anvendelse eller et annet informasjonsmateriale som råder legen, teknikeren eller pasienten om hvordan man hensiktsmessig forebygger eller behandler sykdommen eller forstyrrelsen det gjelder. Med andre ord inkluderer produksjonsartikkelen instruksjonsmidler som indikerer eller antyder et doseringsregime, inkludert, men ikke begrenset til, faktiske doser, overvåkningsprosedyrer og annen overvåkinginformasjon.

[0173] Nærmere bestemt tilveiebringer oppfinnelsen en produksjonsartikkel omfattende pakkemateriale, så som en boks, flaske, rør, vial, beholder, sprøyter, insufflator, intravenøs (i.v.) pose, konvolutt og lignende; og minst én enhetsdoseringsform av et farmasøytisk middel inneholdt i emballasjematerialet, der det farmasøytiske midlet omfatter formuleringen inneholdende polypeptidet. Emballasjematerialet inkluderer instruksjonsmidler som indikerer at polypeptidet kan anvendes til å forebygge, behandle og/eller håndtere ett eller flere symptomer forbundet med sykdommen eller forstyrrelsen ved administrering av spesifikke doser og ved å anvende spesifikke doseringsregimer som beskrevet i dette dokumentet.

[0174] Oppfinnelsen tilveiebringer også en produksjonsartikkel omfattende emballeringsmateriale, så som en boks, flaske, rør, vial, beholder, sprøyter, insufflator, intravenøs (i.v.) pose, konvolutt og lignende; og minst én enhetsdoseform av hvert farmasøytiske middel inneholdt i emballasjematerialet, der et farmasøytisk middel omfatter en formulering inneholdende polypeptidet av interesse, og der emballasjematerialet inkluderer instruksjonsmidler som indikerer at midlene kan anvendes for å forebygge, behandle og/eller håndtere sykdommen eller forstyrrelsen ved administrering av spesifikke doser og ved å anvende spesifikke doseringsregimer som beskrevet i dette dokumentet.

[0175] Oppfinnelsen tilveiebringer også en produksjonsartikkel omfattende emballeringsmateriale, så som en boks, flaske, rør, vial, beholder, sprøyter, insufflator, intravenøs (i.v.) pose, konvolutt og lignende; og minst én enhetsdoseform av hvert farmasøytiske middel inneholdt i emballasjematerialet, der ett farmasøytisk middel omfatter en formulering inneholdende polypeptidet, og der emballasjematerialet inkluderer instruksjonsmidler som indikerer at midlene kan anvendes til å forebygge, behandle og/eller håndtere ett eller flere symptomer forbundet med sykdommen eller forstyrrelsen ved å administrere spesifikke doser og ved anvendelse av spesifikke

doseringsregimer som beskrevet i dette dokumentet.

[0176] Formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og settene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres til et individ for å forebygge, behandle og/eller håndtere en spesifikk sykdom og/eller forstyrrelse. I et spesifikt aspekt administreres formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og settene ifølge den foreliggende oppfinnelsen til et individ for å forebygge, behandle og/eller håndtere en sykdom og/eller forstyrrelse forbundet med eller karakterisert ved unormal uttrykking og/eller aktivitet av et bestemt mål eller ett eller flere symptomer av disse. I et annet spesifikt aspekt administreres formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og settene ifølge den foreliggende oppfinnelsen til et individ for å forebygge, behandle og/eller håndtere sykdommer og/eller forstyrrelser forbundet med unormal uttrykking og/eller aktivitet av RANKL, sykdommer og/eller forstyrrelser forbundet med overuttrykking av IL-6, eller sykdommer og forstyrrelser forbundet med heterodimere cytokiner og deres reseptorer, eller ett eller flere symptomer av disse.

[0177] Sykdommer og forstyrrelser forbundet med avvikende uttrykking og/eller aktivitet av RANKL er for eksempel bensykdommer og forstyrrelser, og inkluderer (uten å være begrensende) de følgende sykdommene og forstyrrelsene: osteoporose (McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33), inkludert, men ikke begrenset til, primær osteoporose, endokrin osteoporose (inkludert, men ikke begrenset til, hypertyreose, hyperparatyreoidisme (Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232), Cushings syndrom og akromegali), arvelig og medfødte former for osteoporose (inkludert, men ikke begrenset til, osteogenesis imperfecta, homocystinuri, Menkes syndrom, Riley-Day syndrom), osteoporose på grunn av immobilisering av ekstremiteter, glukokortikoid-indusert osteoporose (Locklin et al. 2001, Bone 28 (Suppl.): S80; McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33; Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232) og post-menopausal osteoporose (McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33); (juvenil eller familiær) Pagets sykdom (Cundy et al. 2002, Hum. Mol. Genet. 11: 2119-2127; Whyte et al. 2002, J. Bone Miner. Res. 17: 26-29; Whyte et al. 2002, N. Engl. J. Med. 347: 175-184; Johnson-Pais et al. 2003, J. Bone Miner Res. 18: 376-380; Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232; Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); inkludert, men ikke begrenset til, hyperkalsemi som følge av faste tumorer (inkludert, men ikke begrenset til, bryst, lunge og nyre) og hematologiske malignanser (inkludert, men ikke begrenset til, multippelt myelom (Sordillo and Pearce 2003, Cancer 97 (3 Suppl): 802-812; Vanderkerken et al. 2003, Cancer Res. 63: 287-289), lymfom og leukemi), idiopatisk hyperkalsemi, og hyperkalsemi forbundet med hypertyreoidisme- og nyrefunksjonsforstyrrelser; bentap, inkludert, men ikke begrenset til, osteopeni etter kirurgi, osteopeni indusert av steroidadministrering, osteopeni

forbundet med forstyrrelser i tynn- og tykktarmen, og osteopeni forbundet med kroniske lever- og nyresykdommer; osteonekrose, dvs. bencelledød, inkludert, men ikke begrenset til, osteonekrose forbundet med traumatisk skade, osteonekrose forbundet med Gauchers sykdom, osteonekrose forbundet med sigdcelleanemi, osteonekrose forbundet med systemisk lupus erytematose, osteonekrose forbundet med revmatoid artritt, osteonekrose forbundet med periodontal sykdom, osteonekrose forbundet med osteolytisk metastase, og osteonekrose forbundet med annen tilstand; bentap forbundet med artrittiske forstyrrelser så som psoriasisartritt, revmatoid artritt, tap av brusk og ledderosjon forbundet med revmatoid artritt (Bezerra et al. 2005, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38: 161-170; Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); artritt (Bezerra et al. 2005, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38: 161-170), inkludert inflammatorisk artritt (McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33), kollagenindusert artritt (Bezerra et al. 2005, Brazilian Journal of Medical and Biological Research 38: 161-170); periprostetisk osteolyse (McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33; Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); kreftrelatert bensykdom (McClung 2006, Current Osteoporosis Reports 4: 28-33); bentap forbundet med aromatasehemmerterapi (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050); bentap forbundet med androgendeprivasjonsterapi (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050); bentapforbundet benmetastase; bentap forbundet med sykdommer som har immunsystemengasjement, så som voksen og barndomsleukemi, kreftmetastase, autoimmunitet, og forskjellige virusinfeksjoner (Holstead Jones et al. 2002, Ann. Rheum. Dis. 61 (Suppl II): ii32-ii39); osteopene forstyrrelser så som voksen og barneleukemi (Oliveri et al. 1999, Henry Ford Hosp. Med. 39:45-48); kroniske infeksjoner så som hepatitt C eller HIV (Stellon et al. 1985, Gastroenterology 89: 1078-1083); autoimmune forstyrrelser så som diabetes mellitus (Piepkorn et al. 1997, Horm. Metab. Res. 29: 584-91), og lupus erytematose (Seitz et al. 1985, Ann. Rheum Dis. 44: 438-445); allergiske sykdommer så som astma (Ebeling et al. 1998, J. Bone Min. Res. 13: 1283-1289); lytiske benmetastaser i flere kreftformer så som brystkreft (Coleman 1998, Curr. Opin. Oncol. 10 (Suppl 1): 7-13); prostatakreft; myelombeinsykdom (Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); periodontale infeksjoner (Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); ekspansil skjeletthyperfosfatasi (Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232); benmetastaser (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050; Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232).

[0178] Også tilveiebrakt av den foreliggende oppfinnelsen er forebyggingen og/eller behandlingen med formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og settene ifølge oppfinnelsen for andre sykdommer og forstyrrelser forbundet med en

ubalanse i RANKL/RANK/OPG-rekasjonsveien. Slike sykdommer og forstyrrelser inkluderer, men er ikke begrenset til, osteoporose, inflammatoriske tilstander, autoimmune tilstander, astma, revmatoid artritt, multippel sklerose, multippel myelom (Sordillo and Pearse 2003, Cancer 97 (3 Suppl): 802-812; Vanderkerken et al. 2003, Cancer Res. 63: 287-289); vaskulære sykdommer (Anandarajah and Schwarz 2006, J. Cell Biochem. 97: 226-232) og kardiovaskular sykdom (Lewiecki 2006, Expert Opin. Biol. Ther. 6: 1041-1050).

[0179] Også tilveiebrakt av den foreliggende oppfinnelsen er forebyggingen og/eller behandlingen med formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og settene ifølge oppfinnelsen av sykdommer og forstyrrelser forbundet med osteopetrose så som osteopetrosis tarda, osteopetrosis congenita og marmorbensykdom.

[0180] Sykdom og forstyrrelser forårsaket av avvikende uttrykking og/eller aktivitet, så som overdreven IL-6-produksjon eller signalering inkluderer sepsis (Starnes et al., 1999) og forskjellige former for kreft så som multippel myelomsykdom (MM), nyrecellekarsinom (RCC), plasmacelleleukemi (Klein et al., 1991), lymfom, B-lymfoproliferativ forstyrrelse (BLPD) og prostatakreft. Ikke-begrensede eksempler på andre sykdommer forårsaket av unormal uttrykking og/eller aktivitet, så som overdreven IL-6-produksjon eller signalering inkluderer benresorpsjon (osteoporose) (Roodman et al., 1992; Jilka et al., 1992), kakeksi (Strassman et al., 1992), psoriasis, mesangial proliferativ glomerulonefritt, Kaposi sarkom, AIDS-relatert lymfom (Emilie et al., 1994), inflammatoriske sykdommer og forstyrrelser så som revmatoid artritt, systemisk utbrudd av juvenil idiopatisk artritt, hypergammaglobulinemi (Grau et al., 1990), Crohns sykdom, ulcerøs kolitt, systemisk lupus erytematose (SLE), multippel sklerose, Castlemans sykdom, IgM-gammopati, kardial myksom, astma (særlig allergisk astma) og autoimmun insulinavhengig diabetes mellitus (Campbell et al., 1991).

[0181] Sykdommer og forstyrrelser forbundet med heterodimere cytokiner og deres reseptorer inkluderer inflammasjon og inflammatoriske forstyrrelser så som tarmsykdommer (kolitt, Crohns sykdom, IBD), infeksjonssykdommer, psoriasis, kreft, autoimmune sykdommer (så som MS), sarkoidose, transplantatavstøtning, cystisk fibrose, astma, kronisk obstruktiv lungesykdom, revmatoid artritt, viral infeksjon, vanlig variabel immunsykt.

[0182] Formuleringene, beholderne, de farmasøytiske enhetsdosene og settene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan også med fordel benyttes i kombinasjon med én eller flere andre terapier (f.eks. ett eller flere andre profylaktiske eller terapeutiske midler), fortrinnsvis terapier som er nyttige i forebyggingen, behandlingen og/eller håndteringen av (samme eller en annen) sykdommen eller forstyrrelsen. Når en eller flere andre terapier (f.eks. profylaktiske eller terapeutiske midler) anvendes kan de administreres separat, i hvilken som helst hensiktsmessig form, og ved hvilken som

helst egnet vei. Terapeutiske eller profylaktiske midler inkluderer, men er ikke begrenset til, små molekyler, syntetiske legemidler, peptider, polypeptider, proteiner, nukleinsyrer (f.eks. DNA- og RNA-nukleotider, inkludert, men ikke begrenset til, antisensenukleotidsekvenser, triple helikser, RNAi, og nukleotidsekvenser som koder for biologisk aktive proteiner, polypeptider eller peptider), antistoffer, andre enkle variable domener, syntetiske eller naturlige uorganiske molekyler, mimetiske midler og syntetiske eller naturlige, organiske molekyler. Enhver terapi/behandling (f.eks. profylaktiske eller terapeutiske midler) som er kjent for å være nyttig, eller som er blitt anvendt eller for tiden anvendes for forebygging, behandling og/eller håndtering av ett eller flere symptomer forbundet med en spesifikk sykdom eller forstyrrelse, kan anvendes i kombinasjon med formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen i samsvar med oppfinnelsen beskrevet i dette dokumentet.

[0183] En formulering ifølge oppfinnelsen kan administreres til et pattedyr, fortrinnsvis et menneske, samtidig med en eller flere andre terapier (f.eks. en eller flere andre profylaktiske eller terapeutiske midler). Uttrykket "samtidig" begrenses ikke til administreringen av profylaktiske eller terapeutiske midler/terapier på nøyaktig samme tid, men i stedet er det ment at formuleringen ifølge oppfinnelsen, og det andre midlet/terapien administreres til et pattedyr i en sekvens og i løpet av et tidsintervall slik at polypeptidet som inneholdes i formuleringen kan virke sammen med det andre midlet/terapien for å tilveiebringe et økt utbytte enn om de ble administrert på annen måte. For eksempel kan formuleringen ifølge oppfinnelsen og det ene eller de flere andre profylaktiske eller terapeutiske midlene administreres samtidig eller sekvensielt i hvilken som helst rekkefølge ved forskjellige tidspunkter; hvis de imidlertid ikke administreres samtidig bør de administreres tilstrekkelig nær i tid for derved å gi den ønskede terapeutiske eller profylaktiske effekten.

[0184] Når den anvendes i kombinasjon med andre terapier (f.eks. profylaktiske og/eller terapeutiske midler), kan formuleringene ifølge oppfinnelsen og den andre terapien virke additivt eller synergistisk. Oppfinnelsen omfatter administrering av en formulering ifølge oppfinnelsen i kombinasjon med andre terapier (f.eks. profylaktiske eller terapeutiske midler) ved den samme eller forskjellige administreringsveier, f.eks. oralt og parenteralt.

[0185] Forskjellige leveringssystemer er kjente og kan anvendes til å administrere formuleringen ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Fremgangsmåter for administrering av formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen inkluderer, men er ikke begrenset til, parenteral administrering (f.eks. intradermal, intramuskulær, intraperitoneal, intravenøs og fortrinnsvis subkutan), epidural administrering, topisk administrering, og mukosal administrering (f.eks. intranasale og orale veier). I en spesifikk utførelsesform administreres de flytende formuleringene ifølge den foreliggende oppfinnelsen parenteralt.

[0186] Oppfinnelsen vil nå bli ytterligere beskrevet ved hjelp av de følgende ikke-begrensende foretrukne aspektene og eksempler:

EKSEMPLER

5

Eksempel 1: Formulerings- og stabilitetsstudier med RANKL008a

Eksempel 1.1: Materialer og fremgangsmåter i studien

1.1.1 Enkle variable domener

10 **[0187]** RANKL008a (SEQ ID NO: 4;
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGRFVS
SITGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNANKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAAYIRP
DTYLSRDYRKYDYWGQGTLVTVSS
GGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGK
15 GLEWVSSISGSGSDTLYADSVKG
RFTISRDNAAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGGS
GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLR
LSCAASGFTFSSYPMGWFRQAPGKGRFVSSITGSGGSTYYADSVKGRFTISR
NAKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYC
20 AAYIRPDYLSRDYRKYDYWGQGTLVTVSS) har blitt beskrevet som SEQ ID
NO: 759 i WO 2008/142164. RANKL008a er et treverdig bispesifikt nanolegeme
bestående av tre humaniserte variable domener av et tungkjede-Ilama-antistoff, hvorav
to identiske underenheter er spesifikke for binding til RANKL mens den resterende
underenheten binder til HSA. Underenhetene fusres hode-til-hale med en G/S-linker i
25 det følgende formatet: RANKL13H5-9GS-Alb8-9GS-RANKL13H5.

[0188] RANKL008a ble uttrykt i *Pichia pastoris* og renses på SP Sepharose som et
fangetrinn og et Q-filter som et poleringstrinn eller på SP Sepharose som et fangetrinn
og Capto MMC som et poleringstrinn eller alternativt ved å anvende et ProtA-
fangsttrinn etterfulgt av og SP-sefarosepuleringstrinn. Konsentrasjonen av nanolegemet
30 og bufferbryteren til PBS, 10 mM fosfat + 100 mM NaCl, 10 mM fosfat + 5 %
mannitol eller 10 mM fosfat + 115 mM NaCl eller andre buffere ble gjort via UF/DF
eller ved dialyse. En endelig filtrering på et 0,22 µm filter ble utført. De forskjellige
satsene av RANKL008a varierte i konsentrasjon fra 143 til 62,8 mg/ml. De fleste
satsene ble fremstilt i konsentrasjoner på rundt 60-85 mg/ml.

1.1.2 Andre reagenser

35 **[0189]** Alle reagensene som anvendes i studien er standard kjemiske reagenser av
høyeste renhet. Den fullstendige sammensetningen av D-PBS var 137 mM NaCl,
2,7 mM KCl, 10 mM dibasisk natriumfosfat, 2 mM monobasisk kaliumfosfat.

1.1.3 Utstyr og kolonner for testing

[0190] HPLC-forsøkene ble utført på et Agilent 1200-serieinstrument fra Agilent Technologies (Palo Alto, USA). Kolonnene som ble anvendt var:

- 5 • RP-HPLC: Zorbax 300SB-C3-5 mikron;
- SE-HPLC: TSKgel G2000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Japan);
- IEX-HPLC: Dionex Propac_wCX-10-kolonne;

[0191] Konsentrasjonen av de rensede RANKL008a-satsene ble bestemt ved
10 spektroskopi ved 280 nm ved anvendelse av enten et Nanodrop ND-1000 (Thermoscientific), eller et Uvikon 943-spektrofotometer (Kontron Instruments) eller et Eppendorf-biofotometer 613.

[0192] Partikkelstørrelsesfordelingen ble målt på en PAMAS SVSS-C-partikkelteller (PARTikelMess-und AnalyseSysteme GMBH).

15 **[0193]** For styrkemålinger ble det anvendt et Biacore 3000 (GE Healthcare). De Elisa-baserte styrkeanalysene ble utført ved anvendelse av standard laboratorieutstyr og plateleserinstrumentering.

[0194] Osmolalitetmålingen ble utført med en osmometermodell 3320 fra Advanced
instruments.

20

1.1.4 Hemming av ELISA for RANKL-styrkemåling

[0195] RANKL008a interagerer med human (løselig) reseptoraktivator av
kjernefaktor-kappa B-ligand (RANKL) og blokkerer interaksjonen av denne liganden
med sin humane reseptoraktivator av kjernefaktor-kappaB (RANK), og forebygger
25 dermed signalisering gjennom denne reseptoren. Styrken på RANKL008a ble målt ved
en ELISA-basert hemmingsanalyse som tillater vurdering av den relative styrken på de
RANKL-bindende delene av en ukjent sats av RANKL008a relativt til en referansesats.

[0196] For referanse-, kontroll- og testprøvene ble det fremstilt forskjellige
fortynninger av nanolegemer. Disse fortynningene ble forhåndsinkubert med en
30 konstant mengde på 5 ng/ml løselig RANKL og en konstant mengde på 200 ng/ml
RANK-Fc. Deretter ble denne blandingen overført til en mikrotiterplate belagt med et
ikke-blokkerende anti-Fc-nanolegame. Etter vasking ble det gjenværende bundne
RANKL detektert med et polyklonalt biotinyler anti-humant RANKL-antistoff,
etterfulgt av pepperrotperoksidase (HRP)-merket streptavidindeteksjon.

35 **[0197]** Den relative styrken for testprøvene sammenlignet med referanseprøvene ble
analysert ved anvendelse av PLA 2.0 Software (Stegmann Systems).

1.1.5 ELISA for HSA-binding

[0198] Den relative styrken til HSA-bindingsenheden i RANKL008a ble målt ved en ELISA. Kort fortalt ble HSA belagt på en plastisk flerbrønners Maxisorp ELISA-plate ved adsorpsjon. Etter blokkering av overskytende bindingssteder på platene med Superblock T20, ble en fortynningsserie av referansene, kontroll- og testprøvene påført på platen. Et bundet nanolegeme ble senere oppdaget ved hjelp av et toverdig anti-nanolegeme, direkte konjugert til pepperrotperoksidase (HRP).

[0199] Den relative styrken for testprøvene, sammenlignet med referanseprøvene ble analysert ved anvendelse av PLA 2,0 programvaren (Stegmann Systems).

1.1.6 Renhetsanalysen av RANKL008a etter størrelsesutelukkelses høytytelsesvæskerkromatografi (SE-HPLC)

[0200] SE-HPLC-analysen besto av en forhåndspakket silikagel TSKgel G2000SW_{XL}-kolonne, en mobil fase bestående av KCl, NaCl og fosfatbuffer pH 7,2 (D-PBS) og UV-deteksjon ved 280 nm. Den relative mengden av det spesifikke proteinet, variant, eller urenheter uttrykt som areal-%, ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer det spesifikke proteinet eller til hvilken som helst proteinurenhet av det totale arealet av alle de integrerte toppene.

1.1.7 Renhetsanalyse av RANKL008a ved reversfase høytytelsesvæskerkromatografi (RP-HPLC)

[0201] I RP-HPLC-analysen ble det anvendt en Zorbax 300SB-C3-kolonne (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Den relative mengden av en spesifikk proteinurenhet ble bestemt ved å måle den lette absorbansen av komponentene som elueres fra RP-HPLC-kolonnen. Den relative mengden av det spesifikke proteinet, varianten eller urenheterne uttrykt som areal-%, ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer det spesifikke proteinet, eller hvilken som helst proteinurenhet av totalarealet av alle de integrerte toppene.

1.1.8 Renhetsanalyse av RANKL008a ved ionebyttehøytytelsesvæskerkromatografi (IEX-HPLC)

[0202] IEX-HPLC-analysen kombinerte anvendelsen av en forhåndspakket Dionex ProPac WCX-10-svak kationbytterkolonne, en mobil fase bestående av citratbuffer pH 5,5 og UV-deteksjon ved 280 nm. Etter lasting av proteinet/proteinene på kolonnen, ble de bundne materialene eluert med en natriumkloridgradient. Den relative mengden av det spesifikke proteinet, varianten, eller urenheter uttrykt som areal-%, ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer det spesifikke proteinet, eller hvilken som helst proteinurenhet av det totale arealet av alle de integrerte toppene.

1.1.9 Relativ styrkebesluttomhet på Biacore

[0203] RANKL eller HSA ble immobilisert på Biacore-brikken (aminkobling ved hjelp av Biacore-aminkoblingssettet). Etter et forbehandlingstrinn med 5 injeksjoner av RANKL008a, ble alle prøvene fortynnet til 2,5 nM i triplikat og analysert på brikken. Skråningene ble bestemt ved hjelp av den generelle passformmetoden og den lineære tilpasningsmodellen (BIA-evalueringsprogramvaren). For å bestemme den innledende bindingsraten (IBR), ble skråningen mellom 5 s og 30 s valgt. Verdiene av disse skråningene ble overført i Excel og den prosentvise aktiviteten/styrken sammenlignet med RANKL008a-referansematerialet ble bestemt. Biacore-styrken uttrykkes dermed som relativ styrke sammenlignet med referansematerialene.

Eksempel 1,2: Stabilitet av nanolegemet i forskjellige buffere etter forskjellige fryse/tine-sykluser

[0204] En fryse/tine-stabilitetsstudie ble utført for å bestemme effekten av gjentagende frysing og tining på gjenvinning, fysisk stabilitet og kjemisk stabilitet av RANKL008a. Alikvoter av sats RANKL008a formulert ved ~ 60-85 mg/ml i bufferne 1-12 gitt i tabell 1 ble underkastet 10 fryse/tine-sykluser (F/T-sykluser) ved -20 °C. En F/T-syklus defineres ved frysing av prøven i 1 time i en fryser ved -20 °C etterfulgt av tining ved romtemperatur i 30 minutter. De belastede prøvene ble sammenlignet med referansematerialet (lagret ved 4 °C) ved anvendelse av SE-HPLC (figur 1 (A); representativt figuren av forsøkene utført i fosfatbuffer), RP-HPLC (figur 2; representativt figuren av forsøkene utført i fosfatbuffer) og ELISA-styrkeanalysene (tabell 2). Alle andre data av fryse-tineforsøkene viser lignende mønstre som gitt i figurene 1 og 2 (med unntak av figur 1 (B), se nedenfor).

[0205] Å utsette RANKL008a for 10 F/T-sykluser hadde ingen signifikant effekt på dens stabilitet: SE-HPLC- og RP-HPLC-profilene var sammenlignbare mellom referansesatsene og materialet som utsettes for flere fryse/tine-sykluser. Det var ingen reduksjon i det totale overflateområdet, og ingen nye topper ble dannet, med unntak av 20 mM L-histidin ved pH 5,5 + 10 % mannitol og 20 mM L-histidin ved pH 6 + 10 % mannitol, der hovedtoppen hadde en svært liten skulder i SE-HPLC-kromatogrammene (figur 1 (B) som viser dataene ved pH 5,5, og der den mindre skulderen på hovedtoppen indikeres med en pil). I tabell 3 og tabell 4 inkluderes dataene for integreringen av de forskjellige toppene (uttrykt som % overflateareal) i henholdsvis SE-HPLC- og RP-HPLC-analysen. Disse dataene viser at det ikke skjer noen endringer i profilene etter 10 fryse-tine-sykluser.

[0206] Analyse av ELISA-styrkeanalysene indikerte ikke noe tap av aktivitet etter gjentagende frysing og tining i alle formuleringer, bortsett fra i 20 mM histidin, ved pH 5,5 + 10 % mannitol, der det syntes å være en nedre RANKL- og HSA-bindingsstyrke.

Eksempel 1.3: Stabilitet av nanolegemet i forskjellige buffere ved lagring ved 37 °C i opptil 10 uker

[0207] RANKL008a ble formulert i forskjellige buffere ved ~ 60-85 mg/ml (buffere 1-12 er gitt i tabell 1). Stabiliteten til de forskjellige prøvene ble undersøkt i akselererte belastningsforhold ved 37 °C ± 3 °C. Prøvene ble tatt etter 2, 3, 5 og 10 ukers lagring ved denne temperaturen, og ble analysert ved anvendelse av SE-HPLC, RP-HPLC og IEX-HPLC. Biacore ble utført på prøvene som er lagret i 10 uker for å vurdere tap i styrke.

1.3.1 SE-HPLC-analyse

[0208] Resultatene av analysen av en prøve av SE-HPLC er gitt i figur 3 der et eksempel er vist for prøven lagret i to uker ved 37 °C i nærværet av 50 eller 100 mM salt eller 10 % mannitolfosfatbuffer. Lagring ved 37 °C resulterte i dannelsen av en klar førtoppeluering ved rundt 40 minutter og noen mindre ettertopper nær hovedtoppen; etter 60 minutters elueringstid (se innskuddet i figur 3) kunne noen nedbrytningsfragmenter observeres. I tabell 3 oppsummeres integreringsdataene for alle de analyserte prøvene for de forskjellige observerte toppene (unntatt topper etter 60 minutter elueringstid). Toppområdet av førtoppen økte over tid, men ble redusert ved tilsetningen av mannitol til bufferen (tabell 3). Ettertoppene etter 60 minutters elueringstid korresponderte med nedbrytningsprodukter (på grunn av gjenværende proteolytisk aktivitet i prøven). Det relative arealet (%) av disse toppene økte bare litt, noe som tyder på at nedbrytningen var begrenset til et minimum.

[0209] Førtoppen representerte den dimere formen av RANKL008a.

Toppoverflatearealet av førtoppen økte med lagringstiden (tabell 3) og ble ledsaget av en samtidig reduksjon i overflatearealet til hovedtoppen (tabell 3). Tilbøyeligheten til å danne dimere var betydelig lavere i formuleringene som inneholdt 10 % mannitol, som syntes å ha en positiv effekt i å undertrykke dimeriseringsprosessen. Legg merke til de betydelige lavere mengdene av dimere observert i acetat- og histidinbufferne (pH 5,5) inneholdende 10 % mannitol (tabell 1 og figur 4). Figur 4(A) oppsummerer % overflatearealet for hovedtoppen i de forskjellige bufferne og ved forskjellige tidspunkt når de lagres ved 37 °C. Figur 4(B) oppsummerer dataene for % førtoppen (dimer).

1.3.2 RP-HPLC-analyse

[0210] Et representativt RP-HPLC er gitt i figur 5 der RP-HPLC-kromatogrammet av en RANKL008a prøve lagret i fosfatbuffer med forskjellige konsentrasjoner av salt eller 10 % mannitol er representert. RP-HPLC-profilene av RANKL008a formulert i de 12 forskjellige bufferne var sammenlignbare med denne figuren. I tabell 4 oppsummeres integrasjonsdata for de forskjellige detekterte toppene. I figur 5 viser

innsettingen en zoom på hovedtoppen der de to førtoppene kan skilles, mens ettertoppen som er fullstendig løst fra basislinjen fra hovedtoppen er pyroglutamatvarianten av RANKL008a der den N-terminale glutaminsyren er blitt omdannet til pyroglutamatformen.

5 **[0211]** Det var to forskjeller mellom RP-HPLC-profilene av referansesatsen og lagringsprøvene. For det første økte pyroglutamattoppen med økt inkubasjonstid og ble mer tydelig i fosfatbuffer ved pH 7 enn ved pH 5,5 eller pH 6. Derne ble en førtopp dannet som funksjon av lagringstid. Overflatearealet av denne toppen var høyere i fosfatbufferen.

10 **[0212]** Det var ingen forskjeller i RP-HPLC-profilene av prøvene uten eller med mannitol.

1.3.3 IEX-HPLC-analyse

15 **[0213]** Et representativt IEX-HPLC-kromatogram av RANKL008a lagret i 2 uker i fosfatbuffer med forskjellige saltkonsentrasjoner eller 10 % mannitol er avbildet i figur 6. Det innfelte viser en zoom inn på hovedtoppen der en mindre ettertopp 1 og en mer betydelig ettertopp 2 er observert. Resultatene fra analysen av de forskjellige prøvene ved IEX-HPLC er gitt i tabell 5 og figur 7.

20 **[0214]** Den første ettertoppen utgjorde maksimalt 4,5 % av det totale toppoverflatearealet. Overflatearealet for denne toppen var det høyeste i fosfatbuffer, og det laveste eller selv fraværende i de mannitolholdige bufferne. Topparealet for den andre toppen på den annen side var betydelig, men likevel betydelig lavere i bufferne som inneholder 10 % mannitol (figur 7). Materialet som elueres i ettertoppen ble oppsamlet ved fraksjonsoppsamling og re-kromatografert på SE-HPLC-kolonnen som
25 beskrevet ovenfor. Denne ettertoppen 2 eluerer i SE-HPLC-kromatogrammet ved dimerposisjonen som viser at i) denne dimeren ikke dissosierer under disse forholdene, og at ii) denne dimeren eluerer senere på IEX-HPLC-kolonnen. Derfor kan vi konkludere med at førtoppen 2 er den dimeriserte formen av RANKL008a.

1.3.4 Biacore-styrkeanalyse av RANKL008a lagret ved 37 °C

30 **[0215]** RANKL- og HSA-binding av RANKL008a i stabilitetsprøver lagret i 10 uker ved 37 °C ble sammenlignet med aktiviteten til den ubelastede referansesatsen ved anvendelse av Biacore-analyse. De relative potensene er gitt i tabell 6, og uttrykkes som % aktivitet i forhold til referansesatsen.

35 **[0216]** Etter 10 ukers lagring ved 37 °C hadde den relative styrken av RANKL008a for binding av RANKL falt til 70-80 % i de forskjellige bufferne (tabell 6). I histidin ved pH 6 + 10 % mannitol, forble aktiviteten den høyeste (87,4 %). Jo høyere NaCl-konsentrasjonen i bufferen var, jo lavere var den relative styrken i prøven (sammenlign verdiene oppnådd i buffere med 50 mM NaCl og 100 mM NaCl i tabell 6).

[0217] Den relative styrken for HSA-binding hadde falt mer sammenlignet med aktiviteten for RANKL-bindingen etter 10 ukers lagring ved 37 °C. Denne reduksjonen i aktivitet var imidlertid mindre betydelig i de mannitolholdige bufferne enn i de NaCl-holdige bufferne. Som observert for RANKL-bindingen sank den prosentvise aktiviteten av HSA med økende konsentrasjoner av NaCl i de forskjellige bufferne.

Eksempel 1.4: Osmolalitetmåling for nanolegemene i de forskjellige bufferne

[0218] Osmolalitetmålingene ble utført på de forskjellige formuleringene som anvendes i stabilitetsstudiene:

RANKL008a i 10 mM fosfat/10 % mannitol:	635 mOsm/kg
RANKL008a i 10 mM acetat/10 % mannitol:	643 mOsm/kg
RANKL008a i 20 mM L-histidin ved pH 5,5/10 % mannitol:	712 mOsm/kg
RANKL008a i 20 mM L-histidin ved pH 6,0/10 % mannitol:	667 mOsm/kg
RANKL008a i 10mM acetatbuffer ved pH 5,5/100 mM NaCl:	272 mOsm/kg

[0219] RANKL008a i 10 mM fosfat/5 % mannitol: 389 mOsm/kg
Formuleringer inneholdende 10 % mannitol var hypertoniske.

Eksempel 1.5: Stabilitet av nanolegemene under mekanisk belastning

[0220] Mekaniske belastningsforsøk ble utført på RANKL008a (62,2 mg/ml) i 10 mM fosfatbuffer ved pH 7,0 med 115 mM NaCl. RANKL008a-prøven ble fortynnet (i 10 mM fosfatbuffer ved pH 7,0 med 115 mM) eller ufortynnet med og uten 0,01 % Tween 80. Prøvene ble ristet, omrørt, rotert og presset gjennom en nål med en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml opptil 50 ml sprøyte) som følger:

- fortynnes til 5 mg/ml eller ufortynnet og ristet (10 s - 1 min);
- presses gjennom en sprøyte (3 ml) med en 25G nål (ufortynnet) (10x);
- roteres (10 opm) på en ende-over-endeblender i 2 dager ved romtemperatur (ufortynnet)
- omrøres i 1 time ved romtemperatur i 2 dager ved 5 °C (fortynnet til 5 mg/ml)

De forskjellige prøvene ble sammenlignet visuelt for eventuelle forskjeller i utseende.

[0221] Sterk risting for en kort tid (10 s) forårsaket sterk skumming av prøvene i fravær av Tween 80, den fortynnede prøven ble meget ugjennomsiktig (figur 8), mens dette var mindre uttalt for den ufortynnede prøven. I nærværet av Tween 80 ble ikke

denne opasiteten observert.

[0222] Den ufortynnede RANKL008a-prøven med og uten 0,01 % Tween 80 ble presset 10 ganger gjennom en nål (25G) med en 3 ml sprøyte. Prøven uten Tween 80 ble ugjennomsiktig, det dannet seg også skum og små luftbobler var synlige når vialen ble tappet, i vialen med 0,01 % Tween 80 var opasiteten begrenset.

[0223] Den ufortynnede RANKL008a-prøven, med eller uten 0,01 % Tween 80 ble rotert i 2 dager ved 10 rpm. Begge prøvene var klare.

[0224] Den fortynnede (til 5 mg/ml) RANKL008a-prøven, med eller uten 0,01 % Tween 80 ble omrørt i 1 time ved romtemperatur og ytterligere i 2 dager ved 5 °C. De visuelle observasjonene er som følger: omrøring i 1 time ved romtemperatur induserte en opasitet som ikke ble observert i nærværet av 0,01 % Tween 80. Etter omrøring i 1 time ved romtemperatur ble prøven uten Tween 80 lett gjennomsiktig, mens prøven med Tween 80 ble klar. Etter 2 dagers omrøring ved 5 °C var begge prøvene ugjennomsiktige, men opasiteten i prøven uten Tween 80 var høyere.

[0225] Med tilsetningen av 0,01 % Tween 80 var RANKL008a-prøven mindre eller ikke ugjennomsiktig etter mekanisk belastning, og det var mindre skumdannelse. Dette indikerer at prøven er mindre utsatt for denaturering ved luft-vann-grenseflaten hvis Tween 80 tilsettes.

Eksempel 1.6: Sprøytbarhet av de forskjellige nanolegemeformuleringene

[0226] Effekten av anvendelse av forskjellige fortynningsmidler, - dvs. saltløsning, fosfatbuffer uten Tween 80 eller fosfatbuffer med Tween 80 - på innhold, visuelt utseende og styrke av RANKL008a ved lav konsentrasjon (0,28 mg/ml) ble bestemt etter passering gjennom forskjellige sprøyter og nåler. RANKL008a ble fortynnet i forskjellige fortynningsmidler, etterfulgt av passasje eller 24 t lagring i sprøyter (Becton Dickinson) (figur 9). Figur 9 inneholder forklaringer til de forskjellige prøvene som genereres i løpet av dette forsøket der de følgende kodene anvendes:

S25/0: lagring ved 25 °C i 0 minutter

S25/24: lagring ved 25 °C i 24 timer

-TW: buffer minus Tween 80

+TW: buffer + Tween 80

PLACEBO refererer til den følgende bufferen: 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,0 + 115 mM NaCl

TUB: prøven som er lagret i et polystyrenrør

[0227] Visuell inspeksjon og innholdsbestemmelse av RANKL008a etter fortynning i forskjellige fortynningsmidler og passasje/lagring i sprøyter er gitt i tabell 7. Data for turbiditetsmåling ved 320 og 350 nm er gitt i figur 10. Den relative HSA- og RANKL-styrken av RANKL008a etter fortynning i forskjellige fortynningsmidler og

passasje/lagring i sprøyter er vist i figur 11.

[0228] Passering gjennom en sprøyte økte turbiditeten litt når man anvendte 10 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl (pH 7,0). Fortynning i saltløsning forårsaket et fall i RANKL/HSA-bindingsaktiviteten på 18-34,0 %. En lignende effekt ble observert ved
 5 anvendelse av 10 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl (pH 7,0) uten Tween 80, dvs. et fall på 15-27 %. I motsetning til dette så ikke fortynning i 10 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl (pH 7,0) med Tween 80 ut til å ha en dramatisk effekt og bekrefter den fordelaktige rollen til Tween 80 i bufferen.

10 **Eksempel 1.7: Stabilitet av nanolegemeformuleringer under sprøytepassasje med forskjellig nålestørrelse**

[0229] Effekten av sprøytepassasje på visuelt utseende av RANKL008a ved hjelp av forskjellige nålestørrelser og nålstørrelsekombinasjoner ble evaluert. RANKL008a ble fortynnet i et Eppendorf-rør (TUB) i 10 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, 0,01 % Tween
 15 80 (v:v), (pH 7,0) til en sluttkonsentrasjon på 0,28 mg/ml, etterfulgt av en enkel passasje gjennom en 1 ml Becton Dickinson sprøyte utstyrt med forskjellige nåler (dvs. Terumo 18G, 23G, 27G og 30G) (figur 12). I denne figuren og tabell 8 gjelder de følgende kodene:

+TW: buffer + Tween 80

20 PLACEBO refererer til følgende buffer: 10

mM Na_2HPO_4 pH 7,0 + 115 mM NaCl

TUB: prøve lagret i et polystyrenrør

18G/18G: prøve trekkes inn med en 18G-nål og trykkes ut med en 18G nål

18G/27G: prøve trekkes inn en 18G nål og trykkes ut med en 27G nål

25 All annen koding er lik de to eksemplene som er gitt ovenfor.

[0230] Turbiditeten ble bestemt ved visuell inspeksjon og ved måling av absorpsjonen ved bølgelengder på 320 nm, 340 nm, 350 nm og/eller 500 nm, og bestemmelse av forholdet mellom den oppnådde verdien over absorpsjonen ved A278 nm

30 (hovedsakelig 320/278 og 350/278). Et forhold på $>0,05$ ble betraktet som signifikant. Visuell inspeksjon, innhold og turbiditet av RANKL008a før (TUB) og etter passasje gjennom sprøyter med forskjellig nålstørrelse er vist i tabell 8.

[0231] I et ytterligere forsøk ble RANKL008a utsatt for enkel passasje gjennom en 1 ml sprøyte utstyrt med forskjellige nålstørrelser (dvs. 27G og 29G) begge ufortynnet
 35 (65 mg/ml) og fortynnet i 10 mM Na_2HPO_4 , 115 mM NaCl, 0,01 % Tween 80 (v:v), (pH 7,0) til en sluttkonsentrasjon på 0,28 mg/ml (figur 13). Visuell inspeksjon, innhold og turbiditet av RANKL008a før (TUB) og etter passasje gjennom sprøyter med forskjellig nålstørrelse er vist i tabell 9.

[0232] I tabell 9 og figur 13 ble de følgende kodene anvendt:

+ TW: buffer + Tween 80

PLACEBO refererer til følgende buffer: 10 mM Na₂HPO₄ pH 7,0 + 115 mM NaCl

TUB: prøve lagret i et polystyrenrør

27G/27G: prøve trekkes inn med en 27G nål og trykkes ut med en 27G nål

5 29G/29G: trekkes inn med en 29G nål og trykkes ut med en 29G nål

T: Terumo needle, B Becton Dickinson-nål

0028 refererer til konsentrasjonen på 0,28 mg/ml, 6500 til rundt 65 mg/ml

10 **[0233]** Forskjellige kombinasjoner av nålstørrelser hadde ikke en betydelig effekt på RANKL008a-gjenvinning eller prøveturbiditet begge ved lav (0,28 mg/ml) og høy (62,8 mg/ml) konsentrasjon (opptil henholdsvis målstørrelsene 29 og 27). I begge forsøkene var turbiditetsverdiene lave (<0,05).

Eksempel 2: Formulerings- og stabilitetsstudier med nanolegemer som binder IL-6R

15

Eksempel 2.1: Materialer og fremgangsmåter som anvendes i studien

2.1.1 Enkle variable domener

20 **[0234]** Tre nanolegemer som ble anvendt i denne studien er blitt beskrevet i PCT-søknad nr. PCT/EP2010/054764 til Ablynx N.V.. IL6R304 er et bispesifikt nanolegeme som består av to humaniserte variable domener av et tungkjeden-Ilama-antistoff, ett binder til et IL-6R, og det andre (Alb8) binder til HSA. De treverdige bispesifikke nanolegemene IL6R305 og IL6R306 består av to identiske underenheter som er spesifikke for IL-6R, mens den tredje underenheten binder til HSA. Oppbyggingen av underenhetene er forskjellig i IL6R305 og IL6R306 (se tabell C-27 i

25 PCT/EP2010/054764). Underenhetene i alle de tre nanolegemene fuseres hode-til-hale med en 9G/S-linker. Sekvensene og egenskapene til de tre nanolegemene er gitt i tabell 10.

30 **[0235]** Nanolegemene ble uttrykt i *Pichia pastoris*. Konsentrasjonen av nanolegeme- og bufferbyttet til PBS eller annen formuleringsbuffer ble gjort via UF/DF (Sartorius Hydrosart Sartocon Slice 200, 10 kDa). En endelig filtrering ble utført ved 0,22 µm. En oversikt over de forskjellige IL-6R-nanolegemesatsene er gitt i tabell 11.

[0236] De ubelastede prøvene i PBS eller andre formuleringer ble anvendt som referansemateriale for å analysere lagringsstabilitetsprøvene.

2.1.2 Andre reagenser

35 **[0237]** Reagenser anvendt i studien er gitt i tabell 12. Den fullstendige sammensetningen av D-PBS var 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM dibasisk natriumfosfat, 2 mM monobasisk kaliumfosfat.

2.1.3 Utstyr og fremgangsmåter for målinger

[0238] HPLC-forsøkene ble utført på et Agilent 1200-serieinstrument fra Agilent Technologies (Palo Alto, USA) eller på et Dionex Ultimate 3000-instrument. Kolonnene som ble anvendt var:

- RP-HPLC: Zorbax 300SB-C3 5-mikron, 4,6 X 150 mm (Agilent, kat. nr. 883995-909) eller Zorbax 300SB-C8 5-mikron, 4,6 X 150 mm (Agilent, kat. nr. 883995-906);
- SE-HPLC: Phenomenex BioSep SEC S2000 (00H-2145-KD)

[0239] Konsentrasjonsbestemmelser av nanolegemene ble gjort med NanoDrop ND-1000 (Thermoscientific), med et Uvikon 943-spektrofotometer (Kontron Instruments) eller med et Eppendorf-biofotometer 6131 ved 280 nm.

[0240] Partikkelstørrelsesfordelingen ble målt på en PAMAS SVSS-C-partikkelteller (PartikelMess- und AnalyseSysteme GMBH).

[0241] Osmolalitmålingen ble gjort med et osmometer av modell 3320 fra Advanced instruments.

[0242] For måling av bindingsaktiviteten ble Biacore 3000 (GE Healthcare) anvendt.

[0243] Den termiske skiftanalysen (TSA) ble utført på en LightCycler480 Q-PCR-enhet (Roche).

[0244] For bestemmelse av T_m-en ble et automatisert VP-kapillær differensielt skanningskalorimeter (DSC, Microcal) anvendt.

2.1.4 Renhetsanalyse av IL-6R-nanolegemene ved størrelsesutelukkelssesvæskeskromatografi (SE-HPLC)

[0245] SE-HPLC-analysen besto av en forhåndspakket Phenomenex BioSep SEC S2000-kolonne, en mobil fase bestående av KCl, NaCl og fosfatbuffer ved pH 7,2 (D-PBS) og UV-deteksjon ved 280 nm. Den relative mengden av spesifikk proteinurenhet ble uttrykt som areal-%, og ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer proteinurenheten med det totale integrerte området.

[0246] Fremgangsmåten kan løse og kvantifisere de relative mengdene av intakt materiale og produktrelaterte urenheter så som aggregater og nedbrytningsfragmenter.

2.1.5 Renhetsanalyse av IL-6R-nanolegemer ved reversfasehøytytelsesvæskeskromatografi (RP-HPLC)

[0247] I RP-HPLC-analysen ble det anvendt en Zorbax 300SB-C3 eller Zorbax 300SB-C8-kolonne (Agilent Technologies, Palo Alto, USA) ved forhøyede temperaturer. Med C3-kolonnen bestod mobil fase A av 0,1 % TFA og mobil fase B bestod av 0,1 % TFA i ACN/isopropanol. Med C8-kolonnen bestod mobil fase A av

0,1 % TFA og mobil fase B bestod av 0,1 % TFA i 1-propanol. Den relative mengden av en spesifikk proteinurenhet ble bestemt ved å måle lysabsorbansen (280 nm) av komponentene som elueres fra RP-HPLC-kolonnen. Den relative mengden av en spesifikk proteinurenhet, uttrykt som areal-%, ble beregnet ved å dele topparealet som
5 tilsvarer forurensningen på det totale integrerte området.

2.1.6 Måling av partikkelstørrelsesfordeling (PAMAS)

[0248] Målene på PAMAS SVSS-C-partikkeltelleren ble utført som følger: 100 µl prøve ble fortynnet 1/10 i 1 ml MilliQ -ann og 10 påfølgende målinger ble utført på alle
10 16 kanalene (innstilt diameter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 50, 100, 150 og 200 µm). For beregning av gjennomsnittsverdien ble de første 2 målingene utelukket og det ble tatt hensyn til fortynningsfaktoren. Resultatene er gitt som kumulative data (totale partikkeltellinger >x µm) eller differensialdata (totale partikkeltellinger mellom diameter x og y µm). Bare de kumulative dataene er presentert.

2.1.7 Affinitetsmåling på Biacore

[0249] En brikke ble først immobilisert med HSA (aminkobling ved hjelp av Biacore-aminkoblingssettet). Etter et forbehandlingstrinn med 5 injeksjoner av nanolegemet ble alle prøvene fortynnet til 2,5 nM i triplikat og analysert på brikken. Kvalitetskontroll av
20 brikkene ved hjelp av referanseprøven ble inkludert i forsøket for å detektere eventuelt tap av aktivitet eller reduksjon i respons (forringelse av brikken). Skråningene ble bestemt ved hjelp av den generelle tilpasningsfremgangsmåten og den lineære tilpasningsmodellen (BIAevaluation-programvare). For å bestemme den innledende bindingsraten (IBR), ble skråningen mellom 5 s og 30 s valgt. Verdiene av disse
25 skråningene ble overført i Excel og den prosentvise aktiviteten sammenlignet med referansen ble bestemt.

2.1.8 ELISA-basert styrkeanalyse for HSA-skjerming

[0250] Humant serumalbumin (HSA) ble immobilisert på en flerbrønns Maxisorp
30 ELISA-plate ved adsorpsjon. Etter blokkering av overskytende bindingssteder på platene med Superblock T20 (PBS) blokkeringsbuffer, ble en fortynning serie av test- og referanseprøvene påført på platen. Det bundne nanolegemet ble deretter detektert ved hjelp av et toverdig anti-nanolegame direkte konjugert til pepperrotperoksidase (HRP). I nærværet av H₂O₂ katalyserer HRP en kjemisk reaksjon med tetrametylbenzidin (es
35 TMB) som resulterer i dannelsen av en farge. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 1 N HCl. Den optiske tettheten av fargen ble målt ved 450 nm.

2.1.9 ELISA-basert styrkeanalyse for IL-6R-binding

[0251] For referanse-, kontroll- og testprøvene ble det fremstilt forskjellige

fortynninger av nanolegemene. Disse fortynningene ble forhåndsinkubert med en konstant mengde på 100 ng/mL IL-6, etterfulgt av tilsetningen av 4 ng/ml løselig IL-6R. Deretter ble denne blandingen overført til en mikrotiterplate belagt med et ikke-nøytraliserende anti-IL-6R-nanolegemen. Etter vasking ble det gjenværende bundne IL-6 detektert med biotinyllert anti-humant IL-6-monoklonalt antistoff, etterfulgt av HRP-merket streptavidindeteksjon. I nærværet av H₂O₂ katalyserer HRP en kjemisk reaksjon med tetrametylbenzidin (es TMB) som resulterer i dannelsen av en farge. Reaksjonen ble stoppet ved tilsetning av 1 N HCl. Den optiske tettheten av fargen ble målt ved 450 nm. Den relative styrken for testprøvene sammenlignet med referanseprøven ble analysert ved anvendelse av PLA 2.0-programvaren.

2.1.10 Kapillær isoelektrisk fokusering (cIEF)

[0252] Kapillær isoelektrisk fokusering (cIEF) er en analyse/separasjons-metode som skiller proteiner med hensyn til lading, dvs. at det skiller de proteiner ifølge deres isoelektriske punkter (pI). Separasjonsprinsippet er likt gelbasert/plan IEF, men skiller seg i hovedsakelig i formatet sitt, dvs. at separasjonen finner sted i et åpent rør av smalt format (kapillar) og eliminerer behovet for hver antikonvektive matriksstøtte. Dessuten er cIEF et helautomatisk instrument med online deteksjon og datainnsamling. En ulempe med tradisjonell cIEF i et konvensjonelt CE-instrument er at de fokuserte (stasjonære) sonene må mobiliseres forbi enkeltpunktsdeteksjonsområdet for å ta opp signalet. Under mobilisering kan sonene utvides med kontaminerende tap av løsning og redusert detekterbarhet. Videre vil analysetiden og risikoen for proteinaggregering/utfelling øke. Ved å avbilde cIEF følges fokuseringsprosessen i sanntid over hele kolonnen/kapillaren med et CCD-kamera med unntak av mobiliseringstrinnet. Så snart fokuseringsprosessen er fullført er analyseløpet ferdig.

Eksempel 2.2: T_m-besluttomhet

[0253] Smeltetemperaturen (T_m) i forskjellige buffere ble bestemt ved å anvende fluorescensbasert termisk skiftanalyse (TSA, for IL6R304 og IL6R305) og ved differensiell skanningskalorimetri (DSC, for IL6R304).

2.2.1 Termisk skiftanalyse

[0254] Den termiske skiftanalysen eller TSA kan utføres i 96-brønners platen i en Q-PCR-enhet for å evaluere effekten av bufferpar, ionestyrke, pH og eksipienser på den termiske stabiliteten av proteiner. Analysen resulterer i en T_m-verdi som er indikativ for den termiske stabiliteten i de testede bufferne. Kort fortalt følger analysen signalendringene til et fluorescensfargestoff, så som Sypro Orange, mens proteinet gjennomgår termisk utbretting. Når Sypro Orange tilsettes til en korrekt brettet proteinløsning, eksponeres den i et vandig miljø og dens fluorescenssignal quenches.

Når temperaturen stiger, gjennomgår proteinet termisk utbretting og eksponerer sin hydrofobe kjerneregion. Sypro Orange binder deretter til de hydrofobe regionene, og kan ikke slettes noe som gir en økning av fluorescenssignalet.

[0255] I et første forsøk ble T_m -en bedømt for IL6R304 og IL6R305 i forskjellige buffere, eksipienser og kombinasjoner av disse med TSA-analysen. De oppnådde T_m -verdiene vises grafisk i figur 14 og figur 15.

[0256] I alle de testede forholdene var T_m -verdiene litt høyere for IL6R304 enn for IL6R305. Bufferne og eksipiensene som ble testet hadde en lignende virkning på T_m -verdiene av IL6R304 og IL6R305:

[0257] Effekt av buffer pH: de høyeste smeltepunktene ble oppnådd i Hepes-buffer (pH 7 og pH 8) og L-histidin ved pH 6,5, etterfulgt av fosfatbuffer (pH 6,7 og 7,7), Tris pH 7,2 og suksinatbuffer ved pH 6,2. De laveste smeltepunktene ble oppnådd i PBS (58,82 °C for IL6R304) og i bufferne med den laveste pH-en, dvs. suksinat ved pH 5,2 og L-histidin ved pH 5,5. Det høyere smeltepunktet i L-histidin ved pH 6,5 korrelerer godt med den høyere løseligheten av IL6R304 i denne bufferen (se eksempel 2.3).

[0258] Effekt av [NaCl] konsentrasjon: de høyeste smeltetemperaturene ble målt når intet natriumklorid ble tilsatt til bufferne. T_m -verdiene ble gradvis redusert med økende NaCl-konsentrasjon; effektplataene ved 300 mM NaCl.

[0259] Effekt av eksipiensene mannitol, sukrose og glysin: alle de testede eksipiensene syntes å ha en stabiliserende effekt på IL6R304 og IL6R305, ettersom smeltetemperaturene økte med økende eksipienskonsentrasjon. De høyeste T_m -verdiene ble oppnådd i buffere inneholdende 7,5 % mannitol eller 5 % sukrose.

[0260] Oppsummert syntes IL6R304 og IL6R305 å være mer stabile i buffere som hadde en nøytral pH og som inneholdt en lav NaCl-konsentrasjon og betydelige mengder av mannitol eller sukrose. Dette er vist skjematisk i tabell 13. L-histidin ved pH 6,5 viste seg å være en god buffer for å ta seg videre i ytterligere stabilitetstesting og formuleringsarbeid. Et annet viktig argument for å fortsette med en L-histidinbuffer er at løseligheten av IL6R304 ble vist å øke dramatisk i denne bufferen sammenlignet med PBS (se eksempel 2.3). Buffere som inneholder en høy NaCl-konsentrasjon bør unngås, mens hepes-buffere ved nøytral pH fortrinnsvis kan anvendes.

2.2.2 Differensiell skanningskalorimetri

[0261] For å identifisere andre egnede buffere som kan anvendes i renseprotokoller, dvs. der proteinet viser akseptabel stabilitet, ble differensiell skanningskalorimetri (DSC) anvendt til å bestemme smeltetemperaturen til IL6R304 i forskjellige kandidatbuffere.

[0262] Figur 16 viser resultatene av et DSC-forsøk utført på IL6R304 formulert i forskjellige buffere. De høyeste smeltetemperaturene ble observert i MES (pH 6,0) og Hepes (pH 7,0), mens acetat, Tris-HCl og fosfat indikerer en noe lavere termisk

stabilitet. T_m-verdien oppnådd i citrat (pH 3,5) var i gjennomsnitt 10 °C lavere enn i de andre bufferne. Alle varmekapasitetssmeltetoppene (C_p) var skarpe og heller symmetriske i alle bufferne. Restaureringen av en bunnlinje etter overgangen indikerte at ingen utfelling hadde skjedd.

5 **[0263]** En oversikt over alle T_m-verdiene oppnådd i DSC-forsøkene er vist i tabell 14. Ut fra disse resultatene kan vi konkludere med at å tilsette mer NaCl fører til en gradvis reduksjon i smeltetemperatur, som også ble observert i TSA.

2.2.3 TSA-forsøk ved hjelp av eksperimentell utforming

10 **[0264]** Et andre TSA-forsøk ble utført på IL6R304 ved hjelp av eksperimentell utforming (DOE). DOE-en bestod av forskjellige trinn. Utfallet av hvert trinn ble anvendt til å definere DOE-en for det neste trinnet. Kort fortalt var de eksperimentelle oppsettene og de oppnådde resultatene de følgende:

- 15 • Trinn 1: L-histidin, suksinat, fosfat og Tris ble testet ved forskjellig pH (6-7) og bufferstyrke (10 - 40 mM). Den mest lovende formuleringen ble funnet å være lav ionestyrke av L-histidin og fosfatbuffer med en pH på henholdsvis 7 og 6.
- Trinn 2: effekten av å tilsette NaCl og forskjellige eksipienser til 15 mM L-histidin, pH 6,5, og 7 og 15 mM fosfat ved pH 6 og 6,5 ble testet. En
20 representant for tre eksipiensfamilier ble inkludert: mannitol (polyol), sukrose (ikke-reduserende sukker) og arginin (aminosyre). Det ble konkludert med at arginin og/eller NaCl reduserer T_m-en av IL6R304. En maksimal smeltetemperatur ble nådd i sukrose eller en blanding av sukrose/mannitol (10 % totalt). Videre ble en høyere T_m oppnådd i L-histidin enn fosfat. For
25 begge bufferne ble de beste resultatene oppnådd ved pH 6,5.
- Trinn 3: andre representanter, dvs. sorbitol, xylitol, ribitol, trehalose og glysin, fra de tre eksipiensfamiliene ble testet i 15 mM L-histidin og 15 mM fosfat, begge ved pH 6,5. Igjen var T_m-en for IL6R304 høyere i L-histidinbuffer enn i fosfat for alle eksipiensene og eksipienskombinasjonene. Den beste
30 bufferformuleringen inneholdt 10 % sorbitol eller trehalose.

(Tabell 15)

[0265] I et fjerde trinn ble resultatet av den statistiske analysen av DOE bekreftet ved en gjentakelse av TSA-en og ved differensiell skanningskalorimetri.

Eksempel 2.3: Løselighet av nanolegemene i forskjellige buffere

35 **2.3.1 Løselighet i PBS og effekten av Tween 80**

[0266] Under nedstrøms prosessering og lagring av IL6R304-, IL6R305- og IL6R306-nanolegemene i D-PBS buffer forekom bunnfall. Bunnfall ble allerede dannet under lagring over natten ved 5 °C eller -20 °C, selv i prøvene som ble filtrert (0,22 µm) før lagring. Dette resulterte ikke bare i et betydelig produkttap, men gjorde det også

upraktisk å utføre etterfølgende forsøk siden filtreringstrinnene måtte innføres hele tiden. Fra disse observasjonene var det klart at PBS ikke er en egnet formuleringsbuffer for noen av IL-6R-nanolegemene og at alternative lagringsbuffer må identifiseres. I et innledende forsøk, ble det vurdert om Tween 80 kunne forhindre at dette bunnfallet (aggregeringen) oppstår.

[0267] Kort fortalt ble IL6R304 (P#051108nr1) fortynnet til 2 mg/ml i PBS-buffer, PBS-buffer + 0,1 % (v:v) Tween 80 eller PBS-buffer + 0,2 % (v:v) Tween 80. De tre prøvene ble lagret i 4 dager ved 5 °C og deretter analysert for synlige partikler (utseendetesting ved visuell inspeksjon; tabell 16), undersynlige partikkeltellinger (PAMAS; figur 17), via UV-spektroskopi (A320/A280-forhold, dvs. måling for nærværet av partikler; tabell 16) og SE-HPLC (figur 18). Signifikant var flere og større partikler til stede i IL6R304-prøven formulert i PBS sammenlignet med IL6R304-prøven formulert i PBS + Tween 80.

2.3.2 Konsentrasjonsforsøk for å bestemme løseligheten av IL6R304 og IL6R305

[0268] IL6R304 og IL6R305, begge formulert i PBS, ble konsentrert trinnvis med en Vivascience-konsentrator (Vivaspin 500 5000 MWCO, 500 µl konsentrator). Under konsentrasjonsforsøket ble retentatet blandet forsiktig regelmessig og ble analysert visuelt for partikler/utfelling. Nærværet av uløselige aggregater i retentatet ble verifisert ved å kontrollere proteinkonsentrasjonen før og etter sentrifugering ved maksimal hastighet. Basert på resultatene fra den termiske skiftanalysen (se eksempel 2.2.1), ble løseligheten av IL6R304 også analysert i 20 mM histidin, pH 6,5.

[0269] Som konklusjon var løseligheten av IL6R304 og IL6R305 i PBS begrenset, med beregnede verdier på henholdsvis 20 mg/ml og 15 mg/ml (konsentrasjonen der proteinutfellingen forekom). Ingen utfelling av IL6R304 ble observert ved en konsentrasjon på mellom 20-90 mg/ml i L-histidinbuffer som tyder på at løseligheten kan økes betydelig ved å endre formuleringsbufferen. Legg merke til at intet vesentlig proteintap har blitt observert.

2.3.3 Bestemmelse av den teoretiske løseligheten

[0270] Den teoretiske løseligheten av IL6R304 og IL6R305 ble bestemt ved anvendelse av PEG-utelukkelsesmetoden i PBS-buffer (IL6R304, IL6R305) eller i 20 mM L-histidin, pH 6,5 (IL6R304). Kort fortalt ble en konsentrert nanolegemeløsning (30-80 mg/ml) i den respektive bufferen inkubert i 15 minutter ved romtemperatur i nærvær av økende konsentrasjoner av PEG6000. Etter sentrifugering ved 20 000 x g i 3 minutter, ble loggverdier av den [løselige proteinkonsentrasjonen] plottet mot PEG6000-konsentrasjonen (figur 19). Ved regresjonsanalyse og ekstrapolering til en nullkonsentrasjon av PEG6000 kunne den teoretiske maksimale proteinkonsentrasjonen (og dermed løselighetsverdier) oppnås for nanolegemene i

bufferne som ble testet. De oppnådde løselighetsverdiene korrelerte godt med verdiene oppnådd eksperimentelt ved hjelp av et trinnvis konsentrasjonsforsøk med de Vivaspin-sentrifugale konsentratorene. Ved sammenligning av løseligheten av IL6R304 i PBS og L-histidin ved pH 6,5, kunne det konkluderes med at løseligheten av IL6R304 økte
 5 betydelig i L-histidinbufferen.

Eksempel 2.4: Lagringsstabilitetsstudie av nanolegemene ved 37 °C

[0271] En innledende lagringsstabilitetsstudie ble utført for å få en generell forståelse av stabiliteten av IL-6R-nanolegemene og for å bestemme om tilsetning av mannitol i
 10 formuleringsbufferen har en fordelaktig effekt på å minimere dannelsen av potensielle dimerer, som det som ble observert for RANKL008a (se eksempel 1.3).

[0272] De tre IL-6R-nanolegemene ble formulert i forskjellige buffere (tabell 17) ved en konsentrasjon på 10 mg/ml (IL6R304), 7,1 mg/ml (IL6R305) og 10,3 mg/ml (IL6R306). Stabiliteten av de forskjellige prøvene ble undersøkt i akselererte
 15 belastningsforhold ved 37 °C. Prøvene ble analysert etter 1 uke ved hjelp av SE-HPLC og RP-HPLC. Utvalgte prøver av IL6R304 og IL6R305 ble også analysert etter 3 ukers lagring.

2.4.1 SE-HPLC-analyse

[0273] For alle de tre IL-6R-nanolegemene resulterte forlenget lagring ved 37 °C i dannelsen av førtopper og noen mindre ettertopper. Ettertoppene korresponderte sannsynligvis med nedbrytningsprodukter (på grunn av den gjenværende proteolytiske aktiviteten i prøven). Overflatearealet av disse ettertoppene forble meget lavt, noe som antyder bare minimal nedbrytning etter 3 uker ved 37 °C.

[0274] Alle de tre IL-6R-nanolegemene hadde en sterk tendens til å danne dimerer/oligomerer (aggregater), som var synlige som førtopp(er) i kromatogrammene av SE-HPLC-analysen. Et eksempel på et kromatogram er vist i figur 20. Topparealet av førtoppen økte betydelig over tiden (angitt som % aggregater i figur 21 og figur 22) og ble ledsaget av en samtidig reduksjon i overflatearealet til hovedtoppen.
 25
 30 Tilbøyeligheten til å danne dimerer/oligomerer syntes å være noe høyere for IL6R305 enn for IL6R304. Også flere dimerer/oligomerer ble dannet i PBS sammenlignet med de andre bufferne som ble testet. Enda viktigere ble de laveste mengdene av oligomerer observert i de mannitolholdige formuleringene.

2.4.2 RP-HPLC-analyse

[0275] RP-HPLC profilen til IL6R304 ved tidspunkt 0 uker inkluderte en hovedtopp med en skulder som elueres før hovedmaterialet og en ettertopp som ikke ble godt løst fra hovedtoppen. Denne ettertoppen korresponderte mest sannsynlig med den pyroglutamatholdige varianten av IL6R304. Overflatearealet av denne toppen øket med lagringstiden og var høyest i PBS og fosfatbuffer sammenlignet med acetat- og

histidinbufferne. Etter 3 uker med lagring økte overflateområdene av to hittil uidentifiserte førtopper (figur 23).

[0276] RP-HPLC-profilen til IL6R305 ved tidspunkt 0 uker inkluderte en hovedtopp med noen mindre førtopper. Løsningsevnen til den anvendte RP-HPLC-metoden som var ikke tilstrekkelig til å separere den pyroglutamatholdige varianten fra hovedmaterialet.

Eksempel 2.5: Osmolalitetmåling

[0277] Ifølge den europeiske farmakopé anses en løsning som isotonisk hvis den har en osmolalitet på 290 ± 30 mOsm/kg. Osmolalitetmålinger på 20 mM L-histidin ved pH 6,5 inneholdende forskjellige konsentrasjoner av ekspienser ble derfor utført for å definere området av ekspienskonsentrasjon som ville være akseptabelt for en isotonisk flytende formulering av IL6R304.

[0278] IL6R304 (10 mg/ml) ble formulert i de forskjellige bufferne i tabell 18.

Resultatene fra osmolalitetmåling av disse formuleringene er vist i figur 24.

Eksempel 2.6: Lagringsstabilitetsstudie av IL6R304 ved 5 °C og 37 °C

[0279] En oversikt over de forskjellige formuleringsbufferne og -fremgangsmåtene anvendt i stabilitetstesting av IL6R304-satsen P#051108nr1 er gitt i henholdsvis tabell 18 og tabell 19. Fordi IL6R304 ble funnet å være tilbøyelige til aggregering og utfelling, ble Tween 80 tilsatt til de fleste formuleringene.

2.6.1 Utseende og OD280

[0280] Ingen turbiditet ble observert i prøvene som er lagret i 5 uker ved 5 °C, noe som indikerer at 20 mM L-histidin ved pH 6,5 er en mye bedre lagringsbuffer for IL6R304 enn PBS.

[0281] Etter lagring i 1 uke ved 37 °C ble det observert en svak turbiditet i alle 12 prøvene. I IL6R304-prøvene i bufferne 1, 2, 3, 7, 8 og 9 ble mer opalescens observert sammenlignet med IL6R304 i bufferne 4, 5, 6, 10, 11 og 12, som alle inneholdt mannitol. Etter lagring i 2 uker ved 37 °C, ble litt mer turbiditet observert sammenlignet med 1 ukes prøvene. Imidlertid fortsatte trenden observert for 1 ukes prøvene: IL6R304-prøvene i bufferne 1, 2, 3, 7, 8 og 9 viste mer opalescens sammenlignet med de mannitolholdige bufferne. Etter lagring i 5 uker ved 37 °C, var turbiditeten fortsatt til stede og noe mindre i prøvene inneholdende mannitol. Men det virket som om turbiditeten ikke hadde økt i forhold til 2 uker prøvene.

[0282] Til tross for opasiteten observert i de belastede prøvene hadde ikke proteinkonsentrasjonen i prøvene sunket betraktelig (data ikke vist), selv om det var en svak tendens til en nedre konsentrasjon på grunn av en høyere turbiditet. Også OD320/OD280-forholdet, som er et mål for turbiditet eller nærvær av partikler, var

<0,05 i alle bufferforhold. Faktisk var forholdet 2-10 ganger lavere enn observert i den ubelastede prøven i PBS, som igjen viser at L-histidin-pH 6,5-bufferen har en stabiliserende effekt på IL6R304.

5 **2.6.2 SE-HPLC-analyse**

[0283] Prøver av referansematerialet (0 uker) og prøvene lagret i opptil 6 måneder ved 5 °C og 37 °C ble analysert ved hjelp av SE-HPLC.

[0284] Det ble ikke observert noen forskjeller mellom SE-HPLC-profilene av referanseprøvene (ved 0 uker) og prøvene lagret i opptil 5 uker ved 5 °C. I tillegg var det ingen signifikante forskjeller mellom de forskjellige bufferne. De små mengdene av aggregatene som allerede er til stede i startmaterialet ble ikke økt med forlenget lagringstid (figur 25 (B)), noe som indikerer at histidinbufferen hadde en stabiliserende effekt på ILR304, selv i fraværet av eksipienser så som Tween 80, mannitol eller sukrose. Legg merke til at IL6R304 dannet aggregater når de lagres i en kort tid (timer-dager) ved 5 °C i D-PBS-buffer.

[0285] SE-HPLC-analyse av prøvene som lagres i 6 måneder ved 5 °C viste også ingen økning i areal-% av de førtoppene, noe som betyr at ingen oligomerer ble dannet under disse lagringsforholdene, selv ikke i formuleringen som bare inneholder 20 mM L-histidin, pH 6,5, dvs. uten Tween-80, eller hvilken som helst eksipiens (data ikke vist).

[0286] Langvarig oppbevaring ved 37 °C resulterte i dannelsen av førtopper og noen mindre tettertopper. Førtoppene korresponderte sannsynligvis bare til nedbrytningsprodukter (på grunn av gjenværende proteolytisk aktivitet i prøven). Det relative arealet (%) av disse toppene økte bare litt, noe som tyder på at nedbrytningen var begrenset til et minimum. De andre toppene synlige i kromatogrammene var bakgrunnstoppene som oppstår fra bufferkomponentene.

[0287] Topparealet av førtoppene økte betydelig over tid (figur 25 (A) og figur 26 (B)). Gitt den relative posisjonen til førtoppene til hovedtoppen, representerte førtoppene mest sannsynlig dimeriske eller oligomeriske former (aggregater) av IL6R304. Toppoverflatearealet av førtoppen økte med lagringstiden og ble ledsaget av en samtidig reduksjon i overflatearealet til hovedtoppen.

[0288] En viktig observasjon var at tilbøyeligheten til å danne dimerer/oligomerer var bufferavhengig: tilbøyeligheten til å oligomerisere var betydelig lavere i de mannitol- og sukroseholdige formuleringene. Glysin syntes ikke å ha en slik positiv effekt i å forebygge oligomeriseringsprosessen. Tween 80 hadde ingen hemmende virkning på dannelsen av oligomerer.

[0289] Det er viktig at % oligomerer observert i alle 12 L-histidinbufferer etter lagring i 3 uker ved 37 °C var betydelig lavere enn den tilsvarende prøven i D-PBS-buffer, dvs. 2,2-4,6 % i L-histidin, pH 6,5 sammenlignet med 11,7 % PBS (figur 26 (A)). Denne

bufferavhengige effekten på den fysiske stabiliteten til IL6R304 korrelerte svært godt med de bufferavhengige forskjellene observert i termisk stabilitetstesting av IL6R304 (eksempel 2.2): smeltetemperaturen for IL6R304 ble funnet å være bare 58,8 °C i PBS, men er 62,8 °C i 20 mM L-histidin, pH 6,5. Å øke den iboende stabiliteten av IL6R304 ved å endre formuleringsbufferen fra PBS til L-histidin viste seg å ha en klar fordelaktig effekt på dens stabilitet ved lagring.

[0290] I prøvene som ble lagret i 6 måneder ved 37 °C ble den laveste % av oligomerer funnet i formuleringen inneholdende 10 % sukrose, som igjen bekrefter den stabiliserende effekten av sukrose på IL6R304 (tabell 20).

2.6.3 RP-HPLC-analyse

[0291] Eksempler på referansematerialet (0 uker) og prøvene som lagres i opptil 5 uker ved 5 °C og 37 °C ble analysert ved hjelp av RP-HPLC.

[0292] RP-HPLC-profilene på tidspunkt 0 uker inkluderte en hovedtopp, to førtopper og en dårlig løst ettertopp. Denne ettertoppen samsvarte sannsynligvis med den pyroglutamatholdige varianten til IL6R304.

[0293] RP-HPLC-profilene av referansesatsen og stabilitetsprøvene lagret i opptil fem uker ved 5 °C ble funnet å være sammenlignbare.

[0294] I stabilitetsprøvene lagret ved 37 °C, økte toppoverflatearealet av pyroglutamattoppen med lagringstiden, mens overflatearealet av hovedtoppen ble redusert. Det totale arealet forble uendret.

[0295] Etter 5 ukers lagring ved 37 °C hadde overflatearealet av de to førtoppene økt i alle bufferforholdene. Identiteten til disse variantene er ikke kjent for tiden, men kan tilsvare nedbrytningsfragmenter.

[0296] Det var ingen signifikante bufferavhengige forskjeller i RP-HPLC-profilene til de forskjellige prøvene og dette tyder på at kjemiske modifikasjoner, så som pyroglutamatdannelse og oksidasjon som vanligvis detekteres ved RP-HPLC, ble begrenset, og er på nåværende tidspunkt upåvirket av bufferen .

Eksempel 2.7: Lagringsstabilitetsstudie av IL6R304 ved -70 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C og 37 °C

[0297] IL6R304 ble formulert ved 10 mg/ml i de 10 forskjellige bufferne vist i tabell 21, lagret ved -70 °C, -20 °C, +5°C og +37 °C i 8 uker, og etter 1 uke + 25 °C. Stabilitetsprøvene ble analysert ved hjelp av SE-HPLC, RP-HPLC, OD280 og visuell inspeksjon. De utvalgte prøver ble også analysert ved hjelp av Biacore (HSA-binding), og potensanalyser (HSA og IL-6R).

2.7.1. Lagring i 8 uker ved -70 °C, -20 °C, 5 °C og 1 uke ved 25 °C

[0298] IL6R304 ble vist å være stabil etter lagring i 8 uker ved -70 °C, -20 °C, 5 °C

og i 1 uke ved 25 °C i alle de 10 testede bufferne. Ingen signifikante forskjeller ble observert i styrke-, turbiditets-, SE-HPLC- og RP-HPLC-profiler mellom referansematerialet og de 10 forskjellige lagringsprøvene.

5 **2.7.2. Lagring i 8 uker ved 37 °C**

Utseende og OD280

[0299] Sammenlignet med prøvene lagret ved -70 °C, -20 °C og 5 °C, ble turbiditeten observert i prøvene lagret ved 37 °C. Absorbansverdiene ved 350 nm hadde økt tilsvarende til >0,01 AU i de fleste bufferne, selv om A350/A280-forholdet fortsatt var <0,05 i alle bufferforhold. Til tross for opasiteten observert i de belastede prøvene, hadde ikke proteinkonsentrasjonen i prøvene ikke redusert seg betraktelig.

SE-HPLC

[0300] Forlenget lagring ved 37 °C resulterte i den tidsavhengige dannelsen av en ettertopp og førtopp. Ettertoppen har en oppholdstid mellom 22 og 23 minutter og samsvarer mest sannsynlig med IL6R304-nedbrytningsfragmenter. Overflatearealet av denne toppen forble imidlertid lav (ca. 2 %), noe som antyder bare minimal nedbrytning etter 8 uker ved 37 °C. De andre ettertoppene som var synlige i kromatogrammene var bakgrunnstopper som oppstår fra bufferkomponentene.

[0301] SE-HPLC-profilen til IL6R304 ved tidspunkt 0 uker inkluderte en hovedtopp og to mindre førtopper som ikke ble løst fullstendig ved grunnlinjen. Overflatearealet til førtoppene økte over tid og ble ledsaget av en samtidig reduksjon i overflatearealet til hovedtoppen. Gitt den relative posisjonen og heterogeniteten av førtoppene representerte de mest sannsynlig dimere og/eller oligomere former av IL6R304. På grunn av denne heterogeniteten og den synkende løsningen mellom førtoppene over tid, ble toppene ble for enkelhets skyld integrert som en enkel topp.

[0302] En viktig observasjon var at tilbøyeligheten til å danne dimere/oligomerer var bufferavhengig: rundt 2 ganger mindre oligomerer ble dannet i L-histidinbuffer sammenlignet med fosfatbuffer (figur 27, figur 28). Den laveste mengden av oligomerer ble observert i den trehaloseholdige formuleringen, etterfulgt av den sukroseholdige formuleringen. Samlet sett, etter lagring av IL6R304 ved 37 °C i flere uker, var mengden av oligomerer til stede i disse bufferne betydelig mindre enn observert tidligere i D-PBS eller i L-histidin ved pH 6,5 uten noen ekspiens.

[0303] Nærværet av et ikke-reduserende sukker undertrykket omfanget av IL6R304-oligomeriseringen betraktelig.

RP-HPLC

[0304] RP-HPLC-kromatogrammene fra ILR304-stabilitetsprøvene lagret i opptil 8 uker ved 37 °C er vist i figur 29.

[0305] RP-HPLC-profilen til ILR304 på tidspunkt 0 uker inkluderte en hovedtopp, med 2 dårlig løste skuldre som elueres før hovedmaterialet, en første ettertopp som tilsvarer den pyroglutamatholdige varianten av ILR304 og en andre ettertopp som tilsvarer ILR304-varianten som mangler en disulfidbro. Identiteten til begge variantene er blitt bekreftet ved LC-MS.

[0306] Etter lagring i 1 uke hadde overflatearealet av den andre ettertoppen sunket til en relativ areal-% på 0, mest sannsynlig på grunn av spontan oksidasjon inn i det korrekt foldede molekylet.

[0307] Overflatearealet til pyroglutamattoppen økte med lagringstiden, mens overflatearealet av hovedtoppen ble redusert. Det totale overflatearealet endret seg ikke betydelig over tiden eller mellom de forskjellige bufferne. Figur 30 viser klart at kinetikken av pyroglutamatdannelsen var forskjellig i L-histidin, pH 6,5 versus fosfat, pH 6,5. Ved alle tidspunktene var mindre pyroglutamat til stede i L-histidinbufferen. På den annen side var det ingen korrelasjon mellom typen eksipiens til stede i bufferen, og mengden av observert pyroglutamat.

[0308] Etter lagring i 8 uker ble det dannet to nye ettertopper. Den første ettertoppen ble plassert mellom hovedtoppen og pyroglutamattoppen, mens den andre ettertoppen eluerte like etter pyroglutamattoppen. Identiteten til disse variantene er for tiden ikke kjent.

Kapillær isoelektrisk fokusering (cIEF)

[0309] cIEF-integreringsdata av IL6R304 lagret i 8 uker ved 37 °C i de forskjellige bufferne er vist i tabell 22. Prøvene formulert i 15 mM L-histidin, pH 6,5 inneholder mindre ladningsvarianter sammenlignet med fosfatbufferen.

Styrkeanalyse og Biacore

[0310] Styrken til prøvene lagret i 8 uker ved 37 °C i bufferne 1-5 ble bestemt i forhold til en ubelastet referansesats ved hjelp av den HSA-bindende ELISA-en og hemmingen ELISA for IL-6R som beskrevet i eksemplene 2.1.8 og 2.1.9 (tabell 23). HSA-bindingsfunksjonen av prøvene lagret i bufferne 1-10 ble også analysert ved hjelp av Biacore (tabell 24). Prøver formulert i de samme bufferne og lagret ved -70 °C, ble inkludert som referansemolekylene.

[0311] Mens styrkeanalysene viste sammenlignbare HSA- og IL-6R-bindingsstyrker mellom stabilitetsprøvene og referansematerialet, demonstrerte Biacore-analyse noen forskjeller i HSA-bindingsaktiviteter.

[0312] Samlet sett var aktivitetene til prøvene formulert i fosfatbuffer (bufferne 6-10) lavere enn i L-histidin (bufferne 1-5). Et funksjonalitetatap på rundt 16 % ble observert i bufferne inneholdende en kombinasjon av sukrose og glysin (buffer 4 og 9).

Kombinasjonen av sukrose og mannitol (buffer 5 og 10) viste intet tap av funksjonalitet for IL6R304 i L-histidinbufferen, mens en reduksjon på 10 % ble observert i fosfatbufferen. Formuleringer inneholdende enten mannitol, sukrose eller trehalose viste en aktivitet på mellom 90 og 100 % etter lagring i 8 uker ved 37 °C.

5

Generell konklusjon om lagringsstabilitetsstudien ved 37 °C

[0313] Lagring for opptil 8 uker med IL6R304 i forskjellige formuleringsbuffer under temperaturlastningsforhold (37 °C) resulterte i de følgende observasjonene:

- 10 • tilbøyeligheten til IL6R304 for å danne oligomerer var avhengig av bufferen og eksipiensen: rundt 2 ganger mindre oligomerer ble dannet i L-histidinbuffer sammenlignet med fosfatbuffer, mens nærværet av et ikke-reduserende sukker undertrykket omfanget av IL6R304-oligomeriseringen enda lengre;
- den kjemiske stabiliteten til IL6R304 var bedre i L-histidinbuffer sammenlignet
15 med fosfatbuffer;
- HSA-bindingsaktiviteten ble opprettholdt lenger i L-histidinbuffer sammenlignet med fosfatbuffer.

Eksempel 2.8: Stabilitet under omrørt belastning

[0314] IL6R304 ble formulert ved 1 mg/ml i de 10 forskjellige bufferne som er vist i
20 tabell 21. Alikvoter på 5 ml ble omrørt ved maksimal hastighet i opptil 24 timer ved 2-8 °C. Prøvene ble analysert etter 2, 4 og 24 timers omrøring.

[0315] Alle løsningene forble klare etter to timer med røring (tabell 25). En økning i turbiditeten ble observert i seks av ti buffere etter 4 timer. Den høyeste opalescensen var til stede i bufferen 10. Samlet sett var økningen i turbiditeten mer uttalt i
25 fosfatbufferne (buffer 6-10). Disse observasjonene ble bekreftet etter bestemmelse av aggregeringsindeksen, definert som $100 * OD_{350}/(OD_{280} - OD_{350})$ (figur 31). Ingen løselige aggregater ble observert under SE-HPLC av de forskjellige prøvene.

[0316] Som konklusjon antyder de omrøringsbelastede dataene en noe bedre omrøringsbelastningsstabilitet av IL6R304 i L-histidin, pH 6,5, sammenlignet med
30 fosfatbuffer, pH 6,5. Ingen signifikante forskjeller ble observert mellom de forskjellige eksipiensene, selv om en noe høyere turbiditet ble observert i nærværet av 10 % trehalose og 2,5 % mannitol/5 % sukrose.

Eksempel 2.9: Langsiktig stabilitetsstudie ved -70 °C, + 5 °C og + 25 °C

[0317] IL6R304-satsen CMC-D-0048, formulert i 15 mM L-histidin, 8 % sukrose, 0,01 % Tween80 (pH 6,5) ved 10,52 mg/ml, ble lagret i 6 måneder ved - 70 °C, +5 °C og +25 °C. Prøvene ble analysert etter 3 og 6 måneders lagring ved visuell inspeksjon (utseende), A280 (innhold), SEC-HPLC, cIEF, RP-HPLC og styrkeanalyser (1L6R-

35

hemningsanalyse og HSA-bindingsanalyse). Resultatene oppsummeres i tabell 42, tabell 43 og tabell 44 for lagring ved henholdsvis -70 °C, +5 °C og +25 °C.

[0318] Det var ingen signifikante endringer i utseende-, innhold-, styrke-, cIEF- og HPLC-profilene mellom kontrollprøven (endepunkt 0 måneder) og alle testprøvene lagret ved -70 °C eller 5 °C, noe som indikerer at IL6R304 er stabil i minst 6 måneder under disse forholdene. Når det gjelder prøven lagret ved +25 °C, ble de følgende observasjonene gjort når man sammenligner resultatene av de belastede prøvene og kontrollprøven:

- SE-HPLC: det er en liten, men gradvis økning i overflatearealet av førtoppen (oligomerer) og ettertoppen (nedbrytningsfragmenter).
- cIEF: det dannes en ettertopp som antas å tilsvare pyroglutamatvarianten.
- RP-HPLC: det dannes tre nye topper, dvs. en førtopp, som mest sannsynlig tilsvarer nedbrytningsfragmenter som er til stede i prøvene (se også SEC-HPLC-dataene) og to ennå uidentifiserte ettertopper. Overflatearealet av førtoppen 2 og ettertoppen 2 (pyroglutamat) øker gradvis med lengre inkubasjonstid.
- Intet styrketap observeres i prøvene som lagres i inntil 6 måneder ved 25 °C.

Eksempel 3: Formulerings- og stabilitetsstudier med nanolegemer som binder IL23

Eksempel 3.1: Materialer og fremgangsmåter i studien

3.1.1 Enkle variable domener

[0319] 23IL0064 (SEQ ID NO: 5;

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKG
REL VATINSGSRTYYADSVKGRFTISRDNSSKKCLYLQMNSLRPEDTAVYYCQT
SGSGSPNFWGQGTLVTVSSGGGGGS
GGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV
SSISGSGSDTLYADSVKGRFTISR
DNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSE
VQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAAS

GRTLSSYAMGWFRQAPGKGREFVSRISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNSSKNT
LYLQMNSLRPEDTAVYYCAKDPS PYYRGSAYLLSGSYDSWGQGTLVTVSS) er
beskrevet som SEQ ID NO: 2616 i WO 2009/068627. 23IL0064 består av tre
humaniserte variable domener av et tungkjede-Ilama-antistoff: 119A3v16 og 81A12v4,
som binder forskjellige epitoper av IL23 p19, og ALB8 som binder HSA.

23IL0075 (SEQ ID NO: 6;

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGRIFSLPASGNIFNLLTIAWYRQAPGKGR
ELVATINSGSRTYYADSVK
GRFTISRDNSSKKTLYLQMNSLRPEDTAVYYCQTSGSGSPNFWGQGTLVTVSSG
GGGSGGGSEVQLVESGGGLVQP

GNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGR
 FTISRDNKTTLYLQMNSLRPED
 TAVYYCTIGGSLSRSSQGTLVTVSSGGGGSGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLR
 LSCAASGRTLSSYAMGWFRQAPG

5 KGREFVARISQGGTAIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYY
 CAKDPSPYYRGSAYLLSGSYDSWG QGTLVTVSS) er beskrevet som SEQ ID NO:
 2622 i WO 2009/068627. 23IL0075 består av tre humaniserte variable domener av et
 tungkjede-Ilama-antistoff: 119A3v16 og 81A22v5, som binder forskjellige epitoper av
 IL23 p19, og det ALB8-bindende HSA-et. Underenhetene i begge nanolegemene
 10 fuseres hode-til-hale med en 9G/S-linker.

[0320] 231L0064 (3,79 mg/ml i D-PBS) og 23IL0075 (4,21 mg/ml i D-PBS) ble
 uttrykt i *Pichia pastoris*. Etter utskilling av fermenteringskraften via et
 sentrifugeringstrinn, etterfulgt av et TFF-trinn, ble nanolegemene fanget på
 15 MabCapture A (Poros), etterfulgt av en eluering ved pH 2,6 ved hjelp av 100 mM
 glysin. Et bufferbytte til 1/10 D-PBS ble utført, og nanolegemene ble ytterligere polert
 på Poros 50HS (Poros). Til slutt ble en behandling med 50 mM OGP for LPS-fjerning
 utført, etterfulgt av et endelig størrelsesutelukkestrinn ved hjelp av Superdex 75 pg
 (GE Healthcare).

20 **[0321]** De ubelastede prøvene i D-PBS eller andre formuleringer ble anvendt som
 referansemateriale for å analysere lagringsstabilitetsprøvene.

3.1.2 Andre kritiske reagenser

[0322] Reagenser anvendt i studien er gitt i tabell 26. Den fullstendige
 25 sammensetningen av D-PBS var 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM dibasisk
 natriumfosfat, 2 mM monobasisk kaliumfosfat.

3.1.3 Utstyr og fremgangsmåter for målinger

[0323] HPLC-forsøk ble utført på et Agilent 1200-serieinstrument fra Agilent
 30 Technologies (Palo Alto, USA). Kolonnene som ble anvendt var:

- RP-HPLC: RP-HPLC: Zorbax 300SB-C3 5-mikron, 4,6 X 150 mm (Agilent,
 kat. nr. 883995-909) og Zorbax 300SB-C8 5-mikron, 4,6 X 150 mm (Agilent,
 kat. nr. 883995-906)
- 35 • SE-HPLC: TSKgel G2000SW_{XL} (Tosoh Bioscience, Japan; del#08540)
- IEX-HPLC:: ProPac WCX-10, 4 x 250 mm, 10 µm (Dionex)

[0324] Konsentrasjonsbestemmelser av nanolegemene ble gjort med NanoDrop ND-
 1000 (Thermoscientific), med et Uvikon 943-spektrofotometer (Kontron Instruments)

eller et Eppendorf-biofotometer 6131 ved 280 nm.

[0325] Partikkelstørrelsesfordelingen ble målt på en PAMAS SVSS-C-partikkelteller (PartikelMess- und AnalyseSysteme GMBH).

[0326] Osmolalitetmålingen ble gjort med en osmometermodell 3320 fra Advanced instruments.

[0327] Den termiske skiftanalysen ble utført på en LightCycler480 Q-PCR-enhet (Roche).

[0328] For bestemmelse av T_m-en ble det anvendt et automatisert VP-kapillært differensielt skanningskalorimeter (DSC, MicroCal).

[0329] Elastisk lysspredning ble målt i et Jasco-spektrofluorometer (FP-6500).

3.1.4 Renhetsanalyse av nanolegemene ved størrelsesutelukkelshøyttelsesvæskrokromatografi (SE-HPLC)

[0330] SE-HPLC-analysen bestod av en forhåndspakket silikagel TSKgel G2000SW_{XL}-kolonne utstyrt med et vernekolonneforhåndskolonnefilter, en mobil fase bestående av KCl, NaCl og fosfatbuffer ved pH 7,2 (D-PBS), og UV-deteksjon ved 280 nm. Den relative mengden av spesifikk proteinurenhet ble uttrykt som areal-%, og ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer den spesifikke proteinurenheten på det totale integrerte området.

3.1.5 Renhetsanalyse av nanolegemene ved reversfasehøyttelsesvæskrokromatografi (RP-HPLC)

[0331] I RP-HPLC-analysen ble det anvendt en Zorbax 300SB-C3-kolonne eller Zorbax 300SB-C8-kolonne (Agilent Technologies, Palo Alto, USA). Den relative mengden av en spesifikk proteinurenhet ble bestemt ved å måle den lysabsorbansen av komponentene som elueres fra RP-HPLC-kolonnen. Den relative mengden av en spesifikk proteinurenhet, uttrykt som areal-%, ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer forurensningen på det totale integrerte området.

3.1.6 Renhetsanalyse av nanolegemene ved ionebyttelhøyttelsesvæskrokromatografi (IEX-HPLC)

[0332] IEX-HPLC-analysen kombinerte anvendelsen av en forhåndspakket Dionex ProPac WCX-10 svak kationbytterkolonne, en mobil fase bestående av citratbuffer pH 5,5 og UV-deteksjon ved 280 nm. Etter lasting av proteinet/proteinene på kolonnen, ble de bundne materialene eluert med en natriumkloridgradient. Den relative mengden av det spesifikke proteinet, varianten, eller urenheter uttrykt som areal-%, ble beregnet ved å dele topparealet som tilsvarer det spesifikke proteinet eller hvilken som helst proteinurenhet på det totale arealet av alle de integrerte toppene.

3.1.7 Måling av partikkelstørrelsesfordeling (PAMAS)

[0333] Målene på PAMAS SVSS-C-partikkeltelleren ble utført som følger: 100 µl prøve ble fortynnet 1/10 i 1 ml MilliQ-vann og 10 påfølgende målinger ble utført i alle 16 kanaler (innstilt diameter 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 25, 50, 100, 150 og 200 µm). For beregning av gjennomsnittsverdien ble de første 2 målingene ekskludert og det ble tatt hensyn til fortynningsfaktoren. Resultatene er gitt som kumulative data (totale partikkeltellinger > x µm) eller differensialdata (totale partikkeltellinger mellom diameter x og y µm). Bare de kumulative dataene er presentert.

3.1.8 Kapillar isoelektrisk fokusering (cIEF)

[0334] Kapillar isoelektrisk fokusering (cIEF) er en analyse/separasjons-metode som skiller proteiner med henyn til lading, dvs. at det skiller proteiner ifølge deres isoelektriske punkter (pI). Separasjonsprinsippet er likt gelbasert/plan IEF men skiller seg hovedsakelig i sitt format, dvs. at separasjonen finner sted i et åpent rør av smalt format (kapillar) og eliminerer behovet for enhver antikonvektiv matriksstøtte. Dessuten er cIEF et helautomatisk instrument med online deteksjon og datainnsamling. En ulempe med tradisjonell cIEF i et konvensjonelt CE-instrument er at de fokuserte (stasjonære) sonene må mobiliseres forbi enkeltpunktdeteksjonsområdet for å ta opp signalet. Under mobiliseringen kan sonene utvides med kontaminerende tap av løsning og redusert detekterbarhet. Videre vil analysetiden og risikoen for proteinaggregering/utfelling øke. Ved å avbilde cIEF følges fokuseringsprosessen i sanntid over hele kolonnen/kapillaren med et CCD-kamera med unntak av mobiliseringstrinnet. Så snart fokuseringsprosessen er fullført fullføres analyseløpet.

Eksempel 3.2: Smeltetemperatur av nanolegemene

[0335] Målingen av smeltetemperaturen for et protein i forskjellige buffere er en raskere måte å screene for buffere der proteinet har høyest fysisk stabilitet. Det er generelt akseptert at dette vil være prediktivt for langtidsstabiliteten ved lave temperaturer. Smeltetemperaturen kan bestemmes ved hjelp av mange forskjellige metoder.

3.2.1 Smeltetemperaturen til 231L0064 i forskjellige formuleringsbuffere målt ved termisk skiftanalyse

[0336] Vi anvendte den termiske skiftanalysen (TSA), som måler endringen i fluorescensintensitet når Sypro orange binder de hydrofobe delene av proteinet som gjennomgår termisk utfolding. Den termiske skiftanalysen ble utført på LightCycler480 Q-PCR-enheten (Roche) som anvender 96-brønners plater.

[0337] I en første studie ble effekten av bufferpar, ionestyrke og pH på den termodynamiske stabiliteten til 231L0064 evaluert i et termisk skiftanalyseforsøk. De

testede bufferne som anvendes er vist i tabell 28. Hver buffer ble testet ved et pH-intervall som strekker seg over 1 pH-enhet rundt deres pKa. En oversikt over resultatene er presentert i figur 32. Smeltetemperaturer minket med økende saltkonsentrasjon. Videre virket pH 5,2 og pH 5,5 mindre fordelaktig sammenlignet med pH 6,2 og høyere. De beste bufferne var Hepes (pH 7 og 8) og histidin pH 6,5. I alle buffene økte tilsetningen av mannitol svakt smeltetemperaturene.

3.2.2 Smeltetemperaturen til 231L0064 og 23IL0075 i forskjellige formuleringsbuffere, målt ved termisk skiftanalyse og differensiell skanningskalorimetri (DSC)

[0338] 23IL0064 og 23IL0075 ble analysert parallelt i forskjellige formuleringsbuffere og rensingsbuffere ved hjelp av den termiske skiftanalysen (TSA) (tabell 34) og DSC (tabell 33). For begge molekylene og i alle testede buffere (acetat, MES, Hepes, TRIS og histidin) avtok smeltetemperaturerene med økende NaCl-konsentrasjon, og smeltetemperaturerene var høyest i nærværet av mannitol.

3.2.3 Smeltetemperatur på 23IL0075 i et stort utvalg av formuleringsbuffere målt ved termisk skiftanalyse

[0339] Smeltetemperaturen for 23IL0075 i et annet utvalg av buffere og et lavere pH-område ble vist av TSA. For dette ble en utforming av forsøk satt opp for å undersøke T_m-en for 23IL0075 som varierer de følgende parameterne: pH-område mellom 5 og 6, bufferkonsentrasjon mellom 10 og 50 mM, og 4 forskjellige buffere: histidin, acetat, fosfat og suksinat. En full faktoriell utforming + sentral komposittutforming ble utført, i totalt 22 forskjellige buffere ble testet i 84 forsøk. Forsøkene ble delt i to 96-brønners plater, på den andre platen ble pH-en utvidet til 4,8 og 6,2, og bufferkonsentrasjonen til 7 og 65 mM. Fosfatbufferen ble bare testet ved pH 6 og 6,2. Fra de eksperimentelle resultatene ble det for hver buffer bygd en modell som ble anvendt til å forutsi T_m-er som en funksjon av bufferkonsentrasjonen og pH-en. Resultatene er vist i tabell 35.

[0340] Suksinat hadde tydelig samlet de laveste spådde T_m-verdiene. For acetat og histidin ved lave konsentrasjoner og høy pH ble de største forutsagte T_m-verdiene oppnådd. Faktisk viste modellen for alle bufferne høyest forutsagte T_m-verdier for laveste bufferkonsentrasjoner. Ifølge den utforming-eksperimentnummeriske optimaliseringen av modellen var den beste bufferen histidinbuffer ved pH 6,2 (ønskelig 1), nært etterfulgt av acetat ved pH 6 (ønskelig 0,96) og fosfat ved pH 6 (ønskelig 0,90).

3.2.4 Bekreftelse av T_m ved differensiell skanningskalorimetri

[0341] Vi bekreftet T_m-bestemmelsen ved differensiell skanningskalorimetri i bufferne valgt i eksempel 3.2.3. Resultatene er vist i grafen i figur 33. Utviklingen var

identisk med det som ble observert i TSA-en selv om de absolutte verdiene til T_m-en var høyere: rundt 62 °C i DSC sammenlignet med rundt 59 °C i TSA-en.

3.2.5 Smeltetemperaturen til 23IL0075 i en rekke formuleringsbuffere for å utforske et bredt spekter av eksipienser målt ved hjelp av termisk skiftanalyse

[0342] En annen utforming av forsøkene (DOE) ble fremstilt for å studere påvirkningen av noen kombinasjoner av eksipienser på den termodynamiske stabiliteten til 231L0075. Kombinasjonen av et sukker eller et polyol (mannitol, sukrose eller sorbitol), med en aminosyre (glysin eller arginin/glutaminsyre-blanding), og et ikke-ionisk vaskemiddel (Tween 80, Tween 20 eller P-F68) ble studert. Disse kombinasjonene ble testet i tre buffere (10 mM acetat ved pH 5,5, 10 mM histidin ved pH 6,0 og 10 mM fosfat ved pH 6,0) (se tabell 35). Basert på de målte smeltetemperaturene ble de optimale buffersammensetningene beregnet (se tabell 36). De høyeste smeltetemperaturene ble forutsagt for histidinbufferen, de laveste smeltetemperaturene for fosfatbufferen. For alle tre bufferne kom sukrose ut som den beste eksipiensen, blandingen av arginin og glutaminsyre som det verste. Mannitol og sorbitol, alene eller i kombinasjon med glysin var også god som eksipiens, skjønt ga alltid litt lavere T_m enn sukrose. Glysin alene var ikke så effektivt.

Eksempel 3.3: Løselighet av nanolegemene

3.3.1 Konsentrasjon av forsøk for å bestemme løseligheten av 23IL0064

[0343] IL23-nanolegemet 231L0064 henholdsvis i D-PBS-buffer, i Na-fosfat 10 mM ved pH 7 med 50 mM NaCl, og i L-histidin 40 mM ved pH 6 med 50 mM NaCl, ble konsentrert trinnvis med en Vivaspin-konsentrator (Vivascience 5000 MWCO 0,5 ml og 5 ml konsentratorer). Under konsentrasjonsforsøket ble retentatet regelmessig forsiktig blandet og konsentrasjonen bestemt ved OD280-målinger. Nærværet av uløselige aggregater i retentatet ble verifisert ved å kontrollere proteinkonsentrasjonen før og etter sentrifugering ved maksimal hastighet i en bord-Eppendorf-sentrifuge. I alle tre bufferne kunne det nås en konsentrasjon på 50 mg/ml uten visuell utfelling. Deretter ble proteinløsningen overført fra 5 ml til 0,5 ml Vivaspin[®]-konsentratoren og konsentrert til en mye høyere sentrifugalkraft (15000xg i stedet for 1500xg). Dette forårsaket en rask ytterligere konsentrasjon, og lokale konsentrasjoner nær membranen var også mye høyere enn den gjennomsnittlige konsentrasjonen målt etter gjenvinningen av retentatet. I tabell 27 oppsummeres de oppnådde sluttkonsentrasjonene, oppnådd etter å ha pipettert retentatet opp og ned, og sentrifugering for å fjerne bunnfall.

[0344] Alle prøvene ble også analysert ved SE-HPLC. Konsentrering i D-PBS-buffer resulterte i en økning i % førtopp. I 10 mM fosfatbufferen og i 40 mM histidinbufferen, begge med 50 mM NaCl, forble SE-HPLC-profilen nøyaktig den

samme ved 83 og 150 mg/ml, sammenlignet med utgangsmaterialet (figur 34). En generisk SE-HPLC-fremgangsmåte ble anvendt på en Phenomenex BioSep SEC S-2000-kolonne, med D-PBS som mobil fase ved 0,2 ml/min.

[0345] En prøve av de konsentrerte 23IL0064-proteinløsningene ble fortynnet til 55 mg/ml ved å anvende de respektive bufferne for videre anvendelse i PEG-utfellingsmetoden.

3.3.2 Bestemmelse av den teoretiske løseligheten av 23IL0064

[0346] Den teoretiske løseligheten av 23IL0064 ble bestemt ved hjelp av PEG-utelukkelsesmetoden i D-PBS-buffer, i Na-fosfat 10 mM ved pH 7, NaCl 50 mM, og i L-histidin 40 mM ved pH 6, NaCl 50 mM. Kort fortalt ble en konsentrert nanolegemeløsning (55 mg/ml) i den respektive bufferen inkubert i 15 minutter ved romtemperatur i nærvære av økende konsentrasjoner av PEG6000. Etter sentrifugering ved 20 000 x g i 3 minutter, ble loggverdiene av [løselig proteinkonsentrasjon] plottet mot PEG6000-konsentrasjonen (figur 35). Ved regresjonsanalyse og ekstrapolering til en nullkonsentrasjon av PEG6000, kunne den teoretiske maksimale proteinkonsentrasjonen (og dermed løselighetsverdiene) oppnås for nanolegemet i de testede bufferne.

[0347] Ved ekstrapolering fra regresjonsplottene til en nullkonsentrasjon av PEG6000, ble en teoretisk løselighetsverdi på 60 mg/ml og 288 mg/ml beregnet for 23IL0064 i D-PBS og i henholdsvis 10 mM fosfatbuffer/50 mM NaCl. 23IL0064 viste svært god løselighet i histidinbufferen: i forsøket som starter med 55 mg/ml kun ved en PEG-konsentrasjon på 27 % begynte proteinet å felle ut noe. Derfor ble forsøket gjentatt med proteinet løst ved 150 mg/ml. Der ved bare skjedde 10 % PEG-utfelling, men så var det ingen volum igjen for OD-målinger. Så løseligheten var faktisk for høy til å oppnå en verdi i denne analysen.

[0348] Som konklusjon ble den høyeste løseligheten oppnådd i 40 mM histidin ved pH 6 med 50 mM NaCl. I fosfatbuffer med 50 mM NaCl var løseligheten bedre enn i D-PBS (med 137 mM NaCl).

3.3.3 Bestemmelse av den teoretiske løseligheten av 231L0064 og 23IL0075

[0349] Den teoretiske løseligheten ble bestemt for 23IL0064 og 23IL0075 ved hjelp av PEG-utelukkelsesmetoden i 10 mM Na-fosfat ved pH 7, NaCl 50 mM, og i L-histidin 40 mM ved pH 6, NaCl 50 mM (den samme bufferen som anvendt i den foregående løselighetsstudien for 231L0064 beskrevet ovenfor). Grafene (figur 36 og figur 37) som representerer proteinkonsentrasjonen i supernatanten som en funksjon av % PEG-konsentrasjonen var meget lik den som oppnås i det foregående forsøket. Igjen var den tilsynelatende løseligheten i histidin høyere enn i fosfatbufferen, og kunne ikke beregnes på grunn av minimal utfelling under de anvendte protein- (5 mg/ml) og PEG-

konsentrasjonene (26,7%. Den beregnede løseligheten i fosfatbuffer ved pH 7 for 23IL0064 og 23IL0075 var lavere enn i det foregående forsøket, dvs. henholdsvis 55 og 42 mg/ml, samtidig som vi observerte opptil 288 mg/ml i det tidligere forsøket. Vi må understreke at disse forsøkene ble utført ved pipettering ved ekstremt lave volumer av svært viskøse løsninger, og derfor burde de absolutte tallene av løselighet bekreftes med andre metoder.

Eksempel 3.4: Belastede stabilitetsstudier for 231L0064 i D-PBS

[0350] En innledende 37 °C belastet stabilitetsstudie ble utført i D-PBS. Den opprinnelige satsen ble sterilisert gjennom et 0,22 µm filter, og 500 µl ble lagret ved 37 °C i 1,5 ml Eppendorf-vialer for hvert tidspunkt (4, 8, 12, 16, 20 og 24 uker). I tillegg ble tilnærmet 9x 100 µl lagret ved -20 °C (referanse). En første prøve ble analysert allerede etter 3 uker ved hjelp av SE-HPLC og en førtopp av aggregater ble påvist (3 %) (figur 38). Etter 4 uker ved 37 °C ble det totale topparealet på SE-HPLC og på RP-HPLC redusert til bare halvparten av referanseprøven (figurene 38 og 39). Vi bestemte oss derfor for å si opp stabilitetsstudien tidlig. I noen av de gjenværende prøvene ble innholdet fortsatt målt ved OD280 etter sentrifugering. Tapet av materiale i 4w-37 °C-prøven ved utfelling (alle prøvene ble sentrifugert før analyse) ble bekreftet i de ytterligere 3 prøvene belastet i 6 uker ved 37 °C: i 2 av de 3 prøvene gikk halvparten av materialet tapt (tabell 29).

[0351] Det kan konkluderes med at 23IL0064 i D-PBS lett dannet aggregater som feller ut etter lagring i 4 uker ved 37 °C. I RP-HPLC-analysen av den 37 °C belastede prøven ble også 12 % ettertopp observert tilsvarende den N-terminale pyroglutamatdannelsen (figur 41).

Eksempel 3.5: Belastet stabilitetsstudie for 231L0064 i histidinbuffer

[0352] Fra resultatene beskrevet i tidligere eksempler på løseligheten, den termiske skiftanalysen og den 37 °C belastede stabiliteten i D-PBS for 23IL0064, ble det konkludert med at fosfat ikke var den optimal bufferen for formulering av 23IL0064. I TSA-en beskrevet i eksempel 3.2.2 undersøkte vi noen mulige formuleringsbuffer og de høyeste T_m-ene ble oppnådd i histidin ved pH 6,5, hepes pH 7, og hepes pH 8. I løslighetsforsøket (se eksempel 3.3) var løseligheten i et 40 mM histidin ved pH 6, med 50 mM NaCl svært høy. Vi bestemte oss derfor for å teste lagringsstabiliteten i histidinbuffer. I tabell 30 er det gitt en liste over testede formuleringsbuffer. Målet med dette oppsettet var å sammenligne histidin ved pH 6,5 med histidin ved pH 6, og undersøke påvirkningen av noen vanlige eksipienser, og påvirkningen av en høyere konsentrasjon på stabiliteten (forskjellen mellom 5 mg/ml og 22 mg/ml). En prøve i Hepes ved pH 8 ble også inkludert, bare for å testes etter 3 uker ved 37 °C.

[0353] For denne undersøkelsen ble 3,2 ml av den opprinnelige satsen dialysert til

20 mM Hepesbuffer ved pH 8 og tilnærmet 65 ml (ca. 246 g) ble dialysert til 20 mM histidinbuffer ved pH 6,5. Eksipiensene ble tilsatt i konsentrerte løsninger (2x), og prøven ved pH 6 ble fremstilt ved tilsetning av HCl. Prøvene ble deretter konsentrert til tilnærmet 5 mg/ml, sterilisert gjennom et 0,22 µm filter og aliquotert i 1,5 ml Eppendorfrør (500 µl/Eppendorf) for lagring under de forskjellige forholdene.

3.5.1 Stabilitet under frysetining

[0354] En prøve av hver av de ovennevnte formuleringene i histidin ble underkastet 10 fryse/tine-sykluser. Prøvene ble analysert ved hjelp av RP-HPLC og OD280-innhold. Ingen forskjell med referanseprøven (én fryse/tine) ble observert.

3.5.2 Skjærbelastning

[0355] To prøver av hver av de ovennevnte formuleringene i histidin ble utsatt for skjærbelastning. Testen ble utført i et kaldt rom (4-8 °C) i små glassrør med 300 µl proteinløsning, omrørt ved en magnetisk stav i 4 og 8 timer ved en middels rotasjonshastighet.

[0356] I alle prøvene belastet med 4 og 8 timers terskel var klar opalisering til stede. Dette ble kvantifisert av en OD280-innholdsanalyse etter sentrifugering av prøvene. Analyse av SE-HPLC viste ingen aggregater. RP-HPLC-analyse etter 4 timers skjærbelastning viste ingen nedbrytning, men etter 8 timers belastning fremkom en viss økning av den ikke-løste førtoppen, spesielt i den konsentrerte prøven. Også på SDS-PAGE ble det generelt ikke oppdaget noen nedbrytning. I tabell 31 er det gitt en rå rangering basert på opalescensen og materialtapet i innholdsanalysen.

3.5.3 Lagring ved 4 °C, 25 °C og 37 °C i 6 uker

[0357] Den første analysen ble utført etter 2,5 uker ved 25 °C og 37 °C lagring. Prøvene ble analysert ved RP-HPLC (se også tabell 32), SE-HPLC, SDS-PAGE og OD 280/350. Svært liten nedbrytning ble observert etter 2,5 uker (data ikke vist). Resultatene etter 6 ukers lagring ved 37 °C omtales nedenfor (for prøven i Hepes pH 8, omtales resultatene etter de 2,5 ukene ved 37 °C).

RP-HPLC-analyse

[0358] RP-HPLC-analyse ble utført hovedsakelig for å detektere kjemisk nedbrytning. Belastning ved 25 °C og ved 37 °C, forårsaket vanligvis økning av ettertoppen tilsvarende det N-terminale pyroglutamatet. Denne ettertoppen økte mindre i histidinbufferen ved pH 6 enn i pH 6,5, og raskest i Hepes-bufferen ved pH 8: f.eks. etter 2,5 uker ved 37 °C var det 11 % pyroglutamat etter toppen i hepes ved pH 8, 7 % histidin ved pH 6,5, og 5 % i histidin ved pH 6 (data ikke vist).

[0359] Videre fremkom en annen ukjent ettertopp. I figur 40 er det gitt en oversikt

over integreringsdataene. I figur 41 gis det et overlegg mellom kromatogrammene oppnådd for de forskjellige lagringstemperaturene for 231L0064 i histidinbuffer ved pH 6,5 ved 22 mg/ml.

5 ***SE-HPLC-analyse***

[0360] For prøvene på 5 mg/ml belastet i 6 uker ved 37 °C, ble det observert små mengder av aggregater (mellom 0,5 og 1 %). Toppene ble integrert. De separerte før- og ettertoppene var aldri høyere enn 1 prosent.

[0361] For prøven ved 22,4 mg/ml ble imidlertid 3 % aggregater påvist i prøven lagret
10 ved 37 °C.

SDS-PAGE-analyse

[0362] Analyse av SDS-PAGE viste liten nedbrytning. For prøvene belastet ved 37 °C i 6 uker ble det observert en svak økning i intensiteten av et nedbrytningsbånd ved en
15 Mw på tilnærmet 27 og noen tynne bånd under hovedbåndet var til stede (figur 42). Det ble ikke observert noen forskjell mellom de forskjellige formuleringsbufferne.

Analyse av OD280, OD350 og undersynlige partikler

[0363] Alle prøvene i lagringsstabilitetsstudien ble videre analysert for deres
20 nanolegemeinnhold (ved OD280), for deres opasitet (ved OD350), og for å detektere undersynlige partikler (ved PAMAS). Svært lignende resultater ble oppnådd mellom referansen og de forskjellige temperaturlagringsprøvene (data ikke vist).

Eksempel 3.6: Elastisk lysspredning

[0364] Tendensen til aggregatdannelse av 23IL0075 i de forskjellige
25 formuleringsbufferne ble bestemt ved hjelp av elastisk lysspredning målt ved en vinkel på 90 ° ved hjelp av temperaturindusert denaturering som målt i Jasco-spektrofluorometeret (eksitasjon og emisjonsbølgelengde 500 nm). Først så vi etter den optimale proteinkonsentrasjonen ved hjelp av 10 mM fosfatbuffer ved pH 6,0. Ved
30 konsentrasjoner på 175 µg/ml 23IL0075 eller lavere ble det ikke sett noen økning i spredningsintensitet i det testede temperaturintervallet: (45-95 °C). Bare ved 250 µg/ml ble spredningen observert. Kurven syntes å vise to overganger, noe som kunne tyde på dannelsen av to forskjellige typer av aggregater (se figur 43).

[0365] Forsøket ble gjentatt for acetat- og histidinbufferne, begge ved pH 6,0.
35 Aggregeringsutbruddstemperaturene i de tre bufferne var svært like (tabell 37). Den største forskjellen mellom de tre bufferne var den maksimale spredningen: det forble innenfor detektorområdet (rundt 435 abs) for histidin mens det gikk ut av rekkevidde i fosfatet så vel som i acetatbufferne (figur 44 og 45). I histidin var den andre overgangen fraværende (figur 46). Ettersom spredningen er proporsjonal med nivået av

de dannede aggregatene, indikerte dette at 10 mM histidinet ville være en mer optimal enn formuleringsbuffer enn 10 mM acetat og 10 mM fosfat ved pH 6.

Eksempel 3.7. Fryse/tine- og skjærbelastningsstudie på 23IL0075 i en histidin-, acetat- og fosfatformuleringsbuffer med mannitol eller en blanding av mannitol og glysin som eksipienser, og et ikke-ionisk vaskemiddel som surfaktant

[0366] Følsomheten 23IL0075 for å frysing/tining og til skjæring eller omrøring er undersøkt i forskjellige kandidatformuleringsbuffere (se tabell 38). Fryse/tine-belastningsstudien bestod av 10 sykluser: 100 µl prøve i et Eppendorf-rør ble frosset ved -20 °C inntil fullstendig frosset og tint ved romtemperatur i 30 minutter etterfulgt av forsiktig blanding. Skjærbelastningstesten ble utført i et kaldt rom (4-8 °C) i små glassrør med 150 µl proteinløsning; proteinløsningen ble omrørt ved en magnetisk stav i 4 timer ved en medium rotasjonshastighet. Alle prøvene ble analysert ved hjelp av RP-HPLC, SE-HPLC og OD500, noen prøver også ved Biacore. På RP-HPLC ble det ikke detektert noen påvirkning av skjærkraft.

[0367] På SE-HPLC, avhengig av formuleringsbufferen, forårsaket fryse/tine-belastning en økning i % førtopp opptil 2,5 % (figur 47 (B)). En blanding av mannitol og glysin beskyttet bedre mot fryse/tine-belastning enn bare mannitol som eksipiens (figur 47).

[0368] I de skjærbelastede prøvene ble nesten ingen økning i % førtopp på SE-HPLC påvist, men opptil 10 ganger mer opalescens (OD500) ble målt enn i fryse/tine-prøvene. Den optiske tettheten ved 500 nm (OD500) økte i de omrørte prøvene og korrelerte med opalescensen i prøvene. Vi konkludere med at i histidinbufferen med 0,05 % poloksamer eller med 0,005 % Tween 80 forble opalescensen lavest (figur 48).

Eksempel 3.8. Frysing/tining, skjærbelastning og temperaturbelastning (37 °C) stabilitetsstudie for 23IL0075 i en histidinformuleringsbuffer med forskjellige kombinasjoner av eksipienser.

[0369] Basert på konklusjonene i eksempel 3.7 testet vi frysingen/tiningen videre, skjærbelastnings- og temperaturbelastningsstabilitet (37 °C) i forskjellige histidinformuleringsbuffere (figur 49 og figur 50). Forskjellige eksipienser ble testet i en formulering med 25 mg/ml protein. En oversikt over formuleringsbufferne testet i F/T og lagringsstabiliteten er vist i tabell 39. I figur 49 presenteres resultatene av OD500-målinger og SE-HPLC etter fryse/tine-belastning. Det ble observert en ubetydelig økning av OD500. I SE-HPLC så vi en økning av oligomerer bare for prøven med 5,4 % mannitol som eksipiens. Tabell 40 presenterer de testede bufferne for skjærbelastning. Her ble det ikke inkludert noen vaskemidler, for å etterligne situasjonen under sluttkonsentrasjonstrinnet i DSP-prosessen. I figur 50 er OD500-, SE-HPLC- og BIAcore-resultatene oppnådd etter 4 timers omrøring av formuleringen

presentert. Omrøring av prøven forårsaket økning i OD500-absorpsjon, men ingen innflytelse på % løselige oligomerer som målt ved SE-HPLC. Disse prøvene ble også testet for albuminbinding på Biacore. Vi konkluderer med at proteinet var best beskyttet mot skjærbelastningen med 10 % sukrose, etterfulgt av en blanding av mannitol og glysin som eksipienser. Ved sammenligning av verdiene med verdiene i eksempel 3,7, ser vi at resultatene var reproducerbare, og at for skjærbelastningen var tilsetningen av et vaskemiddel fordelaktig.

[0370] De akselererte stabilitetsprøvene ved 25 mg/ml i de forskjellige kandidatformuleringsbufferne ble analysert ved OD500, SE-HPLC og RP-HPLC etter 3 og 6 ukers lagring. I SE-HPLC, ble økningen av oligomerer bare sett ved 37 °C (figur 51). I RP-HPLC økte ettertoppen som tilsvarte pyroglutamatet fra 3 til 4 % etter 6 ukers lagring ved 25 °C, men til i gjennomsnitt 9 % etter 6 uker ved 37 °C. I tabell 41 er RP-HPLC- og SE-HPLC-resultatene etter 3 og 6 ukers lagring ved 37 °C og 6 uker ved 25 °C vist. OD500-verdiene forble for alle bufferne (unntatt én avvikende) under 0,01.

TABELLER

[0371]

Tabell 1. Oversikt over de forskjellige formuleringsbufferne for RANKL008a anvendt i stabilitetstesting.

Buffer	Konsentrasjon RANKL008a (mg/ml)	Buffer	[NaCl] (mM)	Mannitol % (vekt:volum)
1	60	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	50	0
2	60	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	100	0
3	60	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	0	10
4	59	10 mM Na-acetat, pH 5,5	50	0
5	59	10 mM Na-acetat, pH 5,5	100	0
6	59	10 mM Na-acetat, pH 5,5	0	10
7	60	20 mM L-histidin, pH 5,5	50	0
8	60	20 mM L-histidin, pH 5,5	100	0
9	60	20 mM L-histidin, pH 5,5	0	10
10	58	20 mM L-histidin, pH 6	50	0
11	58	20 mM L-histidin, pH 6	100	0
12	58	20 mM L-histidin, pH 6	0	10
13	84,3	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	100	0
14	70	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	0	5

Tabell 2. Relative styrker av HSA- og RANKL-bindingsrester av RANKL008a etter 10 F/T-sykluser som bestemt av ELISA-styrkeanalysene (hemming og HSA-binding).

Buffer	Relativ styrke (relativt referansematerialet)	
	RANKL	HSA
Fosfat + 50 mM NaCl, pH 7	0,904	0,767
Fosfat + 100 mM NaCl, pH 7	0,966	0,672
Fosfat + 10 % Mannitol, pH 7	0,956	0,715
Acetat + 50 mM NaCl, pH 5,5	1,033	0,747
Acetat + 100 mM NaCl, pH 5,5	0,905	0,705
Acetat + 10 % Mannitol, pH 5,5	0,878	0,737
Histidin + 50 mM NaCl, pH 5,5	0,724	0,723
Histidin + 100 mM NaCl, pH 5,5	0,719	0,670
Histidin + 10 % Mannitol, pH 5,5	0,692	0,572
Histidin + 50 mM NaCl, pH 6	0,927	0,768
Histidin + 100 mM NaCl, pH 6	0,923	0,680
Histidin + 10 % Mannitol, pH 6	0,882	0,754

Tabell 3. Integrasjonsdata (% av totalt overflateareal) av de ulike topper observert i SE-HPLC-kromatogrammer av RANKL008a etter 10 F/T-sykluser eller oppbevart ved 37 grader C i ulike formuleringsbuffer ved alle tidspunkter testet og i sammenligning med hver kontrollprøve (hver buffer).

SE-HPLC	Prøve	Phosphat pH 7 50 mM NaCl 60 mg/ml	Phosphat pH 7 100 mM NaCl 60 mg/ml	Phosphat pH 7 10% Mannitol 60 mg/ml	Acetat pH 5.5 50 mM NaCl	Acetat pH 5.5 100 mM NaCl	Acetat pH 5.5 10% Mannitol 59 mg/ml	Histidin pH 5.5 50 mM NaCl	Histidin pH 5.5 100 mM NaCl	Histidin pH 5.5 10% Mannitol 60 mg/ml	Histidin pH 6 50 mM NaCl	Histidin pH 6 100 mM NaCl	Histidin pH 6 10% Mannitol 58 mg/ml
% Prepeak	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 F/T cycles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2w 37°C	5.6	6.9	1.3	4.6	6.3	2.3	5.5	7.5	0.54	6.3	7.7	0.63
	3w 37°C	4.4	6.2	0.65	3.9	5.9	0.18	5.6	7.9	0.34	7.0	8.6	0.39
	5w 37°C	13.7	15.8	3.9	11.5	14.2	1.22	14.0	17.1	1.5	16.2	17.4	2.0
% Main peak	10w 37°C	23.8	25.3	11.1	21.0	23.9	3.4	27.2	27.8	5.4	26.8	27.0	7.3
	control	100	100	100	100	100	100	100	100	100*	100	100	100*
	10 F/T cycles	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	2w 37°C	93.5	92.2	97.9	94.8	93.1	98.8	94.0	92.1	98.8	93.1	91.5	96.7
	3w 37°C	93.7	92.0	95.2	95.0	92.8	96.9	93.4	91.5	98.6	91.3	90.2	98.8
% Postpeak1	5w 37°C	81.14	78.87	91.52	87.38	84.63	97.87	84.85	81.73	97.49	82.22	81.19	96.76
	10w 37°C	69.2	68.0	80.5	77.5	74.7	95.1	71.3	73.5	93.1	71.3	71.2	91.0
	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 F/T cycles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2w 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Postpeak2	3w 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5w 37°C	3.16	3.36	3.12	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10w 37°C	3.7	3.5	5.0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10 F/T cycles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Postpeak3	2w 37°C	0.23	0.27	0.19	0.23	0.26	0.19	0.19	0.17	0.19	0.20	0.23	0.18
	3w 37°C	0.57	0.58	0.31	0.49	0.53	0.27	0.48	0.55	0.27	0.54	0.5	0.27
	5w 37°C	0.41	0.47	0.27	0.37	0.39	0.25	0.45	0.29	0.23	0.52	0.42	0.37
	10w 37°C	0.5	0.5	0.3	0.4	0.4	0.2	0.4	0.5	0.2	0.4	0.4	0.3
	control	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Postpeak3	10 F/T cycles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2w 37°C	0.62	0.64	0.60	0.37	0.41	0.46	0.31	0.26	0.37	0.40	0.58	0.53
	3w 37°C	1.15	1.25	1.07	0.52	0.64	0.61	0.49	0.55	0.57	1.12	0.71	0.56
	5w 37°C	1.59	1.50	1.49	0.75	0.78	0.66	0.70	0.88	0.78	1.06	0.99	0.87
	10w 37°C	2.7	2.6	3.1	1.1	1.0	1.3	1.1	1.3	1.3	1.5	1.4	1.5

Tabell 4. Integrasjonsdata (% av totalt overflateareal) av de ulike topper observert i RP-HPLC-kromatogrammer av RANKL008a etter 10 F/T-sykluser eller oppbevart ved 37 grader C i ulike formuleringsbuffer ved alle tidspunkter testet og i sammenligning med hver kontrollprøve (hver buffer)

RP-HPLC	Prøve	Phosphat pH 7 50 mM NaCl 60 mg/ml	Phosphat pH 7 100 mM NaCl 60 mg/ml	Phosphat pH 7 10% Mannitol 60 mg/ml	Acetat pH 5.5 50 mM NaCl	Acetat pH 5.5 100 mM NaCl	Acetat pH 5.5 10% Mannitol 59 mg/ml	Histidin pH 5.5 50 mM NaCl	Histidin pH 5.5 100 mM NaCl	Histidin pH 5.5 10% Mannitol 60 mg/ml	Histidin pH 6 50 mM NaCl	Histidin pH 6 100 mM NaCl	Histidin pH 6 10% Mannitol 58 mg/ml
% Prepeak 1	control	0.25	0.14	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0
	10 F/T cycles	0.20	0.08	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2w 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3w 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	5w 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10w 37°C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Prepeak 2	Control	0	0	0	0	0	ND	0	0	0	0	0	0
	10 F/T cycles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	2w 37°C	1.10	1.00	1.10	0.78	0.82	0.78	0.82	0.72	0.76	0.76	0.79	0.87
	3w 37°C	1.6	1.4	1.8	0.7	0.8	0.9	0.7	0.9	0.9	0.7	0.9	0.9
	5w 37°C	2.1	2.0	2.3	1.0	0.9	1.1	1.1	1.2	1.2	1.2	1.1	1.5
	10w 37°C	3.4	2.9	3.7	1.5	1.5	1.9	1.6	1.7	2.0	2.0	1.9	2.1
% Main peak	Control	96.6	96.7	96.7	96.8	97.0	ND	96.5	96.6	96.4	96.7	96.8	96.8
	10 F/T cycles	96.7	96.6	95.9	97.0	96.7	96.6	97.0	95.8	96.5	96.4	96.8	96.8
	2w 37°C	93.7	94.0	93.5	95.8	96.0	95.6	96.0	95.7	95.9	95.6	95.7	95.5
	3w 37°C	92.3	92.7	91.9	95.7	95.5	95.4	95.6	95.4	95.3	95.6	95.5	95.5
	5w 37°C	90.2	90.3	89.1	94.8	95.1	94.7	94.7	94.6	94.8	94.4	94.7	94.0
	10w 37°C	84.1	85.4	83.4	93.5	93.3	92.7	93.3	93.3	92.4	93.1	92.3	92.0
% Pyroglut.	Control	3.2	3.1	3.3	3.2	2.9	ND	3.5	3.0	3.6	3.3	3.2	3.2
	10 F/T cycles	3.1	3.3	4.0	3.3	3.2	3.4	3.0	3.3	3.5	3.6	3.2	3.2
	2w 37°C	5.1	4.7	5.4	3.4	3.2	3.6	3.2	3.5	3.4	3.6	3.5	3.6
	3w 37°C	6.1	6.0	6.3	3.6	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.6	3.6	3.6
	5w 37°C	7.7	7.7	8.6	4.1	3.9	4.2	4.2	4.3	4.1	4.4	4.1	4.4
	10w 37°C	12.5	11.7	12.9	5.0	5.2	5.5	5.2	5.1	5.5	4.8	5.8	5.9

Tabell 5. Integreringsdata (% av det totale overflatearealet) av de forskjellige toppene observert i de IEX-HPLC-kromatogrammene av RANKL008a lagret i 10 uker ved 37 °C i forskjellige formuleringsbuffer.

Buffer	% Hovedtopp	% Ettertopp 1	% Ettertopp 2
Fosfat + 50 mM NaCl, pH 7	69,6	4,4	26,0
Fosfat + 100 mM NaCl, pH 7	67,0	4,5	28,1
Fosfat + 10 % Mannitol, pH 7	84,6	3,2	12,1
Acetat + 50 mM NaCl, pH 5,5	72,8	2,7	24,4
Acetat + 100 mM NaCl, pH 5,5	69,6	2,8	27,6
Acetat + 10 % Mannitol, pH 5,5	95,4	0	4,6
Histidin + 50 mM NaCl, pH 5,5	66,0	2,8	31,2
Histidin + 100 mM NaCl, pH 5,5	68,1	2,8	29,0
Histidin + 10 % Mannitol, pH 5,5	92,8	0	7,2
Histidin + 50 mM NaCl, pH 6	67,4	2,6	30,1
Histidin + 100 mM NaCl, pH 6	67,0	2,6	30,4
Histidin + 10 % Mannitol, pH 6	88,8	2,6	9,0

Tabell 6. Relative styrker av HAS- og RANKL-bindingsrestene av RANKL008a etter 10 uker ved 37 °C som målt av Biacore-analyse.

Buffer	Relativ styrke	
	RANKL	HSA
Fosfat + 50 mM NaCl, pH 7	81,0	57,4
Fosfat + 100 mM NaCl, pH 7	78,6	56,6
Fosfat + 10 % Mannitol, pH 7	76,3	66,8
Acetat + 50 mM NaCl, pH 5,5	80,1	63,0
Acetat + 100 mM NaCl, pH 5,5	78,0	59,0
Acetat + 10 % Mannitol, pH 5,5	80,9	79,4
Histidin + 50 mM NaCl, pH 5,5	80,2	59,7
Histidin + 100 mM NaCl, pH 5,5	73,1	55,0
Histidin + 10 % Mannitol, pH 5,5	75,2	73,6
Histidin + 50 mM NaCl, pH 6	79,1	59,3
Histidin + 100 mM NaCl, pH 6	78,3	57,5
Histidin + 10 % Mannitol, pH 6	87,4	83,4

- 5 **Tabell 7.** Visuell inspeksjon og innholdsbestemmelse av RANKL008a etter fortynning til 0,28 mg/ml i forskjellige fortynningsmidler og passasje/lagring i sprøyter (se figur 9).

Prøve*	visuell inspeksjon	innhold (mg/ml) (95 % konfidensintervall)
0028 SALTHOLDIG TUB	små bunnfall	0,265 (0,261-0,270)
0028 SALTHOLDIG SYR	små bunnfall	0,263 (0,261-0,265)

Prøve*	visuell inspeksjon	innhold (mg/ml) (95 % konfidensintervall)
S25/0		
0028 SALTHOLDIG SYR S25/24	små bunnfall	0,259 (0,256-0,262)
0028 PLACEBO-TW TUB	små bunnfall	0,272 (0,271-0,273)
0028 PLACEBO-TW SYR S25/0	små bunnfall	0,268 (0,267-0,269)
0028 PLACEBO-TW SYR S25/24	små bunnfall	0,268 (0,259-0,276)
0028 PLACEBO+TW TUB	klar	0,281 (0,281-0,281)
0028 PLACEBO+TW SYR S25/0	lett turbid	0,280 (0,278-0,282)
0028 PLACEBO+TW SYR S25/24	lett turbid	0,279 (0,277-0,281)
* S25/0: lagring ved 25 °C i 0 minutter S25/24: lagring ved 25 °C i 24 timer -TW: buffer minus Tween 80 +TW: buffer + Tween 80 PLACEBO refererer til den følgende bufferen: 10 mM Na ₂ HP04 ved pH 7,0 + 115 mM NaCl TUB: prøve lagret i et polystyrenrør		

Tabell 8. Visuell inspeksjon, innhold (konfidensintervall) og turbiditet av RANKL008a fortynnet til 0,28 mg/ml før (TUB) og etter passasje gjennom sprøyter med forskjellig nålstørrelse som beskrevet i eksempel 1.8.

Prøve*	visuell inspeksjon	innhold (mg/ml) (95 % konfidensintervall)	OD 320/278-forhold	OD 350/278-forhold
0028 PLACEBO+TW TUB	klar	0,288 (0,275-0,301)	0,0010	0,0019
0028 PLACEBO+TW 18G/18G	klar	0,285 (0,284-0,286)	0,0003	0,0000
0028 PLACEBO+TW 18G/23G	klar	0,288 (0,271-0,307)	0,0000	0,0000
0028 PLACEBO+TW 18G/27G	klar	0,285 (0,279-0,290)	0,0000	0,0002
0028 PLACEBO+TW 18G/30G	klar	0,286 (0,285-0,287)	0,0005	0,0002
0028 PLACEBO+TW 23G/23G	klar	0,287 (0,285-0,289)	0,0005	0,0007
0028 PLACEBO+TW 27G/27G	klar	0,285 (0,284-0,286)	0,0001	0,0005
0028 PLACEBO+TW	klar	0,287 (0,280-0,294)	0,0007	0,0019

Prøve*	visuell inspeksjon	innhold (mg/ml) (95 % konfidensintervall)	OD 320/278-forhold	OD 350/278-forhold
30G/30G				
* +TW: buffer + Tween 80 PLACEBO refererer til den følgende bufferen: 10 mM Na₂HP04 pH 7,0 + 115 mM NaCl TUB: prøve lagret i et polystyrenrør 18G/18G: prøve trukket inn med en 18G nål trykket ut med en 18G nål 18G/27G: trukket inn med en 18G nål og trykket ut med en 27G nål All annen koding er lik de to eksemplene som er gitt ovenfor				

Tabell 9. Visuell inspeksjon, innhold (med 95 % konfidensintervall) og turbiditet av RANKL008a før (TUB) og etter passasje gjennom sprøyter med forskjellig nålstørrelse som beskrevet i eksempel 1.7 ved en konsentrasjon på 0,28 mg/ml, eller rundt 65 mg/ml

Prøve*	visuell inspeksjon	innhold (mg/ml) (95 % konfidensintervall)	OD 320/278-forhold	OD 350/278-forhold
0028 PLACEBO+TW TUB	klar	0,284 (0,283-0,285)	0,0014	0,0010
0028 PLACEBO+TW 27G/27G (3x)	klar	0,284 (0,283-0,285)	0,0031	0,0021
0028 PLACEBO+TW 29G/29G B	klar	0,282 (0,280-0,284)	0,0024	0,0010
0028 PLACEBO+TW 29G/29G T	klar	0,283 (0,282-0,284)	0,0041	0,0033
6500 PLACEBO+TW TUB	klar	63,5 (62,4-64,6)	0,0019	0,0006
6500 PLACEBO+TW 27G/27G (3x)	klar	62,9 (62,7-63,1)	0,0015	0,0008
* +TW: buffer + Tween 80 PLACEBO refererer til følgende buffer: 10 mM Na₂HP04 pH 7,0 + 115 mM NaCl TUB: prøve lagret i et polystyrenrør 27G/27G: prøve trukket inn med en 27G-nål og trykket ut med en 27G-nål 29G/29G: trukket inn med en 29G-nål og trykket ut med en 29G-nål T: Terumo-nål, B Becton Dickinson-nål 0028 refererer til konsentrasjon på 0,28 mg/ml, 6500 til 65 mg/ml				

Tabell 10. Proteinsekvenser av Nanolegemer anvendt i eksempel 2.

IL6R304, SEQ ID NO: 1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMWYRQAPGKGRVAGIISSGGSTSYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSS
IL6R305, SEQ ID NO: 2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMWYRQAPGKGRVAGIISSGGSTSYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGVSFKINVMWYRQAPGKGRVAGIISSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAV YYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSW VRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLSRSSQGTL TVTVSS
IL6R306, SEQ ID NO: 3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMWYRQAPGKGRVAGIISSGGSTSYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSL RLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSDTLYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTA VYYCTIGGSLSRSSQGTLTVTVSSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGVSFKINVMWYRQAPG KGRVAGIISSGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCAFITTESDYDLGRRYWGQGL TVTVSS

Tabell 11. Oversikt over IL6R-satsene som anvendes i formuleringen og stabilitetsstudiene som er beskrevet i eksempel 2.

Sats nr.	Nanolegеме	Buffer	Konsentrasjon
P#051108nr1	IL6R304	PBS	4,58 mg/ml
P#051108nr2	IL6R305	PBS	3,46 mg/ml
P#051108nr2	IL6R306	PBS	5,65 mg/ml
BS#030309nr1,5-9	IL6R304	25mM hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl	3,79 mg/ml
B5#060509nr1	IL6R304	25mM hepes, pH 7,5, 100 mM NaCl	4,6 mg/ml

5

Tabell 12. Reagenser som anvendes i formuleringen og stabilitetsstudie beskrevet i eksempel 2

Reagens	Tilbyder	Kat. nr.
ACN, HPLC-renhet	Biosolve	Kat. nr. 012007
TFA	Biosolve	Kat. nr. 20234131
Isopropanol, HPLC-renhet	Biosolve	Kat. nr. 162606
Vann av MilliQ-renhet		
D-PBS	Gibco	Kat. nr. 14190-094
NaCl	Merck	Kat. nr. 1,06404,1000
Gelfiltreringsstandard	Bio-Rad	Kat. nr. 151-1901
HSA	Sigma	Kat. nr. A3782
L-histidin	Fluka	Kat. nr. 53319
D-Mannitol	Fluka	Kat. nr. 17311
Sukrose	Fluka	Kat. nr. 18219
Glysin	Fluka	Kat. nr. 50058
Tween-80	Merck	Kat. nr. K351 65661 609

Reagens	Tilbyder	Kat. nr.
L-histidin-HCl-monohydrat	Sigma	Kat. nr. 53369
Ravsyredinatriumheksahydrat	Fluka	Kat. nr. 14158
Trizma base	Sigma	Kat. nr. T6066-5
Sorbitol	Fluka	Kat. nr. 85529
Xylitol	Sigma	Kat. nr. X3375-100g
Ribitol	Fluka	Kat. nr. 02240
L-arginin	Fluka	Kat. nr. 11009
MES	Sigma	Kat. nr. M3671
Natriumdihydrogenfosfat	Merck	Kat. nr. 1.06345.1000
Dinatriumhydrogenfosfat	Merck	Kat. nr. 1.06576.1000

Tabell 13. Oppsummering av resultatene fra TSA-analysen. T_m-verdiene oppnådd i den ulike bufferen kodes fra hvit til mørkegrå, dvs. fra høyere til lavere T_m-verdier.

Buffer/pH	Histidin pH 6,5	Hepes pH 8	Fos.	Suksinat	Histidin pH5,5	Tris pH7
	Hepes pH 7	Fos. pH 6,7	pH 7,7	pH 6,2	Suksinat pH 5,2	PBS
NaCl	0	100	200		400	500
Mannitol	7,5 %	5 %	2,5 %	0		
Sukrose	10 %	5 %				
Glysin	200 mM	100 mM				

5 **Tabell 14.** Oversikt over T_m-verdiene oppnådd ved DSC ved hjelp av IL6R304.

Buffer	T _m (°C) i 0 mM NaCl	T _m (°C) i 25 mM NaCl	T _m (°C) i 100 mM NaCl	T _m (°C) i 500 mM NaCl
25 mM citrat ved pH 3,5	50,21	/	/	/
25 mM acetat ved pH 5,5	61,30	61,21	60,19	58,59
25 mM MES ved pH 6,0	62,52	61,83	60,60	58,66
25 mM hepes ved pH 7,0	62,48	62,27	61,13	59,24
25 mM fosfat ved pH 7,0	60,70	/	/	/
25 mM Tris ved pH 7,5	61,82	61,82	60,91	59,43

Tabell 15. Oversikt over T_m-resultatene oppnådd av DSC og TSA ved hjelp av IL6R304 formulert i ulike buffere.

Eksipiens(er)	DSC		TSA	
	T _m (°C) i 15 mM L-histidin, ved pH 6,5	T _m (°C) 15 mM fosfat, ved pH 6,5	T _m (°C) i 15 mM L-histidin, ved pH 6,5	T _m (°C) i 15 mM fosfat, ved pH 6,5
/	ND	ND	61,09*/61,11**	60,48/60,48
5 % mannitol	64,74	63,81	61,91/61,87	61,34/61,31
10 % sukrose	65,40	64,35	62,78/63,20	62,34/62,78
10 % trehalose	65,28	64,51	62,78/63,59	63,17/63,61
2,5 % mannitol + 2,5 % sukrose	64,37	63,83	61,52/61,91	61,53/61,30
2,5 % sorbitol + 2,5 % trehalose	64,65	63,85	62,34/62,34	62,77/62,77
2,5 % sorbitol + 2,5 % trehalose + 1,5 mM glysin	64,83	64,33	62,33/62,35	63,19/62,96
10 % trehalose + 0,01 % Tween-80	Kjør svikt	63,77	ND	ND
* måling 1, ** måling 2				

Tabell 16. Visuelt utseende, UV-spektroskopi og PAMAS-data viser en høyere løselighet for IL6R304 i nærværet av Tween 80.

	IL6R304 (2 mg/ml) lagret i 4 dager ved 5 °C		
	PBS	PBS + 0,1 % Tween 80	PBS + 0,2 % Tween 80
Utseende	Turbid, gjennom-siktig	Klar, fargeløs	Klar, fargeløs
A320/A280	0,014	0,012	0,009
Undersynlige partikkeltellinger/100 µl			
> 1 µm	157,557	42,243	52,157
> 2 µm	69,471	19,514	21,429
> 3 µm	43,371	12,043	12,743
> 4 µm	29,757	8,329	8,600
> 5 µm	18,300	4,971	4,800
> 6 µm	11,814	3,114	3,143
> 7 µm	8,300	2,300	2,186
> 8 µm	5,900	1,671	1,500
> 9 µm	4,543	1,214	1,086
> 10 µm	3,400	971	800

	IL6R304 (2 mg/ml) lagret i 4 dager ved 5 °C		
	PBS	PBS + 0,1 % Tween 80	PBS + 0,2 % Tween 80
> 15 µm	800	271	300
> 25 µm	200	100	86
> 50 µm	114	29	14
> 100 µm	86	0	14
> 150 µm	71	0	14
> 200 µm	71	0	14

Tabell 17. Oversikt over de forskjellige formuleringsbufferne anvendt i innledende stabilitetstesting av IL6R304, IL6R305 og IL6R306.

Tilstand	Buffer	[NaCl]	Mannitol
1	PBS	0 mM	0 %
2	PBS	0 mM	5 %
3	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	100 mM	0 %
4	10 mM NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O, pH 7	100 mM	5 %
5	10 mM Na-acetat, pH 5,5	100 mM	0 %
6	10 mM Na-acetat, pH 5,5	100 m M	5 %
7	20 mM L-histidin, pH 6	100 mM	0 %
8	20 mM L-histidin, pH 6	100 mM	5 %

- 5 **Tabell 18.** Oversikt over de ulike formuleringsbufferne anvendt i stabilitetstesting av IL6R304.

Buffer	Konsentrasjon IL6R304	Buffer	% Tween 80	% Mannitol	% sukrose	mM glysin
1	10 mg/ml	20 mM L-histidin	/	/	/	/
2	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,01	/	/	/
3	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	/	/	/
4	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	5	/	/
5	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	5	/	200
6	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	2,5	/	100
7	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	/	10	/

Buffer	Konsentrasjon IL6R304	Buffer	% Tween 80	% Mannitol	% sukrose	mM glysin
8	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	/	/	200
9	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	/	5	100
10	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	2,5	5	/
11	10 mg/ml	20 mM L-histidin	/	2,5	5	100
12	10 mg/ml	20 mM L-histidin	0,05	2,5	5	100

Tabell 19. Fremgangsmåter anvendt for å vurdere stabiliteten til IL6R304 ved ulike tidspunkt (representert som x uker eller u) etter lagring ved 5 °C og 37 °C.

Fremgangs- måte	Formål	Ref. materiale	Belastningsforhold	
			5 °C	37 °C
A280	Innhold	0 uker	1, 2 og 5 uker	1, 2, 3 og 5 uker
Utseende	Utfelling	0 uker	1, 2 og 5 uker	1, 2, 3 og 5 uker
RP-HPLC	Renhet/varianter	0 uker	1, 2 og 5 uker	1, 2, 3 og 5 uker
SE-HPLC	Renhet/aggregering/hydrolyse	0 uker	1, 2 og 5 uker	1, 2, 3 og 5 uker
Biacore	Styrke (HAS-binding)	0 uker	5 uker	5 uker
Osmolalitet	Karakteristikk	0 uker	/	/

- 5 **Tabell 20.** Oversikt over SE-HPLC-integrasjonsresultatene etter lagring i 6 måneder ved 37 °C.

Buffer	%-førtopp 1	%-førtopp 2	% hovedtopp	% ettertopp
Ref	0,52	0,17	99,3	0
Buffer 1	ND	ND	ND	ND
Buffer 2	20,4	2,1	73,4	4,1
Buffer 3	ND	ND	ND	ND
Buffer 4	18,1	1,7	76,0	4,2
Buffer 5	22,2	2,0	71,4	4,4
Buffer 6	21,4	1,7	72,7	4,2
Buffer 7	15,1	0	80,5	4,4
Buffer 8	21,1	2,4	72,0	4,5

Buffer	%-førtopp 1	%-førtopp 2	% hovedtopp	% ettertopp
Buffer 9	16,7	2,7	76,3	4,3
Buffer 10	15,8	1,9	77,9	4,4
Buffer 11	17,5	2,0	76,4	4,2
Buffer 12	16,8	3,3	75,7	4,2

Tabell 21. Oversikt over de ulike formuleringsbufferne som ble testet i stabilitetsstudien.

Nr.	Kons.	Buffer	Mannitol	Sukrose	Trehalose	Glysin	Tween-80
1	10 mg/ml	15 mM L-histidin, pH 6,5	5 %				0,01 %
2	10 mg/ml	15 mM L-histidin, pH 6,5		10 %			0,01 %
3	10 mg/ml	15 mM L-histidin, pH 6,5			10 %		0,01 %
4	10 mg/ml	15 mM L-histidin, pH 6,5		7,5 %		0,35 %	0,01 %
5	10 mg/ml	15 mM L-histidin, pH 6,5	2,5 %	5 %			0,01 %
6	10 mg/ml	15 mM fosfat, pH 6,5	5 %				0,01 %
7	10 mg/ml	15 mM fosfat, pH 6,5		10 %			0,01 %
8	10 mg/ml	15 mM fosfat, pH 6,5			10 %		0,01 %
9	10 mg/ml	15 mM fosfat, pH 6,5	7,5 %	7,5 %		0,35 %	0,01 %
10	10 mg/ml	15 mM fosfat, pH 6,5	2,5 %	5 %			0,01 %

Tabell 22. cIEF-integreringsdata av IL6R304 lagret i 8 uker ved 37 °C i de ulike bufferne

Buffer	% førtopp (sure varianter)	% Hovedtopp	% -ettertopp (basiske varianter)
1	5,5	81,3	13,0
2	5,0	81,5	13,5
3	6,1	79,7	14,2
4	5,7	81,2	13,2
5	5,1	81,2	13,7
6	9,0	71,6	19,3
7	9,9	70,5	19,6
8	8,3	71,8	19,9
9	11,7	68,5	19,8
10	8,7	70,5	20,2

Tabell 23. Relativ styrke av IL6R304 etter 8 uker ved +37 °C sammenlignet med B5#030309nr2.3-5.

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

5 **Tabell 24.** Oppsummering av BIAcore-resultatene for HAS-binding av stabilitetsprøvene lagret i 8 uker ved 37 °C, uttrykt som % aktivitet sammenlignet med den tilsvarende prøven lagret ved -70 °C.

Buffer	% aktivitet sammenlignet med referansen
1	97,5
2	93,2
3	92,5
4	83,9
5	101,9
6	92,2
7	89,4
8	99,0
9	84,3
10	89,6

Tabell 25. Utseende av IL6R304 etter 0, 2, 4 og 24 timers omrøring ved 2-8 °C.

Buffer	0 timer	2 timer	4 timer	24 timer
1	klar	klar	klar	klar/lett opaliserende
2	klar	klar	klar	klar/lett opaliserende
3	klar	klar	lett opaliserende	lett opaliserende
4	klar	klar	klar	klar/lett opaliserende
5	klar	klar	lett opaliserende	lett opaliserende
6	klar	klar	lett opaliserende	opaliserende
7	klar	klar	lett opaliserende	opaliserende
8	klar	klar	lett opaliserende	Svært opaliserende
9	klar	klar	klar	opaliserende
10	klar	klar	opaliserende	opaliserende

Tabell 26. Reagenser anvendt i formulerings- og stabilitetsstudien beskrevet i eksemplene 3.

Reagens	Tilbyder	Kat. nr.
ACN, HPLC-renhet	Biosolve	Kat. nr. 012007
TFA	Biosolve	Kat. nr. 20234131
N-propanol, HPLC-renhet	Sigma-Aldrich	Kat. nr. 34871
Vann av MilliQ-renhet		
D-PBS	Invitrogen	Kat. nr. 14190
NaCl	Merck	Kat. nr. 1,06404,1000
Gelfiltreringsstandard	Bio-Rad	Kat. nr. 151-1901
HSA	Sigma	Kat. nr. A3782
L-histidin	Fluka	Kat. nr. 53319
D-Mannitol	Fluka	Kat. nr. 17311
Sukrose	Fluka	Kat. nr. 18219
Glysin	Fluka	Kat. nr. 50058
Tween 80	Merck	Kat. nr. K351 65661 609

5 **Tabell 27.** Endelige konsentrasjoner oppnådd etter konsentrasjon av 23IL0064 ved hjelp av Vivaspin-filtre. Filtreringen ble stoppet i det øyeblikket sluttvolumet ble begrenset (100 til 200 µl) og proteintapet oppstod. Alle prøvene ble analysert ved SE-HPLC: prosent-pre-før-toppen (% totalt overflateareal) representerer aggregater i prøven.

buffertilstand	startforhold		etter ULTRAFILTRERING		
	konsentrasjon	% førtopp in SE-HPLC	konsentrasjon	% førtopp i SE-HPLC	% gjen-vinning
D-PBS	3,8 mg/ml	2,80 %	110 mg/ml	6,30 %	42 % ⁽¹⁾
50 mM NaCl, 10 mM fosfat pH 7	3,4 mg/ml	2,70 %	83 mg/ml	2,80 %	66 % ⁽¹⁾
50 mM NaCl, 40 mM histidin pH 6	3,4 mg/ml	2,70 %	150 mg/ml	2,70 %	59 % ⁽¹⁾
⁽¹⁾ Lave gjenvinninger kan skyldes lokale konsentrasjonseffekter oppnådd i løpet av blindveiltrafiltreringsoppsettet.					

Tabell 28. Bufferne ble testet i en termisk skiftanalyse for 23IL0064.

Buffer	pKa	pH	Konsentrasjon (mM)	mM NaCl	% mannitol
Suksinat	5,64 (pK2)	5,2	20	0	0 - 2,5 - 5 - 7,5
		6,2		50 - 150 - 300 - 500	0
Histidin	6,04 (pK2)	5,5	20	0	0 - 2,5 - 5 - 7,5
		6,5		50 - 150 - 300 - 500	0
Fosfat	7,20 (pK2)	6,7	20	0	0 - 2,5 - 5 - 7,5
		7,7		50 -150 - 300 - 500	0
hepes	7,48	7,0	20	0	0 - 2,5 - 5 - 7,5
		8,0		50 - 150 - 300 - 500	0

Tabell 29 Konsentrasjoner målt ved Nanodrop (gjennomsnittet av 2 målinger) i prøvene belastet ved 37 °C. Konsentrasjonen ble bestemt etter en kort høyhastighetsrotasjon (1 min ved 15 000x g)

P23IL0064-prøver (4mg/ml i D-PBS)	Konsentrasjon (mg/ml)
Referanse (-20 °C)	4,05
3 uker 37 °C (etikett 24 uker)	3,99
4 uker 37 °C (etikett 4 uker)	2,0
6 uker 37 °C (etikett 8 uker)	2,30
6 uker 37 °C (etikett 12 uker)	4,11
6 uker 37 °C (etikett 16 uker)	2,33

Tabell 30. Bufferne testet i belastet stabilitet for 23IL0064.

Buffer	pH	Konsentrasjon*	Eksipiens/sur-faktant	Tidspunkt analysert	Lagrings-temp.
Hepes 20 mM	8	5 mg/ml		2,5 uker	37 °C
His 20 mM	6,5	5 mg/ml		2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C
His 20 mM	6,5	22 mg/ml**		2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C
His 20 mM	6	5 mg/ml		2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C
His 20 mM	6,5	5 mg/ml	0,02 % Tween 80	2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C
His 20 mM	6,5	5 mg/ml	8 % mannitol	2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C
His 20 mM	6,5	5 mg/ml	8 % sukrose	2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C
His 20 mM	6,5	5 mg/ml	1,5 % glysin	2,5 uker/6 uker	4 - 25 - 37 °C

*De nøyaktige konsentrasjonene anvendt i studien varierte mellom 4,9 og 5,1 mg/ml **Merket som 'HØY KONS.' i figurene, var den faktiske kons. 22,36 mg/ml.

Tabell 31. Rå rangering av graden av opalescens og materialtap induisert ved skjærstress for 23IL0064 i ulike formuleringsbuffere.

5 mg/mL	20 mM Histidin pH 6.5 + 8% sukrose	Lavere  Høyere opalescens
	20 mM Histidin pH 6.5 + 8% mannitol	
	20 mM Histidin pH 6.0	
	20 mM Histidin pH 6.5 + 1.5% glycin	
	20 mM Histidin pH 6.5 + 0.02% Tween 80	
	20 mM Histidin pH 6.5	
	20 mM Histidin pH 6.5 KONS (22.36 mg/ml)	

Tabell 32. Integreringsdata av RP-HPLC-analysen av stabilitetsprøvene av 23IL0064 i forskjellige bufferforhold (sammenlignet med 6 uker ved 37 °C, 6 uker ved 25 °C, 6 uker ved 4 °C og -80 °C Ref.).

p23IL0064 i	Belastningsforhold	før 1 22,4	før 2 23,3	Hoved-topp 23,9	etter 1 27,5	etter 2 29,0	Totalt toppareal (%)*
20 mM histidin ved pH 6,5	-80 °C Ref	68	195	1671	76	20	2029
	%	3 %	10 %	82 %	4 %	1 %	100 %
	6 uker ved 4 °C	77	201	1791	85	29	2182
	%	4 %	9 %	82 %	4 %	1 %	108 %
	6 uker ved 25 °C	77	196	1696	125	33	2127
	%	4 %	9 %	80 %	6 %	2 %	105 %
	6 uker ved 37 °C	130	186	1499	274	57	2146
	%	6 %	9 %	70 %	13 %	3 %	106 %
20 mM histidin ved pH 6,0	-80 °C Ref	68	199	1807	66	20	2159
	%	3 %	9 %	84 %	3 %	1 %	100 %
	6 uker ved 4 °C	69	195	1751	71	17	2104
	%	3 %	9 %	83 %	3 %	1 %	97 %
	6 uker ved 25 °C	67	206	1696	90	22	2080
	%	3 %	10 %	82 %	4 %	1 %	96 %
	6 uker ved 37 °C	117	200	1573	152	37	2079
	%	6 %	10 %	76 %	7 %	2 %	96 %
20 mM histidin ved pH	-80 °C Ref	66	175	1564	49	14	1867

p23IL0064 i	Belastnings- forhold	før 1 22,4	før 2 23,3	Hoved-topp 23,9	etter 1 27,5	etter 2 29,0	Totalt toppareal (%)*
<i>6,5 + 0,02 % Tween80</i>	%	4 %	9 %	84 %	3 %	1 %	100 %
	6 uker ved 4 °C	74	196	1749	85	29	2133
	%	3 %	9 %	82 %	4 %	1 %	114 %
	6 uker ved 25 °C	86	196	1556	117	37	1992
	%	4 %	10 %	78 %	6 %	2 %	107 %
	6 uker ved 37 °C	116	195	1258	245	66	1881
	%	6 %	10 %	67%	13 %	4 %	101 %
<i>20 mM histidin ved pH 6,5 + 8 % mannitol</i>	-80 °C Ref	70	201	1770	66	19	2128
	%	3 %	9 %	83 %	3 %	1 %	100 %
	6 uker ved 4 °C	68	193	1739	80	14	2093
	%	3 %	9 %	83 %	4 %	1 %	98 %
	6 uker ved 25 °C	82	192	1665	123	32	2094
	%	4 %	9 %	80 %	6 %	2 %	98 %
	6 uker ved 37 °C	95	173	1438	256	35	1998
<i>20 mM histidin ved pH 6,5 + 8 % sukrose</i>	%	5 %	9 %	72 %	13 %	2 %	94 %
	-80 °C Ref	56	193	1685	70	16	2019
	%	3 %	10 %	83 %	3 %	1 %	100 %
	6 uker ved 4 °C	61	198	1691	62	17	2029
	%	3 %	10 %	83 %	3 %	1 %	100 %
	6 uker ved 25 °C	80	202	1591	123	29	2026
	%	4 %	10 %	79 %	6 %	1 %	100 %
<i>20 mM histidin ved pH 6,5 + 1,5 % glysin</i>	6 uker ved 37 °C	139	246	1292	316	73	2065
	%	7 %	12 %	63 %	15 %	4 %	102 %
	-80 °C Ref	53	167	1413	51	15	1698
	%	3 %	10 %	83 %	3 %	1 %	100 %
<i>20 mM histidin ved pH 6,5 + 1,5 % glysin</i>	6 uker ved 4 °C	68	197	1669	67	18	2019
	%	3 %	10 %	83 %	3 %	1 %	119 %

p23IL0064 i	Belastnings- forhold	før 1 22,4	før 2 23,3	Hoved-topp 23,9	etter 1 27,5	etter 2 29,0	Totalt toppareal (%)*
	6 uker ved 25 °C	74	189	1596	124	31	2014
	%	4 %	9 %	79 %	6 %	2 %	119 %
	6 uker ved 37 °C	95	185	1359	278	52	1968
	%	5 %	9 %	69 %	14 %	3 %	116 %
<i>20 mM histidin ved pH 6,5 KONS.</i>	-80 °C Ref	72	233	1984	81	15	2385
	%	3 %	10 %	83 %	3 %	1 %	100 %
	6 uker ved 4 °C	90	218	1880	88	21	2297
	%	4 %	9 %	82 %	4 %	1 %	96 %
	6 uker ved 25 °C	96	235	1848	143	33	2355
	%	4 %	10 %	78 %	6 %	1 %	99 %
	6 uker ved 37 °C	126	261	1725	332	62	2505
	%	5 %	10 %	69 %	13 %	2 %	105 %
%: gjenvinning beregnet ved hjelp av det totale arealet i forhold til -80 °C Ref av den samme tilstanden.							

Tabell 33. Smeltetemperaturer for 23IL0064 og 23IL0075 i forskjellige buffere som bestemt ved differensiell skanningskalorimetri (ved 1 mg/ml). Skanningen ble utført ved 1 °C/min, start ved 30 °C.

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

5

Tabell 34. Smeltetemperaturer for 23IL0064 og 23IL0075 i buffere som bestemt ved termisk skiftanalyse (ved 0,1 mg/ml)

10

Buffer	23IL0064	23IL0075*	23IL0075*
20 mM Histidin pH 6,5; 50 mM NaCl	54,5	57,0	57,0
20 mM Histidin pH 6,5	56,6	59,2	59,3
20 mM Histidin pH 6,5; 7,5 % mannitol	57,9	60,7	60,6
20 mM hepes pH 7; 50 mM NaCl	54,8	57,4	57,5
20 mM hepes pH 7	56,8	59,8	59,9
20 mM hepes pH 7; 7,5 % mannitol	58,2	61,1	61,2
20 mM hepes pH 8; 50 mM NaCl	55,0	57,6	57,8
20 mM hepes pH 8	56,4	59,5	59,4
20 mM hepes pH 8; 7,5 % mannitol	57,6	60,3	60,3
* Målingene ble utført på de 2 satsene			

Tabell 35. Utforming-Ekspertnummerisk optimalisering av modellen. Jo større den ønskelige koeffisienten er, jo bedre er forslaget for det optimale.

Løsninger for fosfat					
Nummer	Kons.(logg10) (mM)	PH	Buffer	Tm (°C)	Ønskelighet
1	1,00	6,00	Fosfat	59,0012	0,895
2	1,04	6,00	Fosfat	58,9419	0,881
Løsninger for acetat					
Nummer	Kons.(logg10) (mM)	PH	Buffer	Tm (°C)	Ønskelighet
1	1,00	6,00	Acetat	59,2759	0,959
2	1,01	6,08	Acetat	59,2615	0,956
3	1,11	5,88	Acetat	59,1489	0,929
4	1,10	5,80	Acetat	59,1345	0,926
5	1,15	5,72	Acetat	59,0452	0,905
6	1,16	5,68	Acetat	59,0036	0,895
7	1,32	6,09	Acetat	58,9476	0,882
8	1,33	6,15	Acetat	58,9406	0,881
9	1,35	6,21	Acetat	58,9317	0,879
10	1,19	5,56	Acetat	58,8937	0,870
11	1,32	5,89	Acetat	58,8726	0,865
12	1,00	5,00	Acetat	58,77	0,841
13	1,35	5,69	Acetat	58,7182	0,829
14	1,50	6,12	Acetat	58,7181	0,829
15	1,10	5,10	Acetat	58,682	0,820
16	1,16	5,19	Acetat	58,6346	0,809

Løsninger for fosfat					
Nummer	Kons.(logg10) (mM)	PH	Buffer	Tm (°C)	Ønskelighet
17	1,57	6,08	Acetat	58,5857	0,798
18	1,44	5,71	Acetat	58,5814	0,797
19	1,35	5,50	Acetat	58,5692	0,794
20	1,55	5,96	Acetat	58,5672	0,793
21	1,6	6,18	Acetat	58,5354	0,786
22	1,70	6,00	Acetat	58,3294	0,738
23	1,62	5,68	Acetat	58,215	0,711
24	1,34	5,01	Acetat	58,0486	0,672
25	1,47	5,20	Acetat	57,9981	0,660
26	1,33	4,96	Acetat	57,9943	0,659
27	1,56	5,35	Acetat	57,9714	0,654
28	1,27	4,83	Acetat	57,9579	0,651
29	1,62	5,41	Acetat	57,9098	0,639
30	1,53	5,16	Acetat	57,8061	0,615
31	1,61	5,29	Acetat	57,7715	0,607
32	1,57	5,20	Acetat	57,7583	0,604
33	1,56	5,18	Acetat	57,7496	0,602
34	1,35	4,79	Acetat	57,7035	0,591
35	1,65	5,24	Acetat	57,61	0,569
36	1,65	5,17	Acetat	57,5141	0,547
37	1,70	5,00	Acetat	57,0985	0,449
37 løsninger funnet					
Løsninger for histidin					
Nummer	Kons.(logg10) (mM)	PH	Buffer	Tm (°C)	Ønskelighet
1	1,01	6,19	Histidin	59,4631	1,000
2	1,00	6,18	Histidin	59,4654	1,000
3	1,02	6,20	Histidin	59,4617	1,000
4	1,01	6,20	Histidin	59,4767	1,000
5	1,01	6,20	Histidin	59,4702	1,000
6	1,01	6,18	Histidin	59,4525	1,000
7	1,01	6,18	Histidin	59,4554	1,000
8	1,00	6,19	Histidin	59,4736	1,000
9	1,02	6,19	Histidin	59,4524	1,000

Løsninger for histidin					
Nummer	Kons.(logg10) (mM)	PH	Buffer	Tm (°C)	Ønskelighet
10	1,02	6,19	Histidin	59,4537	1,000
11	1,01	6,20	Histidin	59,4644	1,000
12	1,02	6,20	Histidin	59,4559	1,000
13	1,01	6,18	Histidin	55,4608	1,000
14	1,02	6,19	Histidin	59,4556	1,000
15	1,00	6,21	Histidin	59,485	1,000
16	1,01	6,18	Histidin	59,4505	1,000
17	1,02	6,19	Histidin	59,4579	1,000
18	1,03	6,21	Histidin	59,4523	1,000
19	1,01	6,18	Histidin	59,4562	1,000
20	1,01	6,21	Histidin	59,4702	1,000
21	1,00	6,19	Histidin	59,4689	1,000
22	1,01	6,20	Histidin	59,4711	1,000
23	1,05	6,21	Histidin	59,4363	0,997
23 løsninger funnet					
Løsninger for suksinat					
Nummer	Kons.(logg10) (mM)	PH	Buffer	Tm (°C)	Ønskelighet
1	1,00	5,94	Suksinat	57,8819	0,633
2	1,00	5,94	Suksinat	57,8819	0,633
3	1,00	5,94	Suksinat	57,8819	0,633
4	1,00	5,93	Suksinat	57,8819	0,633
5	1,00	5,95	Suksinat	57,8818	0,633
6	1,00	5,92	Suksinat	57,8818	0,633
7	1,00	5,96	Suksinat	57,8817	0,633
7 løsninger funnet					

Tabell 36. Optimaliseringsresultater basert på de oppnådde smeltetemperaturene i skreeningen av et bredt spekter av eksipienser i en histidin-, acetat- eller fosfatbuffer for formuleringen av 23IL0075. Resultatene ble arrangert fra høy til lav Tm-verdi. Formuleringssammensetningen må leses ved å kombinere identiteten til eksipiensene i kolonnene 2 til 4, og mengden av hver eksipiens i kolonnene 5 til 7.

Kombinasjon nummer	Sukker/ polyol	Vaske-middel	Amino-syre	Buffer	% sukker /polyol	% amino-syre	% vaske-middel	Tm-verdi (°C)
47	Sukrose	Tween 20	Glysin	Histidin PH 6	10,5	0	0	62,9 7

Kombinasjon nummer	Sukker/polyol	Vaske-middel	Amino-syre	Buffer	% sukker/polyol	% amino-syre	% vaske-middel	Tm-verdi (°C)
44	Sukrose	Tween 20	Arg/Glu	Histidin PH 6	10,5	0	0	62,5
5	Mannito l	P-F68	Glysin	Histidin PH 6	5,6	0	0	62,2 2
41	Sukrose	P-F68	Glysin	Histidin PH 6	10,5	0	0	62,2 2
11	Mannito l	Tween 20	Glysin	Histidin PH 6	5,6	0	0	62,1 8
46	Sukrose	Tween 20	Glysin	Acetat PH5,5	10,5	0	0	62,1 6
42	Sukrose	P-F68	Glysin	Fosfat PH 6	6,3	0,91	0	62,1 3
38	Sukrose	P-F68	Arg/Glu	Histidin PH 6	10,5	0	0	61,9
6	Mannito l	P-F68	Glysin	Fosfat PH 6	3,7	0,77	0	61,8 6
43	Sukrose	Tween 20	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	10,5	0	0	61,7 7
40	Sukrose	P-F68	Glysin	Acetat PH 5,5	8,8	0,37	0	61,7 4
22	Sorbitol	P-F68	Glysin	Acetat PH 5,5	3,9	0,69	0	61,7
48	Sukrose	Tween 20	Glysin	Fosfat PH 6	9,2	0,28	0	61,6 7
4	Mannito l	P-F68	Glysin	Acetat PH 5,5	4,7	0,37	0	61,5 8
53	Sukrose	Tween 80	Glysin	Histidin PH 6	10,5	0	0	61,5 8
54	Sukrose	Tween 80	Glysin	Fosfat PH 6	6,4	0,90	0	61,5 2
17	Mannito l	Tween 80	Glysin	Histidin PH 6	5,6	0	0	61,4 4
37	Sukrose	P-F68	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	10,5	0	0	61,4 3
23	Sorbitol	P-F68	Glysin	Histidin PH 6	5,6	0	0	61,3 9
12	Mannito l	Tween 20	Glysin	Fosfat PH 6	5,6	0	0	61,3 3
10	Mannito l	Tween 20	Glysin	Acetat PH 5,5	5,6	0	0	61,2
30	Sorbitol	Tween 20	Glysin	Fosfat PH 6	0,0	2,3	0,0021	61,2

Kombinasjon nummer	Sukker/polyol	Vaske-middel	Amino-syre	Buffer	% sukker/polyol	% amino-syre	% vaske-middel	Tm-verdi (°C)
29	Sorbitol	Tween 20	Glysin	Histidin PH 6	5,6	0	0	61,19
50	Sukrose	Tween 80	Arg/Glu	Histidin PH 6	10,5	0	0	61,14
52	Sukrose	Tween 80	Glysin	Acetat PH 5,5	8,4	0,46	0	61,1
2	Mannitol 1	P-F68	Arg/Glu	Histidin PH 6	5,6	0	0	61,07
45	Sukrose	Tween 20	Arg/Glu	Fosfat PH 6	10,5	0	0	61,01
18	Mannitol 1	Tween 80	Glysin	Fosfat PH 6	5,6	0	0	60,93
8	Mannitol 1	Tween 20	Arg/Glu	Histidin PH 6	5,6	0	0	60,88
28	Sorbitol	Tween 20	Glysin	Acetat PH 5,5	5,6	0	0	60,86
24	Sorbitol	P-F68	Glysin	Fosfat PH 6	3,2	1,00	0	60,84
16	Mannitol 1	Tween 80	Glysin	Acetat PH 5,5	5,6	0	0	60,73
19	Sorbitol	P-F68	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	5,6	0	0,062	60,71
49	Sukrose	Tween 80	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	10,5	0	0	60,68
20	Sorbitol	P-F68	Arg/Glu	Histidin PH 6	5,6	0	0,036	60,65
39	Sukrose	P-F68	Arg/Glu	Fosfat PH 6	10,5	0	0	60,5
1	Mannitol 1	P-F68	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	5,6	0	0	60,43
34	Sorbitol	Tween 80	Glysin	Acetat PH 5,5	3,9	0,69	0	60,29
26	Sorbitol	Tween 20	Arg/Glu	Histidin PH 6	5,6	0	0,0004	60,27
35	Sorbitol	Tween 80	Glysin	Histidin PH 6	5,6	0	0	60,18
14	Mannitol 1	Tween 80	Arg/Glu	Histidin PH 6	5,6	0	0	60,17
3	Mannitol 1	P-F68	Arg/Glu	Fosfat PH 6	5,5	0,06 + 0,05	0	60,15
25	Sorbitol	Tween 20	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	5,6	0	0,0017	60,0

Kombinasjon nummer	Sukker/polyol	Vaske-middel	Amino-syre	Buffer	% sukker/polyol	% amino-syre	% vaske-middel	Tm-verdi (°C)
								4
7	Mannitol 1	Tween 20	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	5,6	0	0	59,9 8
51	Sukrose	Tween 80	Arg/Glu	Fosfat PH 6	10,5	0	0	59,9 8
9	Mannitol 1	Tween 20	Arg/Glu	Fosfat PH 6	5,6	0	0	59,8 6
21	Sorbitol	P-F68	Ang/Glu	Fosfat PH 6	5,6	0	0,106	59,7 3
13	Mannitol 1	Tween 80	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	5,6	0	0	59,5 4
15	Mannitol 1	Tween 80	Arg/Glu	Fosfat PH 6	5,6	0	0	59,4 9
36	Sorbitol	Tween 80	Glysin	Fosfat PH 6	5,6	0	0	59,4 6
31	Sorbitol	Tween 80	Arg/Glu	Acetat PH 5,5	5,6	0	0,0027	59,3 6
32	Sorbitol	Tween 80	Arg/Glu	Histidin PH 6	4,9	0,34 + 0,29	0,0009	59,3 4
27	Sorbitol	Tween 20	Arg/Glu	Fosfat PH 6	5,6	0	0,0039	59,1 7
33	Sorbitol	Tween 80	Arg/Glu	Fosfat PH 6	5,6	0	0,0049	58,5 9

Tabell 37. Sammenligning av aggregeringsstarttemperaturer og maksimal spredning nådd for 23IL0075 i 3 buffere (25 µg/ml), som målt ved elastisk lysspredning. (Temperaturintervall: 45-95 °C, temperaturgradient: 2 °C/min, datastigning: 1 °C, bølgelengde (eks./em): 500 nm, båndbredde (eks./em): 3 nm)

	Aggregeringsstarttemperatur	Maksimalt nådd spredning
10 mM fosfat ved pH 6	52,1 °C	Ute av målestokk
10 mM acetat ved pH 6	51,0 °C	Ute av målestokk
10 mM histidin ved pH 6	52,7 °C	435 abs

Tabell 38. Listen over bufferne ble testet i frysing/tinging og omrørt i belastningsstudien til 23IL0075 (10 mg/ml)

Nr.	Buffer		
1	10 mM acetat pH 5,5	5,6 % mannitol	0,0025 % Tween 80
2	10 mM acetat pH 5,5	5,6 % mannitol	0,005 % Tween 80
3	10 mM acetat pH 5,5	5,6 % mannitol	0,05 % P-F68

Nr.	Buffer		
4	10 mM acetat pH 5,5	5,6 % mannitol	0,1 % P-F68
5	10 mM histidin pH 6,0	5,6 % mannitol	0,0025 % Tween 80
6	10 mM Histidin pH 6,0	5,6 % mannitol	0,005 % Tween 80
7	10 mM histidin pH 6,0	5,6 % mannitol	0,05 % P-F68
8	10 mM histidin pH 6,0	5,6 % mannitol	0,1 % P-F68
9	10 mM fosfat pH 6,0	5,6 % mannitol	0,0025 % Tween 80
10	10 mM fosfat pH 6,0	5,6 % mannitol	0,005 % Tween 80
11	10 mM fosfat pH 6,0	5,6 % mannitol	0_05°/a P-F68
12	10 mM fosfat pH 6,0	5,6 % mannitol	0,1 iso P-F68
13	10 mM acetat pH 5,5	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,0025 % Tween 80
14	10 mM acetat pH 5,5	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,005 % Tween 80
15	10 mM acetat pH 5,5	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,05° lo P-F68
16	10 mM acetat pH 5,5	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,1 % P-F68
17	10 mM histidin pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,0025 % Tween 80
18	10 mM histidin pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,005 % Tween 80
19	10 mM histidin pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,05 % P-F68
20	10 mM histidin pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,1 % P-F68
21	10 mM fosfat pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,0025 % Tween 80
22	10 mM fosfat pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,005 % Tween 80
23	10 mM fosfat pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,05 % P-F68
24	10 mM fosfat pH 6,0	2,8 % mannitol 1,15 % glysin	0,1 % P-F68

Tabell 39. Stabilitetsstudie av 23IL0075 i 10 mM histidin pH 6,0 med forskjellige eksipienser. Prøvene ble belastet med 10 X frysing/tinging, og ble lagret ved forskjellige temperaturer (-70 °C, 5 °C, 25 °C og 37 °C) i en stabilitetsstudie. Belastnings- og stabilitetsprøvene ble analysert ved hjelp av OD-måling, RP-HPLC og SE-HPLC.

Nr.	Kons. (mg/ml)	Buffer	Mannitol	Sukrose	Glysin	Poloksamer 188	Tween-80
1	25	10 mM L-histidin, pH 6	5,4 %				0,005 %
2	25	10 mM L-histidin, pH 6		10,0 %			0,005 %
3	25	10 mM L-histidin, pH 6	3,5 %	3,5 %			0,005 %
4	25	10 mM L-histidin, pH 6	2,8 %		1,15 %		0,005 %
5	25	10 mM L-histidin, pH 6	5,4 %			0,05 %	

Nr.	Kons. (mg/ml)	Buffer	Mannitol	Sukrose	Glysin	Poloksamer 188	Tween-80
6	25	10 mM L-histidin, pH 6		10,0 %		0,05 %	
7	25	10 mM L-histidin, pH 6	3,7 %	3,5 %		0,05 %	
8	25	10 mM L-histidin, pH 6	2,8 %		1,15 %	0,05 %	
9	25	10 mM L-histidin, pH 6	3,5 %	3,5 %			

Tabell 40. Prøvene ble utsatt for skjærspenning ved omrøring. Prøvene ble etterpå analysert av OD-målinger, RP-HPLC, SE-HPLC og BIAcore.

Nr.	Kons.	Buffer	Mannitol	Sukrose	Glysin
1	10 mg/ml	10 mM L-histidin, pH 6	5,4 %		
2	10 mg/ml	10 mM L-histidin, pH 6		10,0 %	
3	10 mg/ml	10 mM L-histidin, pH 6	3,5 %	3,5 %	
4	10 mg/ml	10 mM L-histidin, pH 6	2,8%		1,15 %

Tabell 41. Resultater av SE-HPLC og RP-HPLC-kromatografi ved 23IL0075 ved 25 mg/ml i ulike formuleringsbufferkandidater (detaljer; se tabellen over) i akselerert stabilitetsstudie ved 25 og 37°C.

	3 uker 37°C		6 uker 37°C		6 uker 25°C	
Eksipienser	% pre-topp i SE-HPLC (oligomerer)*	% post-topp i RP-HPLC (N-terminal pyroglutamat)**	% pre-topp* i SE-HPLC	% post-topp** i RP-HPLC	% pre-topp* i SE-HPLC	% post-topp** i RP-HPLC
Mannitol / Tween 80	4.8	6.7	6.9	9.5	0.7	4.9
Sucrose/Tween 80	4.0	6.0	7.1	9.2	0.6	4.1
Mannitol/sucros_/Tween 80	5.3	5.6	9.5	8.5	0.6	3.8
Mannitol/Glycin /Tween 80	7.2	5.6	12	8.8	0.7	3.9
Mannitol/PF	5.0	6.2	12***	14.7***	0.8	5.6
Sucrose/PF	3.7	5.8	7.9	9.4	0.6	4.1
Mannitol/Sucrose/PF	4.3	5.4	8.5	8.3	0.7	4.1
Mannitol/Glycin /PF	5.4	5.4	11	8.6	0.8	3.9
Mannitol/Sucrose	3.5	5.2	7.5	8.3	0.8	3.8

*I referanseprøven 0,3 til 0,4 % pre-topp i SE-HPLC;

**post-topp i RP-HPLC var til stede;

*** Prøven stresset i 6 uker ved 37 gr.C i mannitol og Poloxamer 188 var avvikende også basert på OD500-verdien som var 0,1 sammenlignet med OD500-verdier alltid under 0,01 for alle andre prøver.

Tabell 42. Stabilitetsdata for IL6R304-sats CMC-D-0048, lagret ved -70 °C.

	Tidspunkt (måneder)		
Testfremgangsmåte	Innledende (0)	3	6
Utseende	Klar, fargeløs løsning	Klar, fargeløs løsning	Klar, fargeløs løsning
A280	10,52 mg/m	10,38 mg/ml	mg/ml
SEC-HPLC	Renhet = 99,20 %	Renhet = 98,67 %	Renhet = 98,76 %
	Førtopper = 0,80 %	Førtopper = 1,33 %	Førtopper = 1,24 %
	Ettertopper = 0,00 %	Ettertopper = 0,00 %	Ettertopper = 0,00 %
cIEF	Renhet = 100,00 %	Renhet = 100,00 %	Renhet = 99,30 %

	Tidspunkt (måneder)		
Testfremgangsmåte	Innledende (0)	3	6
	Ettertopp = 0,00 %	Ettertopp = 0,00 %	Ettertopp = 0,70 %
RP-HPLC	Renhet = 93,90 %	Renhet = 91,93 %	Renhet = 92,8 %
	Førtopp 1 = 0,00 %	Førtopp 1 = 0,14 %	Førtopp 1 = 0,12 %
	Førtopp 2 = 3,20 %	Førtopp 2 = 3,41 %	Førtopp 2 = 3,00 %
	Ettertopp 1 = 0,00 %	Ettertopp 1 = 0,00 %	Ettertopp 1 = 0,00 %
	Ettertopp 2 = 2,60 %	Ettertopp 2 = 4,10 %	Ettertopp 2 = 3,60 %
	Ettertopp 3 = 0,00 %	Ettertopp 3 = 0,00 %	Ettertopp 3 = 0,00 %
	Ettertopp 4 = 0,20 %	Ettertopp 4 = 0,29 %	Ettertopp 4 = 0,32 %
	Ettertopp 5 = 0,00 %	Ettertopp 5 = 0,14 %	Ettertopp 5 = 0,15 %
Styrke (IL-6R-hemming)	1,256 ± 0,084	0,973 ± 0,072	1,049 ± 0,090
Styrke (HAS-binding)	1,044 ± 0,094	0,955 ± 0,085	0,985 ± 0,069

Tabell 43. Stabilitetsdata av IL6R304-sats CMC-D-0048, lagret ved +5 °C.

	Tidspunkt (måneder)		
Testfremgangsmåte	Innledende (0)	3	6
Utseende	Klar, fargeløs løsning	Klar, fargeløs løsning	Klar, fargeløs løsning
A280	10,52 mg/ml	10,29 mg/ml	10,33 mg/ml
SEC-HPLC	Renhet = 99,20 %	Renhet = 98,50 %	Renhet = 98,62 %
	Førtopper = 0,80 %	Førtopper = 1,50 %	Førtopper = 1,38 %
	Ettertopper = 0,00 %	Ettertopper = 0,00 %	Ettertopper = 0,00 %
cIEF	Renhet = 100,00 %	Renhet = 100,00 %	Renhet = 99,30 %
	Ettertopp = 0,00 %	Ettertopp = 0,00 %	Ettertopp = 0,70 %
RP-HPLC	Renhet = 93,90 %	Renhet = 91,71 %	= 92,30 %
	Førtopp 1 = 0,00 %	Førtopp 1 = 0,15 %	Førtopp 1 = 0,11 %
	Førtopp 2 = 3,20 %	Førtopp 2 = 3,53 %	Førtopp 2 = 3,20 %
	Ettertopp 1 = 0,00 %	Ettertopp 1 = 0,00 %	Ettertopp 1 = 0,00 %
	Ettertopp 2 = 2,60 %	Ettertopp 2 = 4,16 %	Ettertopp 2 = 3,90 %
	Ettertopp 3 = 0,00 %	Ettertopp 3 = 0,00 %	Ettertopp 3 = 0,00 %
	Ettertopp 4 = 0,20 %	Ettertopp 4 = 0,29 %	Ettertopp 4 = 0,35 %
	Ettertopp 5 = 0,00 %	Ettertopp 5 = 0,15 %	Ettertopp 5 = 0,12 %
Styrke (IL6R-hemming)	1,256 ± 0,084	0,959 ± 0,061	1,015 ± 0,076
Styrke (HAS-binding)	1,044 ± 0,094	0,930 ± 0,103	0,983 ± 0,078

Tabell 44. Stabilitetsdata av IL6R304-satsen CMC-D-0048, lagret ved 25 °C.

Testfremgangsmåte	Tidspunkt (måneder)		
	Innledende (0)	3	6
Utseende	Klar, fargeløs løsning	Klar, fargeløs løsning	Klar, fargeløs løsning
A280	10,52 mg/ml	10,29 mg/ml	10,48 mg/ml
SEC-HPLC	Renhet = 99,20 %	Renhet = 97,81 %	Renhet = 97,13 %
	Førtopper = 0,80 %	Førtopper = 1,57 %	Førtopper = 1,87 %
	Ettertopper = 0,00 %	Ettertopper = 0,62 %	Ettertopper = 1,00 %
cIEF	Renhet = 100,00 %	Renhet = 96,40 %	Renhet = 92,30 %
	Ettertopp = 0,00 %	Ettertopp = 3,60 %	Ettertopp = 7,70 %
RP-HPLC	Renhet = 93,90 %	Renhet = 87,77 %	Renhet = 82,30 %
	Førtopp 1 = 0,00 %	Førtopp 1 = 0,44 %	Førtopp 1 = 0,87 %
	Førtopp 2 = 3,20 %	Førtopp 2 = 4,56 %	Førtopp 2 = 6,40 %
	Ettertopp 1 = 0,00 %	Ettertopp 1 = 0,00 %	Ettertopp 1 = 1,10 %
	Ettertopp 2 = 2,60 %	Ettertopp 2 = 6,26 %	Ettertopp 2 = 8,80 %
	Ettertopp 3 = 0,00 %	Ettertopp 3 = 0,54 %	Ettertopp 3 = 0,86 %
	Ettertopp 4 = 0,20 %	Ettertopp 4 = 0,30 %	Ettertopp 4 = 0,32 %
	Ettertopp 5 = 0,00 %	Ettertopp 5 = 0,13 %	Ettertopp 5 = 0,16 %
Styrke (IL6R-hemming)	1,256 ± 0,084	0,945 ± 0,065	0,949 ± 0,066
Styrke (HSA-binding)	1,044 ± 0,094	0,967 ± 0,095	0,926 ± 0,065

SEKVENSLISTE**[0372]**

<110> Ablynx NV

5 <120> STABILE FORMULERINGER AV POLYPEPTIDER OG ANVENDELSER AV
DISSE

<130> P09-023-PCT-1

<160> 6

<170> PatentIn versjon 3.5

<210> 1

10 < 211> 245

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Nanolegemesekvens

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 145 150 155 160

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175

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

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

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

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser
 245

5 <210> 2

< 211> 375

< 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

10 < 223> Nanolegemesekvens

<400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

130

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 3

< 211> 375

5 < 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Nanolegemesekvens

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Val Phe Lys Ile Asn
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 145 150 155 160

Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
 165 170 175

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

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

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

Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Leu
 225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
370 375

<210> 4

< 211> 385

5 < 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Nanolegemesekvens

<400> 4

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

65		70		75		80									
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			85						90					95	
Ala	Ala	Tyr	Ile	Arg	Pro	Asp	Thr	Tyr	Leu	Ser	Arg	Asp	Tyr	Arg	Lys
			100					105					110		
Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly
		115						120					125		
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
	130					135					140				
Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Asn	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
145					150					155					160
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
				165					170					175	
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp
			180					185					190		
Thr	Leu	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
		195					200					205			
Asn	Ala	Lys	Thr	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Pro	Glu
	210					215					220				
Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Thr	Ile	Gly	Gly	Ser	Leu	Ser	Arg	Ser
225					230					235					240
Ser	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
				245					250					255	
Gly	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
			260					265					270		
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
		275					280					285			
Ser	Ser	Tyr	Pro	Met	Gly	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Arg
		290				295					300				
Glu	Phe	Val	Ser	Ser	Ile	Thr	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala
305					310					315					320
Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn
				325					330					335	

134

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

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

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

Ser
 385

<210> 5

< 211> 386

< 212> PRT

5 < 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Nanolegemesekvens

<400> 5

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

135

145 150 155 160
 Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 165 170 175
 Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 180 185 190
 Leu Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn
 195 200 205
 Ala Lys Thr Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp
 210 215 220
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser
 225 230 235 240
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 245 250 255
 Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 260 265 270
 Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser
 275 280 285
 Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu
 290 295 300
 Phe Val Ser Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 305 310 315 320
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
 325 330 335
 Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr
 340 345 350
 Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu
 355 360 365
 Leu Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 370 375 380
 Ser Ser
 385

<210> 6

< 211> 386

5 < 212> PRT

< 213> Kunstig sekvens

<220>

< 223> Nanolegemesekvens

<400> 6

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ile Phe Ser Leu Pro
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

Leu Val Gln Pro Gly Asn Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
 145 150 155 160

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 165 170 175

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asp Thr
 180 185 190

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

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

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser

137

225		230		235		240
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly						
		245		250		255
Gly Ser Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro						
		260		265		270
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Ser						
		275		280		285
Ser Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Arg Glu						
		290		295		300
Phe Val Ala Arg Ile Ser Gln Gly Gly Thr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp						
		305		310		315
						320
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr						
		325		330		335
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr						
		340		345		350
Tyr Cys Ala Lys Asp Pro Ser Pro Tyr Tyr Arg Gly Ser Ala Tyr Leu						
		355		360		365
Leu Ser Gly Ser Tyr Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val						
		370		375		380
Ser Ser						
385						

P a t e n t k r a v

1. Formulering omfattende en vandig bærer med en pH på 5,5 til 8,0 og et polypeptid omfattende ett eller flere enkle variable domener i en konsentrasjon på
 5 1 mg/ml til 200 mg/ml, idet formuleringen formuleres for administrering til et menneske, og formuleringen er ytterligere omfattende en buffer i en konsentrasjon på 10 til 100 mM valgt fra histidin pH 6,0-6,5, idet formuleringen har en uorganisk saltkonsentrasjon på 150 mM eller lavere, og der polypeptidet velges fra ett av SEQ ID NO: 1 til 6.

10 2. Formuleringen ifølge krav 1, som ikke inneholder noe uorganisk salt.

3. Formuleringen ifølge krav 1 eller 2, der konsentrasjonen av polypeptidet er 5 til 100 mg/ml, mer foretrukket 5 til 50 mg/ml, så som 5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml,
 15 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, eller enda mer.

4. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 3, der

20 - polypeptidet har en løselighet på minst 20 mg/ml, fortrinnsvis 50 mg/ml eller mer, mer foretrukket 90 mg/ml, som bestemt av PEG-utelukkelsesmetoden, eller ved et konsentrasjonsforsøk;

- mindre enn 10 % av polypeptidet danner pyroglutamat ved den N-terminale glutaminsyren under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker
 25 (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), % av pyroglutamatet er som målt ved hjelp av RP-HPLC;

- mindre enn 10 % av polypeptidet danner dimerer under lagring ved en temperatur på 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3 uker, minst 5
 30 uker, minst 8 uker, minst 10 uker, minst 3 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer), % av dimerer som målt ved SE-HPLC;

- minst 80 % av polypeptidene beholder bindingsaktiviteten deres på minst ett av målene sine etter lagring ved 37 ± 5 °C opptil minst 2 uker (fortrinnsvis minst 3
 35 uker, minst 5 uker, minst 2 måneder, minst 6 måneder, minst 1 år, 1,5 år eller til og med 2 år eller mer) sammenlignet med bindingsaktiviteten før lagring, idet bindingsaktiviteten er som målt ved ELISA og/eller Biacore; og/eller

- polypeptidet har et OD320/OD280-forhold på 0,05 eller lavere etter mekanisk belastning valgt fra:

- risting av formuleringen i 10 s til 1 min;
- pressing av formuleringen gjennom en kanyle (25G, fortrinnsvis 26G, mer foretrukket 27G, enda mer foretrukket 28G, mest foretrukket 29G eller mer) med en sprøyte (sprøyten som anvendes kan være hvilken som helst kommersielt tilgjengelig sprøyte, så som f.eks. en 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml, 30 ml, 40 ml til 50 ml sprøyte);
- rotering i to dager ved 10 rpm; og/eller
- omrøring i 1 time ved romtemperatur og/eller 4-48 timer ved 4 °C i minst 10 rpm (så som 50 rpm, 100 rpm eller mer).

5. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 4, der bufferen er en histidin-pH 6,5- eller histidin-pH 6,0-buffer.

6. Formuleringen ifølge krav 5, der histidinbufferen har en konsentrasjon på 10 til 50 mM, mer foretrukket 10 til 20 mM, så som 10 eller 15 mM.

7. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 6, videre omfattende en eksipiens i en konsentrasjon på 1 til 20 %.

8. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 7, der eksipiensen er et sakkarid, et ikke-reduserende sukker og/eller polyol.

9. Formuleringen ifølge krav 8, der eksipiensen velges fra mannitol, trehalose, sorbitol og sukrose.

10. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 8 eller 9, der eksipiensen har en konsentrasjon på 2,5 til 15 %, mer foretrukket 5 til 10 %, så som rundt 5 %, 7,5 %, 8 % og 10 %.

11. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 10, videre omfattende en surfaktant ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 % valgt fra polysorbat 20, polysorbat 80 eller en poloksamer.

12. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 11, der surfaktanten er polysorbat 80.

13. Formuleringen ifølge krav 12, der surfaktanten har en konsentrasjon på 0,01 til 0,1 %, fortrinnsvis 0,01 til 0,05 %, så som rundt 0,01 eller 0,005 %.

14. Formuleringen ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 13, omfattende:
- a) en histidin-pH 6,5- eller pH-6,0-buffer ved en konsentrasjon på 10 til 100 mM;
 - b) sukrose ved en konsentrasjon på 1 til 20 %; og
 - c) polysorbat 80 ved en konsentrasjon på 0,001 til 1 %.

5

15. Formuleringen ifølge krav 14, omfattende:
- a) 15 mM histidin ved pH 6,5;
 - b) 8 % sukrose; og
 - c) 0,01 % polysorbat 80.

10

16. Formuleringen ifølge krav 14, omfattende:
- a) 10 mM histidin ved pH 6,0;
 - b) 10 % sukrose; og
 - c) 0,005 % polysorbat 80.

15

17. Fremgangsmåte for fremstilling av en formulering ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 16, minst omfattende trinnet med konsentrering av polypeptidet og utbytting av det med den valgte bufferen og/eller eksipiensen.

20

18. Forseglet beholder inneholdende en formulering ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 16.

25

19. Farmasøytisk enhetsdoseform egnet for parenteral administrering til et menneske, omfattende en formulering ifølge hvilket som helst av kravene 1 til 16 i en egnet beholder.

30

20. Sett omfattende én eller flere av de forseglede beholderne ifølge krav 18 og/eller farmasøytiske enhetsdoseringsformer ifølge krav 19, og instruksjoner for anvendelse av formuleringen.

35

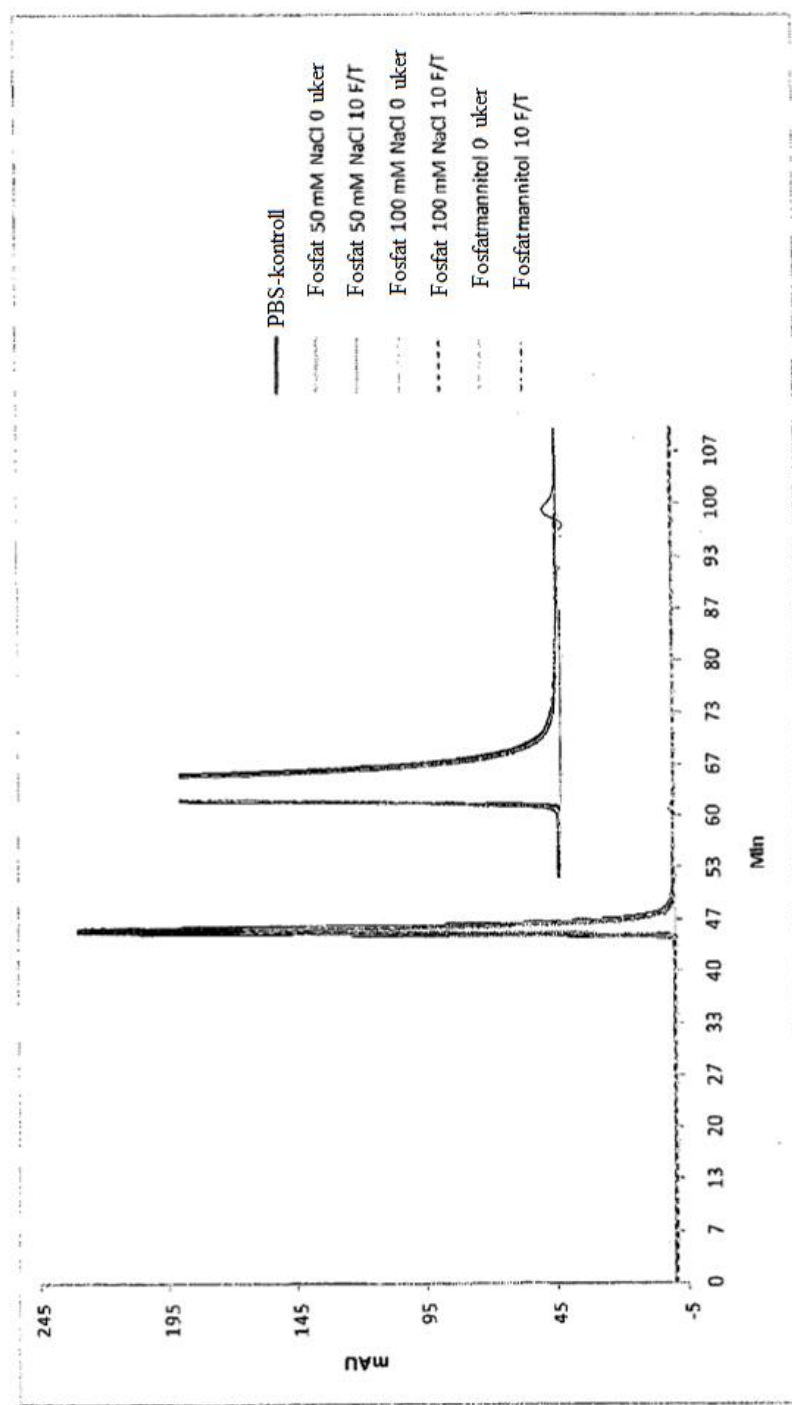
21. Formuleringen, beholderen, den farmasøytiske enhetsdosen eller settet ifølge hvilket som helst av de foregående kravene, for anvendelse i terapi.

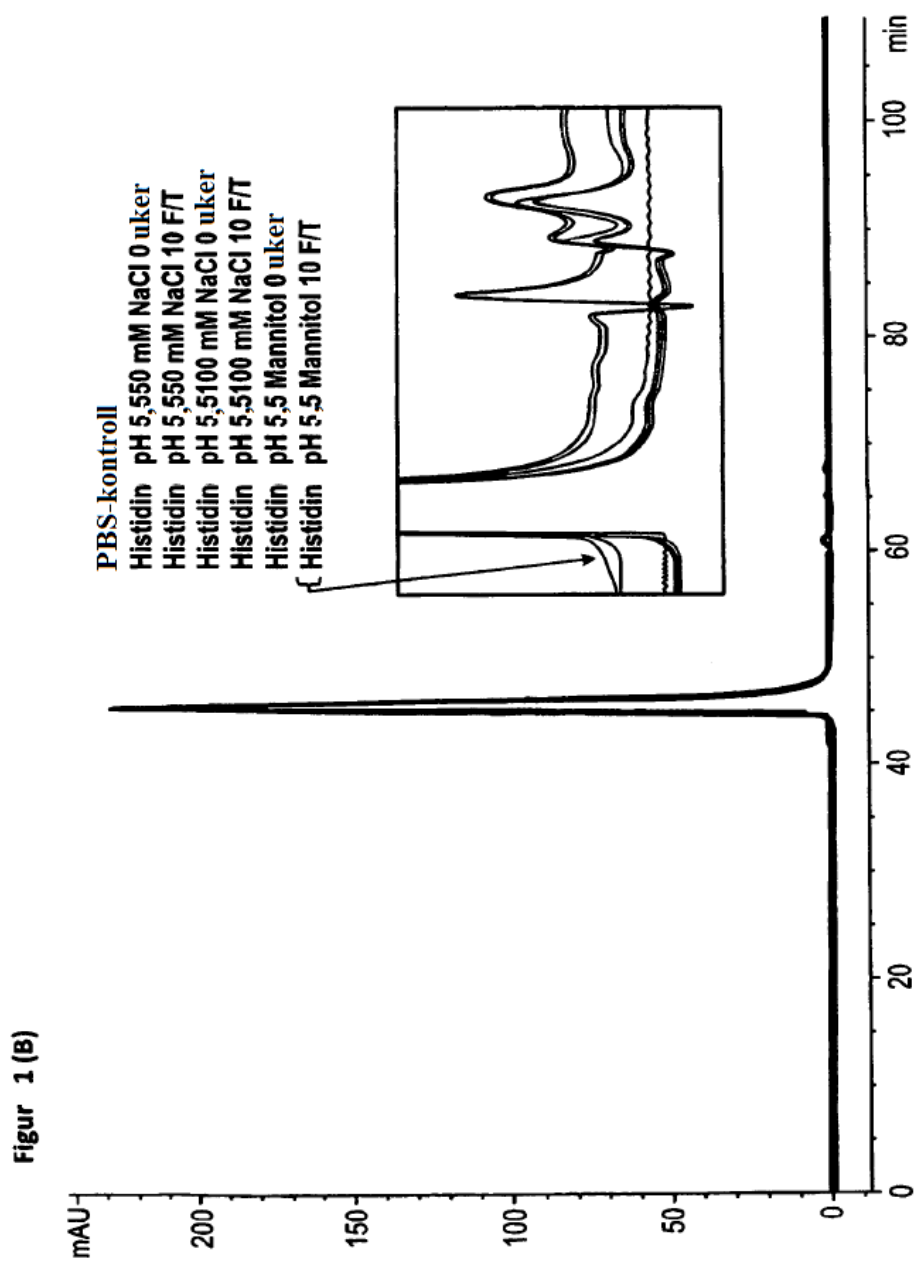
35

22. Formuleringen, beholderen, den farmasøytiske enhetsdosen eller settet ifølge krav 21 for behandling av osteoporose, kreftindusert bentap, benbrudd forbundet med autoimmunitet, og/eller viral infeksjon, revmatoid artritt, unormal synovial cellevekst, plasmocytoseindusert Castlemans sykdom, tumor, muskelproteinproteolyse, multippel sklerose, systemisk lupuserytematose, inflammatorisk tarmsykdom, pankreatitt, psoriasis, angiogenese, systemisk innsettingstype juvenil revmatoid artritt, ryggmargs-

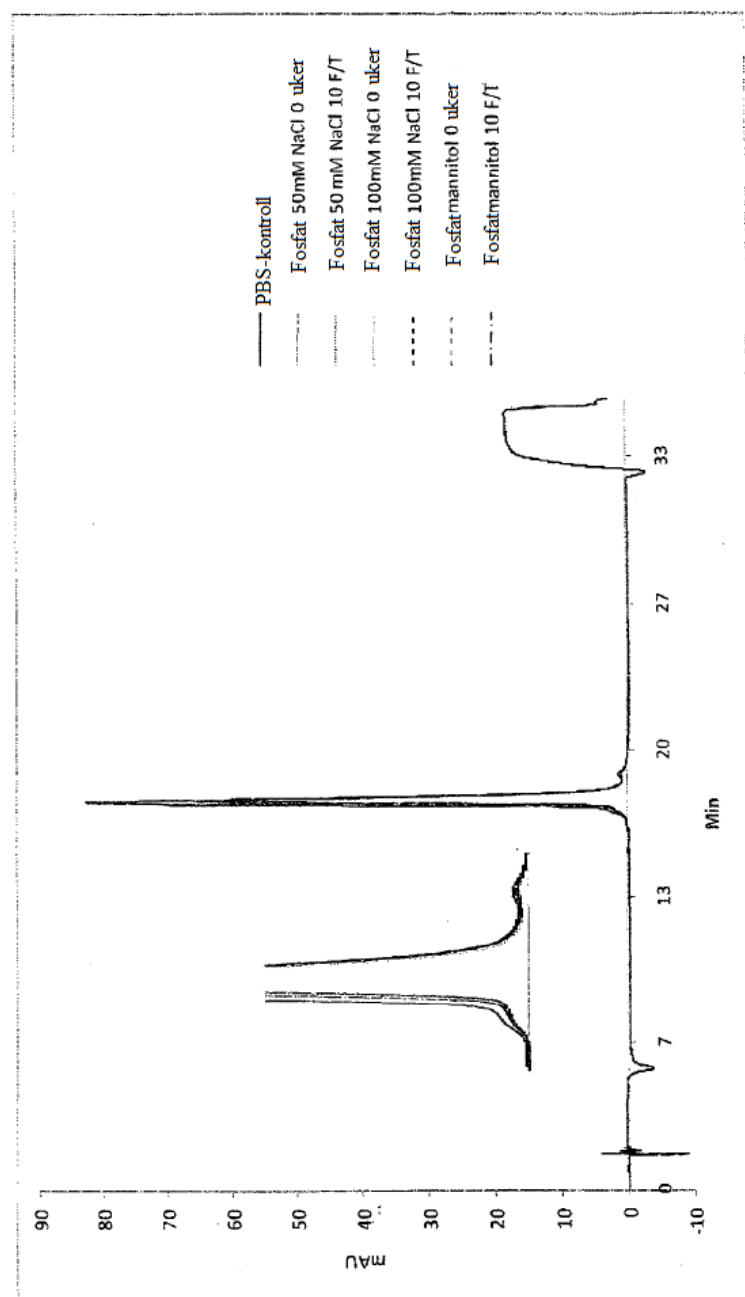
skade, endotel skade eller ødeleggelse, mesoteliom, vaskulitt, osteoartritt, indre øreforstyrrelse, kreft, avstøtning etter transplantasjon, langerhanøtetransplantasjon, myokardialt infarkt, prostatakreft, koroidal neovaskularisering, muskelregenerasjon, inflammatorisk myopati, kronisk avstøtning i hjertetransplantasjon, forsinket podingsfunksjon, som tarmsykdommer (kolitt, Crohns sykdom, IBD), infeksjons-
5 sykdommer, psoriasis, kreft, sarkoidose, transplantatavstøtning, cystisk fibrose, astma, kronisk obstruktiv pulmonær sykdom, viral infeksjon, vanlig variabel immunsvikt.

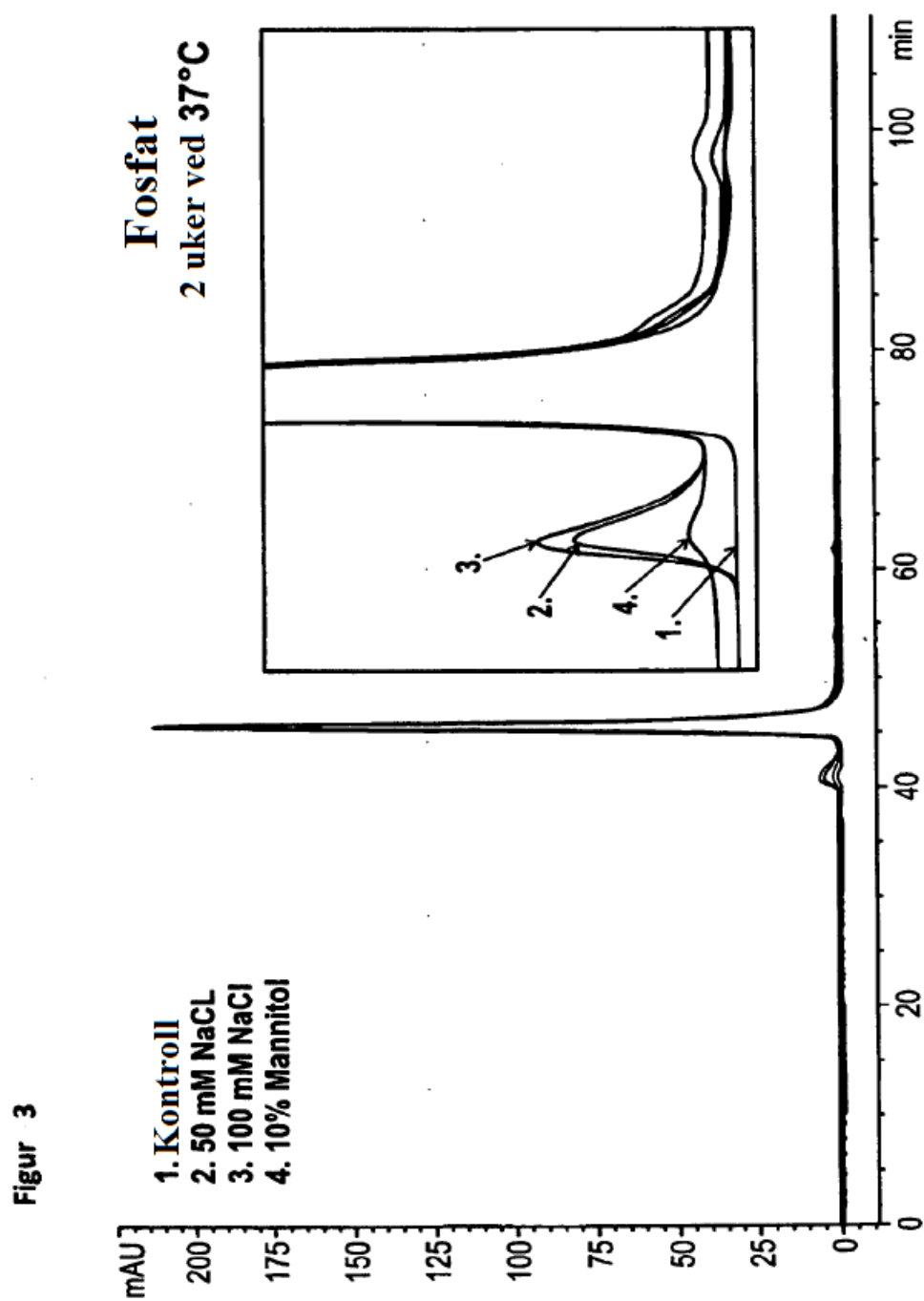
Figur 1 (A)



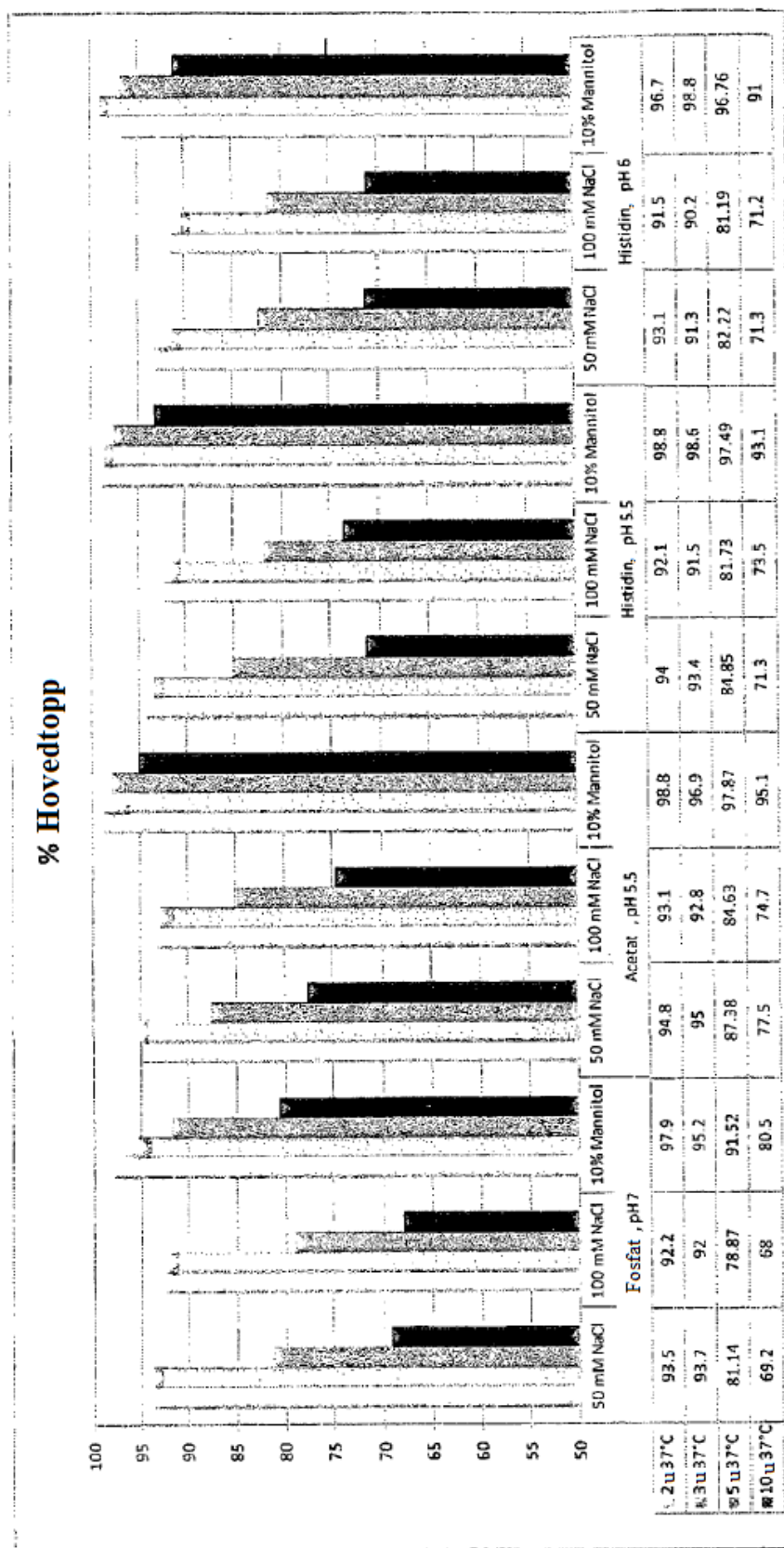


Figur 2

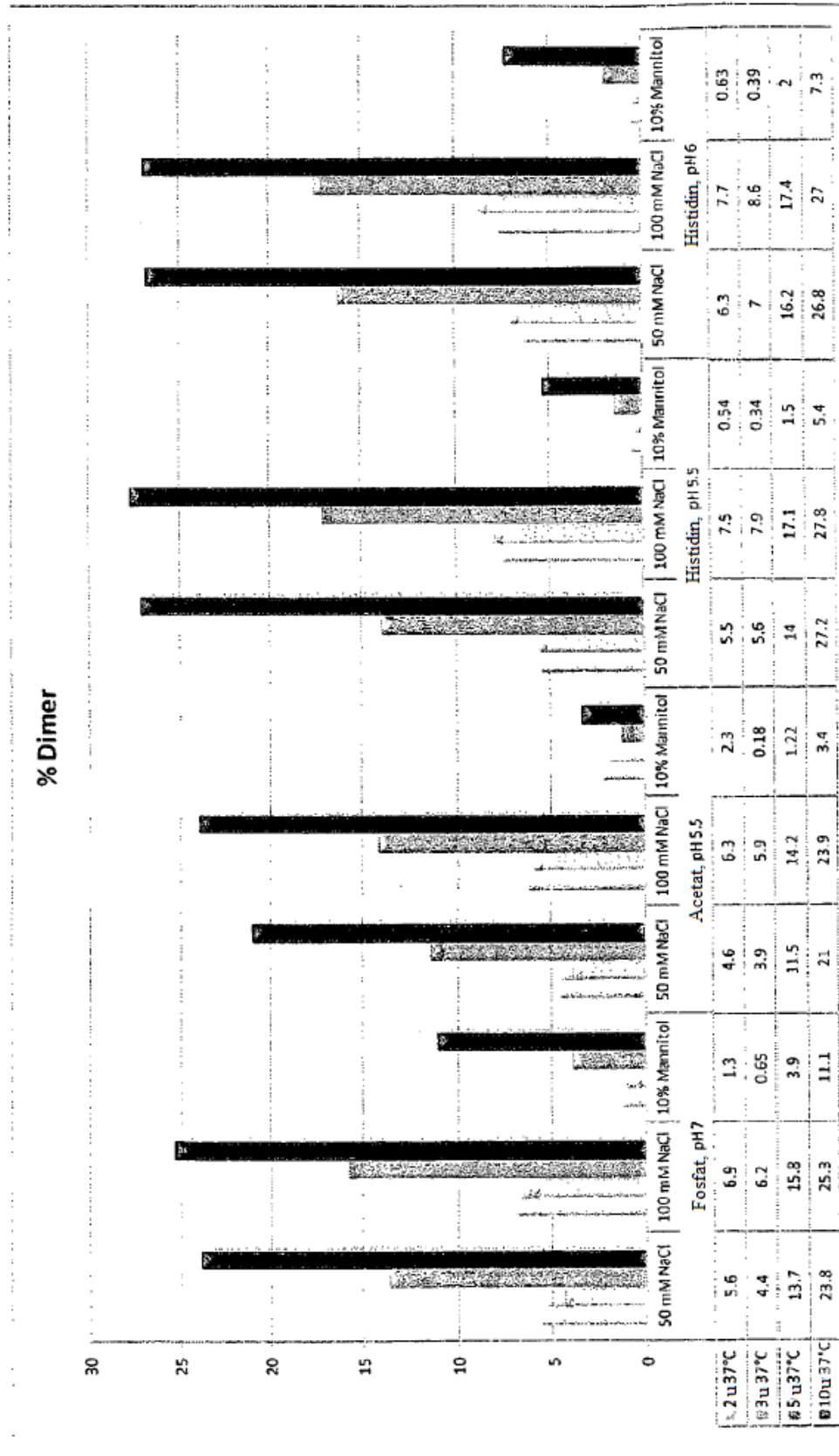


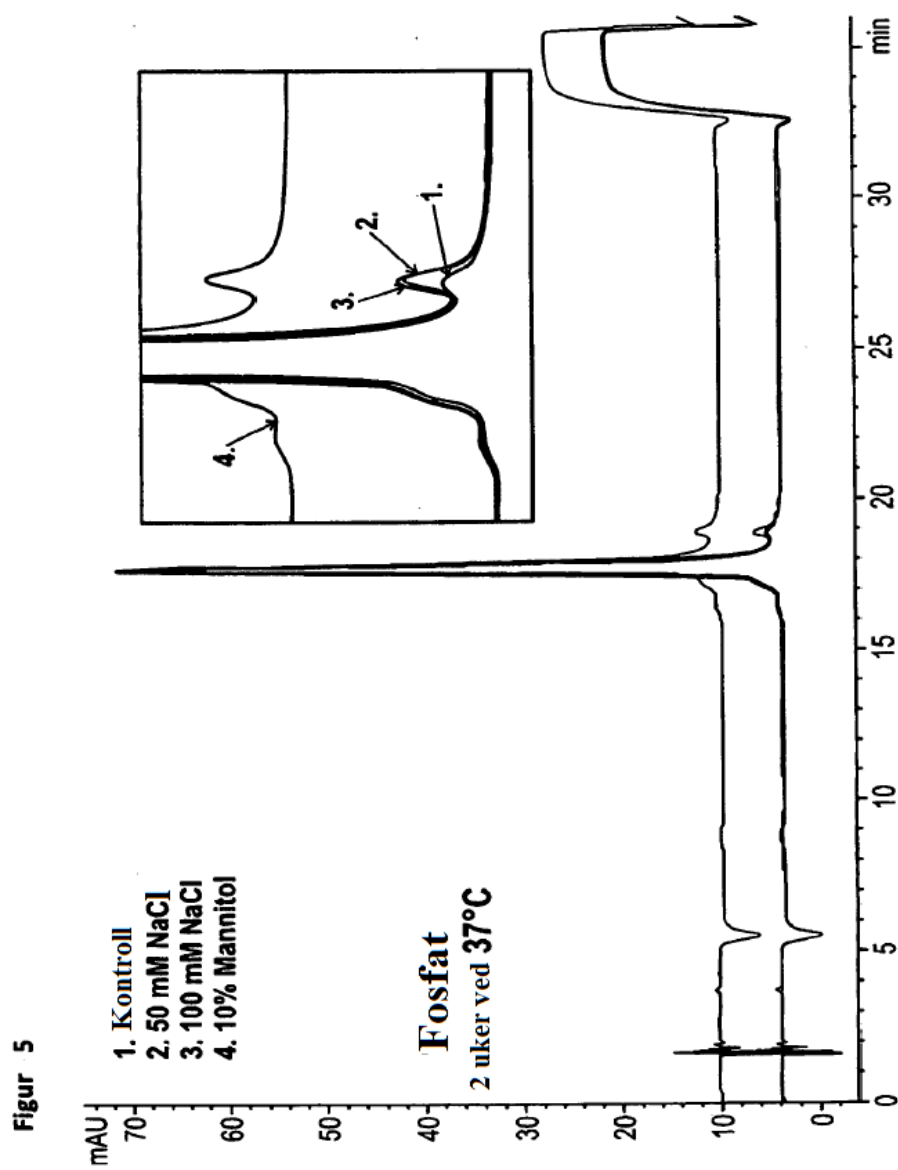


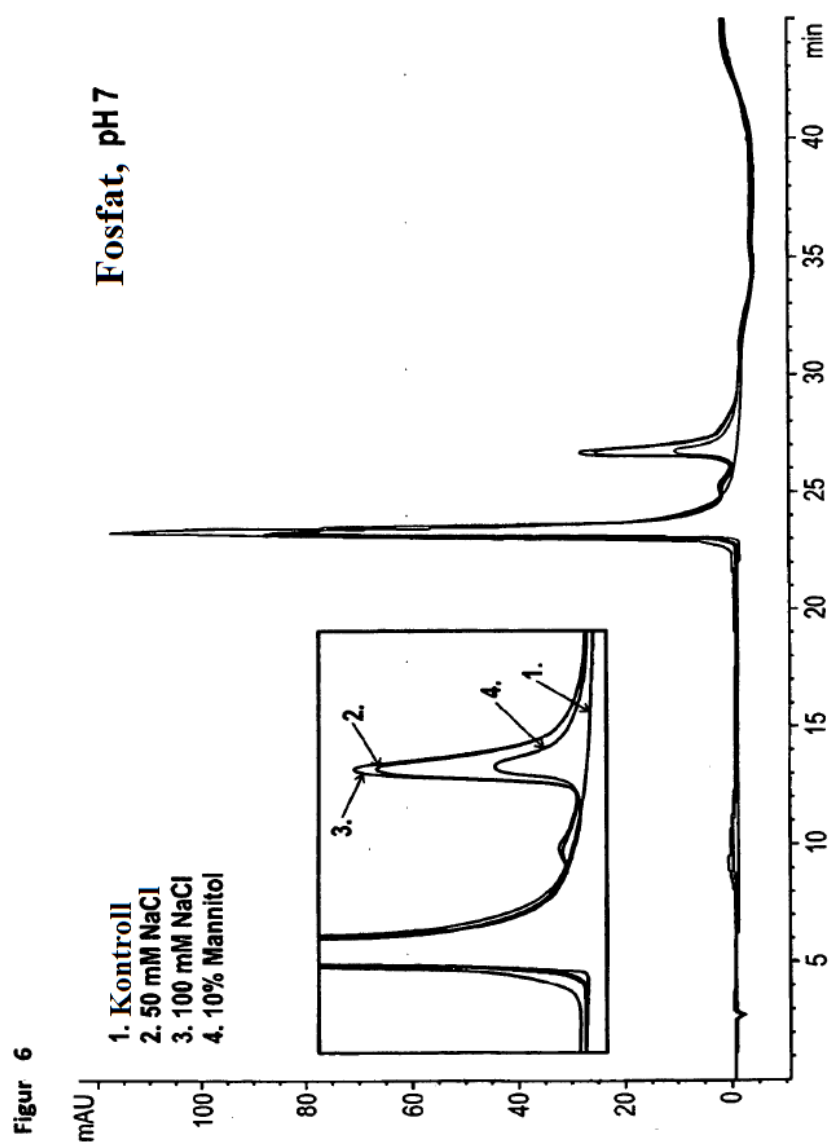
Figur 4 (A)



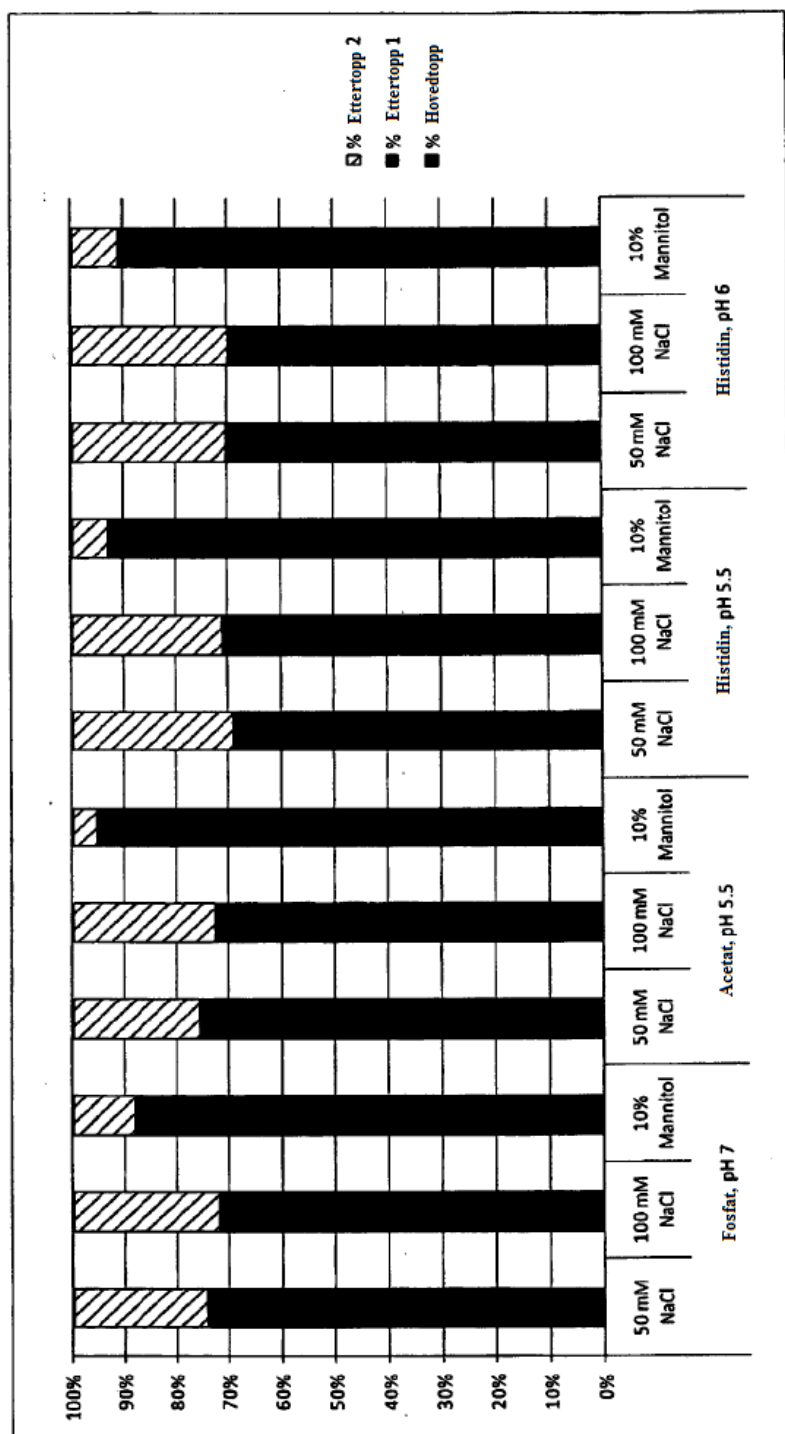
Figur 4 (B)

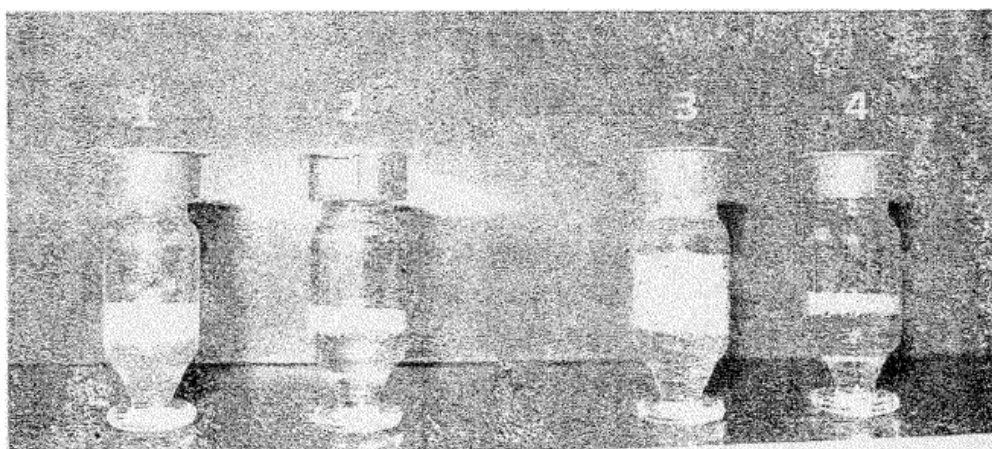






Figur 7

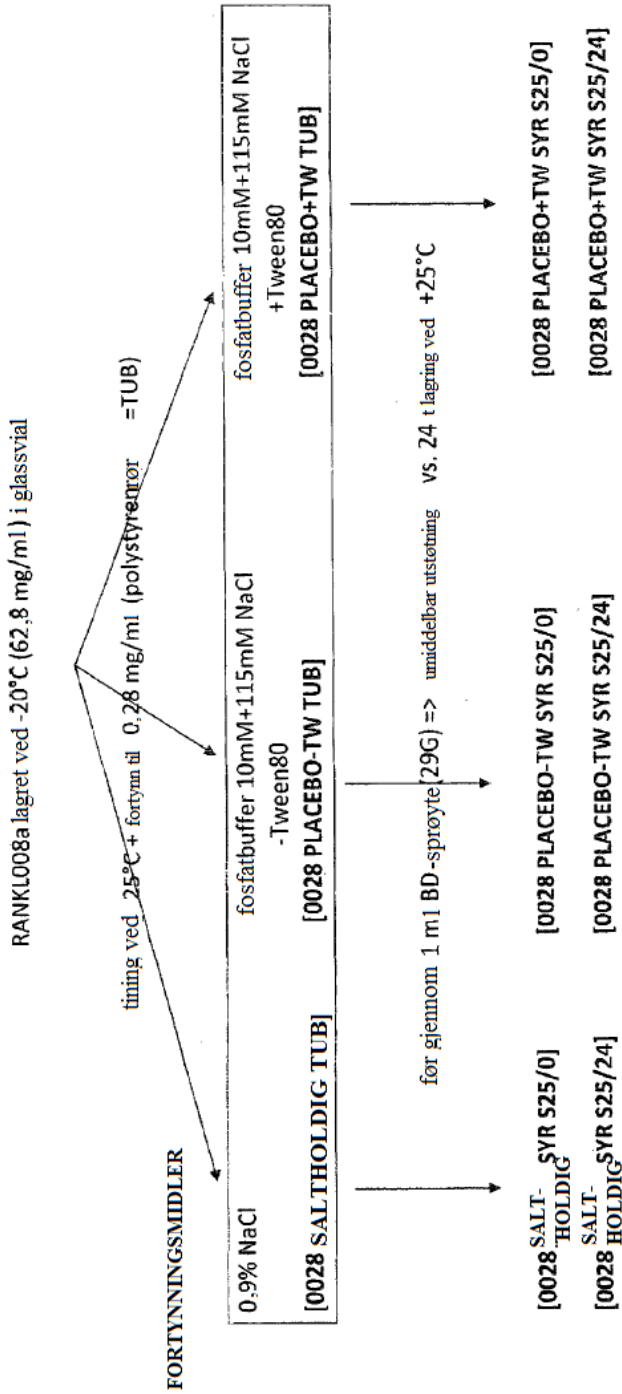


Figur 8**Prøver:**

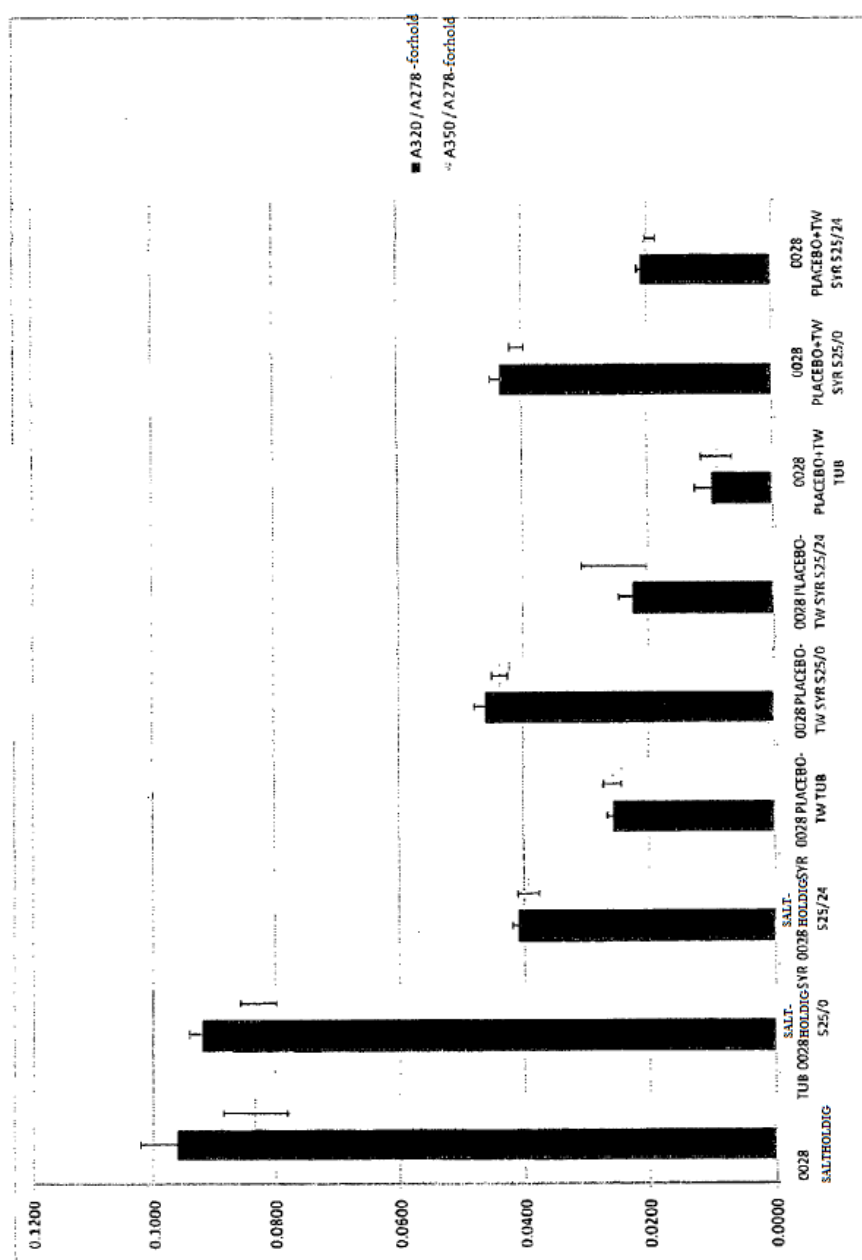
1. RANKL008a fortynnet til 5 mg/ml uten Tween80
2. RANKL008a fortynnet til 5 mg/ml med 0,01% Tween80
3. RANKL008a ufortynnet uten Tween80
4. RANKL008a ufortynnet med 0,01% Tween80

Fortynnet/ufortynnet	Tween80	Tween80
Fortynnet til 5 mg/ml	Gjennomsiktig (prøve 1)	Klar (prøve 2)
	Mer skum (prøve 1)	Skum (prøve 2)
Ufortynnet	Klar (prøve 3)	Klar (prøve 4)
	Mer skum (prøve 3)	Skum (prøve 4)

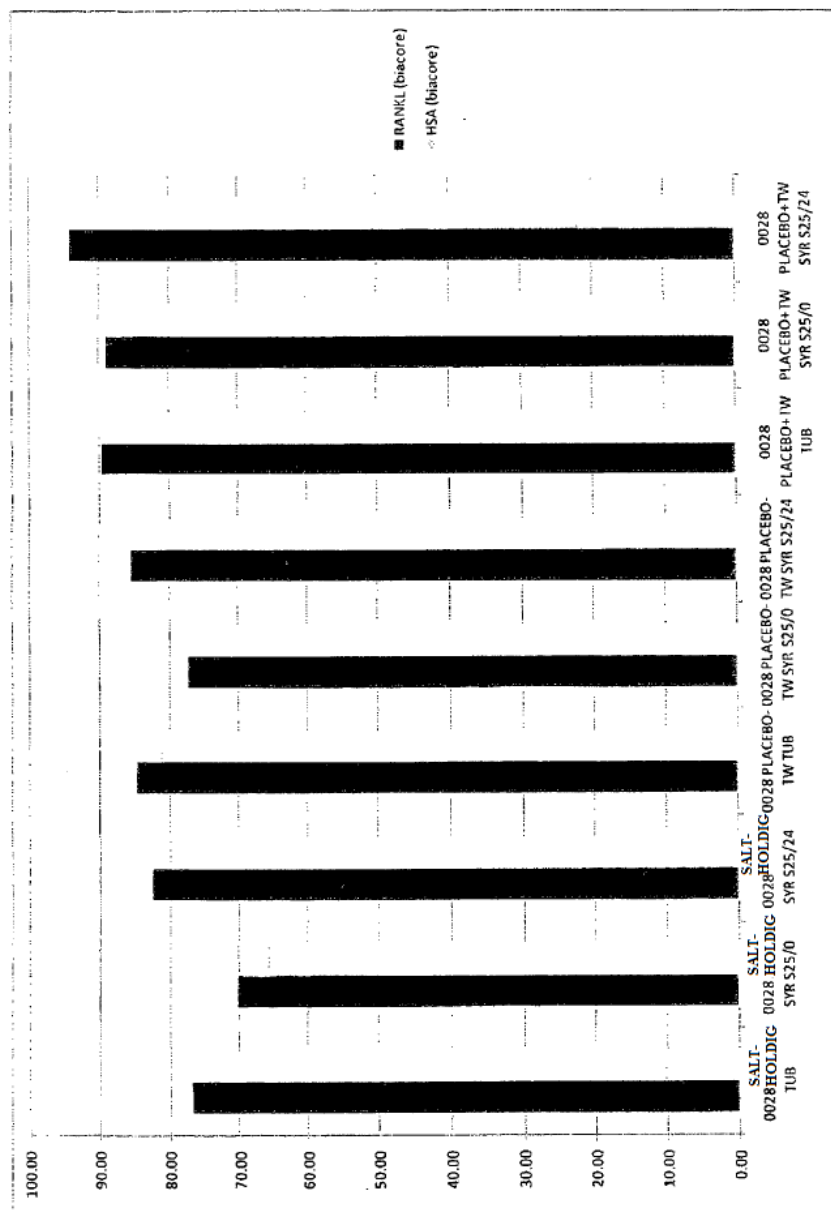
Figur 9



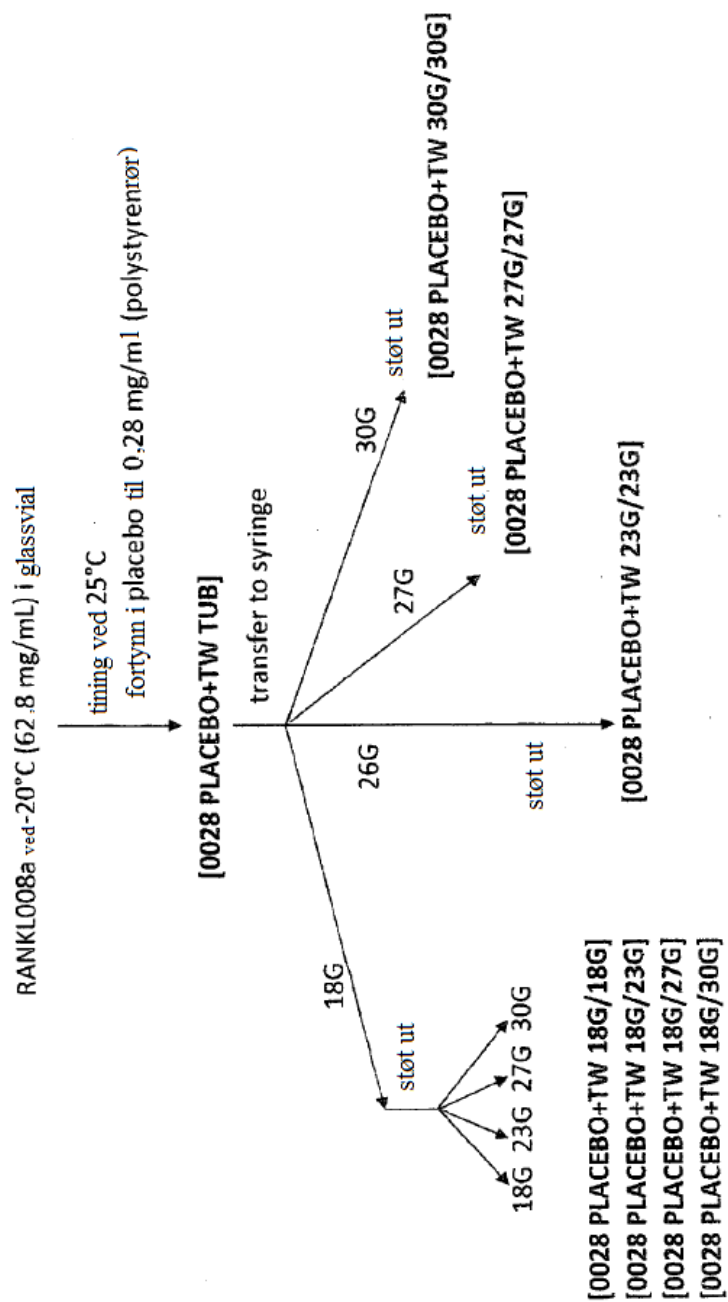
Figur 10



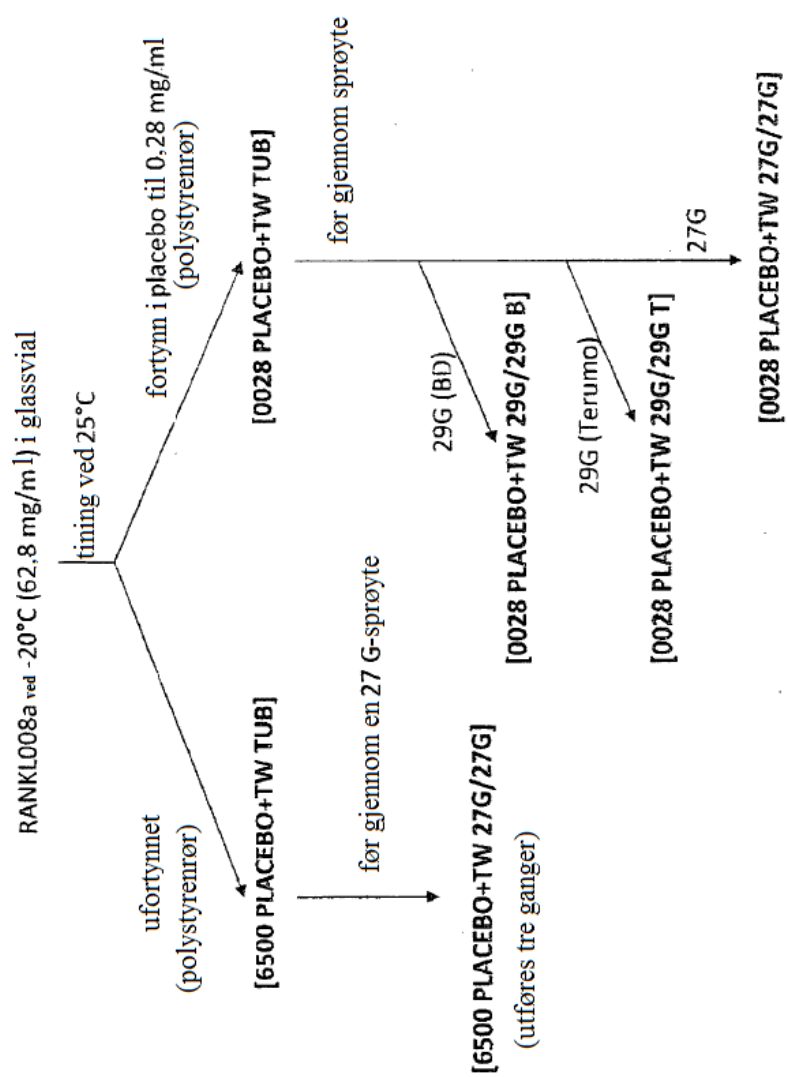
Figur 11



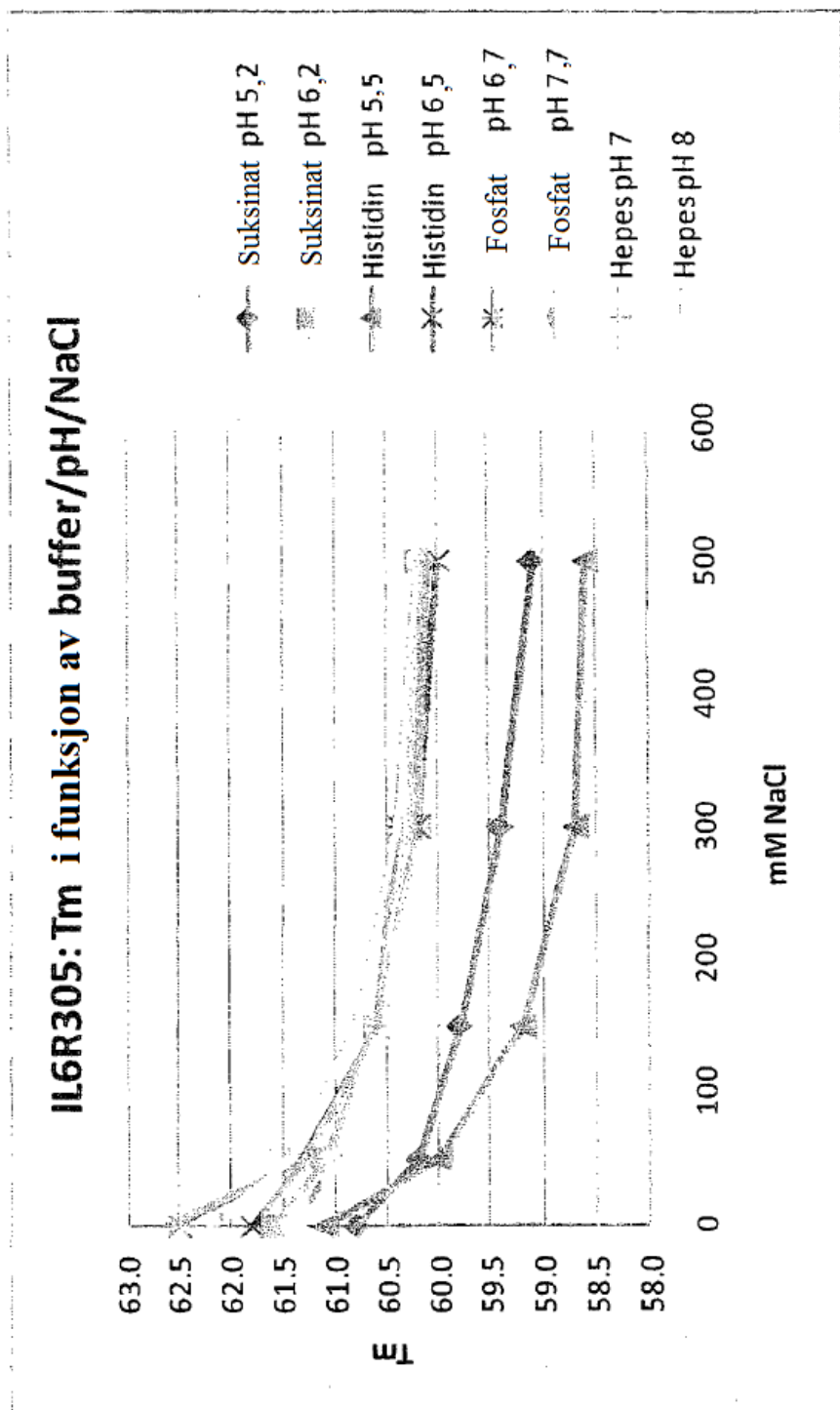
Figur 12



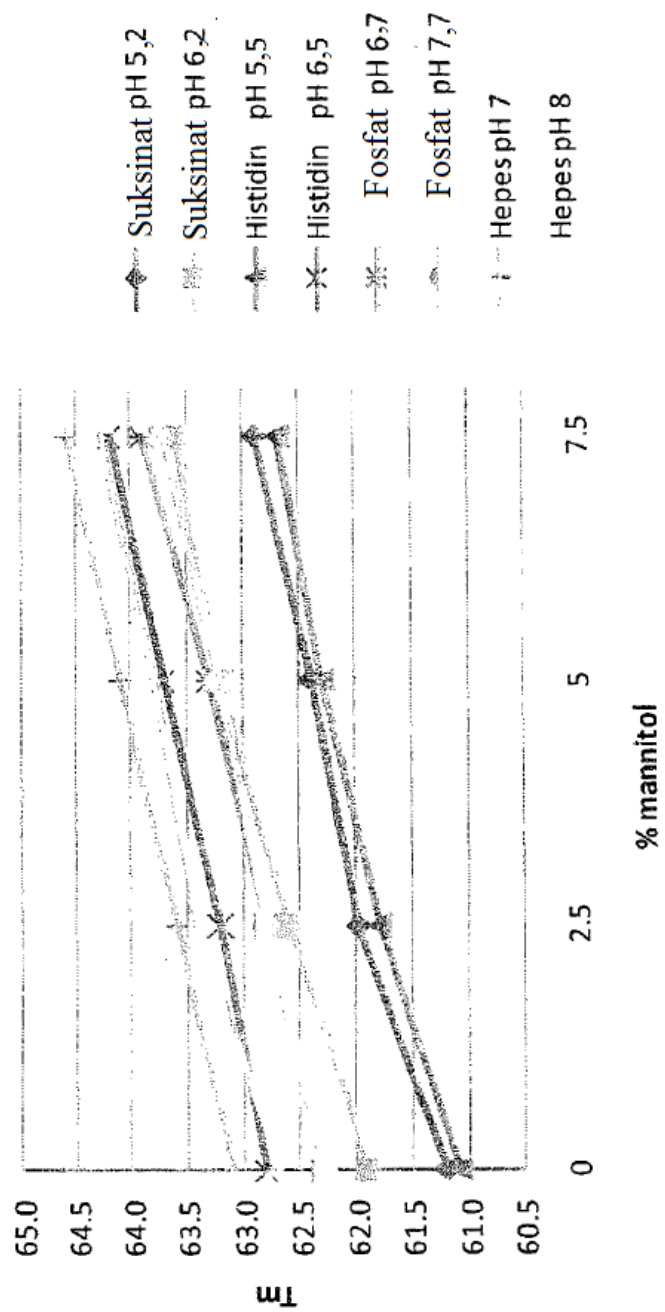
Figur 13



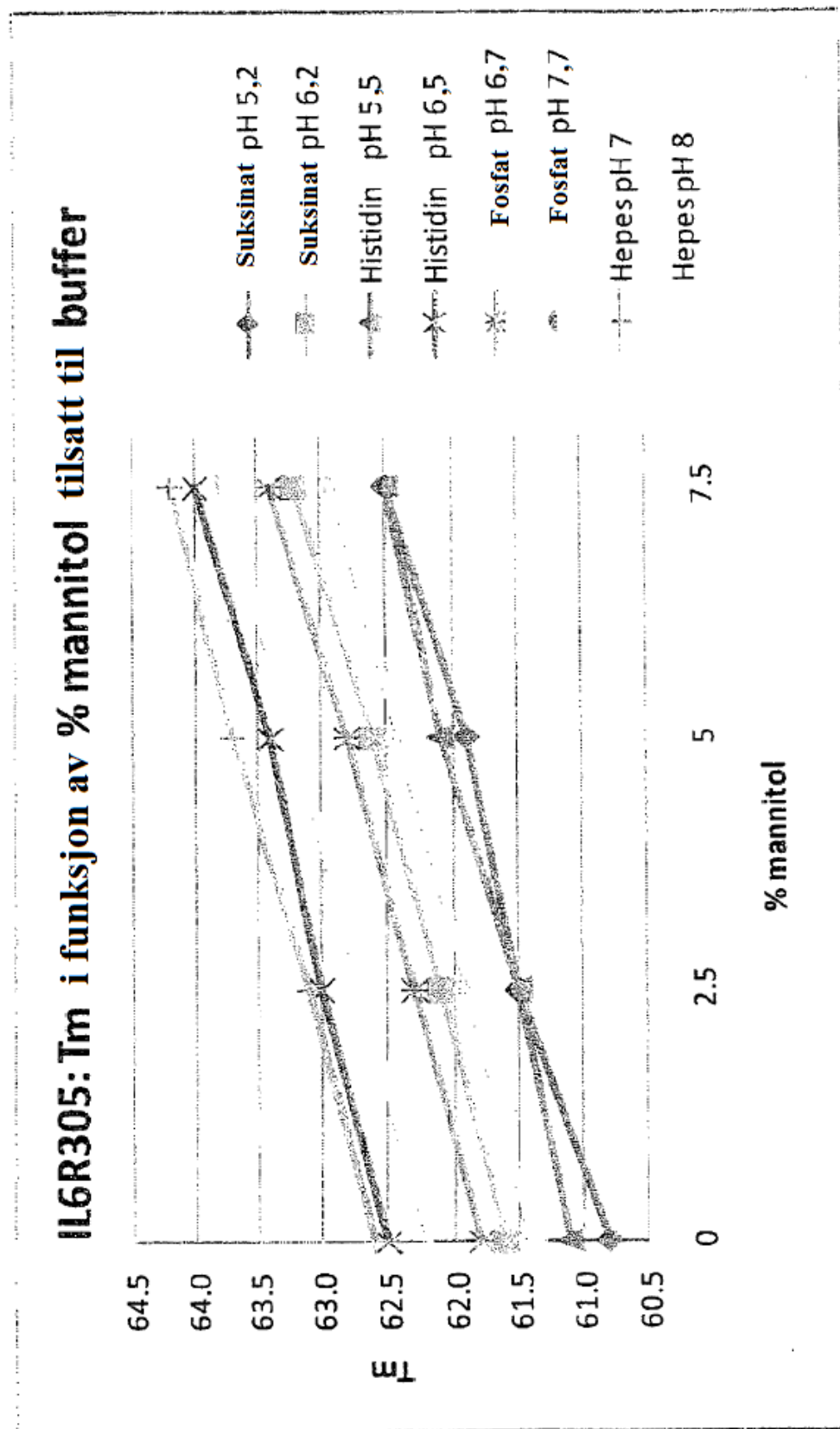
Figur 14 (B)



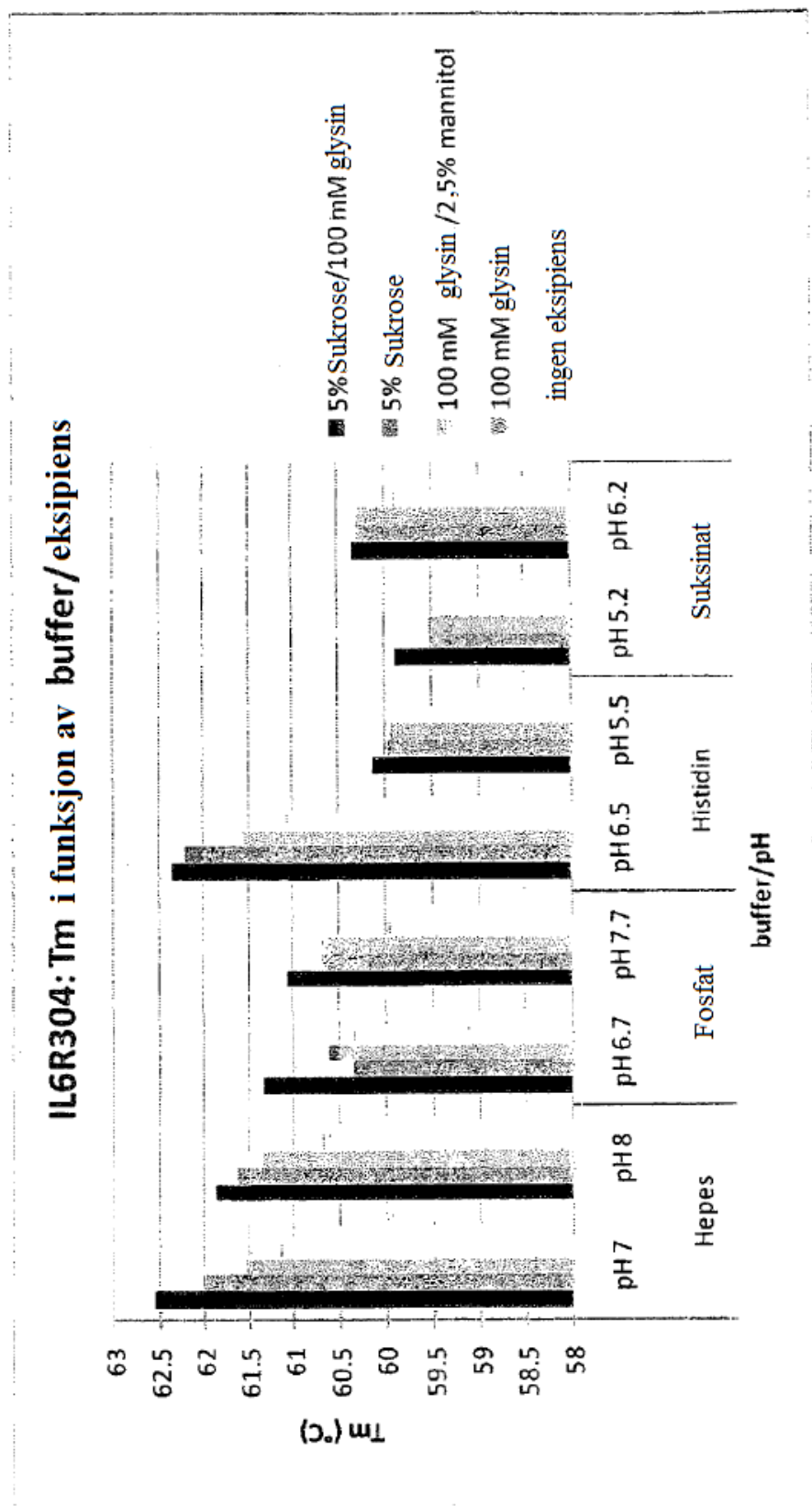
IL6R304: Tm i funksjon av % mannitol tilsatt til buffer



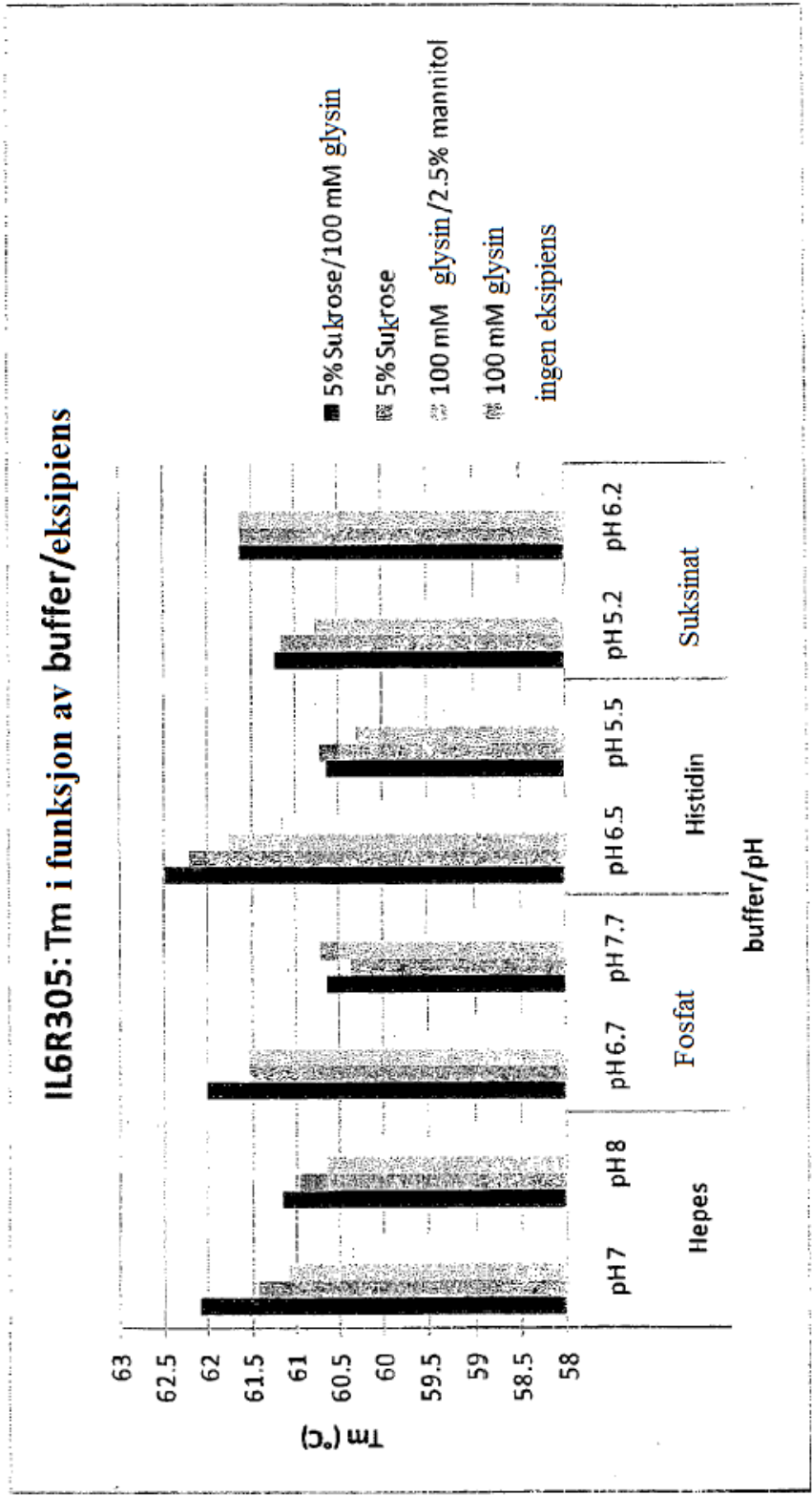
Figur 14 (D)



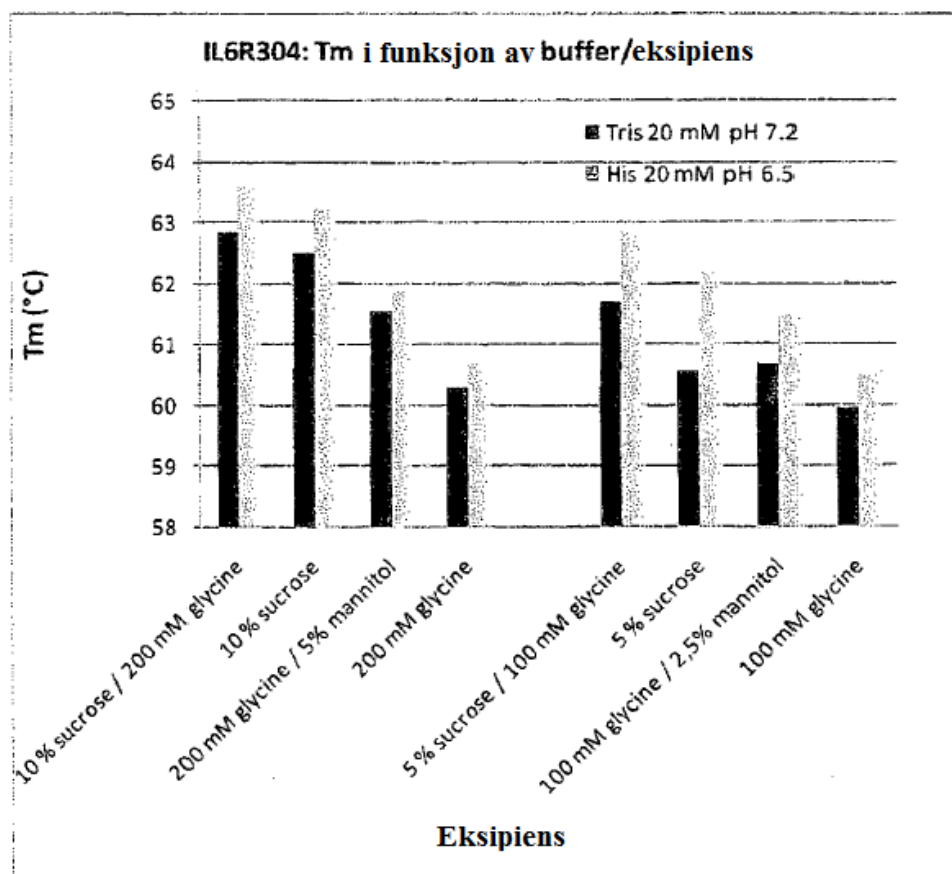
Figur 14 (E)



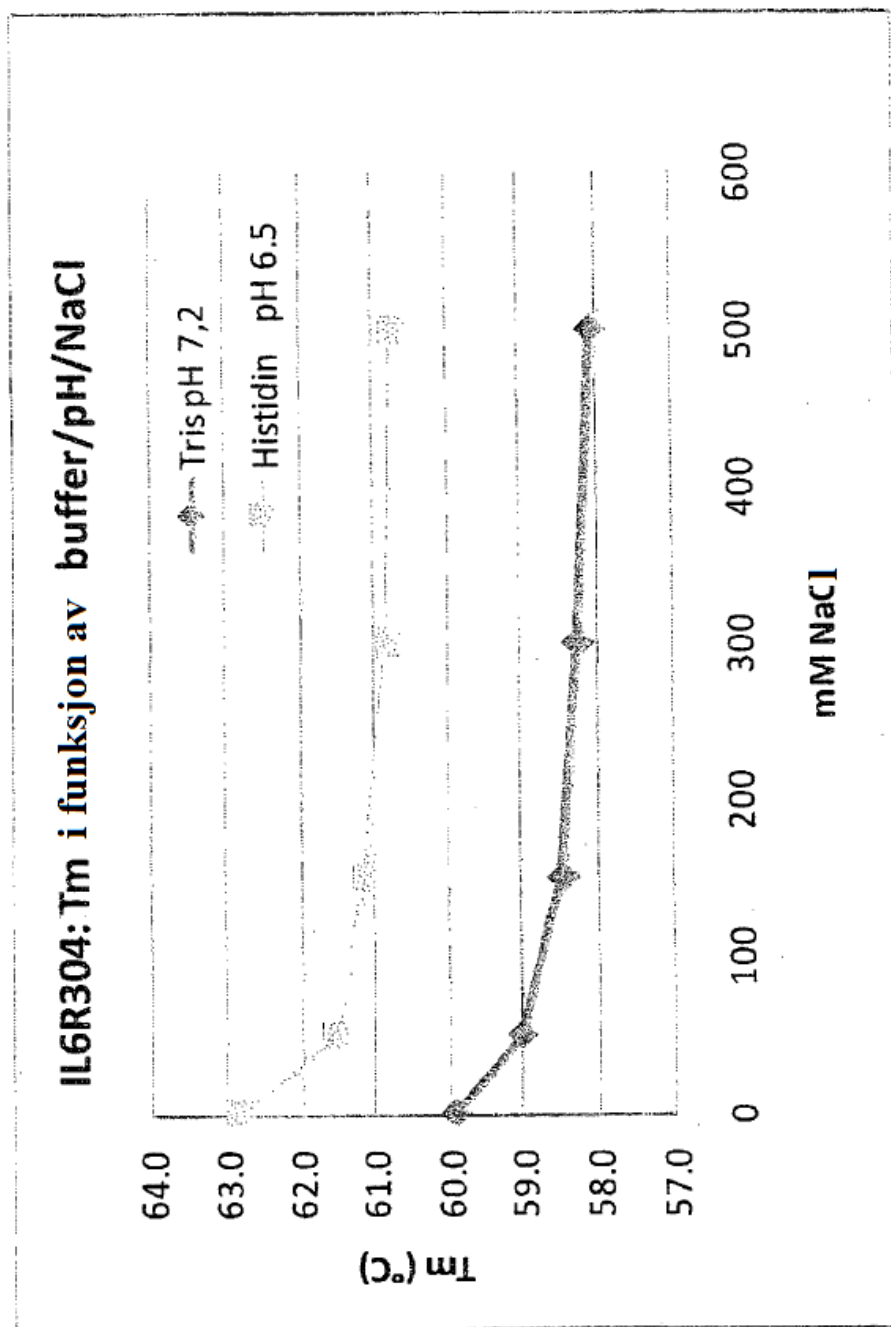
Figur 14 (F)



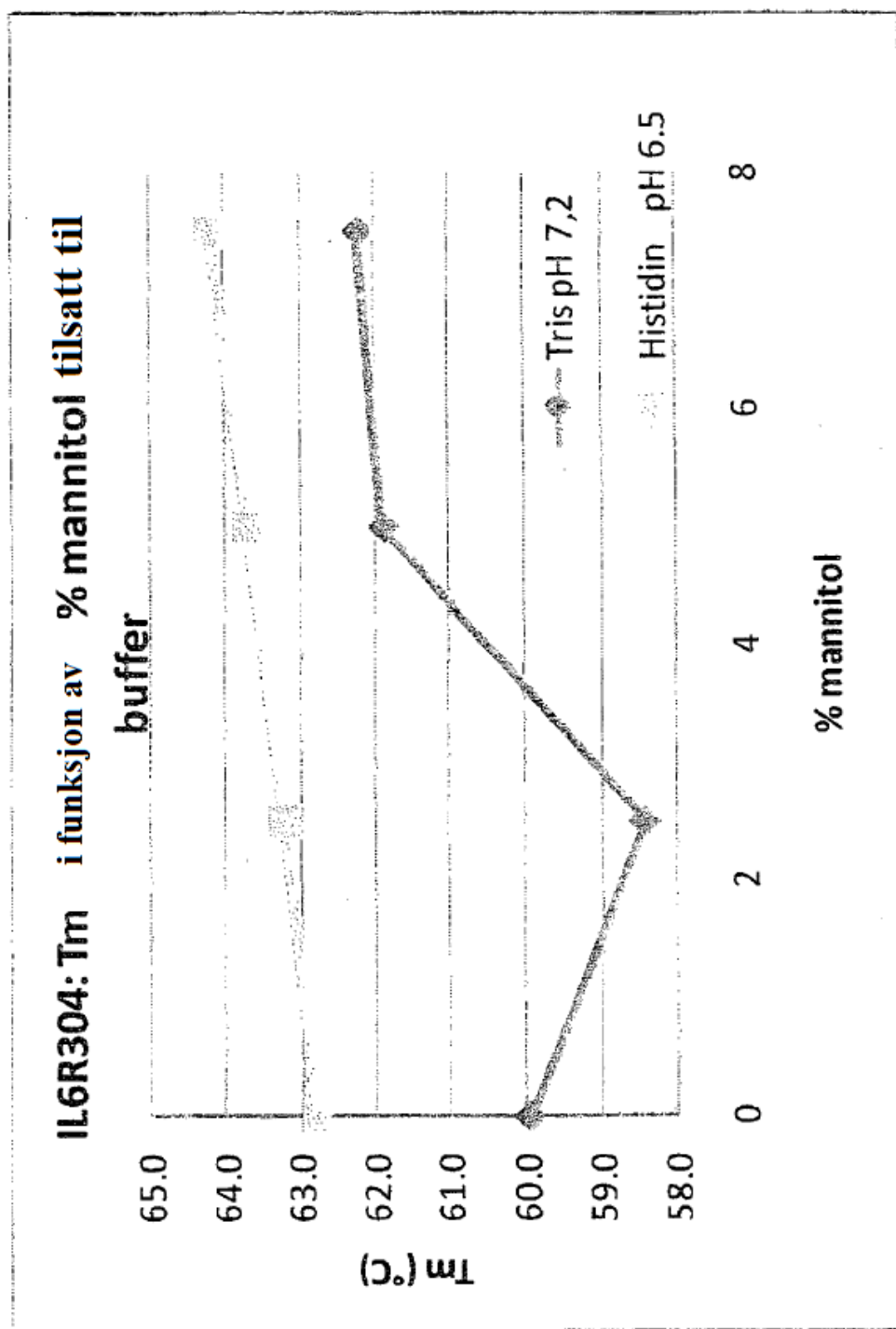
Figur 15 (A)



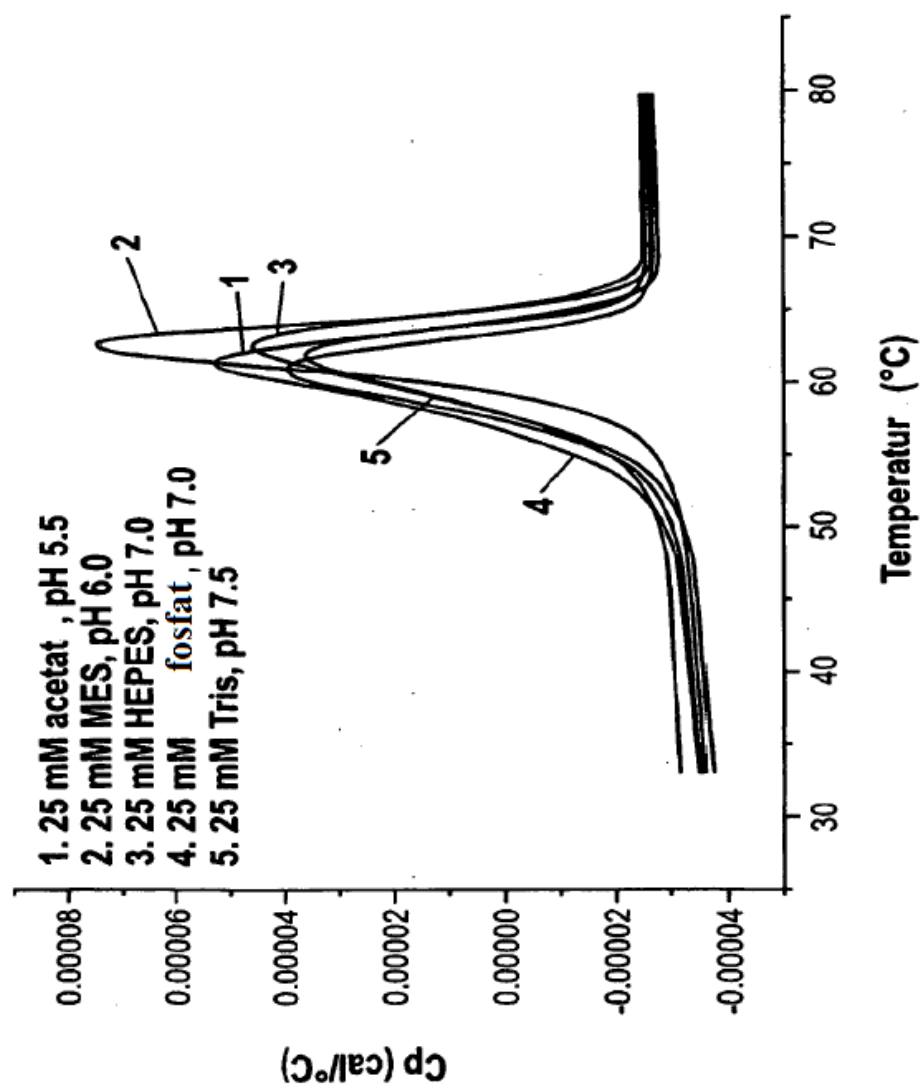
Figur 15 (B)



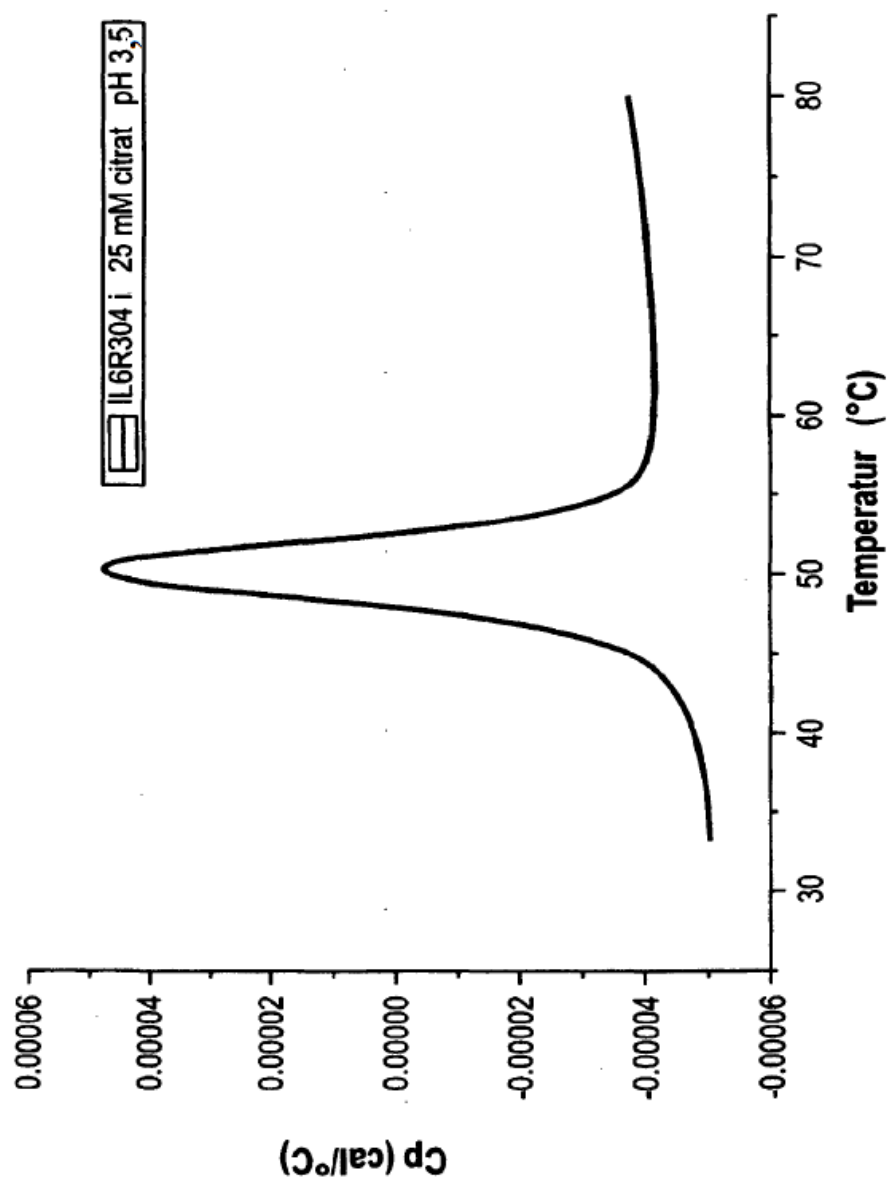
Figur 15 (C)



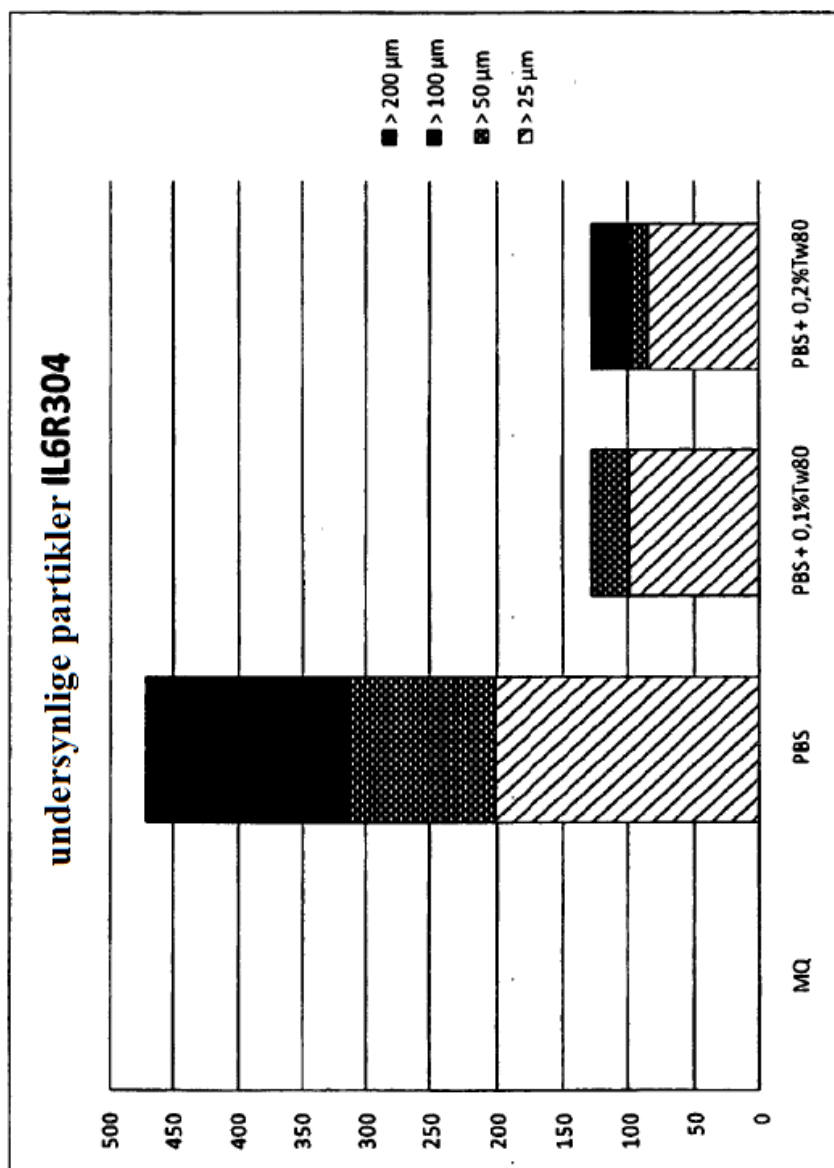
Figur 16 (A)



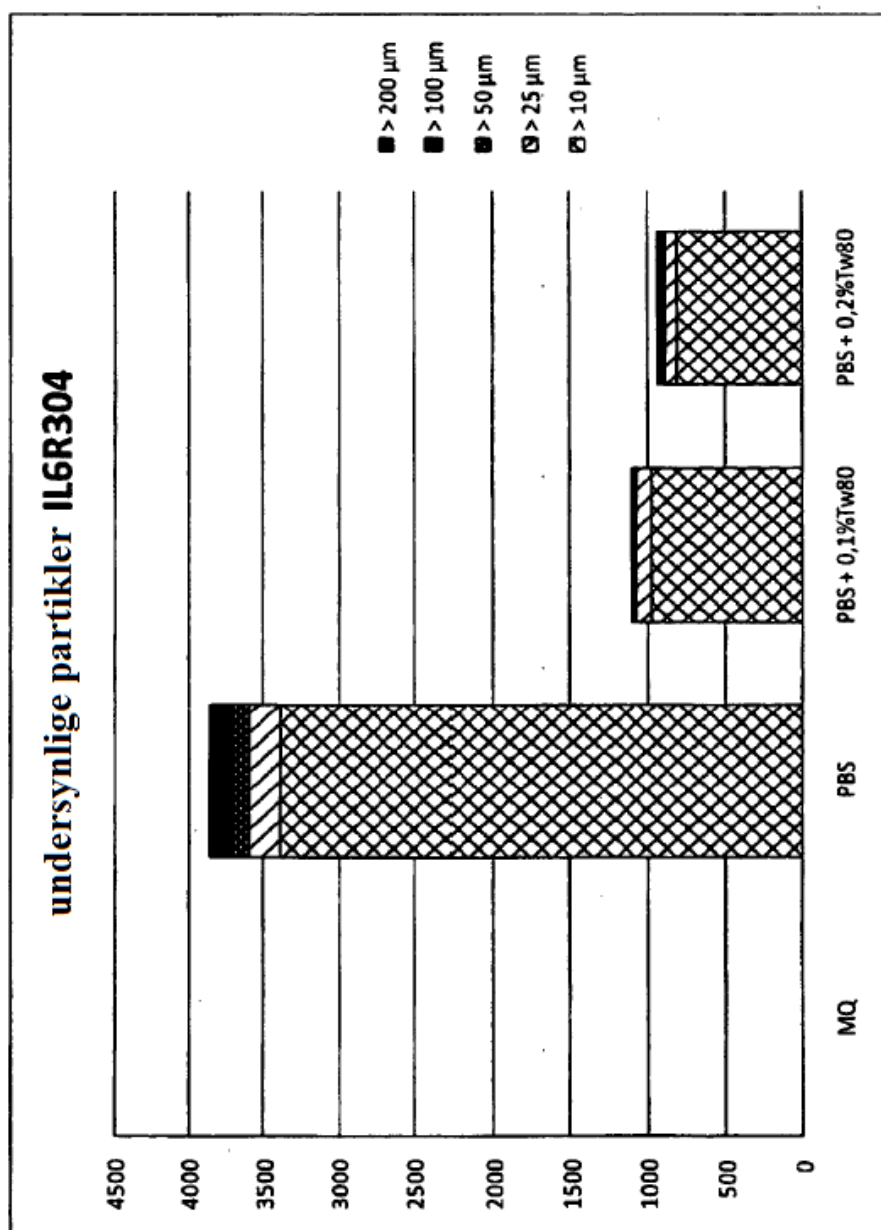
Figur 16 (B)



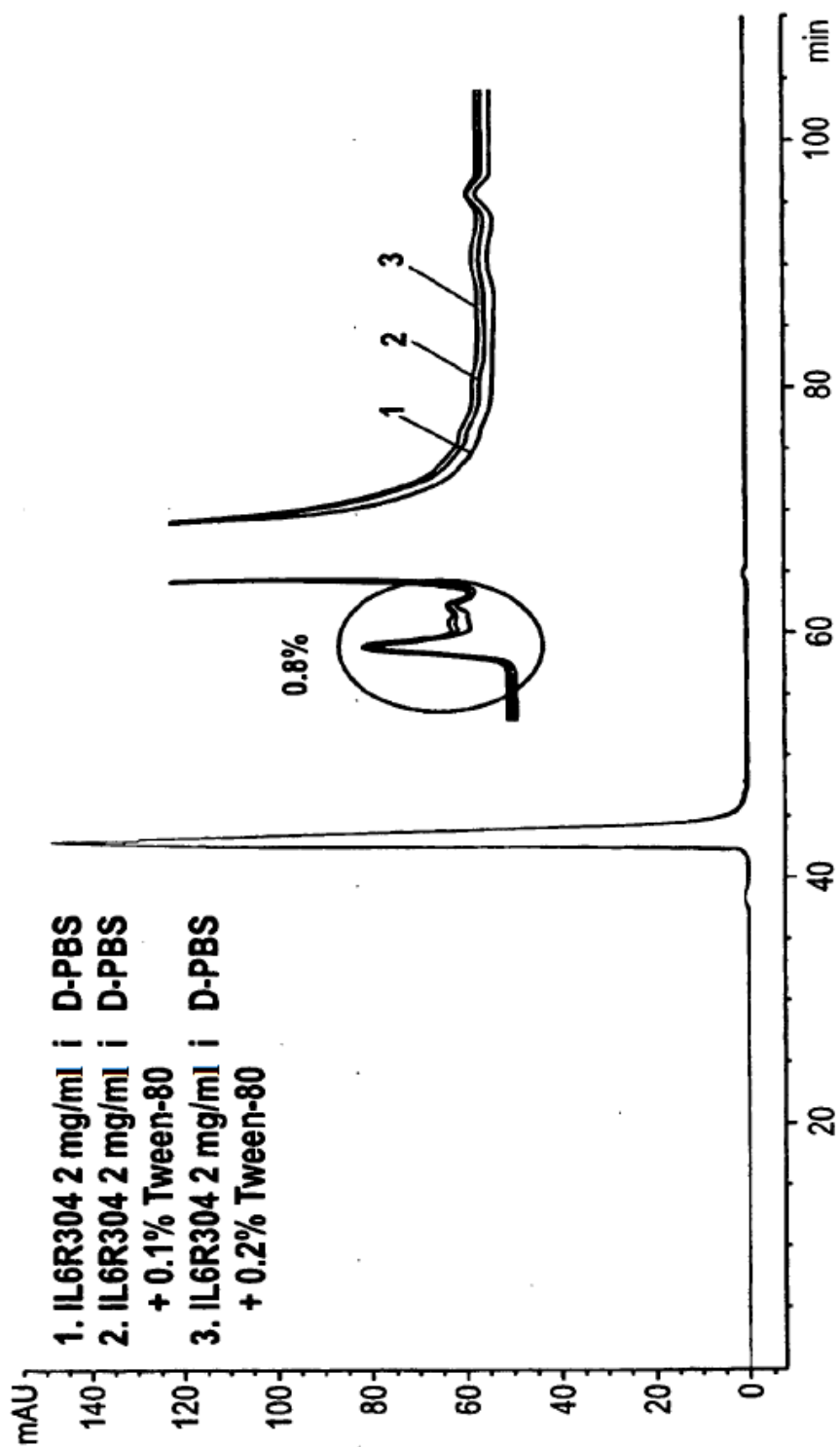
Figur 17 (A)



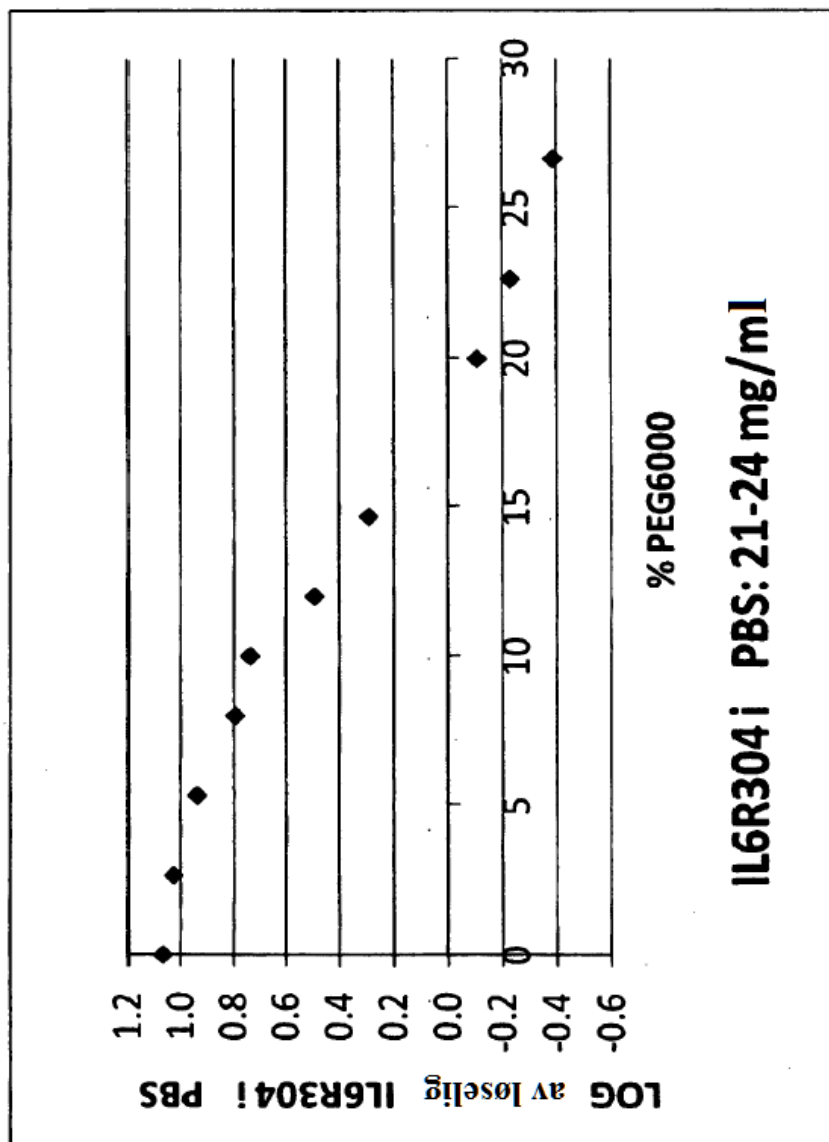
Figur 17 (B)



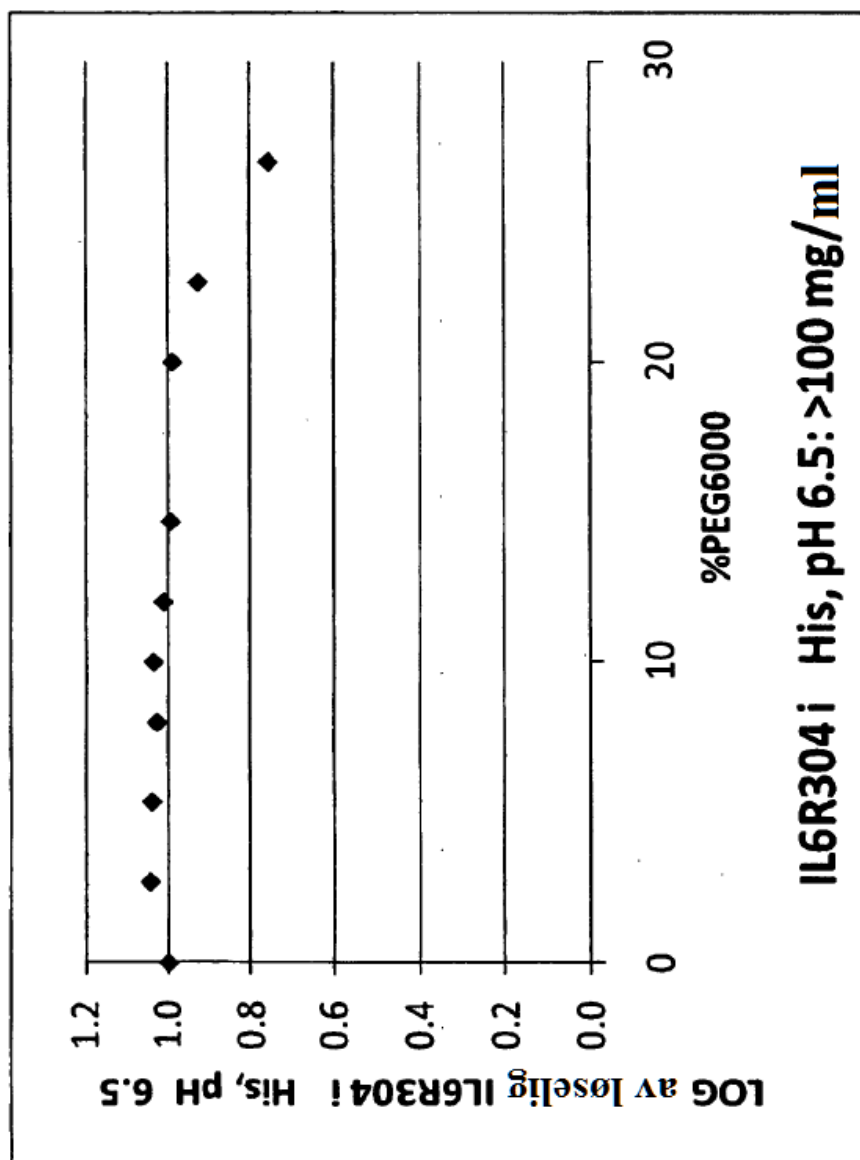
Figur 18



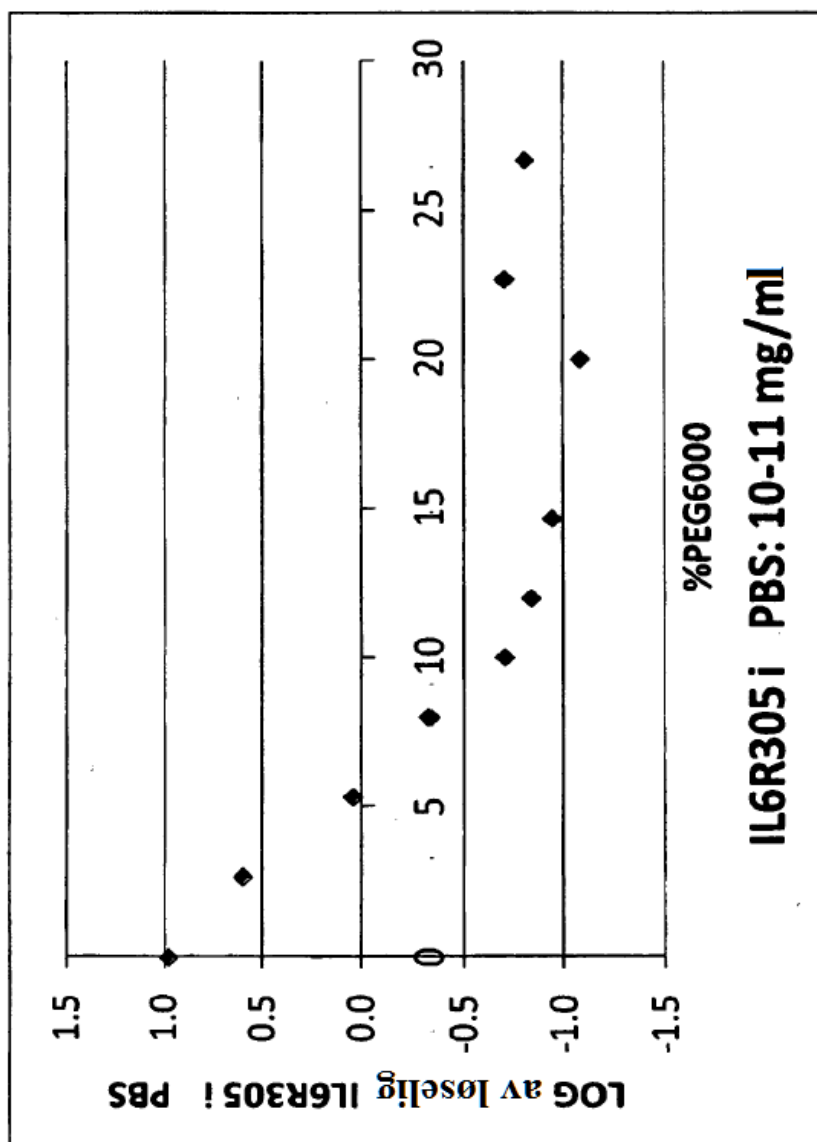
Figur 19 (A)



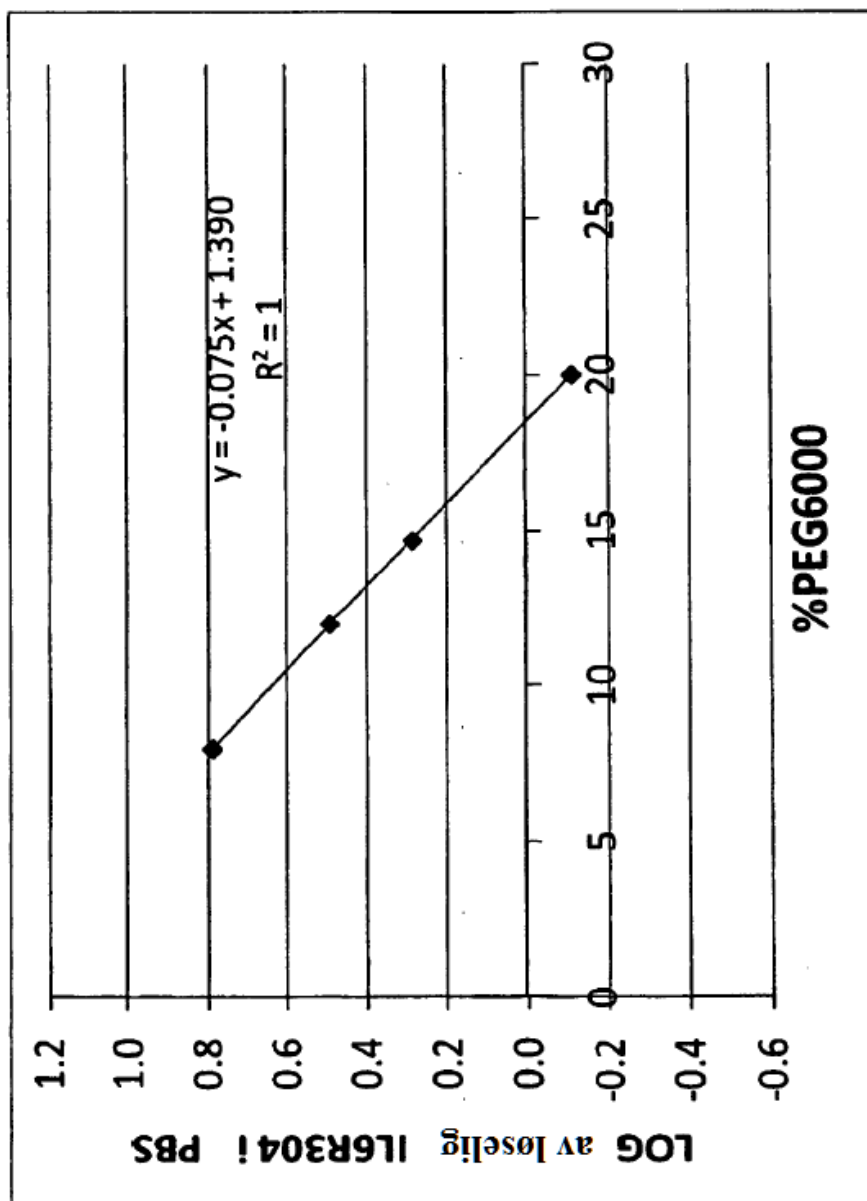
Figur 19 (B)

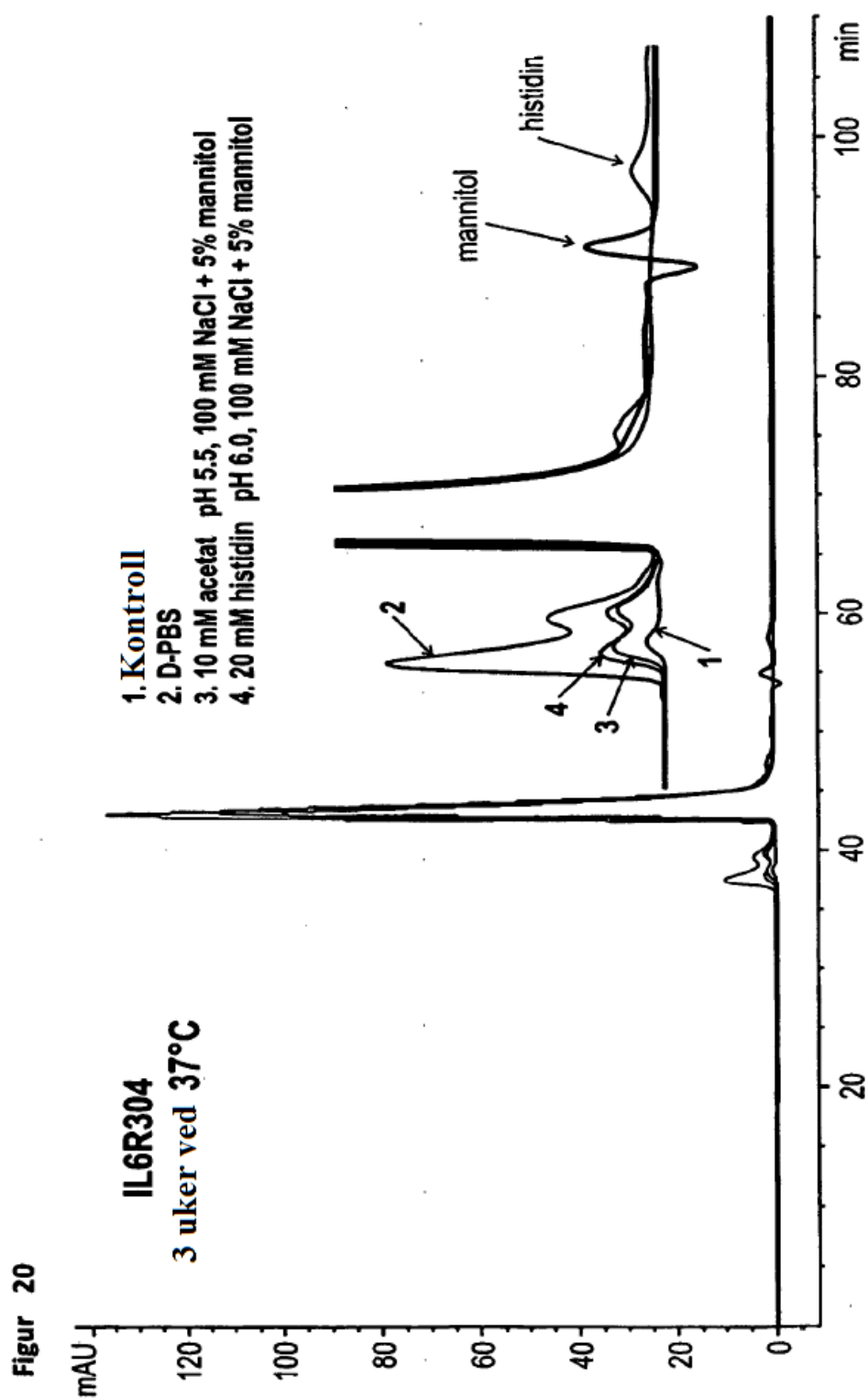


Figur 19 (C)

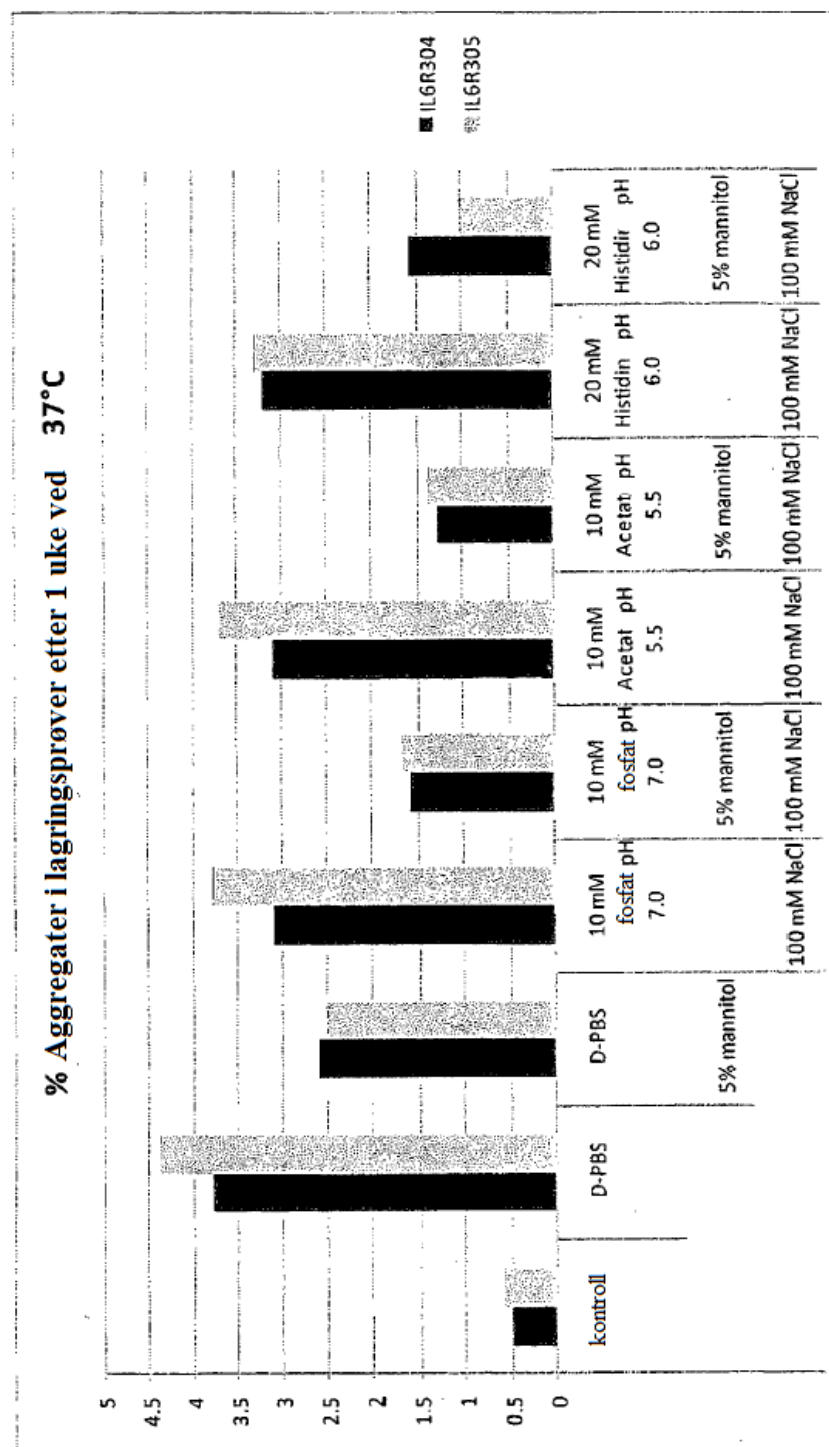


Figur 19(D)

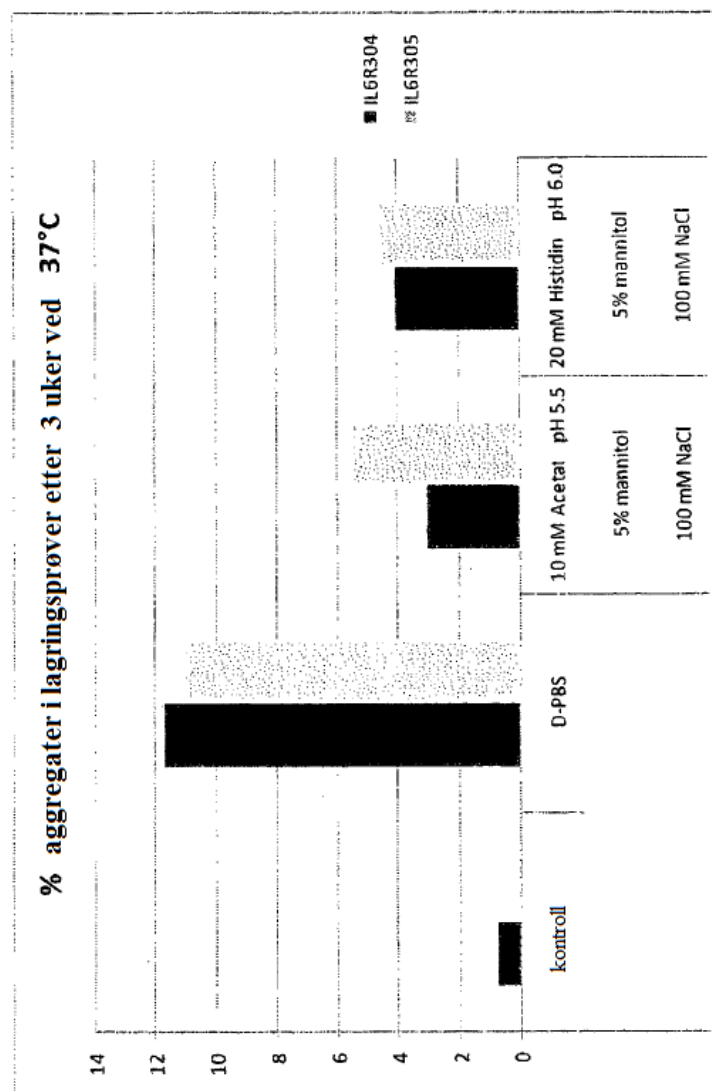




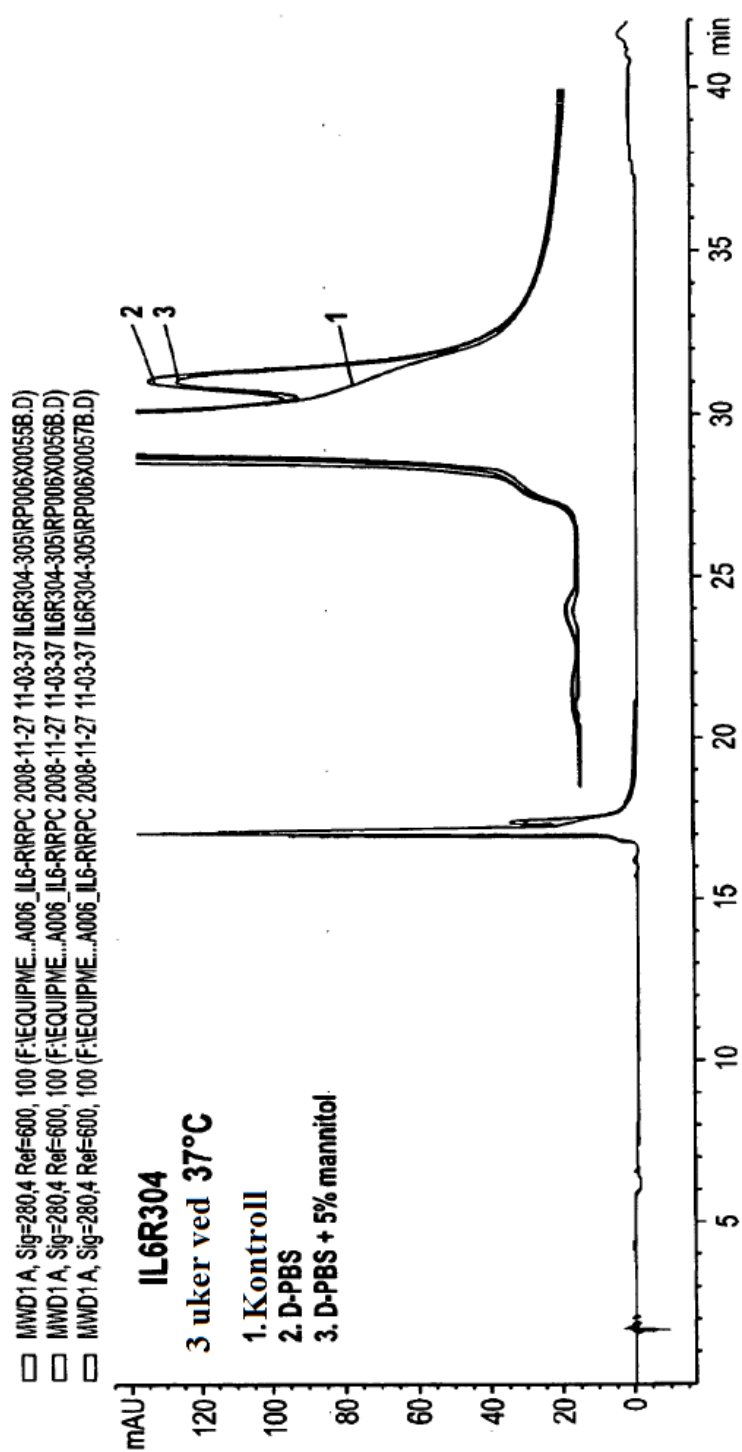
Figur 21



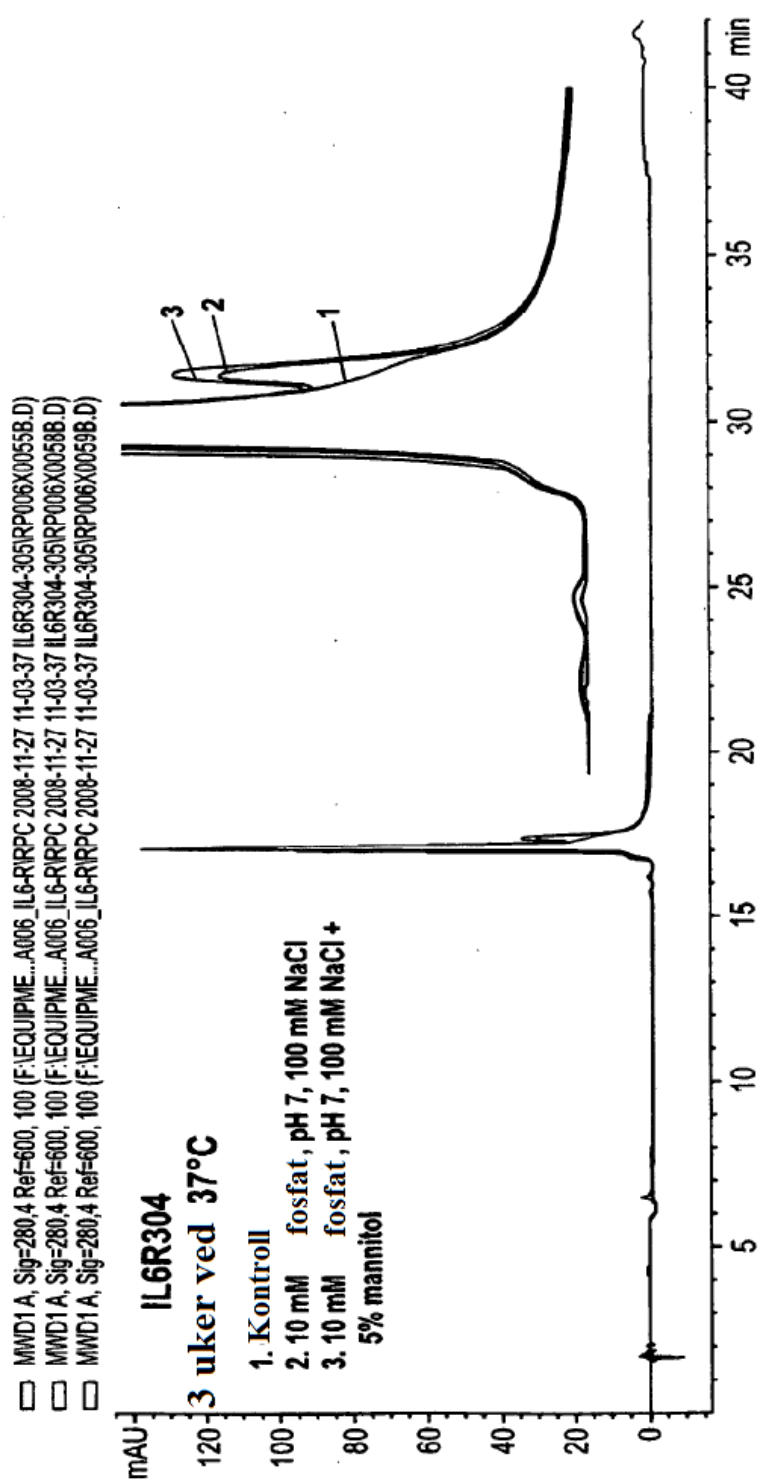
Figur 22



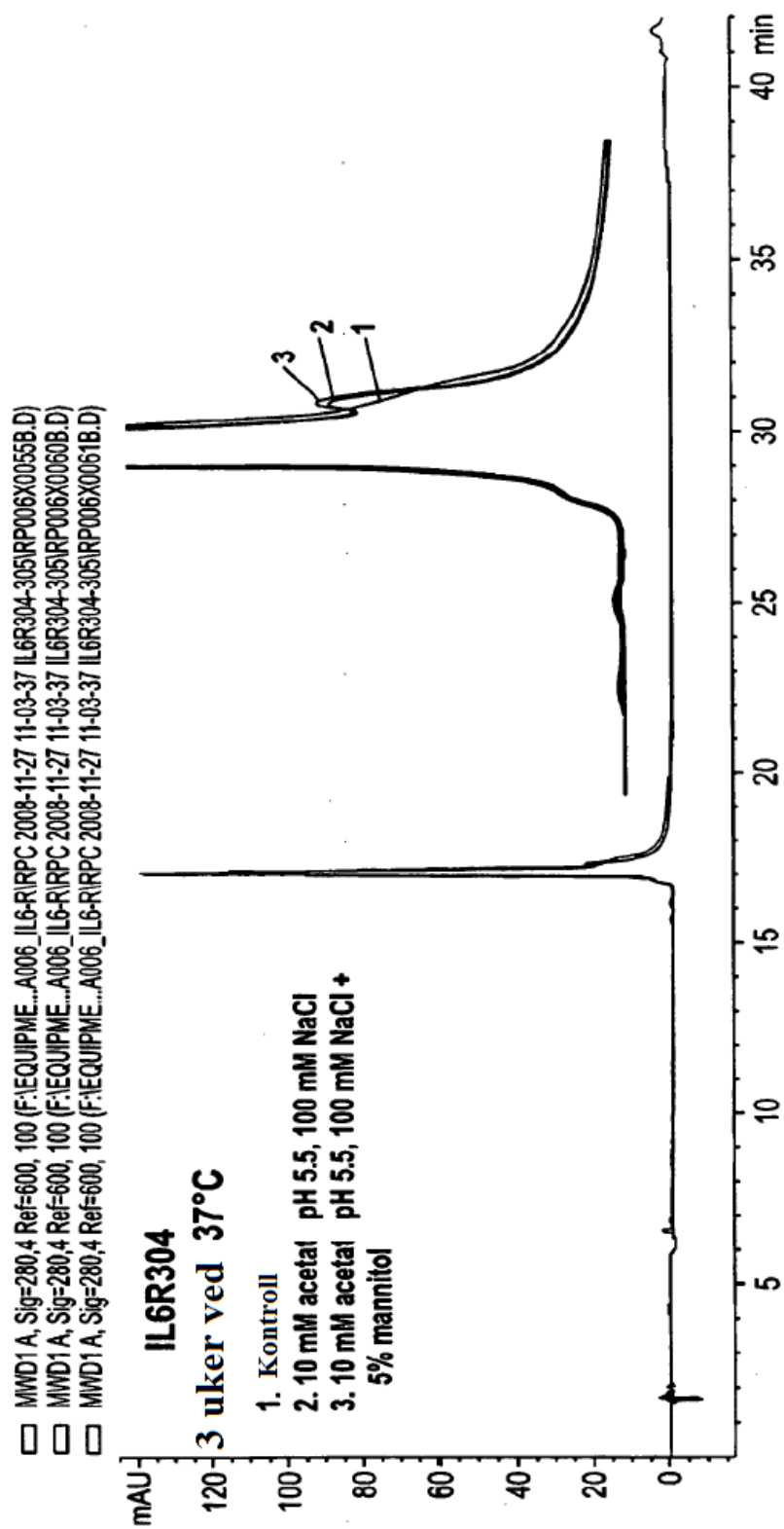
Figur 23(A)



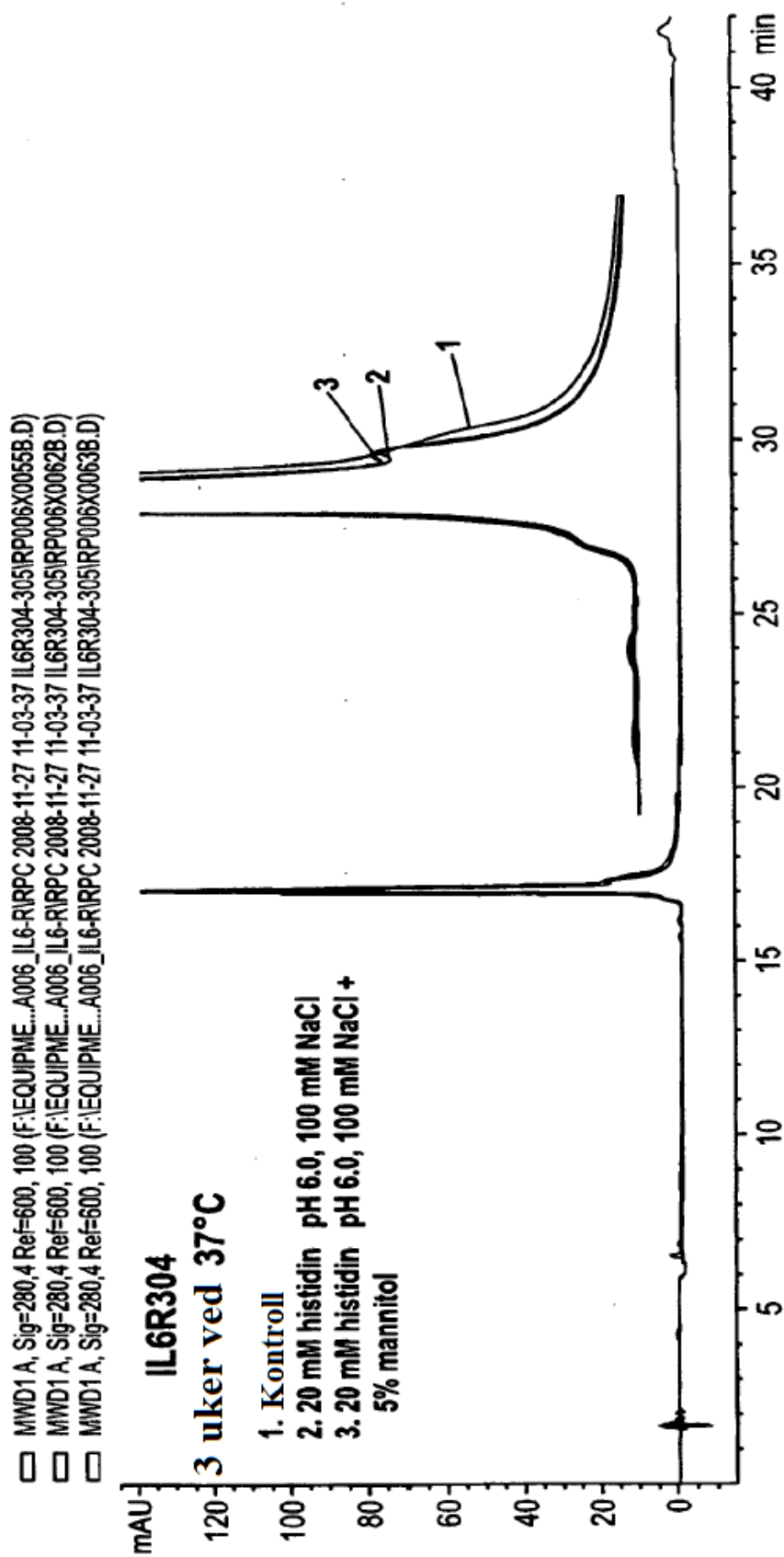
Figur 23(B)

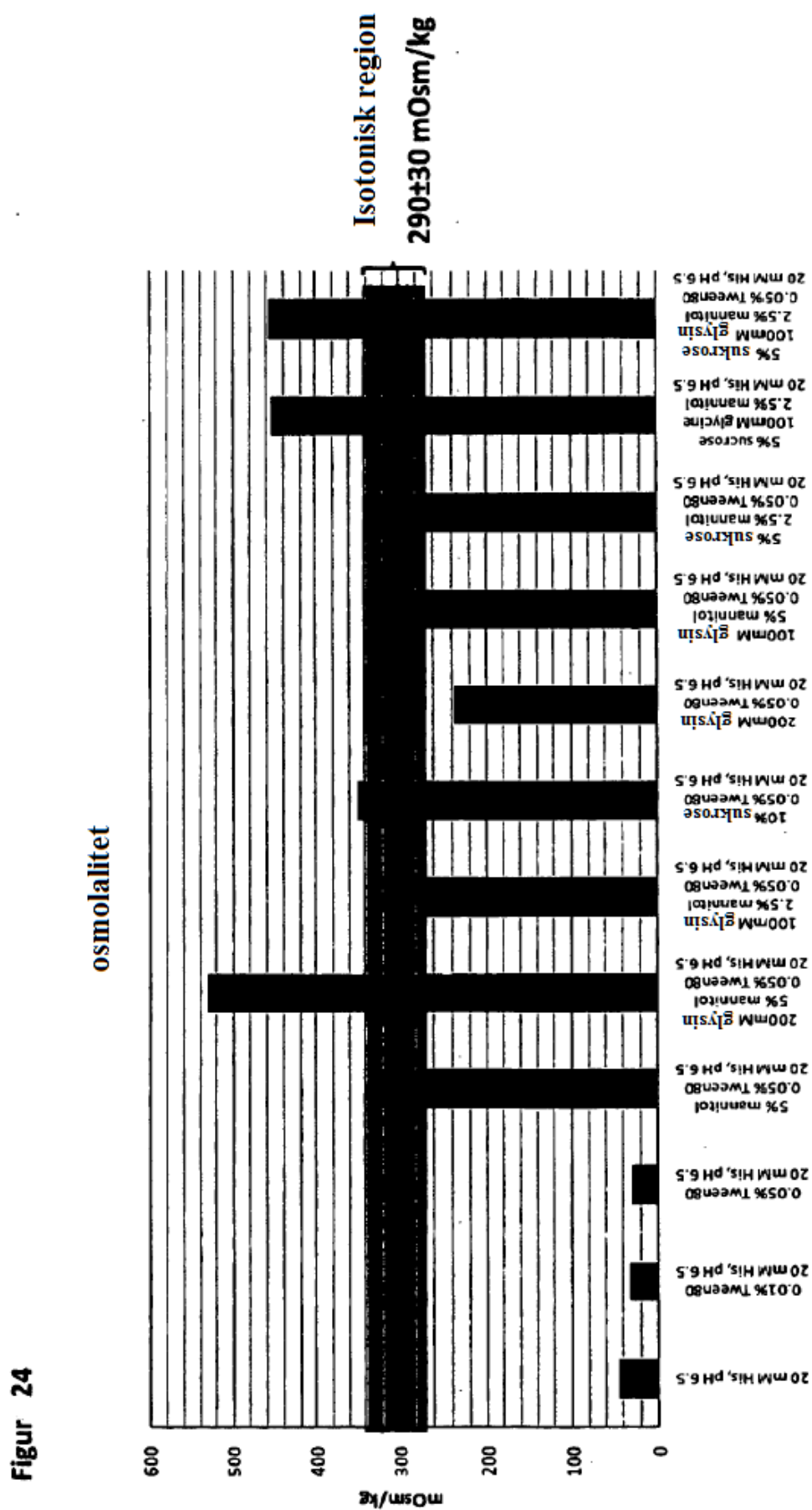


Figur 23(C)

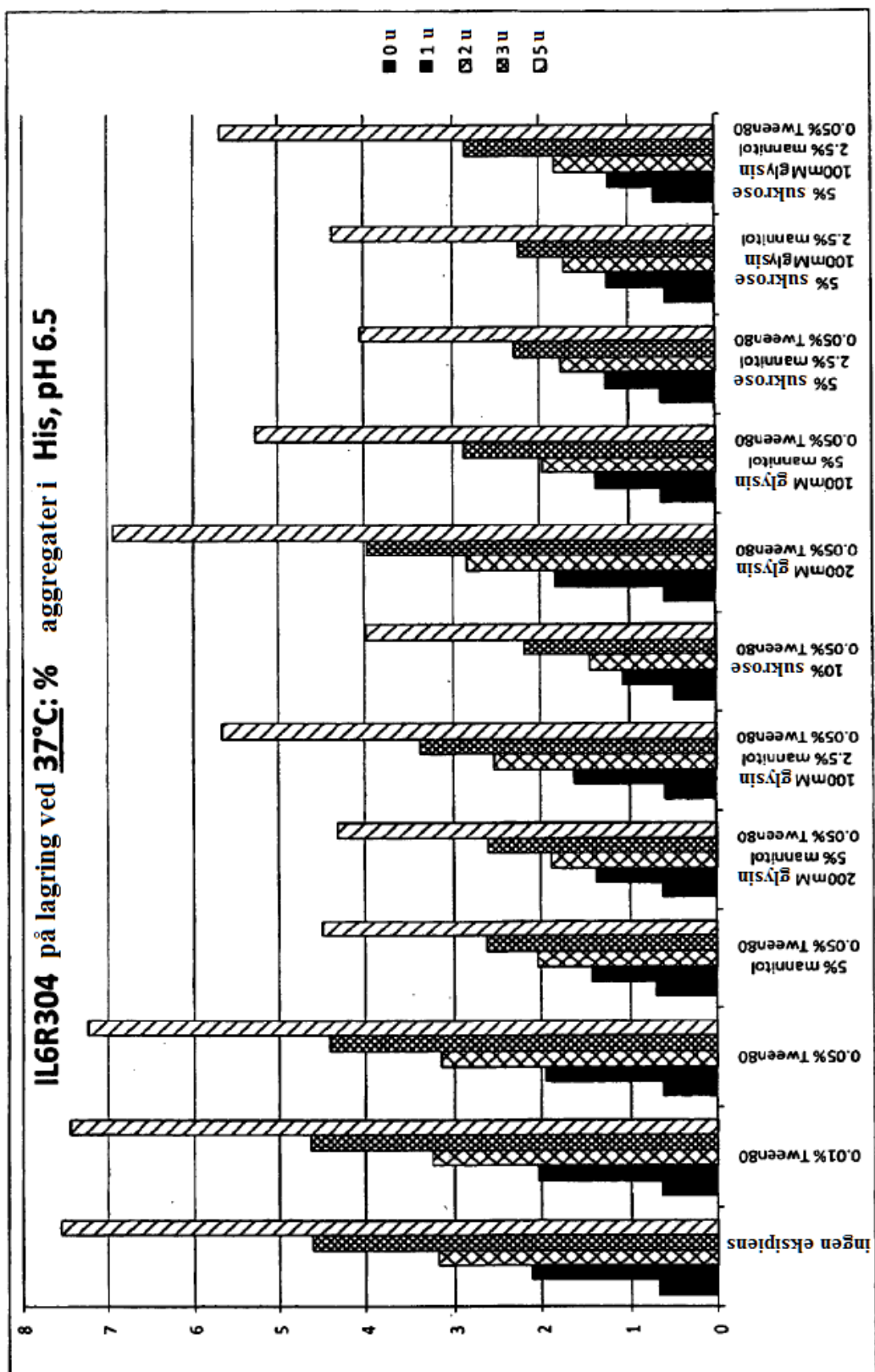


Figur 23(D)

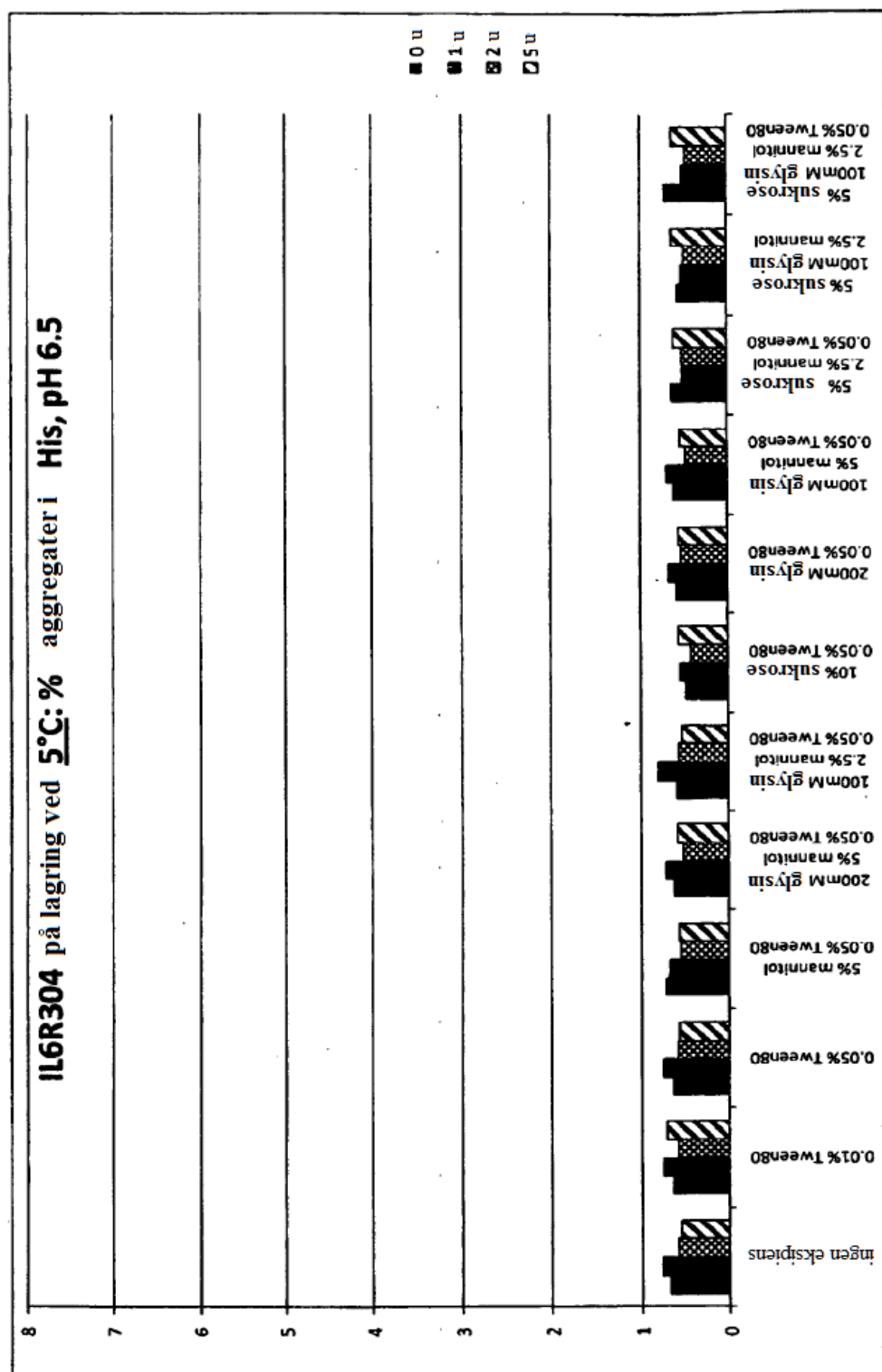




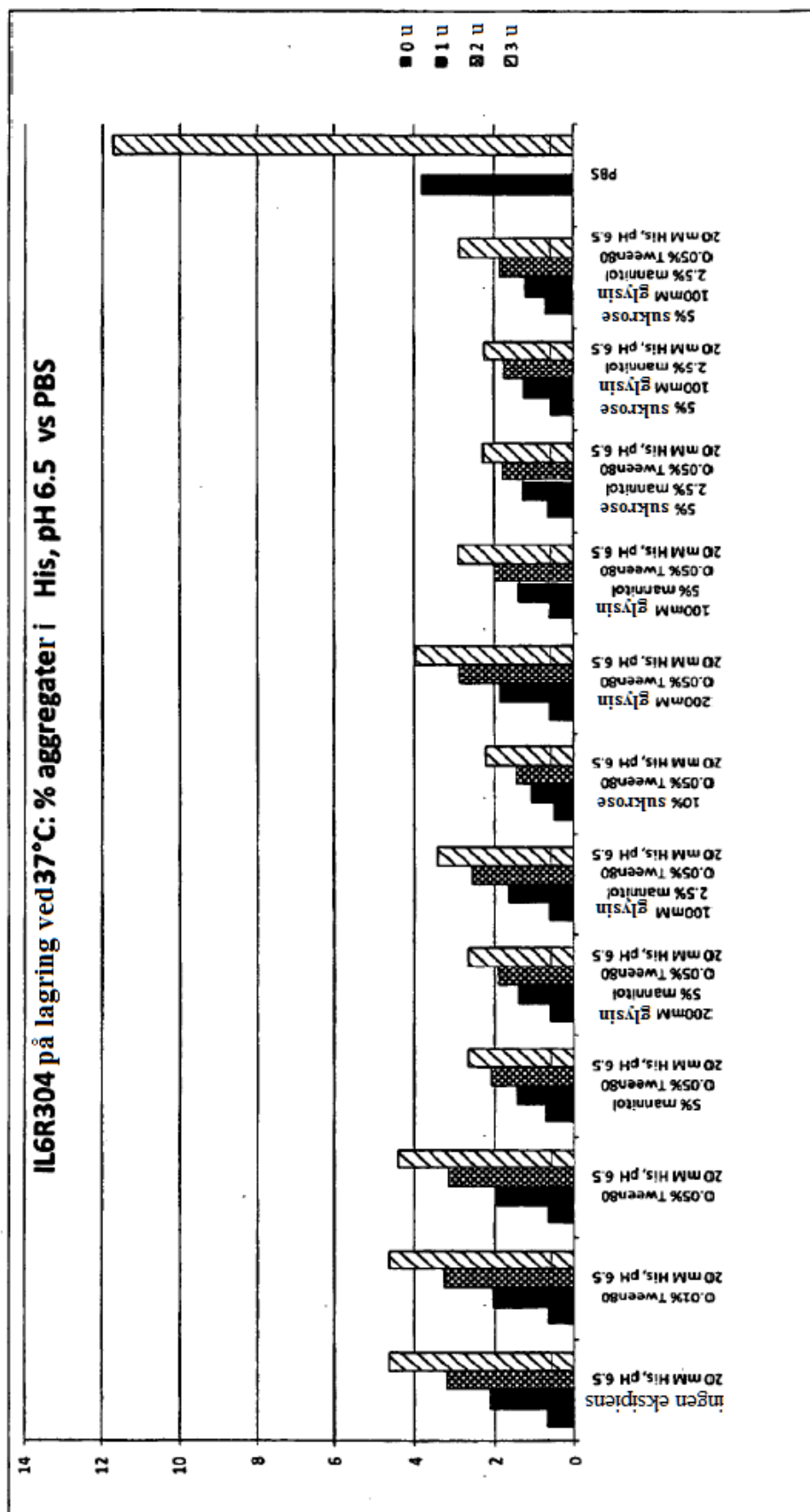
Figur 25 (A)

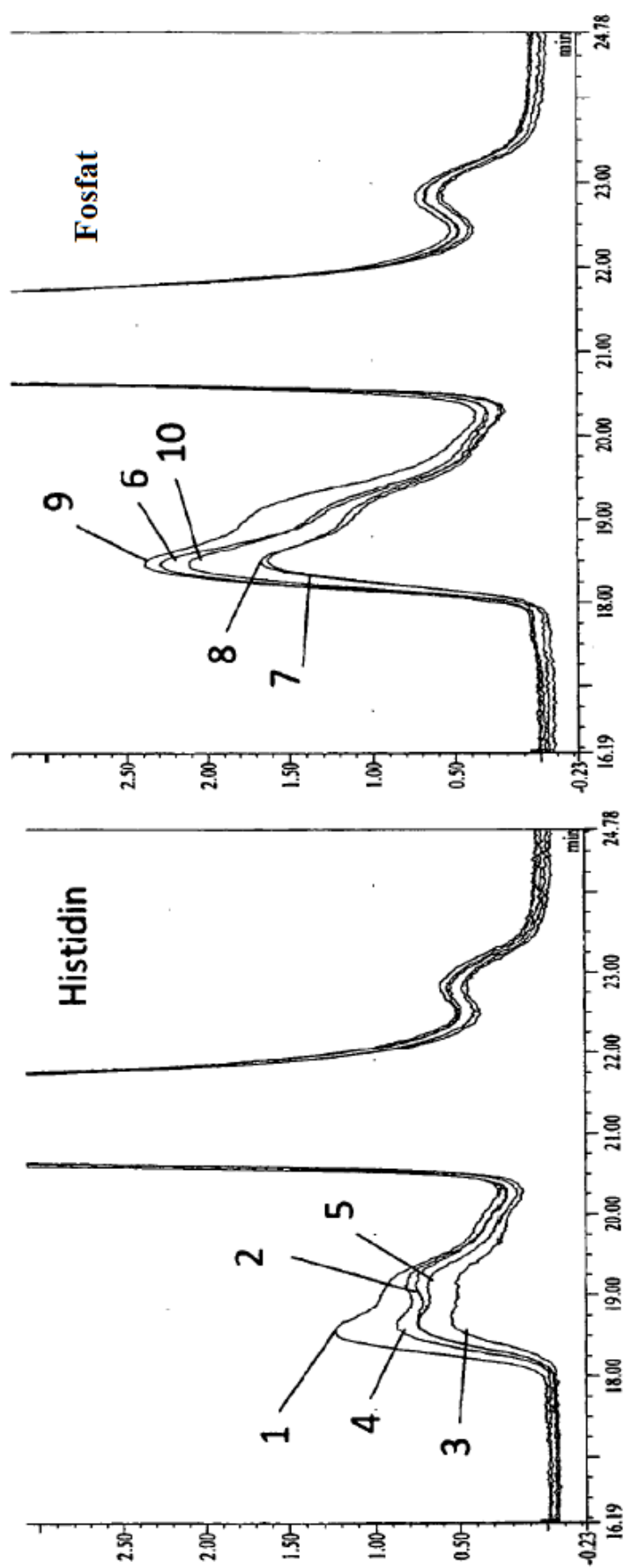


Figur 25 (B)

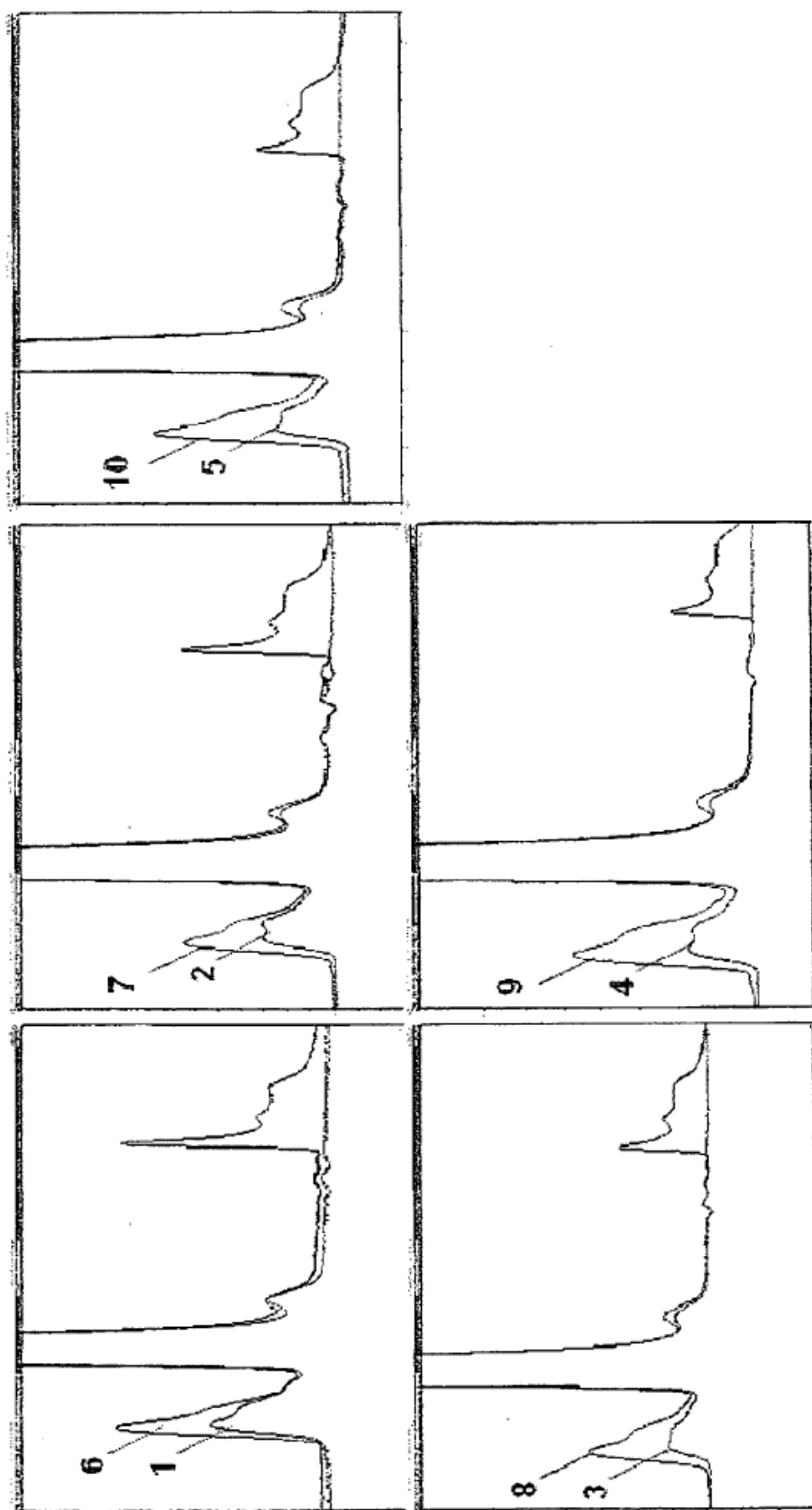


Figur 26 (A)

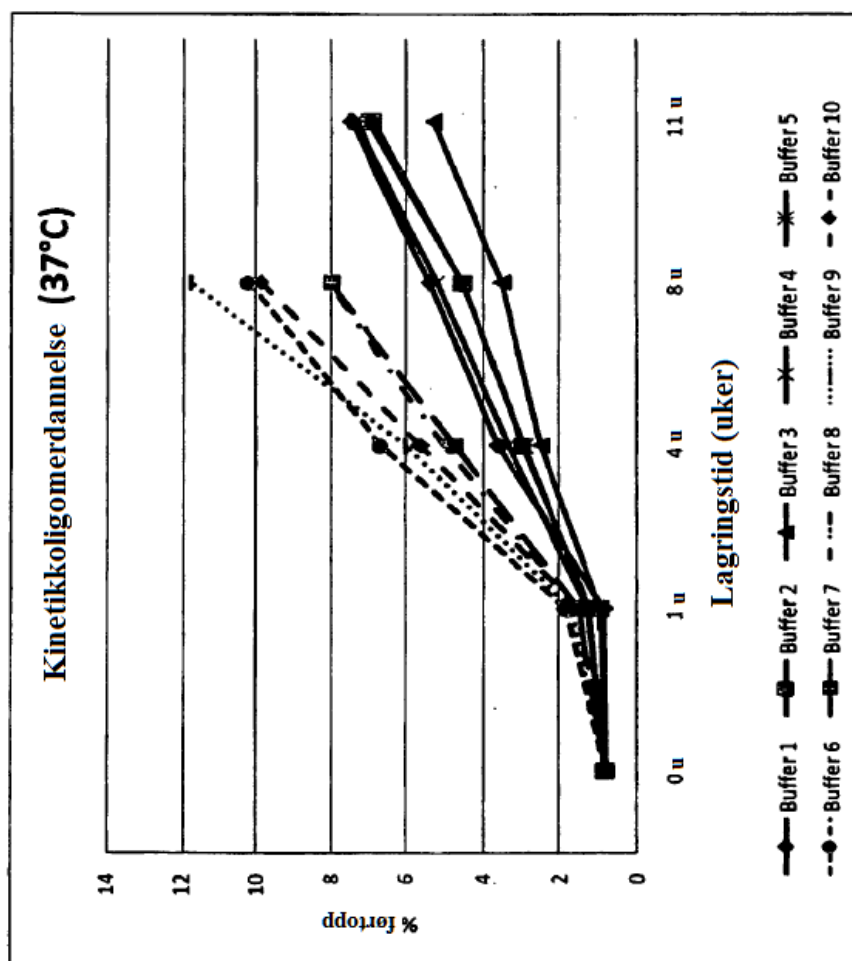


Figur 27 (A)

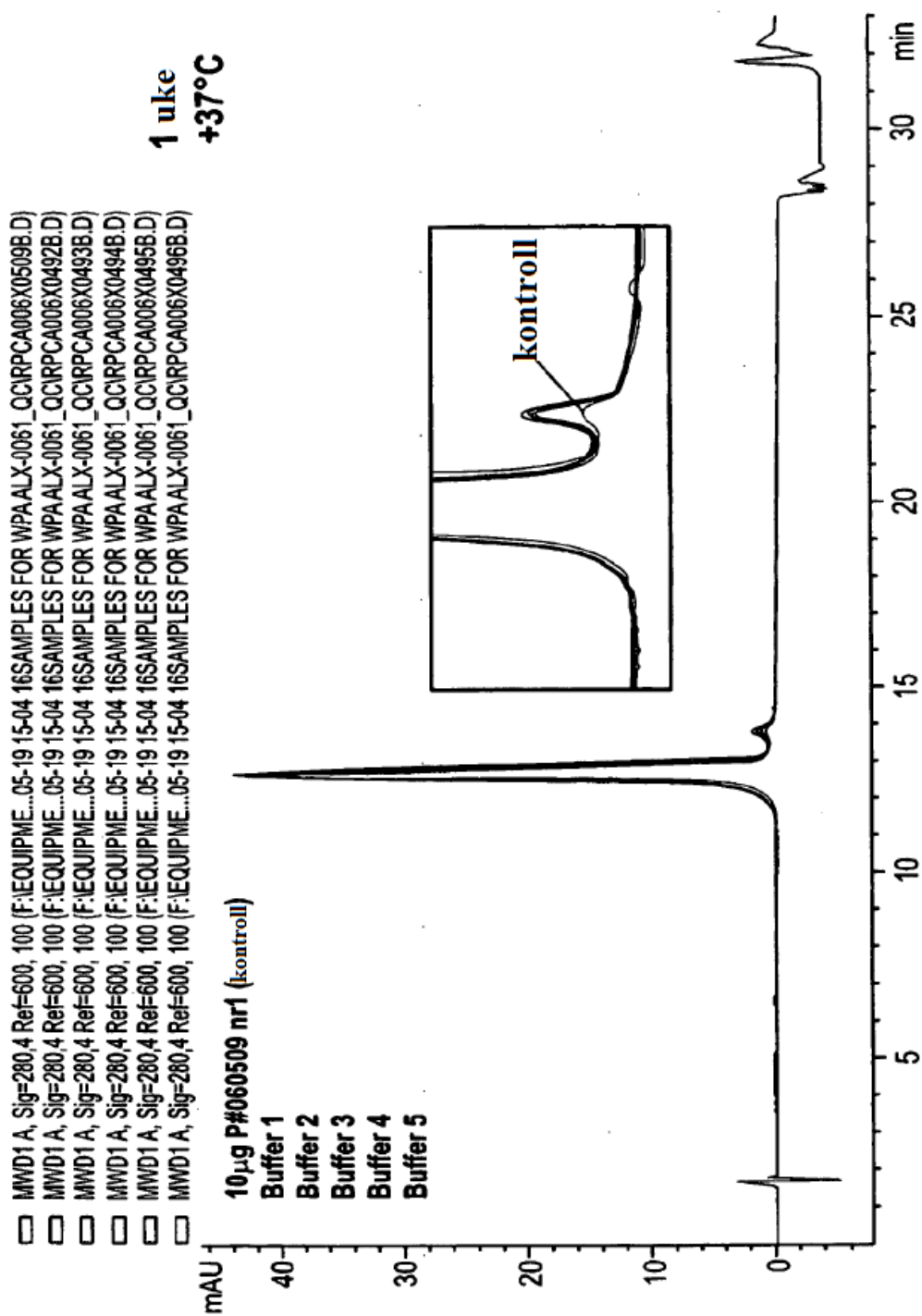
Figur 27 (B)



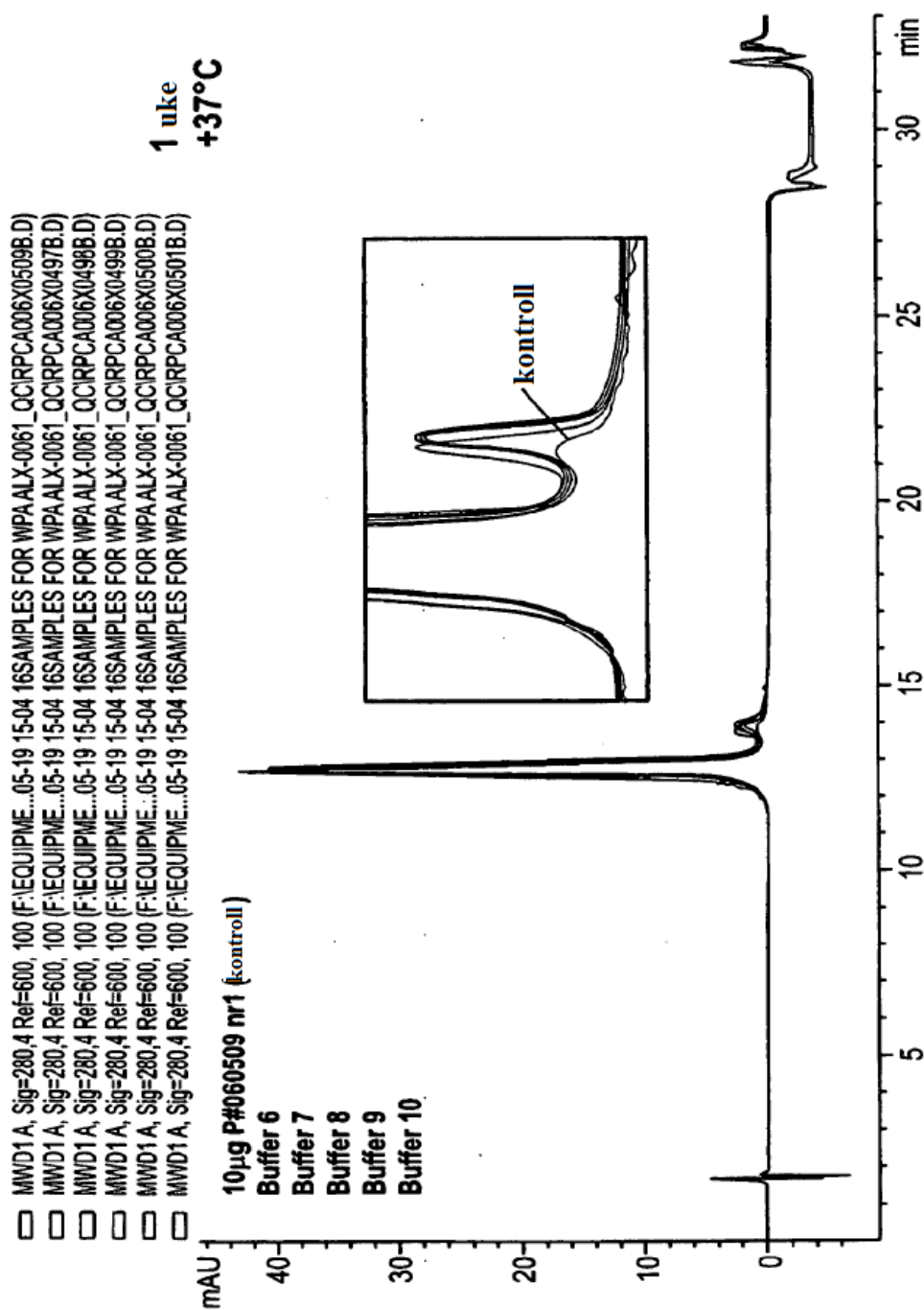
Figur 28



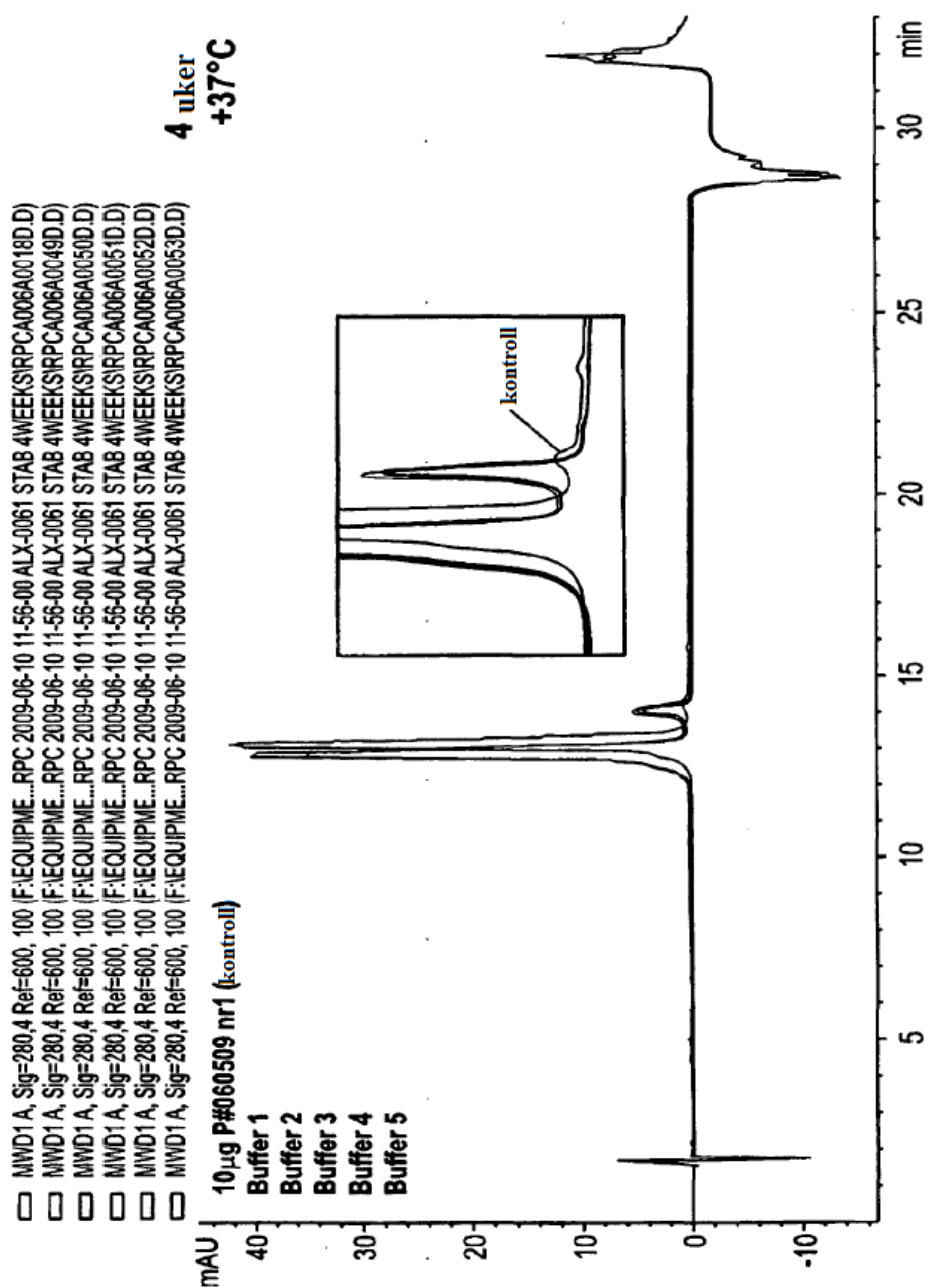
Figur 29(A)



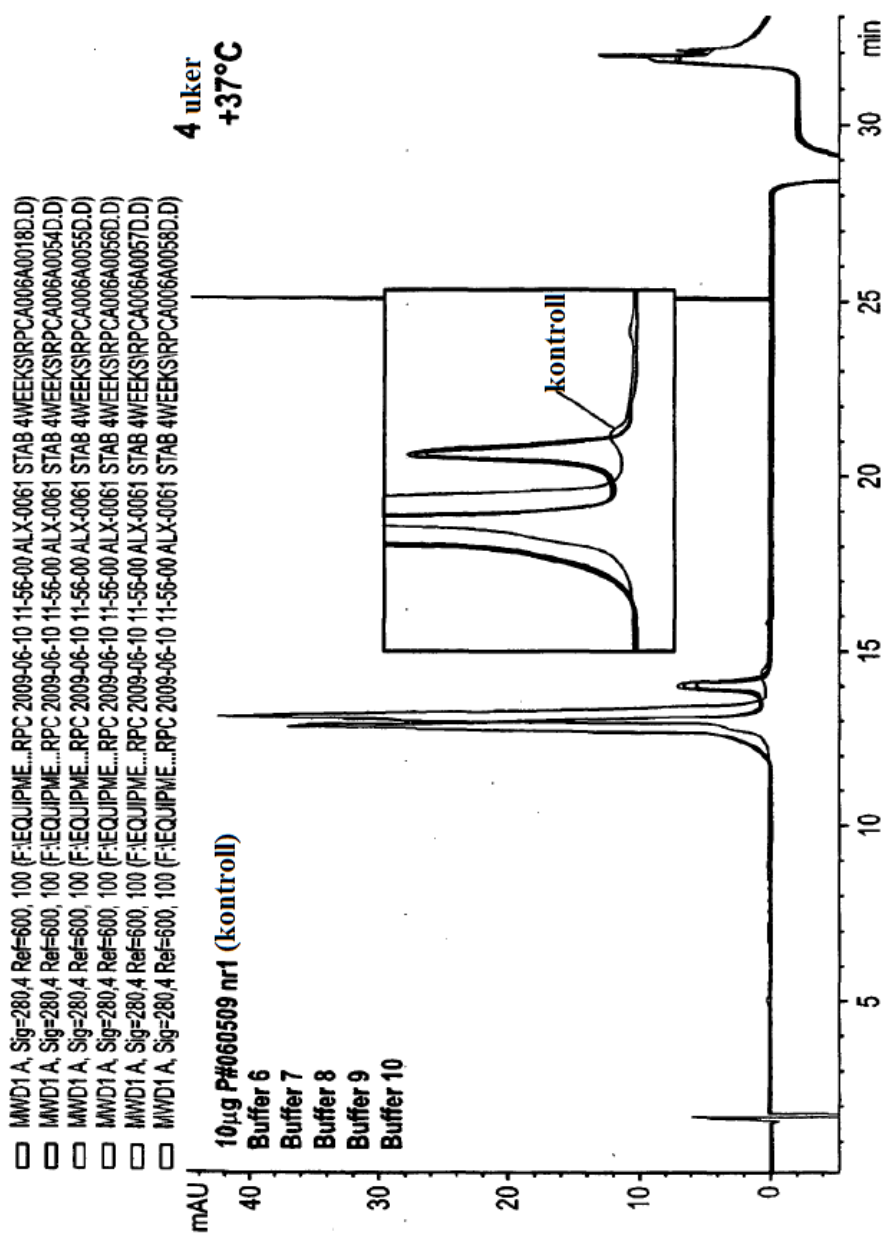
Figur 29(B)



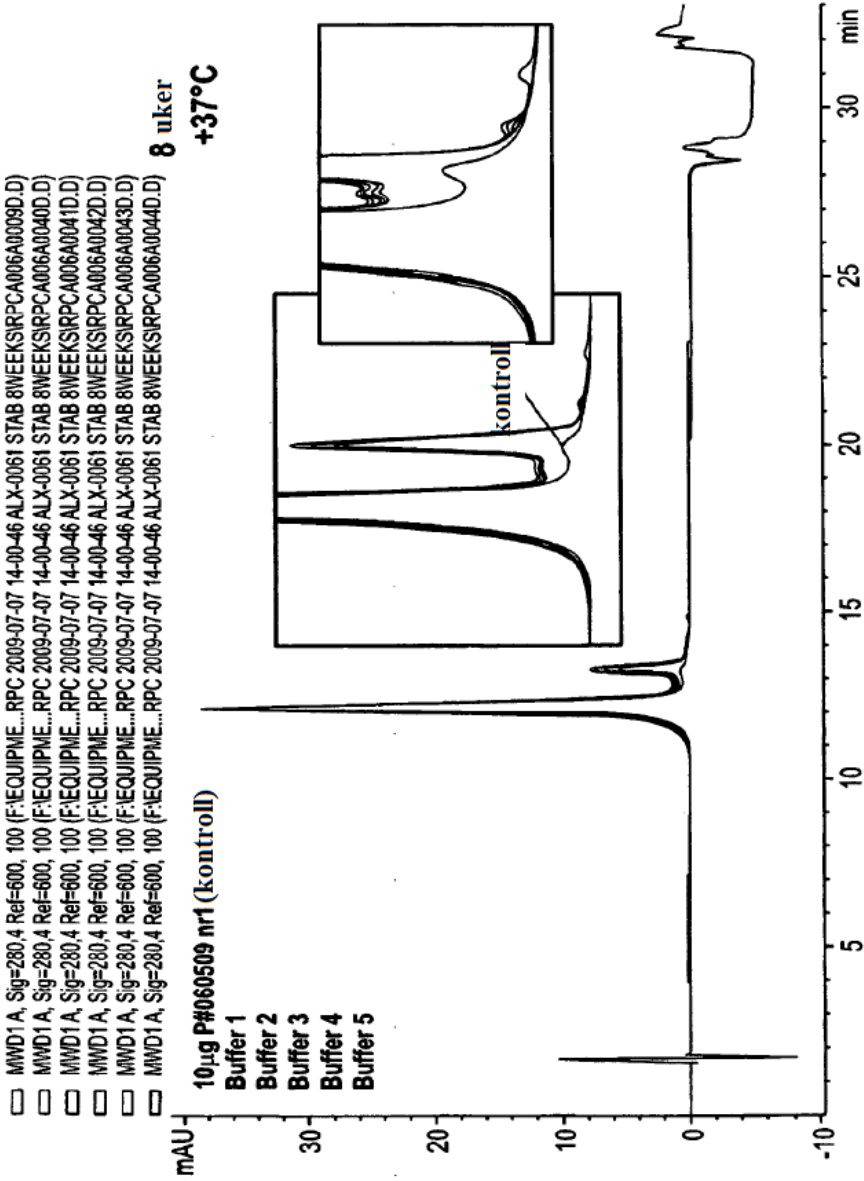
Figur 29(C)



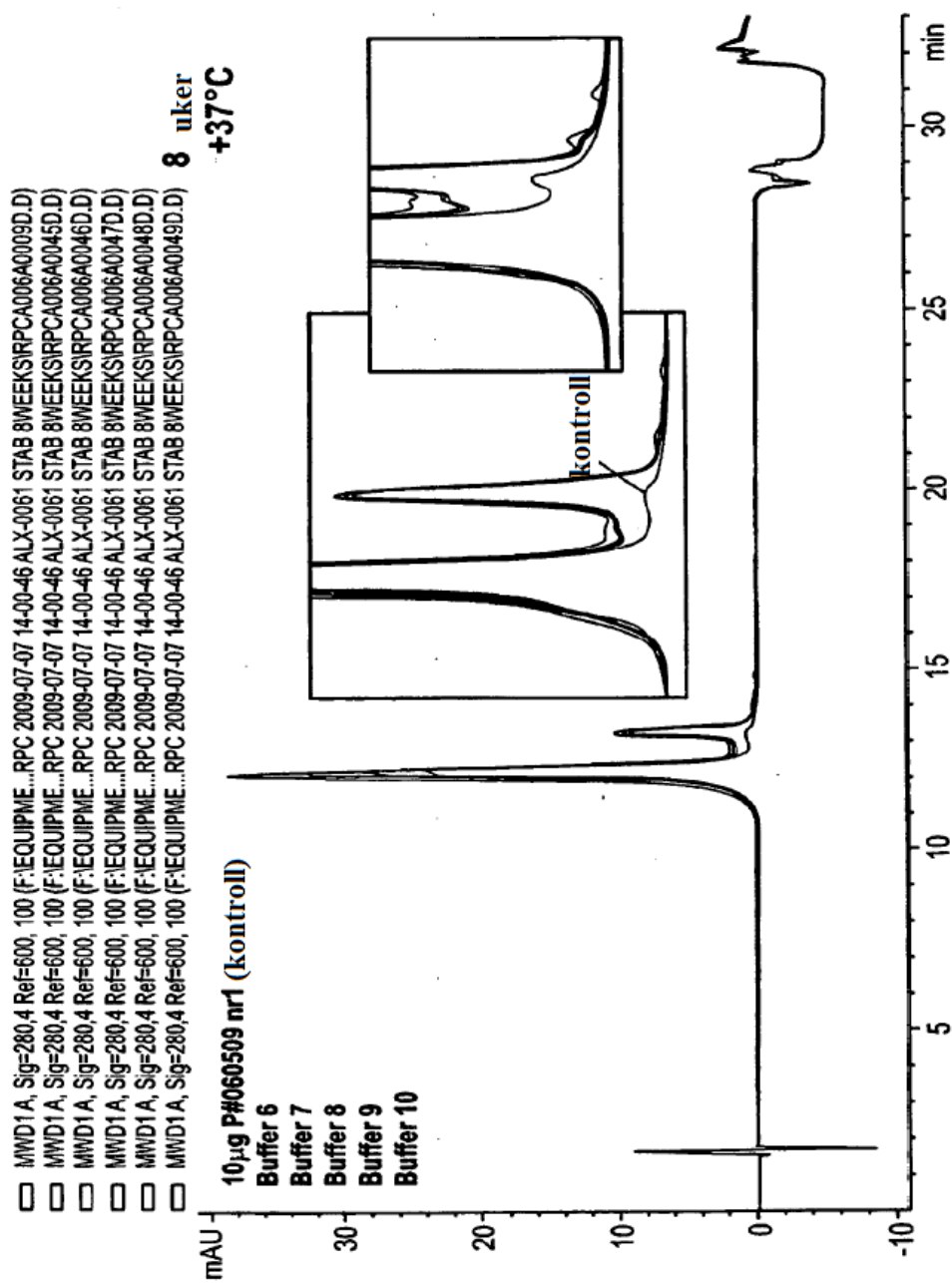
Figur 29(D)



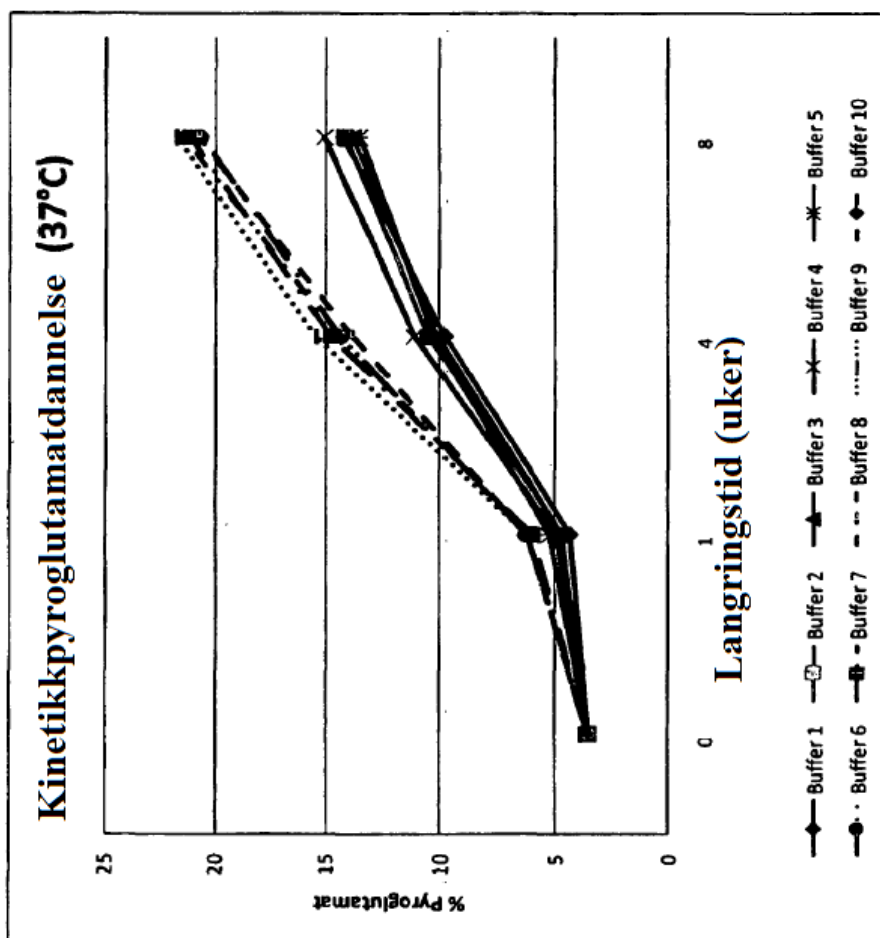
Figur 29(E)



Figur 29(F)

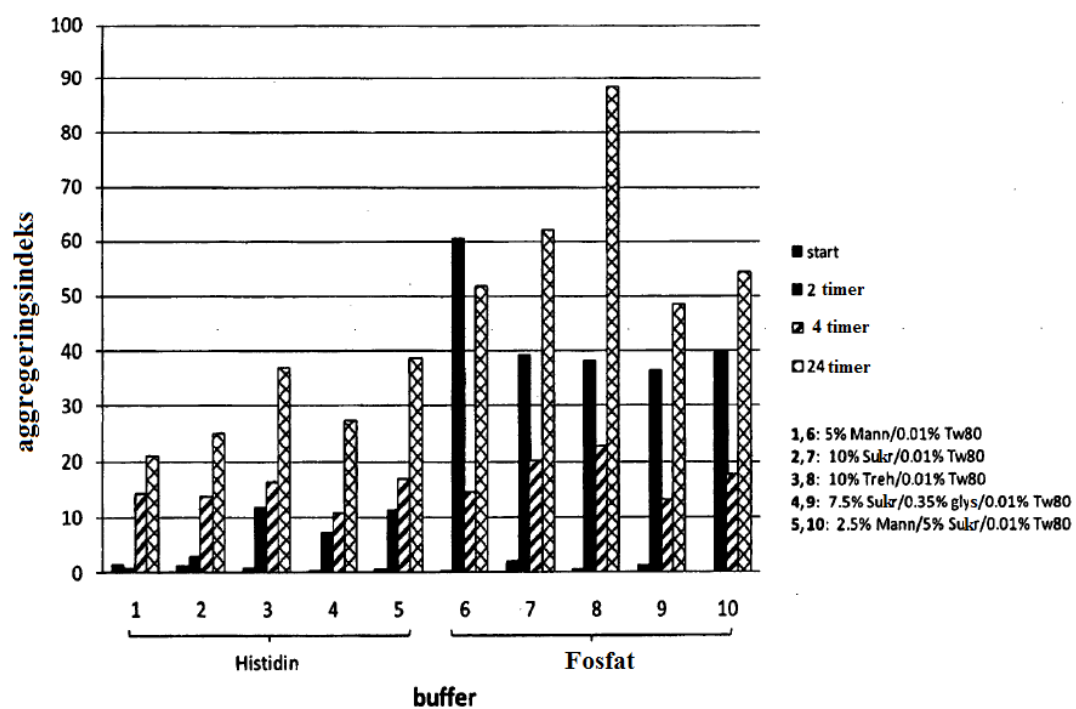


Figur 30

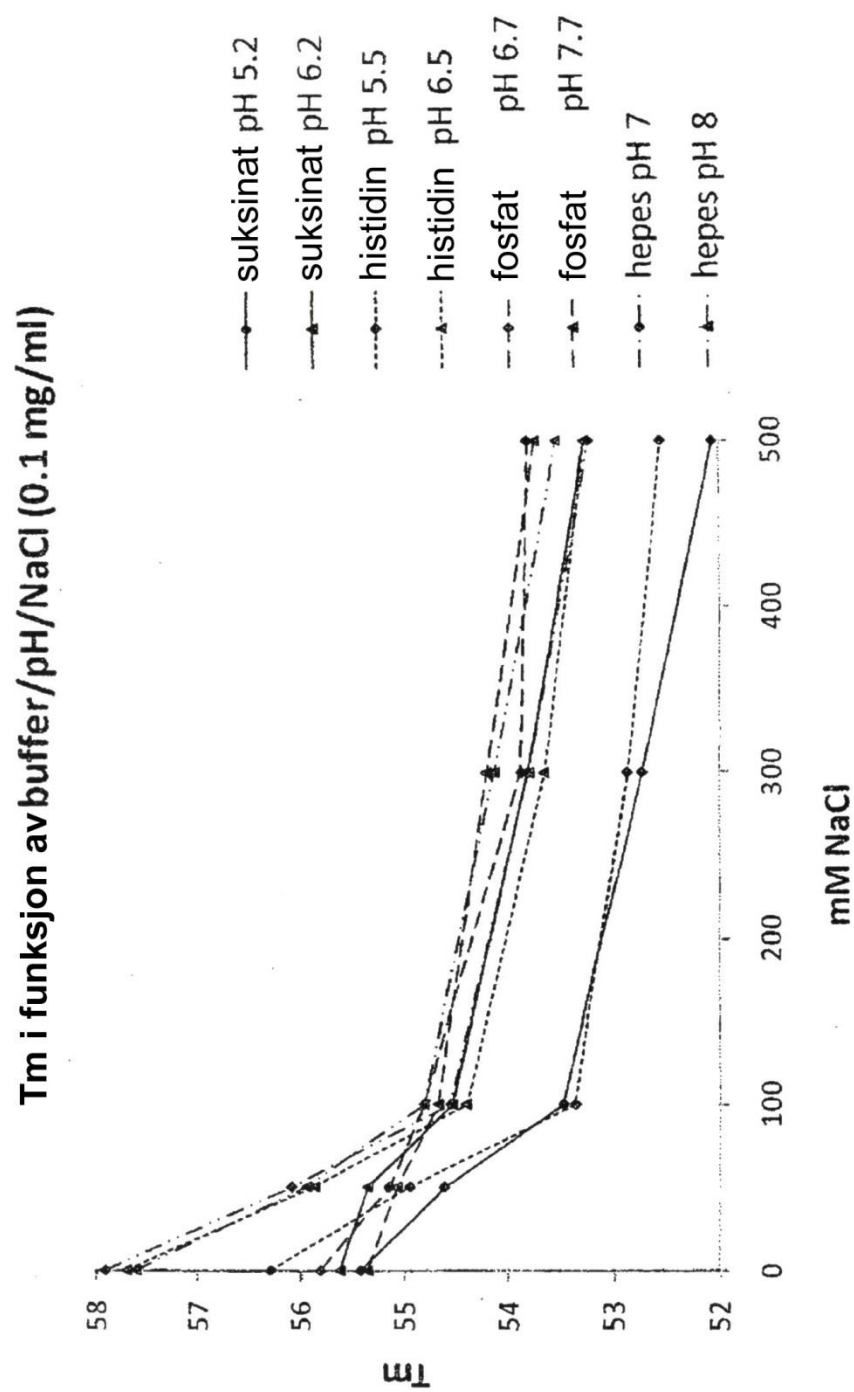


Figur 31

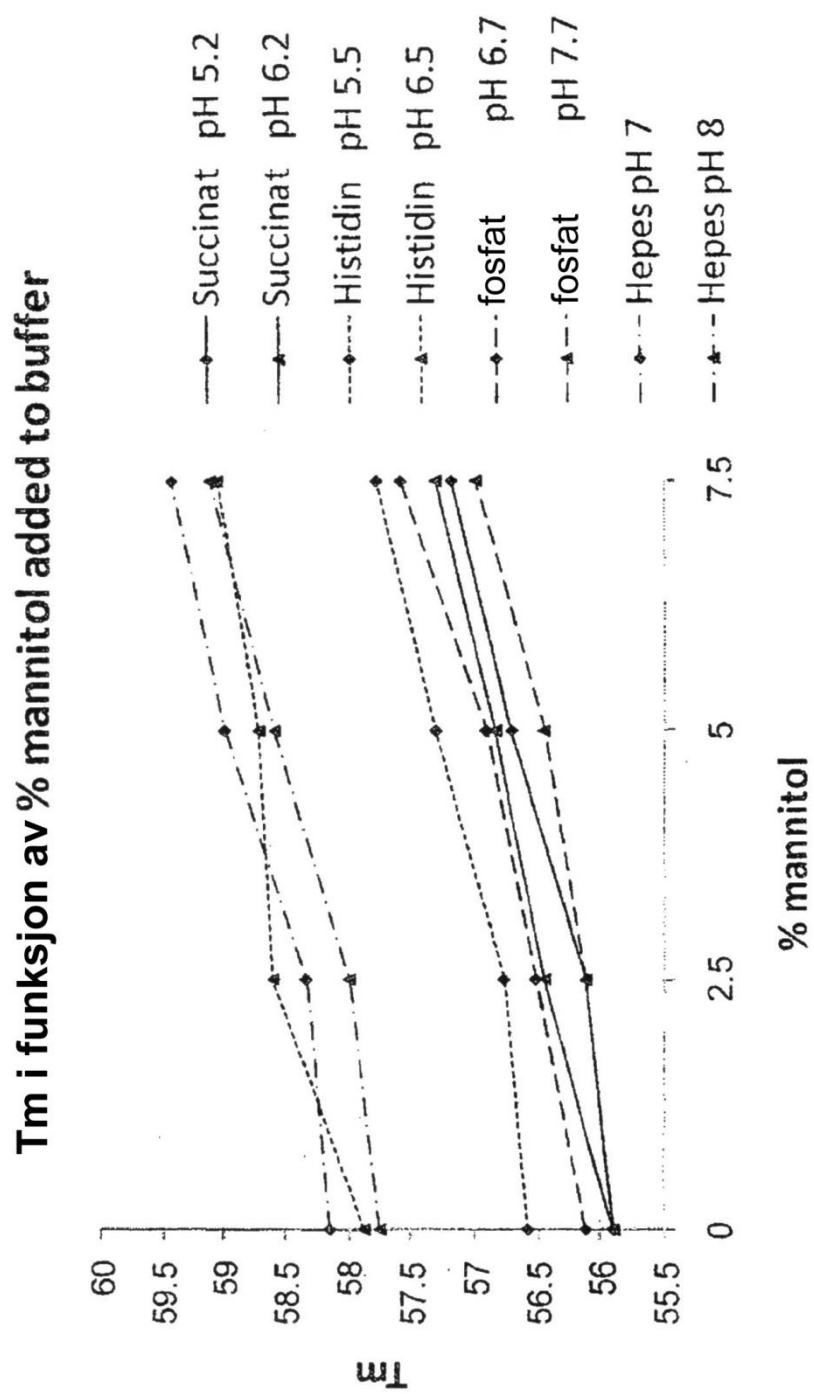
aggregeringsindeks i funksjon av buffer/tid



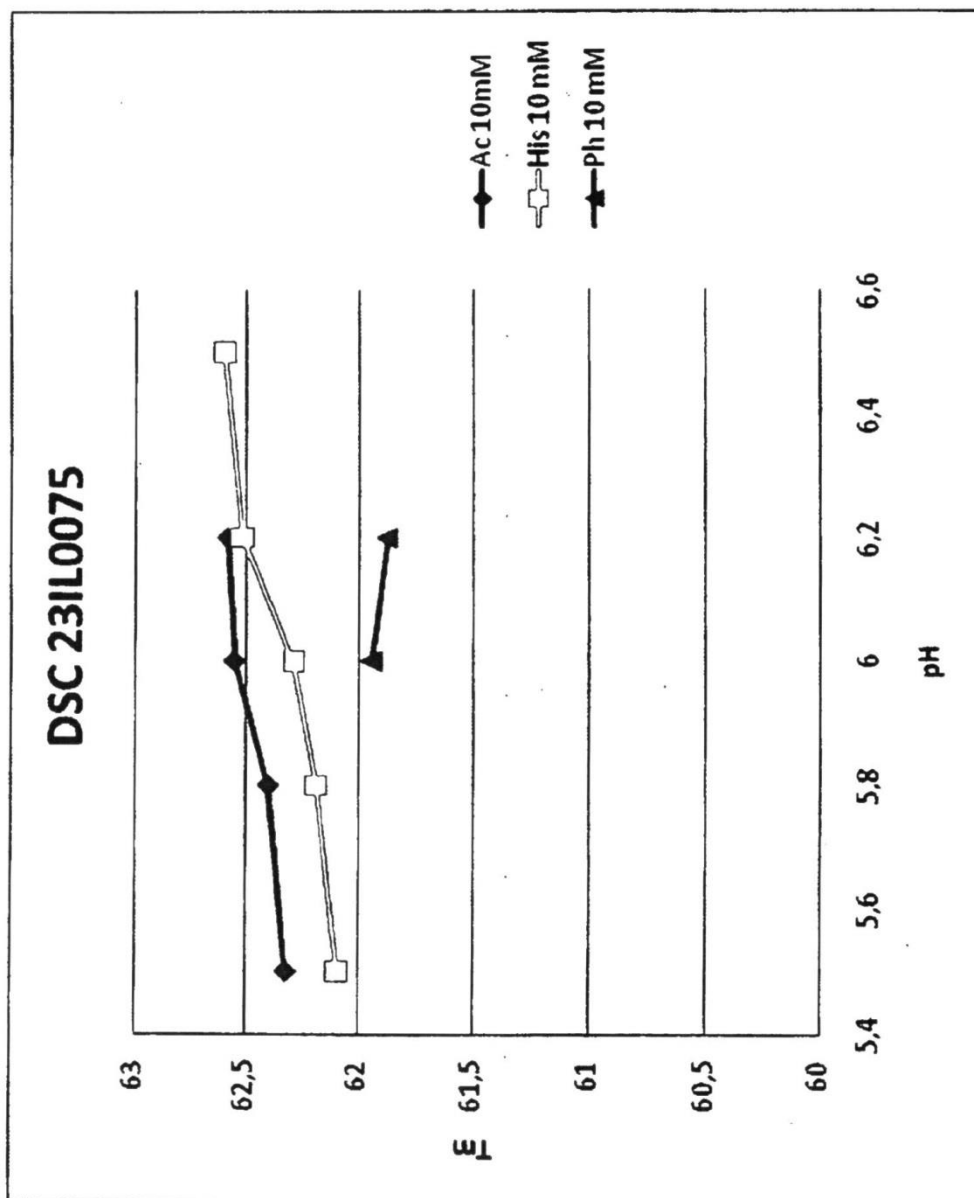
Figur 32 (A)

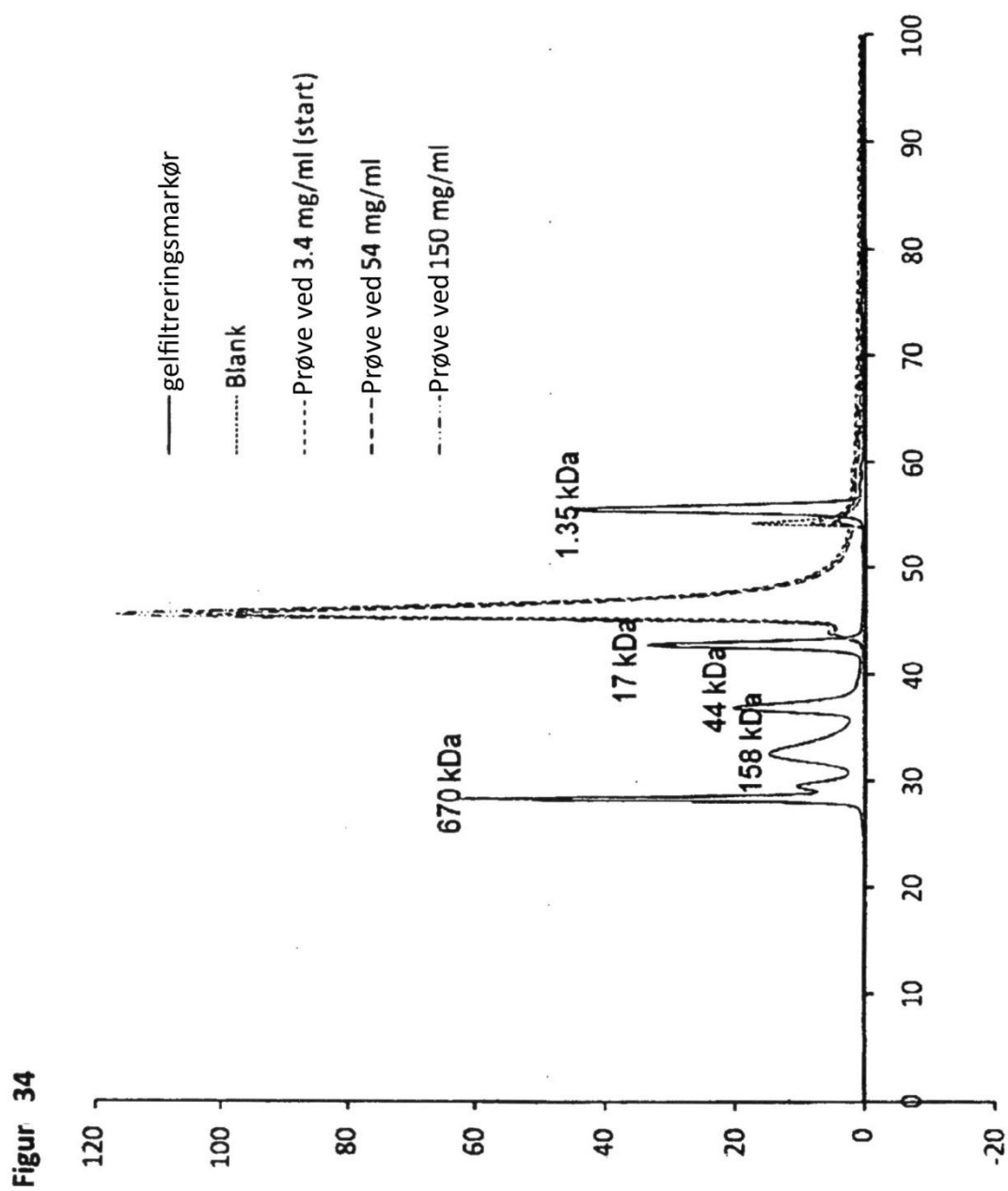


Figur 32 (B)

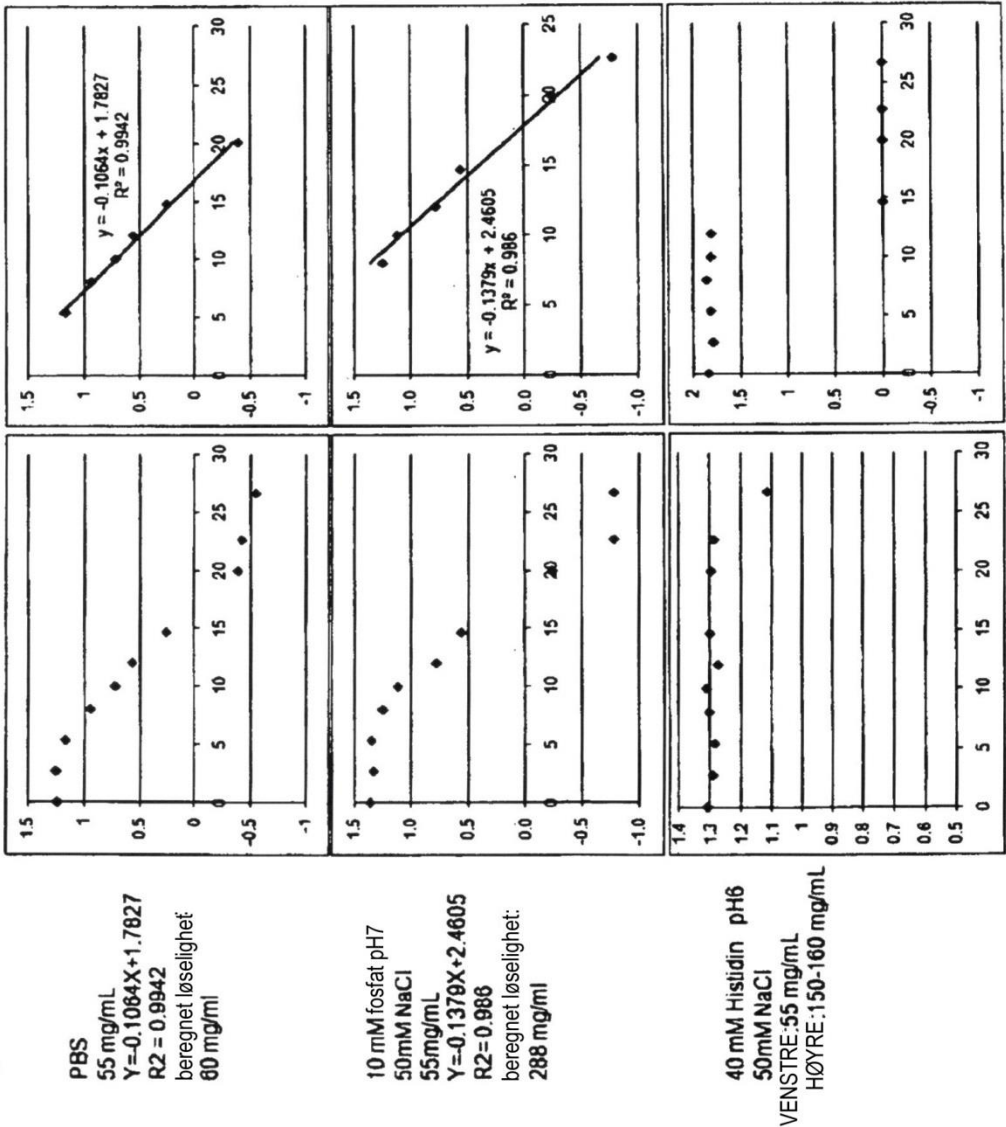


Figur 33

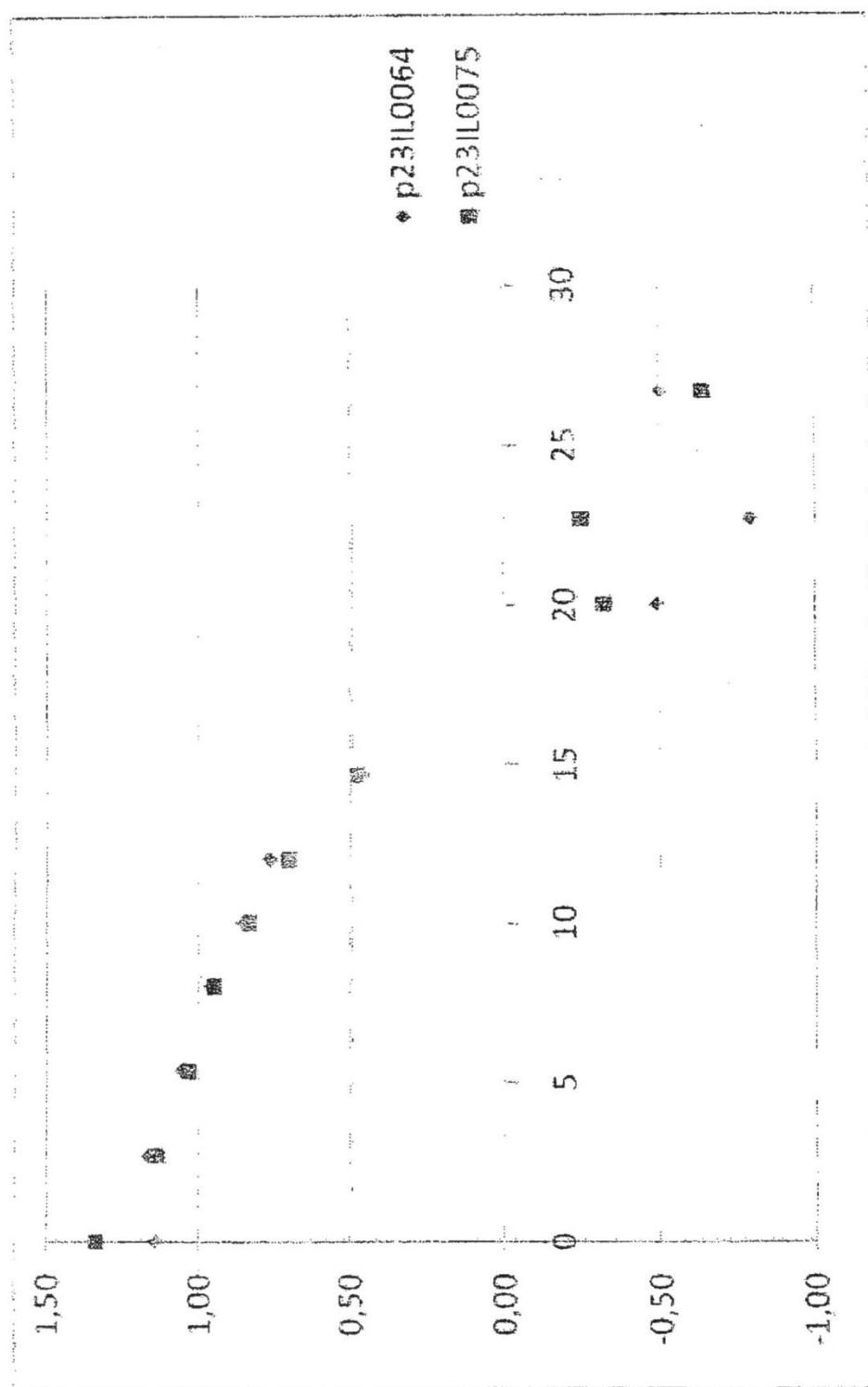




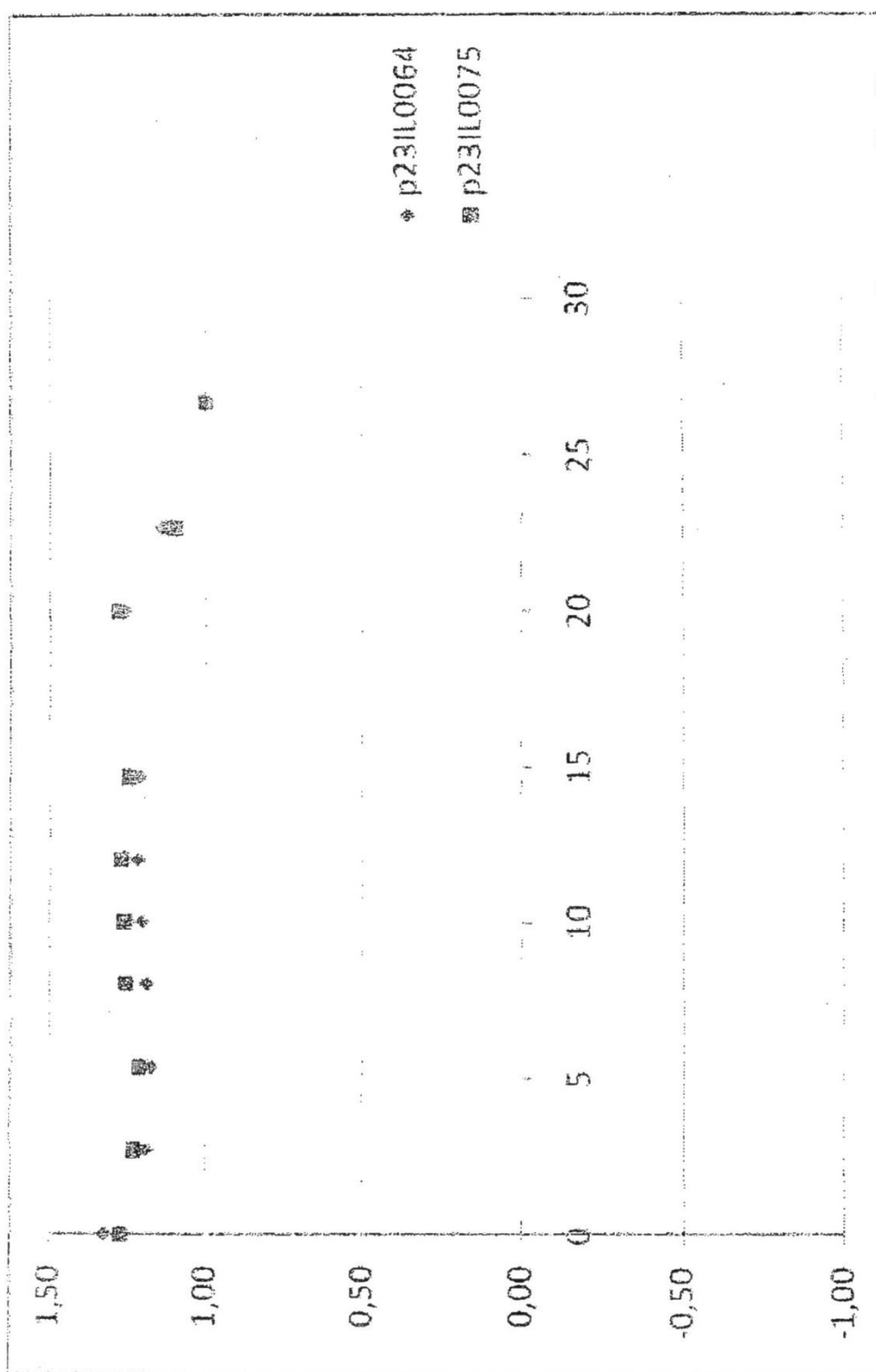
Figur 35



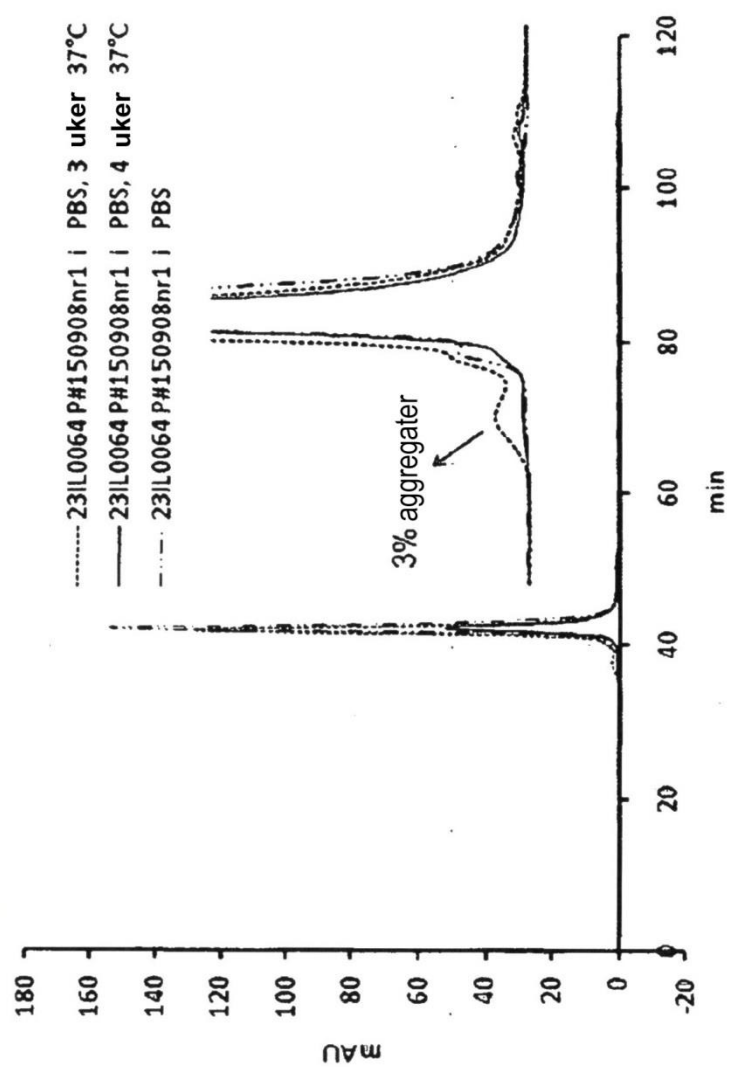
Figur 36

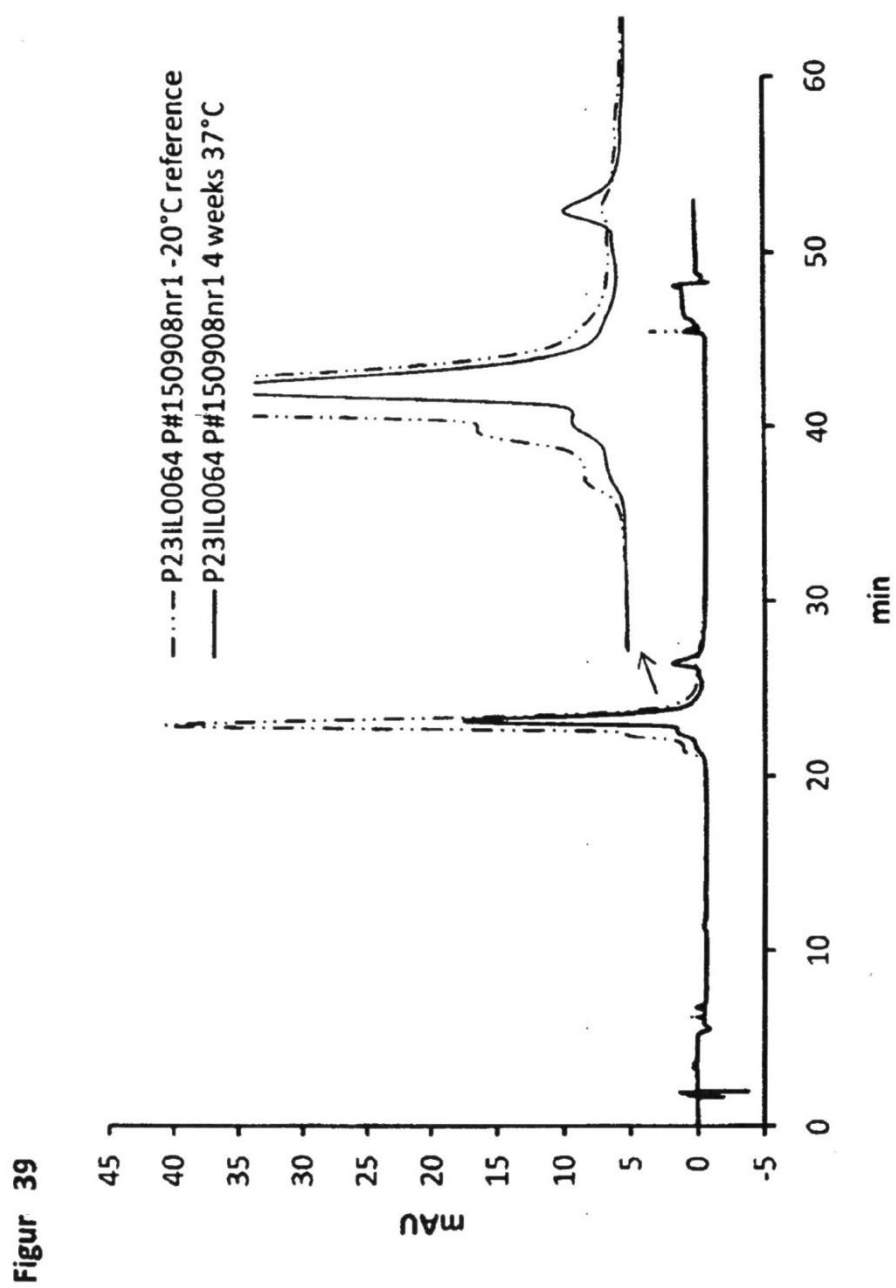


Figur 37



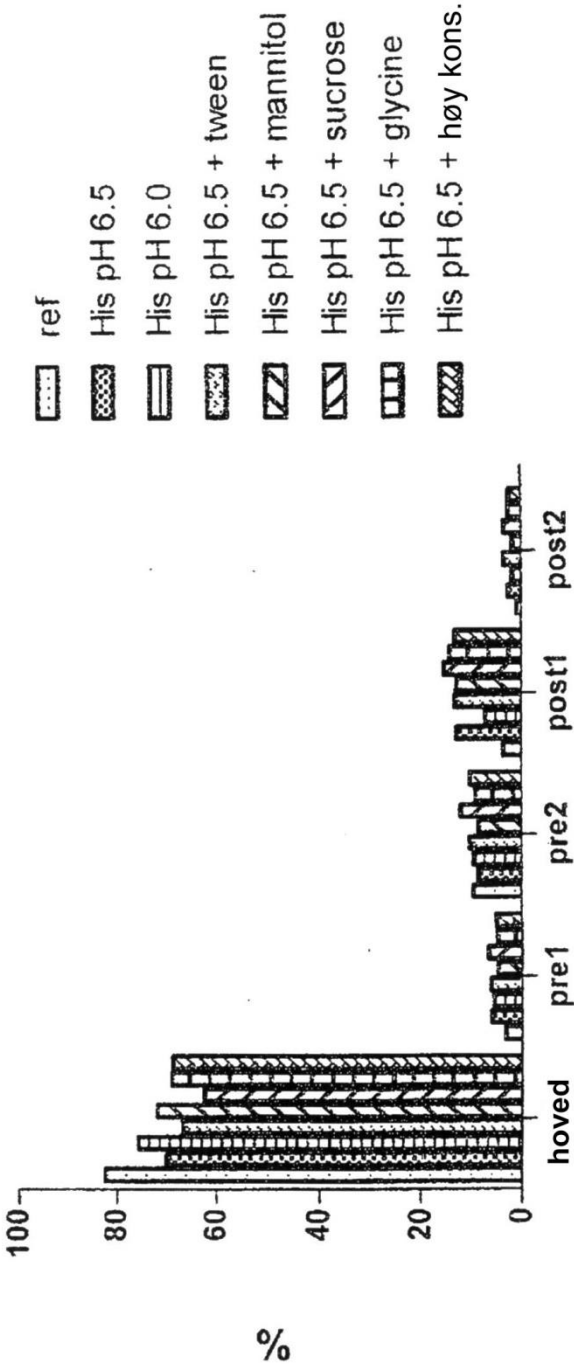
Figur 38

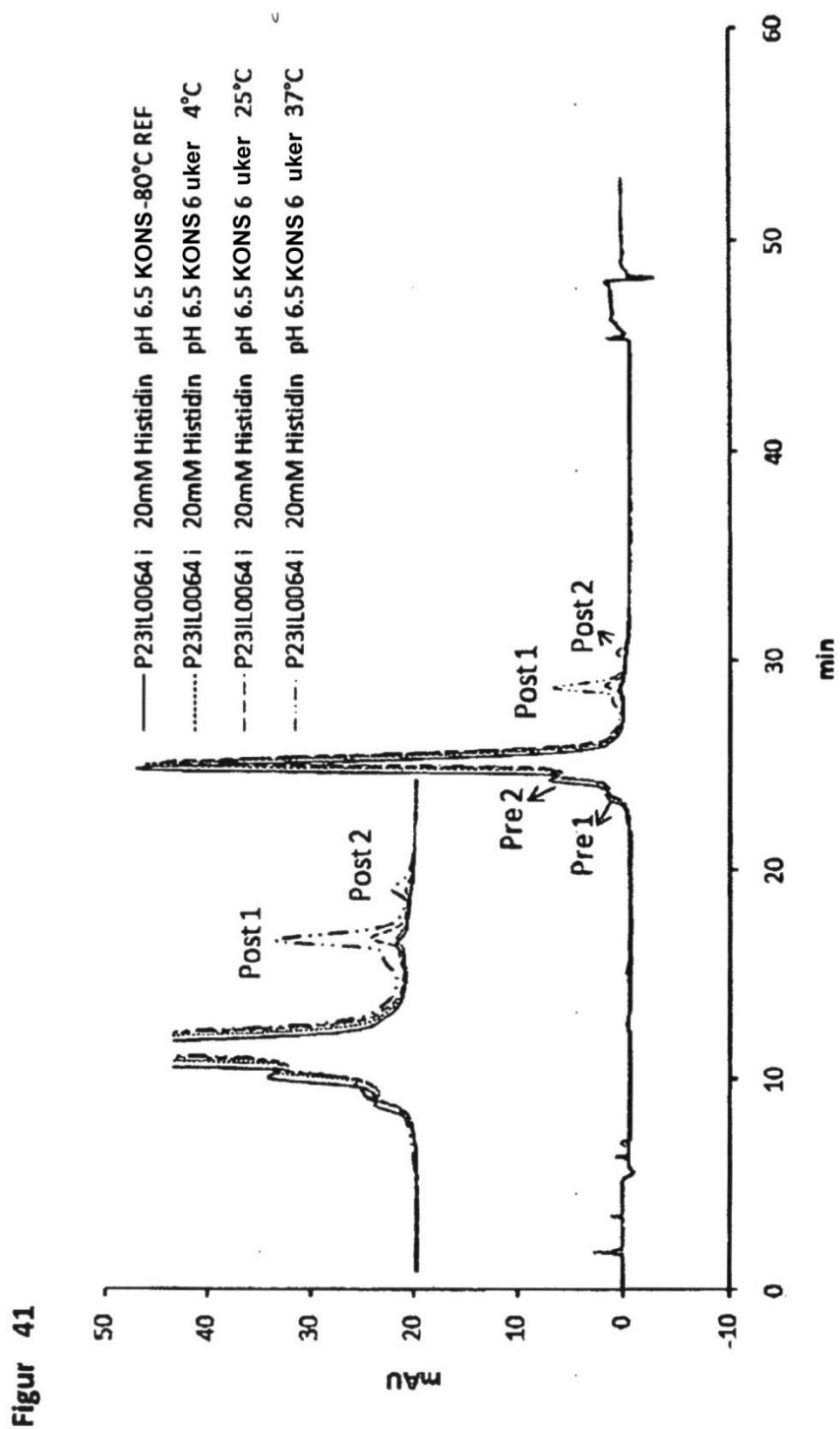




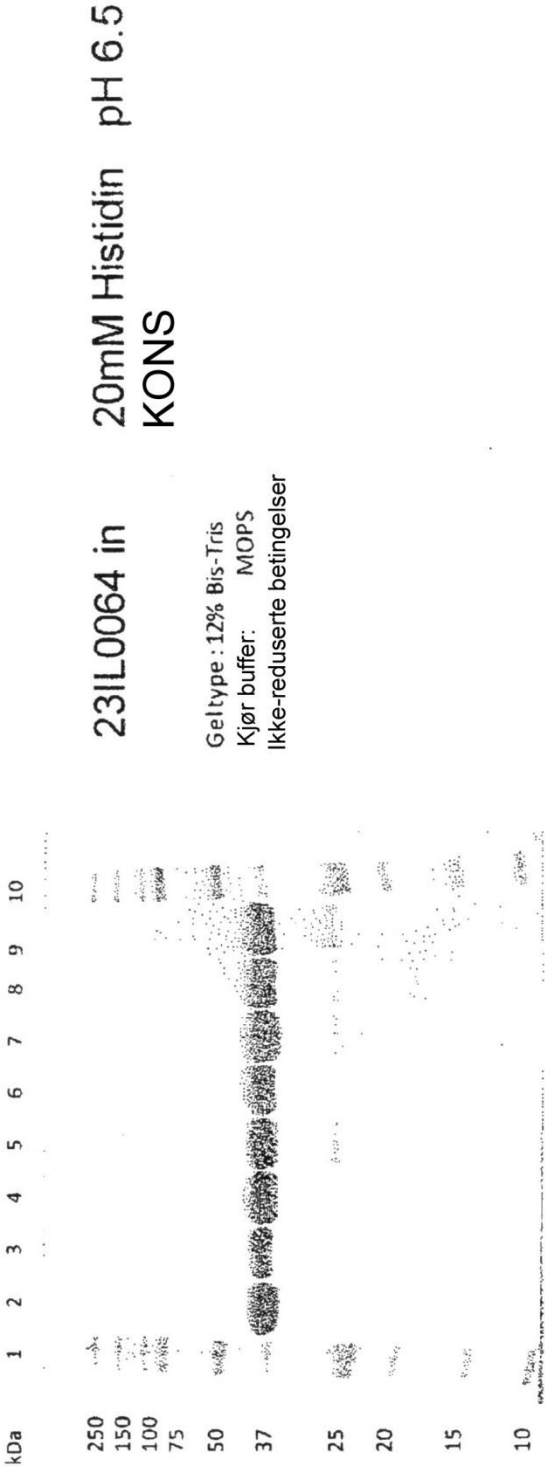
Figur 40

RPC-topper (%) etter 6 ukers lagring ved 37°C



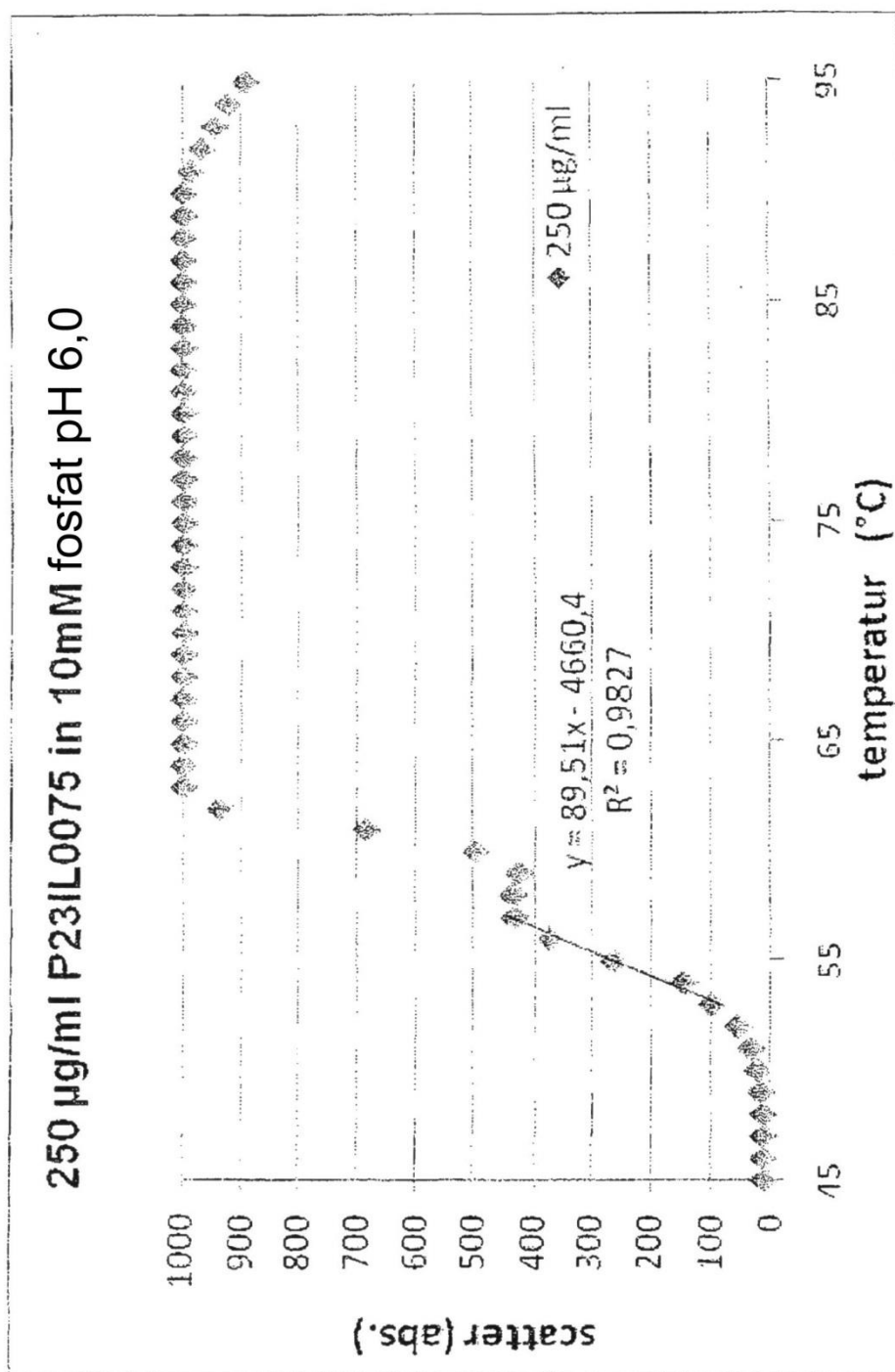


Figur 42

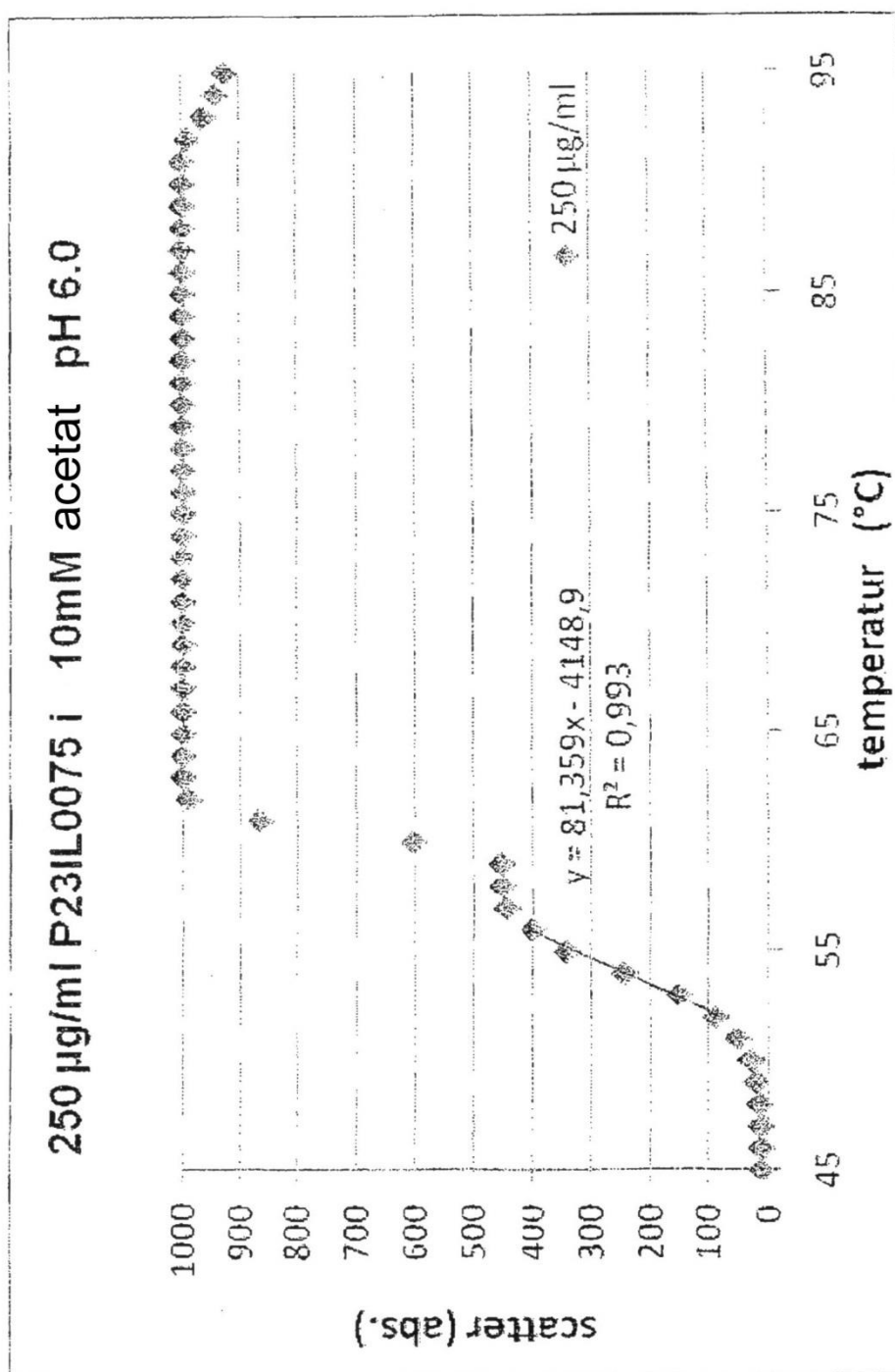


Felt	Prøve
1 og 10	Presisjon pluss proteindobbel fargestandard
2	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, -80°C Ref (Før sentrifugering)
3	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, 4°C 6 weeks (Før sentrifugering)
4	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, 25°C 6 weeks (Før sentrifugering)
5	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, 37°C 6 weeks (Før sentrifugering)
6	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, -80°C Ref (Etter sentrifugering)
7	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, 4°C 6 weeks (Etter sentrifugering)
8	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, 25°C 6 weeks (Etter sentrifugering)
9	p23IL0064 in 20mM Histidine pH 6.5 CONC, 37°C 6 weeks (Etter sentrifugering)

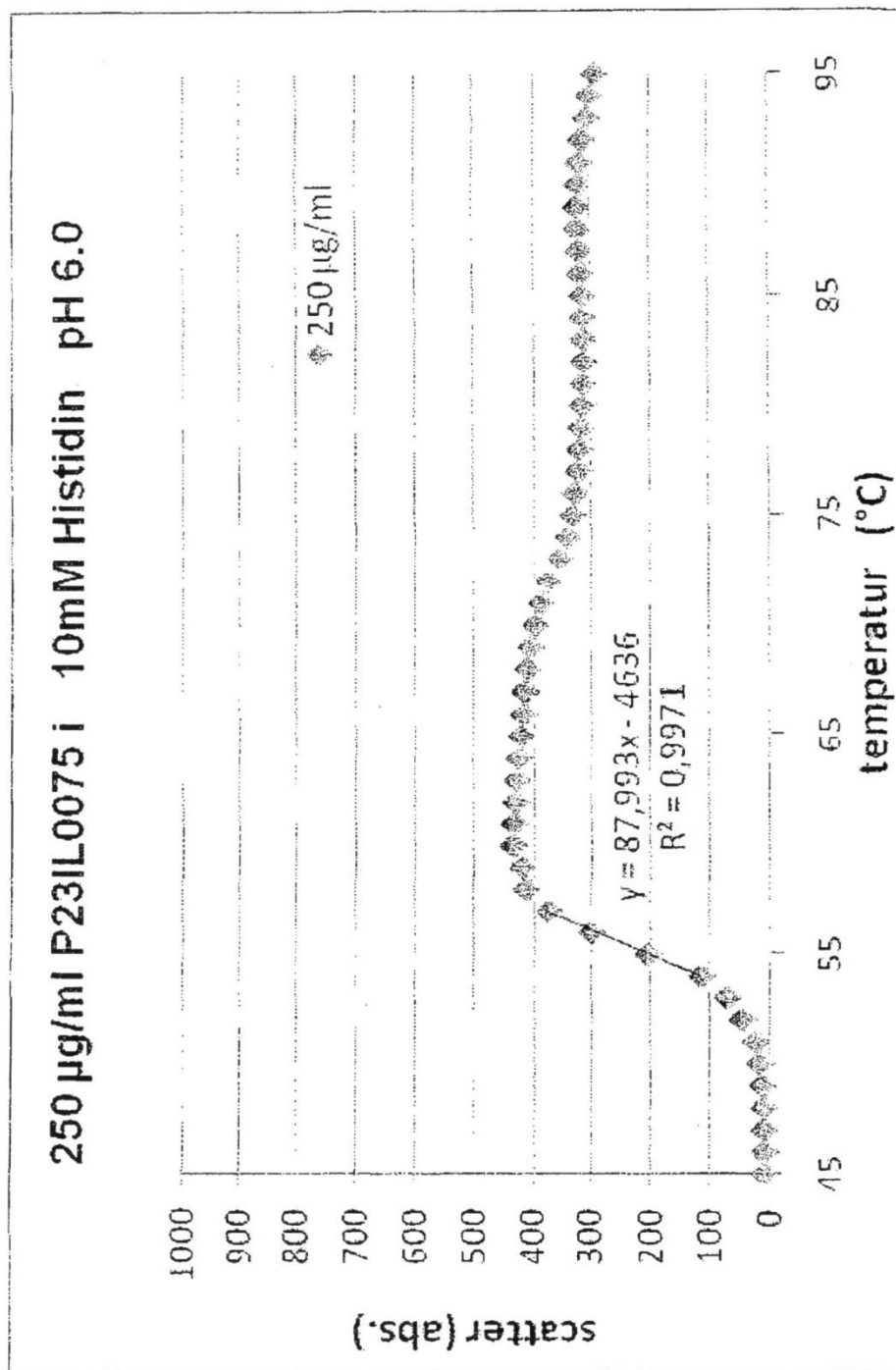
Figur 44



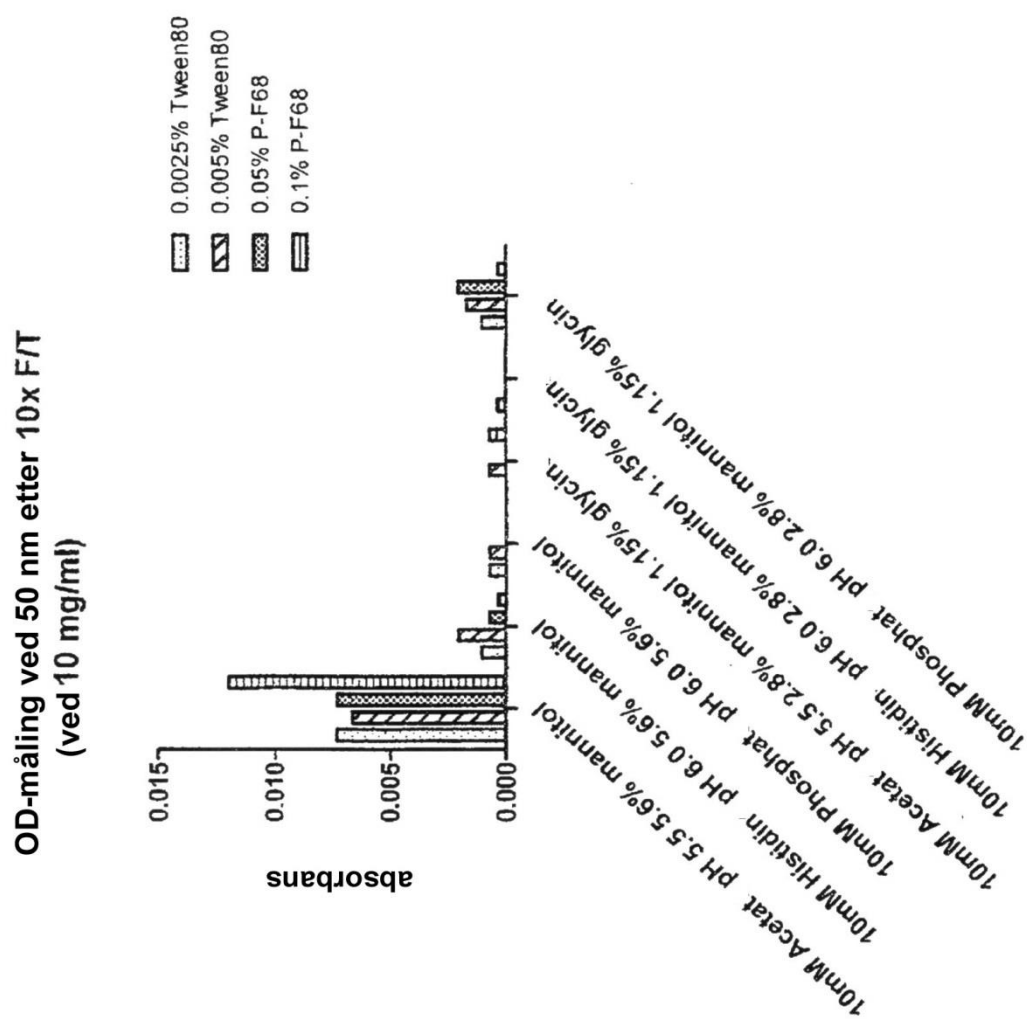
Figur 45



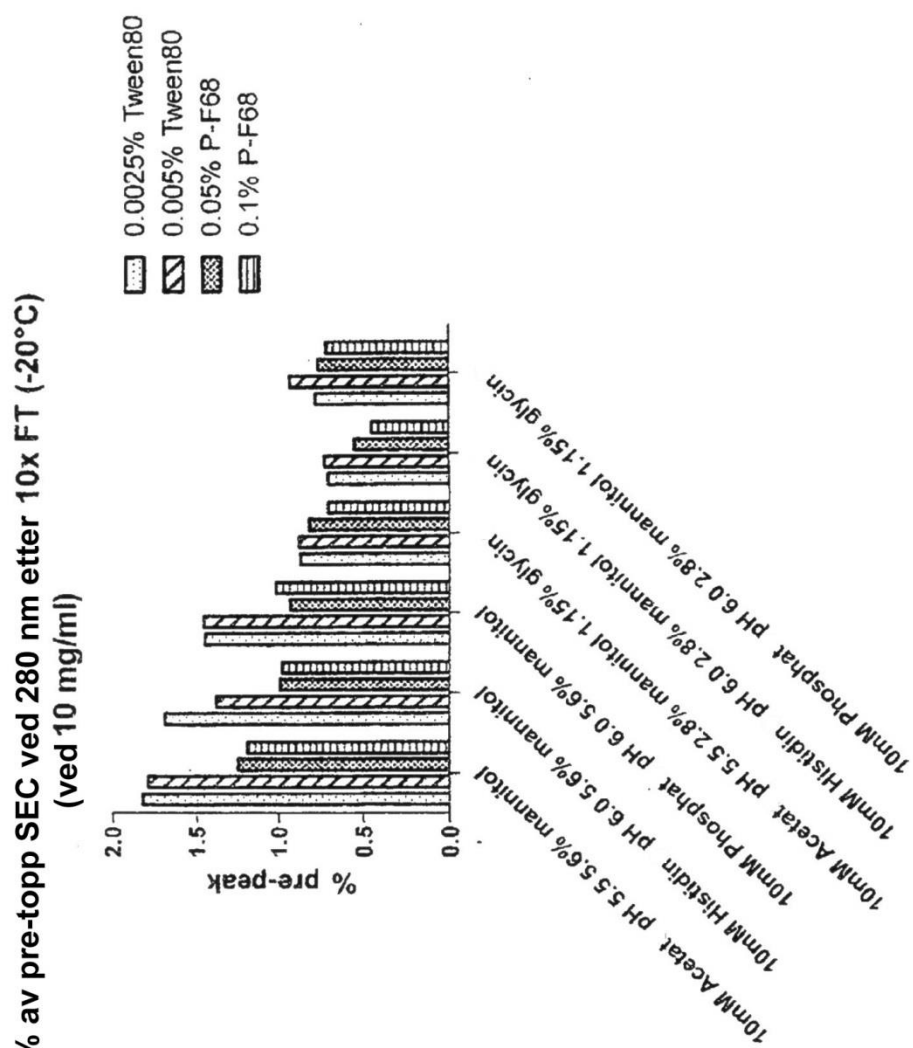
Figur 46



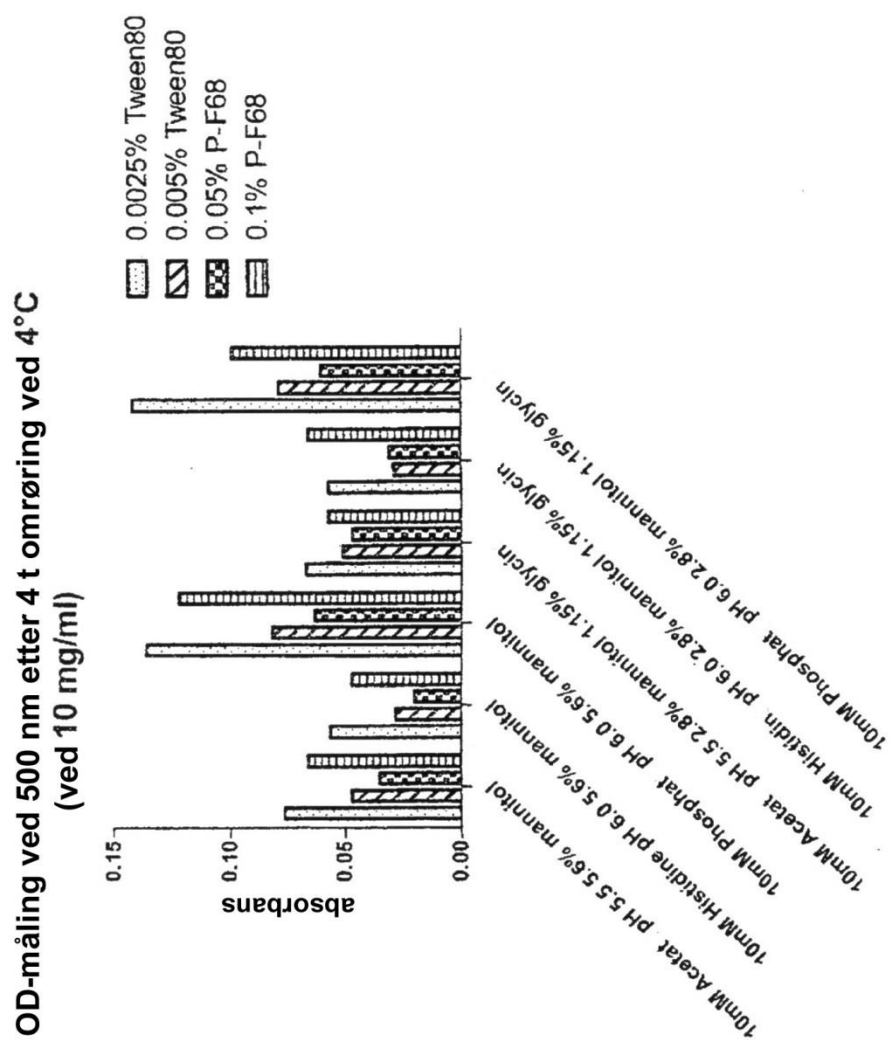
Figur 47 (A)



Figur 47 (B)

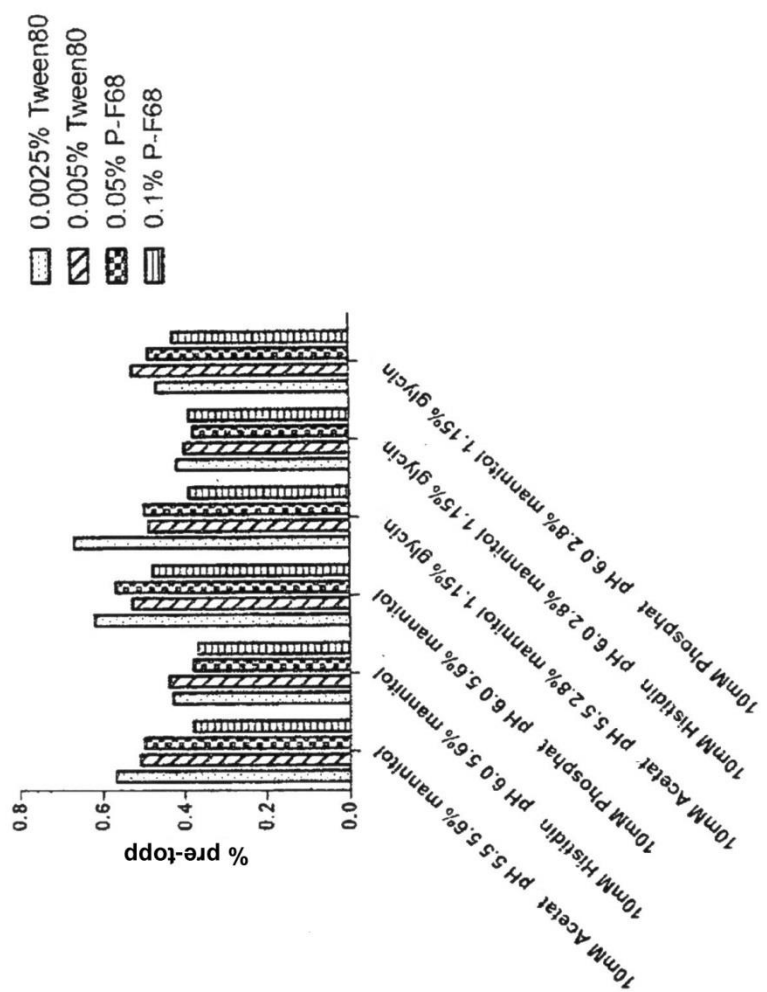


Figur 48 (A)



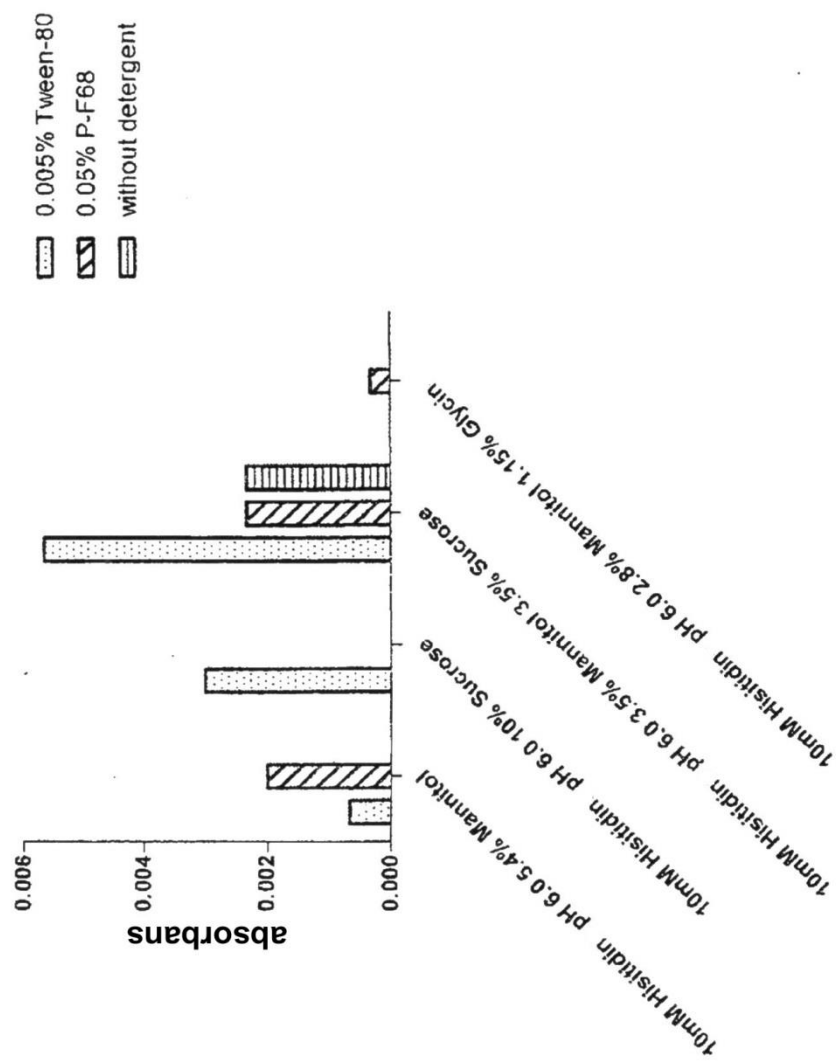
Figur 48 (B)

Areal% av pre-topp SEC ved 280 nm etter 4 t omrøring ved 4°C
(ved 10 mg/ml)



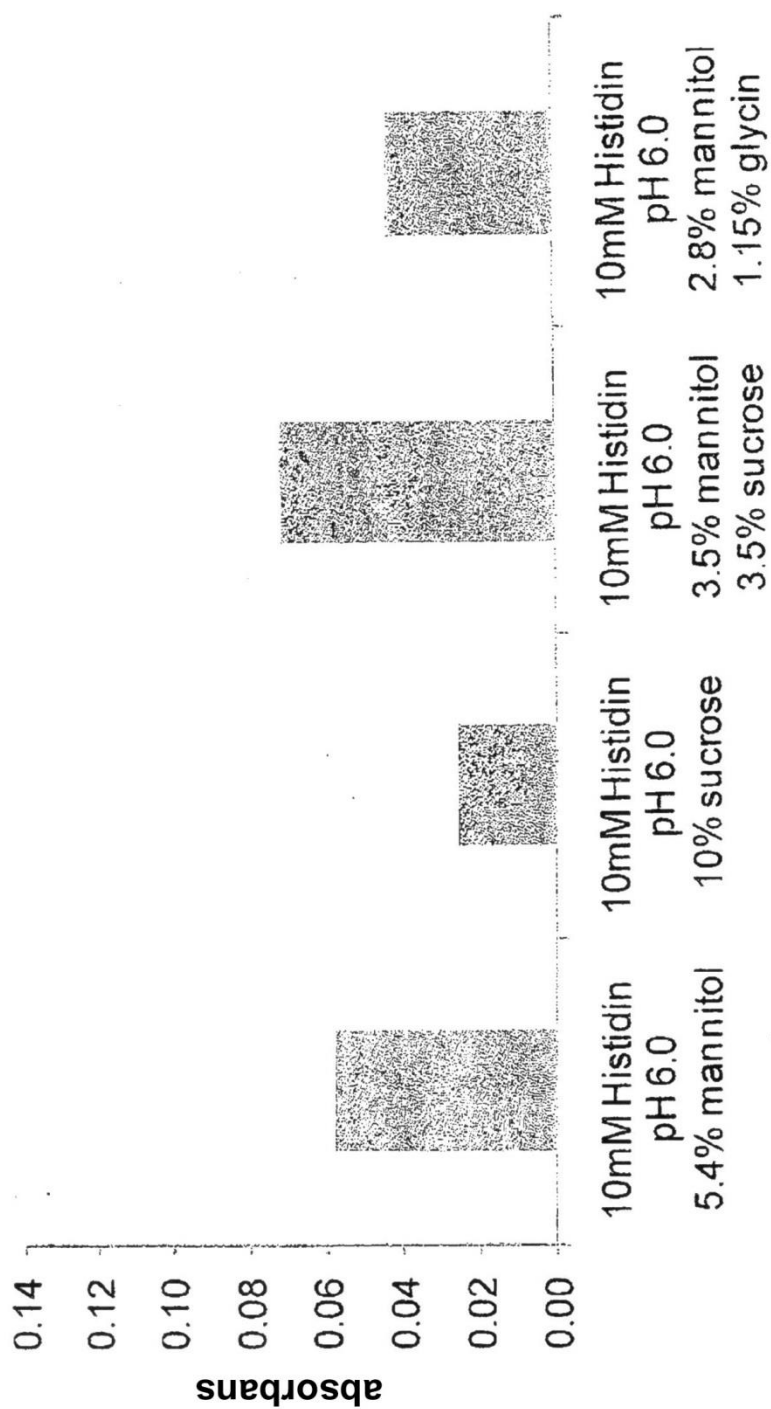
Figur 49 (A)

OD-måling ved 500 nm etter 10x F/T (-20°C)
(ved 25 mg/ml)



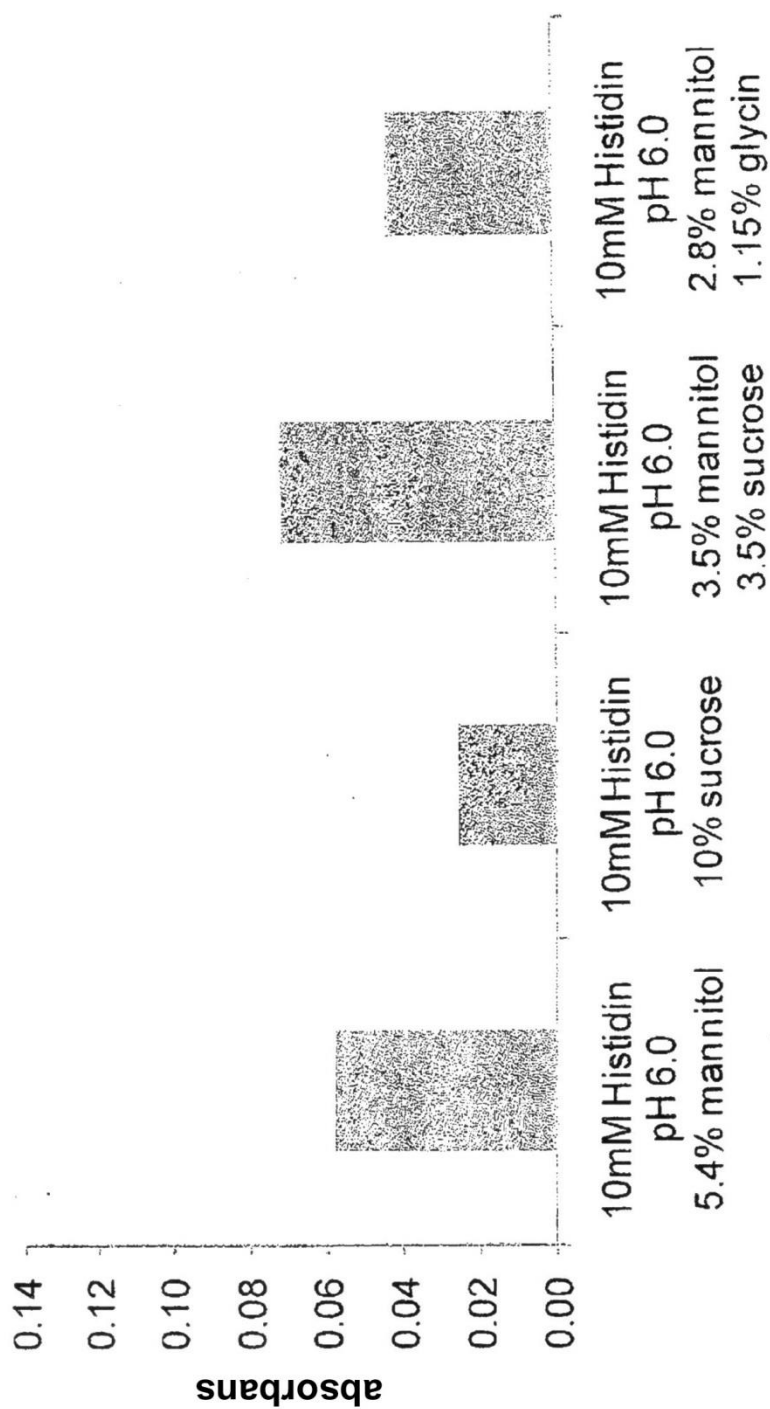
Figur 50 (A)

OD-måling ved 500 nm efter 4 t omrøring ved 4 C
(ved 10mg/ml)



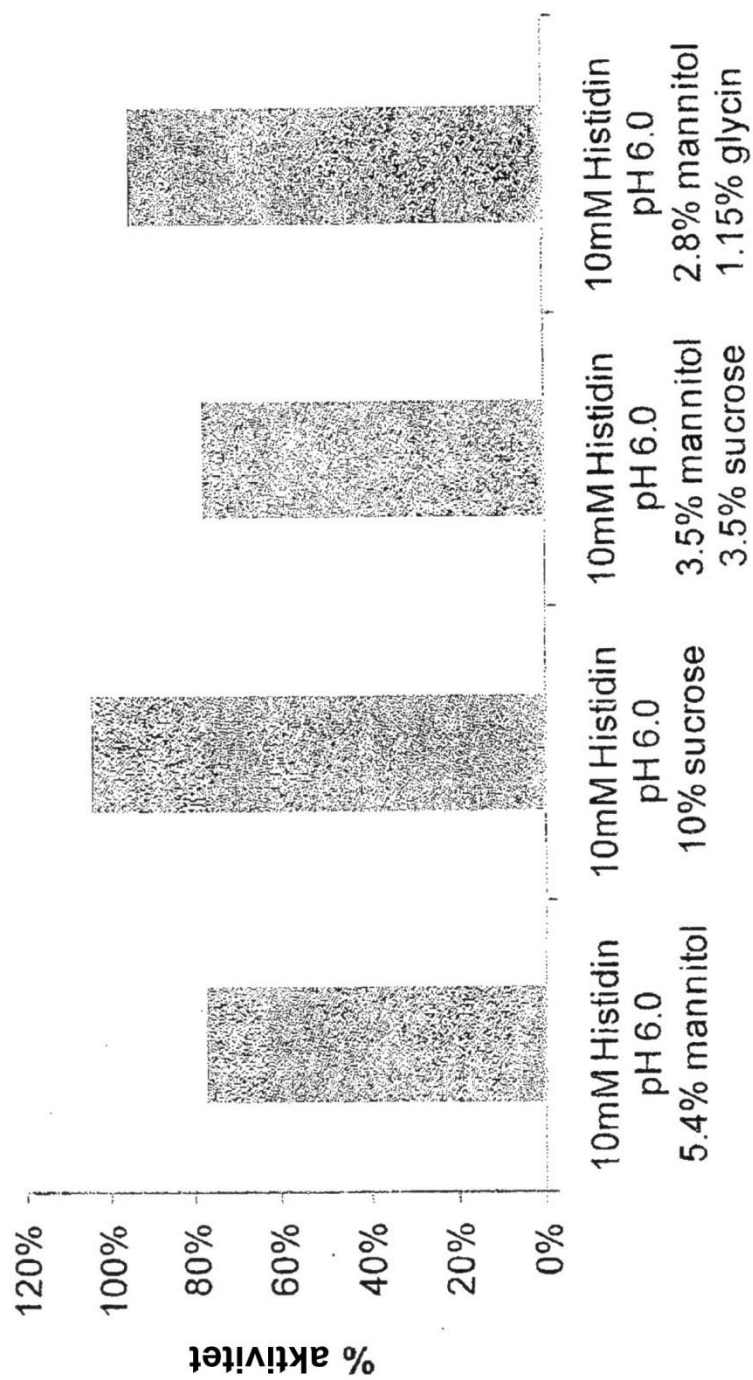
Figur 50 (A)

OD-måling ved 500 nm efter 4 t omrøring ved 4 C
(ved 10mg/ml)



Figur 50 (C)

Biacore: % aktivitet (binding på albumin (HSA)) sammenlignet med referanse etter 4 t omrøring ved 4 C (ved 10 mg/ml)



Figur 51

