

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 662**

51 Int. Cl.:

C07K 14/705 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **18.07.2013 PCT/EP2013/065250**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.01.2014 WO14013039**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.07.2013 E 13742412 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2875045**

54 Título: **Composición que comprende una mezcla de isoformas CD95-Fc**

30 Prioridad:

18.07.2012 EP 12176978

18.07.2012 EP 12176980

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

03.07.2018

73 Titular/es:

**APOGENIX AG (100.0%)
Im Neuenheimer Feld 584
69120 Heidelberg, DE**

72 Inventor/es:

**HILL, OLIVER;
GIEFFERS, CHRISTIAN y
THIEMANN, MEINOLF**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Observaciones:

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

ES 2 674 662 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende una mezcla de isoformas CD95-Fc

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una mezcla de isoformas de la proteína de fusión APG101, proporcionando las formulaciones tal composición en una forma estable así como un método para producir tal composición.

Las proteínas de fusión que comprenden el dominio extracelular del receptor de muerte CD95 (Apo-1; Fas) fusionado a un dominio Fc de inmunoglobulina, se describen en el documento WO2004085478. Sin embargo, resultaba difícil proporcionar tales proteínas de fusión en cantidades suficientes con una estabilidad suficiente.

10 De acuerdo con un primer aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una mezcla de isoformas de APG101, en la que APG101 no modificado está representado por la SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicha mezcla variantes de APG101 truncadas en el extremo N y cuyo primer aminoácido es el aminoácido 17, 21 y 26 con respecto a SEQ ID NO: 1 y menos de 1 mol% de APG101 no modificado de acuerdo con SEQ ID NO: 1 y distribuidas dentro de un intervalo de pl de 4,0-8,5, y en donde dicha mezcla de isoformas APG101
15 puede obtenerse por un método que comprende los pasos

(a) producir una mezcla de isoformas APG101 mediante un proceso de producción alimentado en lotes que proporciona una recolección celular usando un medio basal que contiene peptona, y

(b) aislar la mezcla de isoformas APG101 de la recolección celular,

20 en donde la etapa (a) comprende una serie de etapas de cultivo de un lote de células principales dado hasta que se alcanzan parámetros de recolección relevantes, seguido de sedimentación celular y filtración del sobrenadante que contiene la proteína de fusión, en donde los parámetros de recolección relevantes son un título APG101 dentro de un intervalo de 0,5 g/l - 5 g/l, y una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 - 1×10^8 células/ml y el paso (b) comprende cromatografía de captura, inactivación de virus, una serie de cromatografía de aniones y/o cationes, filtración de virus y ajuste a una concentración de proteína final deseada. APG101 comprende un dominio CD95
25 extracelular (APO-1; Fas) y un segundo dominio que es un dominio Fc. Por consiguiente, el dominio CD95 extracelular, como se usa en la presente memoria, también se puede llamar "primer dominio", mientras que el dominio Fc se puede llamar "segundo dominio".

La primera proteína de dominio es una proteína humana; es decir, un dominio CD95 extracelular humano. Como se define por la SEQ ID NO:1 APG101 puede ser una proteína de fusión que comprende un dominio CD95 extracelular humano (aminoácidos 26—172) y un dominio IgG1 Fc humano (aminoácidos 172—400), opcionalmente comprendiendo además una secuencia de señal N-terminal (por ejemplo, aminoácidos 1—25 de SEQ ID NO: 1). La presencia del péptido de señal indica la forma inmadura de APG101. Durante la maduración, el péptido de señal se desdobla. De acuerdo con una realización especialmente preferida, la secuencia de señal se desdobla. APG101 con la secuencia de señal también se compone por la expresión "APG101 no modificado". El término "APG101"
35 describe una proteína de fusión de la posición 26-400 de la SEQ ID NO:1, con y/o sin un péptido de señal.

La composición de acuerdo con la invención comprende una mezcla de isoformas de APG101. El término "isoforma", como se utiliza en la presente, designa diferentes formas de la misma proteína, es decir, diferentes formas de APG101, como se define en las reivindicaciones. Las isoformas pueden diferir, por ejemplo, en la longitud de las proteínas, por los aminoácidos, es decir, la delección, y/o modificación post-traslacional de los aminoácidos, cuando se compara con la proteína no modificada correspondiente, es decir, la proteína que se traduce y expresa a partir de una secuencia de codificación dada sin ninguna modificación. Las diferentes isoformas podrán distinguirse, por ejemplo, por electroforesis, tal como SDS-electroforesis, y/o enfoque isoeléctrico que se prefiere de acuerdo con la presente invención.
40

Las isoformas que difieren en la longitud de proteína pueden ser, por ejemplo, acortadas y/o extendidas en el terminal N y/o terminal C cuando se comparan con la proteína no modificada correspondiente. Una mezcla de isoformas APG101 de acuerdo a la invención comprende menos de 1 mol% de APG101 en la forma no modificada así como las variantes de acortadas del terminal N, cuyo primer aminoácido es el aminoácido 17, 21 y 26, respectivamente, de SEQ ID NO:1.
45

Tales proteínas de fusión N-terminalmente acortadas, en términos de la presente invención, también pueden nombrarse como -17, -21, y -26variantes N-terminalmente acortadas de APG101 no modificado. La numeración se refiere a la proteína APG101 que incluye la secuencia de señal de acuerdo con la SEQ ID NO:1, en donde el número se refiere al primer aminoácido en la variante de APG101 N-terminalmente truncada.
50

Esto significa que una proteína de fusión acortada que tiene SEQ ID NO:1 N-terminalmente truncada por 16 aminoácidos corresponde a una variante APG101 designada -17 y da como resultado una proteína que tiene los aminoácidos 17-400 de la SEQ ID NO:1, N-terminalmente truncada por 20 aminoácidos corresponde a -21
55

(aminoácidos 21-400 de SEQ ID NO:1) y N-terminalmente truncada por 25 aminoácidos corresponde a -26 (aminoácidos 26-400 de SEQ ID NO:1).

Un ejemplo para un acortamiento de terminal C de las isoformas de APG101 es el truncamiento Lys de terminal C.

5 De acuerdo con la presente invención, la mezcla de las isoformas APG101 de la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende menos de 1% de mol de APG101 no modificado. Se prefiere más una realización que comprende una mezcla de isoformas de APG101 que no comprende ningún APG101 no modificado.

Como se señala anteriormente, las isoformas también pueden diferir por la delección de aminoácidos y/o la adición de aminoácidos. Tal delección puede comprender uno o más aminoácidos.

10 Las isoformas de acuerdo con la invención también pueden diferir con respecto a la modificación post-traslacional. La modificación post-traslacional de acuerdo con la presente invención puede incluir, sin limitarse a, la adición de grupos hidrofóbicos, en particular para la localización de membrana tal como la miristoilación, palmitoilación, isoprenilación o gliptación, la adición de cofactores para la actividad enzimática mejorada tal como lipoyación, la adición de grupos químicos más pequeños tales como acilación, formilación, alquilación, metilación, amidación en la terminal C, adición de aminoácidos, γ -carboxilación, glicosilación, hidroxilación, oxidación, glicilación, biotilación y/o pegilación.

De acuerdo con la presente invención, la adición de ácidos siálicos, la glicosilación basada en Fc, en particular la glicosilación de terminal N basada en Fc, y/o la piro-Glu-modificación son las realizaciones preferidas de la modificación post-traslacional.

20 De acuerdo con una realización preferida, las proteínas de fusión comprendidas por la composición farmacéutica de la invención comprenden cantidades altas de ácidos siálicos. De acuerdo con la presente invención, el contenido de ácido siálico es preferentemente de aproximadamente 4,0 a 7,0 mol de NeuAc/mol de APG101, más preferentemente de 4,5 a 6,0 mol de NeuAc/mol de APG101 y más preferentemente 5,0 mol de NeuAc/mol de APG101. Como se utiliza en la presente, los ácidos siálicos se refieren a derivados sustituidos por N u O de ácido neuramínico. Un ácido siálico preferido es el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc). El grupo amino lleva generalmente ya sea un grupo acetilo o glicilo, pero se han descrito otras modificaciones. Los sustituyentes de hidroxilo pueden variar de manera considerable. Los sustituyentes de hidroxilo preferidos son grupos acetilo, lactilo, metilo, sulfato y/o fosfato. La adición de ácido siálico en lo general da como resultado proteínas más aniónicas. La carga negativa resultante brinda a esta modificación la capacidad de cambiar una carga de superficie de proteína y la capacidad de unión. Las cantidades altas de ácido siálico conducen a una mejor estabilidad en suero y, por consiguiente, a una farmacocinética mejorada e inmunogenicidad inferior. El alto grado de sialilación de las isoformas de APG101 de la presente invención podría explicarse por la cantidad alta de estructura dianténaria. Tendrá que considerarse como altamente sorprendente que las isoformas de APG101 en la composición farmacéutica de la invención obtenida por el método inventivo exhiban tan alto grado de adición de ácido siálico.

35 De acuerdo con la presente invención, la glicosilación designa una reacción en la cual un carbohidrato se une a un grupo funcional de una proteína de fusión, fragmento funcional del mismo como se define en la presente. En particular, se refiere a la adición de un carbohidrato a APG101 o una isoforma del mismo. El carbohidrato puede agregarse, por ejemplo, por enlace N o enlace O. Los carbohidratos enlazados por N se unen a un nitrógeno de cadenas de sitio de asparagina o arginina. Los carbohidratos enlazados por O se unen al oxígeno de hidroxilo de las cadenas laterales de serina, treonina, tirosina, hidroxilisina o hidroxiprolina. De acuerdo con la presente invención, el enlace N, en particular la glicosilación del terminal N basada en Fc, se prefiere. Los sitios de glicosilación enlazados por N particularmente preferidos, se sitúan en las posiciones N118, N136 y/o N250 de APG101 (SEC ID NO:1).

45 La fucosilación de acuerdo con la presente invención se refiere a la adición de las unidades de azúcar de fucosa a una molécula. Con respecto a la presente invención tal adición de una unidad de azúcar de fucosa a APG101 representa un tipo de glicosilación especialmente preferido. Una porción alta de las formas fucosiladas conduce a una citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo reducido (ADCC). Por consiguiente, la mezcla de las isoformas de la proteína de fusión se caracterizan por ADCC reducido, lo cual es beneficioso para las aplicaciones de diagnóstico y farmacéuticas.

50 Por supuesto, además del primer y segundo dominio, como se definen en la presente, las isoformas APG101 de acuerdo con la invención pueden comprender dominios adicionales tales como los dominios objetivo adicionales, por ejemplo, anticuerpos de cadena única o fragmentos de los mismos y/o dominios de señal.

La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención puede comprender proteínas de fusión N-terminalmente bloqueadas, las cuales proporcionan una estabilidad más alta con respecto a la degradación del terminal N mediante proteasas, así como proteínas de fusión que tienen un terminal N libre, que proporciona una estabilidad más alta con respecto a la degradación del terminal N mediante proteasas.

55 Las modificaciones que bloquean el terminal N de la proteína se conocen por los expertos en la materia. Sin embargo, una modificación post-traslacional preferida de acuerdo con la presente invención que bloquea el terminal N es la modificación piro-Glu. Piro-Glu también se denomina ácido carboxílico de pirrolidona. La modificación Piro-

- 5 Glu, de acuerdo con la presente invención, se refiere a la modificación de una glutamina de terminal N por ciclización de la glutamina por medio de la condensación del grupo α -amino con un grupo carboxilo de cadena lateral. Las proteínas modificadas exhiben una vida media incrementada. Tal modificación también puede ocurrir en un residuo de glutamato. Se prefiere particularmente una modificación piro-Glu, es decir, un ácido carboxílico de pirrolidona, con respecto a la proteína de fusión N-terminalmente acortada -26.
- En una realización preferida de la presente solicitud, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención comprende 80-99% de mol de proteínas de fusión N-terminalmente bloqueadas y/o 1-20% de mol de proteínas de fusión que tienen un terminal N libre.
- 10 De acuerdo con una realización preferida adicional, la composición comprende de 0,0 a 5,0% de mol, más preferentemente de 0,0 a 3,0% de mol y aún más preferentemente de 0,0 a 1,0% de mol de formas de peso molecular alto de la proteína de fusión tales como agregados. En una realización preferida, la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención no comprende ninguno de los agregados de las isoformas de la proteína de fusión, en particular, ni dímeros ni agregados de APG101. Los dímeros o agregados, por lo general, son indeseados, debido a que tienen un efecto negativo sobre la solubilidad.
- 15 La forma funcional de APG101 comprende dos proteínas de fusión, como se describen en la presente, acopladas por puentes de disulfuro en la región bisagra en las posiciones 179 y/o 182 con la SEQ ID NO:1 de referencia de las dos moléculas (véase Figura 7). El puente de disulfuro también puede formarse en la posición 173 con referencia a la SEQ ID NO:1 de las dos moléculas, dando como resultado una estabilidad mejorada. Si el puente de disulfuro en la posición 173 con referencia a la SEQ ID NO:1 no se requiere, el residuo Cys en esta posición puede reemplazarse por otro aminoácido, o puede delecionarse.
- 20 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención se proporciona por el método de acuerdo con la presente invención descrito en la presente.
- De acuerdo con la invención, la mezcla de las isoformas APG101 se distribuye dentro de un intervalo de pl de aproximadamente 4,0 a aproximadamente 8,5. En una realización adicional, el intervalo de pl de la mezcla de las isoformas de APG101 comprendidas por la composición de acuerdo con la invención es de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,8, más preferentemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5.
- 25 El punto isoeléctrico (pl) se define por el valor pH en el cual una superficie o molécula en particular no lleva carga eléctrica. Dependiendo del intervalo de pH del medio circundante, los aminoácidos de una proteína pueden llevar diferentes cargas positivas o negativas. La suma de todas las cargas de una proteína es cero en un intervalo de pH específico, su punto isoeléctrico, es decir, el valor de pl. Si una molécula de proteína en un campo eléctrico alcanza un punto del medio que tiene este valor de pH, su movilidad electroforética disminuye y permanece en este sitio. Cualquier experto en la técnica se encuentra familiarizado con los métodos para determinar el valor de pl de una proteína dada, tal como el enfoque isoeléctrico. La técnica es capaz de una resolución extremadamente alta. Las proteínas que difieren por una carga única pueden separarse y/o fraccionarse.
- 30 La composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención descrita en la presente puede utilizarse para aplicaciones farmacéuticas, de diagnóstico y/o investigación. Puede aplicarse en medicina humana así como medicina veterinaria.
- Otro aspecto de la presente invención se refiere a una formulación que comprende una composición farmacéutica de acuerdo con la invención.
- 40 De acuerdo con una realización preferida, la formulación comprende
- (a) fosfato, más preferentemente de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM de tampón de fosfato, más preferentemente de aproximadamente 5 mM de fosfato a aproximadamente 85 mM de fosfato, más preferentemente de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM de fosfato, más preferentemente de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM de fosfato, aún más preferentemente de aproximadamente 40 mM a aproximadamente 60 mM de fosfato, lo más preferentemente aproximadamente 50 mM de fosfato.
- 45 (b) un agente intensificador de la viscosidad, preferentemente a aproximadamente 0,1-10% en peso de agente intensificador de la viscosidad, más preferentemente de 1 a 8% en peso de agente intensificador de la viscosidad, más preferentemente de aproximadamente 3% en peso a aproximadamente 7% en peso de agente intensificador de la viscosidad, aún más preferentemente de aproximadamente 6% en peso a aproximadamente 7% en peso de agente intensificador de la viscosidad, y lo más preferentemente aproximadamente 5% en peso de agente intensificador de la viscosidad, y
- 50 (c) tiene un valor pH en el intervalo de 4-8.
- En términos de la presente invención, el término "fosfato" se encuentra comprendido por cualquier tampón de fosfato adecuado conocido por los expertos en la materia. De acuerdo con una realización especialmente preferida, el
- 55 tampón de fosfato es Na-fosfato.

- Los agentes incrementadores o intensificadores de la viscosidad se conocen bien por los expertos en la materia y comprenden ácido alginico, carboximetil celulosa, dextrina, gelatina, goma guar, hidroxietil celulosa, silicato de aluminio y magnesio, alcohol de polivinilo, oxido de polietileno, sílice, almidón, goma xantano, etc. Los excipientes adicionales que por supuesto pudieran presentarse, comprenden sacarosa, sorbitol y/o glicina. Sin embargo, un agente intensificador de la viscosidad que se prefiere especialmente de acuerdo con la presente invención, es el sorbitol. De acuerdo con una realización especialmente preferida, el agente intensificador de la viscosidad sorbitol se presenta con aproximadamente 5% en peso.
- El valor del pH de la formulación de acuerdo con la presente invención se encuentra dentro del intervalo de aproximadamente 4 a 8. De acuerdo con una realización preferida, se encuentra dentro del intervalo de 5 a 8, más preferentemente de 6 a 8 y aún más preferentemente de 6,5 a 8. De acuerdo con una realización especialmente preferida, el pH es aproximadamente 6,5, aproximadamente 7,0 o aproximadamente 7,5.
- De acuerdo con una realización especialmente preferida, la formulación de acuerdo con la presente invención comprende aproximadamente 30 mM de Na-fosfato o aproximadamente 50 mM de Na-fosfato, aproximadamente 5% de sorbitol y exhibe un valor de pH de aproximadamente 6,5 (cf. tampones 5 y 6 de la Figura 10).
- De manera sorprendente, la composición farmacéutica de la invención proporcionada en ese tipo de formulación es muy estable y no tiende a formar agregados. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención se caracterizan además por la fragmentación reducida de APG101. Además, fue posible proporcionar concentraciones de proteína altas, por ejemplo, aproximadamente 20 mg/ml en forma estable.
- La composición farmacéutica y/o formulación de acuerdo con la invención puede administrarse a un sujeto en necesidad de la misma, particularmente un paciente humano, en una dosis suficiente para el tratamiento de las condiciones específicas mediante medios adecuados. Por ejemplo, la composición farmacéutica y/o formulación de acuerdo con la invención puede formularse junto con vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. La toxicidad y eficiencia terapéutica puede determinarse de acuerdo con los protocolos estándar. La composición farmacéutica puede administrarse sistémicamente, por ejemplo, intraperitonealmente, intramuscularmente, o intravenosamente o localmente, tal como intranasalmente, subcutáneamente o intratecalmente. La dosis de la composición farmacéutica y/o formulación administrada, por supuesto, será dependiente del sujeto a ser tratado y de la condición del sujeto, tal como el peso del sujeto, la edad del sujeto y el tipo y severidad de la enfermedad o lesión a ser tratada, la manera de administración y el juicio del médico. Por ejemplo, una dosis diaria de 0,001 a 100 mg/kg es adecuada.
- Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición farmacéutica o formulación que comprende la composición farmacéutica o formulación de acuerdo con la invención, la cual contiene al menos un agente activo adicional. El tipo de agente activo que se utilice depende más de la indicación a ser tratada. Por ejemplo, los agentes citotóxicos tales como doxorrubicina, cisplatina o carboplatina, citoquinas u otros agentes anti-neoplásicos pueden utilizarse en el tratamiento del cáncer.
- La formulación y/o composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede además comprender vehículos, diluyentes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables. El término "vehículo", cuando se utiliza en la presente, incluye vehículos, excipientes y/o estabilizadores que no son tóxicos para la célula o mamífero que se encuentra expuesto a ellos en las dosis y concentraciones empleadas. Frecuentemente, los vehículos fisiológicamente aceptables son liposomas o soluciones acuosas reguladoras del pH. Los ejemplos de vehículos fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos (sin embargo, con respecto a la formulación de la presente invención, se prefiere un tampón de fosfato); anti-oxidantes incluyendo ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas tales como albumina de suero, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrofílicos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos, y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas, agentes gelificantes tales como EDTA, azúcar, alcoholes tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; y/o agentes tensoactivos no iónicos tales como TWEEN, polietileno o polietilenglicol.
- De acuerdo con una realización preferida, la composición farmacéutica y/o formulación de acuerdo con la invención puede utilizarse para inhibir la trayectoria de señalización de CD95, en particular, la trayectoria apoptótica extrínseca activada por CD95L, es decir, el ligante receptor CD95. En particular, la composición farmacéutica puede utilizarse en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos seleccionados de trastornos autoinmunes, SIDA, trastornos cardiacos, por ejemplo, infarto de miocardio, trastornos de injerto-contrahuésped, rechazo de trasplantes, daño cerebral, por ejemplo apoplejía, lesiones de la médula espinal, sepsis, hepatitis, trastornos asociados con la inflamación, lesión de reperfusión isquémica y trastornos renales. Por supuesto, la composición farmacéutica y/o formulación descrita en la presente puede utilizarse para el tratamiento de cánceres, preferentemente cánceres solidos, por ejemplo, cánceres cerebrales, por ejemplo, glioblastomas. De manera alternativa, el cáncer a ser tratado puede ser un cáncer de origen mielóide o linfóide.
- Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para producir una composición de acuerdo con la invención que comprende las etapas:

(a) producir una composición de acuerdo con la presente invención mediante un proceso de producción de alimentación por lotes, proporcionando una recolección de células usando un medio que contiene peptona y

(b) aislar la composición de la presente invención de la recolección de células,

5 en donde la etapa (a) comprende una serie de etapas de cultivo de un lote de células principales dado hasta que se alcanzan parámetros de recolección relevantes, seguido de sedimentación celular y filtración del sobrenadante que contiene la proteína de fusión, en donde los parámetros de recolección relevantes son un título APG101 dentro de un intervalo de 0,5 g/l - 5 g/l y una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 - 1×10^8 células/ml y la etapa (b) comprende cromatografía de captura, inactivación de virus, una serie de cromatografías de aniones y/o cationes, filtración de virus y ajuste a una concentración de proteína final deseada.

10 Una ventaja del método de la presente invención en comparación con los métodos conocidos de la técnica anterior es su producción alta.

15 La etapa (a), es decir, el "método para producir una composición de acuerdo con la presente invención mediante un proceso de producción de alimentación por lotes proporcionando una recolección de células" también se designará como el "proceso corriente arriba (USP)" en lo sucesivo. El método de acuerdo con la etapa (a) de la presente invención también se refiere como el "USP inventivo". La Figura 1 muestra una comparación del proceso corriente arriba de acuerdo con la técnica anterior y una realización preferida del proceso corriente arriba de la presente invención.

La etapa (b), es decir, el "aislamiento de la composición de la presente invención de la recolección de células" también se designará como el "proceso corriente abajo (DSP)" en lo sucesivo.

20 La etapa (a) comprende una serie de etapas de cultivo de un lote celular principal dado hasta que se alcanzan los parámetros de recolección relevantes seguidas por la sedimentación y la filtración de la proteína de fusión, conteniendo el sobrenadante. En una realización preferida de la presente invención, las etapas del proceso del proceso corriente arriba pueden resumirse como una serie que comprende las siguientes etapas.

25 Descongelación, subcultivo, 50 l biorreactor, 200 l biorreactor, 1000 l biorreactor, sedimentación, filtración profunda y 0,2 μ m de filtración.

30 Por supuesto, llevar a cabo las etapas de cultivo a partir del subcultivo hacia el biorreactor de 1000 l es solo una manera de llevar a cabo la invención. Por ejemplo, las etapas de cultivo pueden llevarse a cabo en biorreactores con tamaños variados también. Por supuesto, durante la serie de las etapas de subcultivo, el experto en la materia puede determinar parámetros adecuados como la temperatura, el tiempo de crecimiento, los medios, etc. El factor crucial es lograr los parámetros de recolección relevantes, los cuales pueden ser una concentración, la densidad celular, con la concentración encontrándose preferentemente dentro de un intervalo de 0,5 g/l a 5 g/l, más preferentemente de 1 g/l a 3 g/l, más preferentemente 1,5 g/l a 5 g/l y lo más preferentemente siendo de 1,8 g/l a 2 g/l. Los ejemplos para los valores de la densidad celular son aproximadamente 1×10^6 a 1×10^8 células/ml, preferentemente aproximadamente 1×10^7 células/ml. En una realización especialmente preferida de la presente invención, la concentración es de aproximadamente 1,8 g/l a aproximadamente 2 g/l y la densidad celular es aproximadamente 1×10^7 células/ml.

El método de acuerdo con la presente invención se lleva a cabo en un medio básico que contiene peptona y un medio químicamente definido.

40 La etapa (b) comprende cromatografía de captura, inactivación de virus, una serie de cromatografía de aniones y/o cationes, filtración de virus y/o ajuste a una concentración de proteína final deseada.

45 El proceso corriente abajo para purificar una composición que comprende isoformas APG101 obtenidas por la etapa (a) de acuerdo con la etapa (b) arriba definida comprende etapas de cromatografía, una etapa de inactivación de virus, una etapa de ultrafiltración, una etapa de diafiltración y una etapa de filtración de virus. De acuerdo con una realización preferida, este proceso corriente abajo comprende tres diferentes etapas cromatográficas. La primera etapa de cromatografía se lleva a cabo con una resina para capturar la proteína objetivo y/o para eliminar las impurezas relacionadas con el proceso (por ejemplo, HCPs, ADN) y/o para reducir el volumen de la fracción que contiene el producto. Una resina correspondiente podrá seleccionarse por el experto en la materia. Un ejemplo de una resina es Mab Select SuRE, que también es una realización preferida de acuerdo con la invención.

50 Después de esta primera etapa de cromatografía, sigue una etapa de inactivación de virus. Preferentemente, esta etapa de inactivación de virus se lleva a cabo bajo condiciones ácidas (por ejemplo, pH $3,5 \pm 0,2$) seguido por un acondicionamiento del grupo de inactivación o a un valor de pH menos ácido tal como pH 5,0. La matriz del tampón para la inactivación del virus y el ajuste al pH 5,0 subsecuente únicamente puede basarse en un tampón Na-citrato 20 nM.

55 Después de esta inactivación del virus, la etapa de cromatografía, una etapa de intercambio de iones, se lleva a cabo a fin de reducir las impurezas relacionadas con el proceso, tal como el ADN. De acuerdo con la presente

invención, se prefiere una etapa de cromatografía de intercambio de aniones (AEX), particular en el modo de flujo continuo. La proteína objetivo pasa la columna AEX, mientras que el ADN se une a la resina. Preferentemente, el grupo de flujo continuo de AEX se procesa posteriormente sin ningún acondicionamiento utilizando una etapa adicional basada en columna. Esta etapa adicional opcional contribuye a la reducción total de la contaminación del virus y HCP residual, ADN y ligante A de la proteína blanqueada. De acuerdo con una realización preferida, se utiliza una columna operada por capto MMC de resina de modo de mezcla en modo de adhesión/eluido.

El eluido se pasa a través de un filtro de virus (VF) y se aplica a una etapa de ultra-diafiltración (UF/DF) posteriormente. De acuerdo con la invención, una carga volumétrica específica de $\leq 100 \text{ l/m}^2$ puede obtenerse en la etapa de filtración del virus. Preferentemente, una membrana con aproximadamente un 30 kD de corte, se utiliza. Por supuesto, las etapas de purificación única anteriormente descritas pueden reemplazarse por las etapas conocidas por el experto en la materia logrando el mismo efecto o uno comparable.

Finalmente, la parte retenida de UF/DF se formula y la concentración de la composición APG101 de acuerdo con la presente invención se ajusta a la concentración de proteína deseada tal como $20 \pm 2 \text{ mg/ml}$.

La Figura 2 ilustra el esquema de flujo de una realización preferida de un proceso corriente abajo de acuerdo con la presente invención. Como puede tomarse de la Figura 3, el proceso corriente abajo inventivo se caracteriza por un número de ventajas sobre los procesos corriente abajo conocidos de la técnica anterior. Por ejemplo, después de la inactivación del virus no se requiere ninguna etapa de mantenimiento en un valor de pH neutral. Con respecto a la etapa de filtración del virus, una carga volumétrica $\leq 100 \text{ l/m}^2$ es posible en comparación a 37 g/m^2 en procesos previos. Además, utilizando el tampón de formulación de la presente invención podrán alcanzarse concentraciones de proteína altas tales como 20 mg/ml en comparación a 10 mg/ml en PBS.

El método para producir una composición de acuerdo con la presente invención, la cual se describe en la presente, da como resultado isoformas APG101 en el intervalo de pI de 4,0 a 8,5. Una composición provista de esta manera contiene solo cantidades muy pequeñas de formas de peso molecular más altas indeseadas tales como dímeros o agregados. Las isoformas APG101 provistas de esta manera se caracterizan por cantidades altas de contenido de ácido siálico así como la glicosilación del terminal N basada en Fc que comprende cantidades altas de formas fucosiladas.

Figuras

Figura 1: Comparación del proceso corriente arriba inventivo con un proceso corriente arriba no inventivo.

Figura 2: Esquema de flujo que muestra una realización preferida del proceso corriente abajo de la invención.

Figura 3: Comparación del proceso corriente abajo inventivo con un proceso corriente abajo no inventivo.

Figura 4a: IEF de Fracción AEX de una mezcla APG101 obtenida por el método inventivo.

Figura 4b: IEF de Fracción AEX de una mezcla APG101 obtenida por el método no inventivo.

Figura 5: Vista General Esquemática del ensayo de potencia.

Figura 6: Actividad biológica in Vitro (EC_{50}) de las mezclas de isoforma APG101 obtenidas por el método inventivo en comparación con APG101 obtenido por los métodos no inventivos.

Figura 7: Molécula APG101 funcional.

Figura 8: Resultados de ensayo de termofluorescencia de una comparación de tampón de composición APG101.

Figura 9: Resultados de ensayo de termofluorescencia de una comparación de excipiente de composición APG101.

Figura 10: Resultados analíticos del estudio de estabilidad de degradación forzada: Excipientes (+) muestra buen rendimiento y (-) muestra escaso rendimiento del tampón con respecto a la estabilidad de APG101.

Figura 11: Ensayo de Termofluorescencia Que Valora La Estabilidad Térmica de Dos Lotes APG101 de Apogenix en Comparación Directa a Fas/Fc Comercialmente Disponible.

Ejemplo 1

Método para producir una composición de acuerdo con la invención

El método para proporcionar una composición de acuerdo con la presente invención comprende un proceso corriente arriba y un proceso corriente abajo como se define anteriormente.

1. Proceso corriente arriba

1.1 Definición del lote

La composición que comprende isoformas APG101 se produce en un cultivo de alimentación por lotes. Dos frascos del banco celular principal MCB1AGA se descongelan. La viabilidad del tercer subcultivo tiene que ser >90%, el conteo celular viable tiene que ser $>1,5 \times 10^6$ células/ml. Si ambos frascos cumplen estas especificaciones, el cultivo con la viabilidad más alta se utiliza para el cuarto subcultivo y la inoculación del reactor de semilla. El cultivo con la viabilidad inferior se descartará después del tercer subcultivo. El cultivo celular se expande en frascos de agitación hasta ≥ 4 L del volumen total antes de inocular el primer biorreactor de semilla. Como primer biorreactor de semilla, se utiliza un biorreactor desechable de 50 L de XcellereX (XDR). El cultivo celular se cultiva por tres días antes de transferirse hacia el segundo reactor de semilla de 200 L de XDR. Después de otros 3 días de cultivo, el reactor de producción de 1000 L se inocula. El procedimiento de recolección se inicia en el día 13 o antes, si la viabilidad cae por debajo del 61%.

1.2 Línea celular

El banco de celular principal utilizado (MCB) se designa "MCB1AGA".

1.3 Descongelación y subcultivos

Dos crio-envases del MCB se resucitan consecutivamente. El siguiente procedimiento de descongelación se aplica para cada envase: Los crio-envases se descongelan en un vaso de precipitados con WFI a $36,8^\circ\text{C}$ (temperatura de rocío) hasta que queda un pequeño cristal de hielo. Las células se transfieren entonces a aproximadamente 10 ml de medio de crecimiento frío (a $5 \pm 3^\circ\text{C}$) (no. de medio 3001772, adquirido de PAA), complementado con 6 mM de L-glutamina (concentración final) y 50 nM de MTX (concentración final). Para eliminar el DMSO residual, se lleva a cabo una etapa de lavado en medio frío ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) por medio de una centrifugación. El gránulo celular se vuelve a suspender en 50 mL de medio precalentado ($36,8 \pm 1^\circ\text{C}$) después de la etapa de centrifugación. La viabilidad y concentración celular se miden con el contador de células Cedex. Este cultivo fuera de congelación se incuba finalmente en una incubadora de agitación con un volumen de trabajo de 50 ml utilizando matraces de agitación de 250 ml.

Los subcultivos, primero y segundo, son divisiones de estabilidad llevados a cabo con un volumen de trabajo de 120 ml (primer subcultivo) y 150 ml (segundo subcultivo) utilizando matraces de agitación de 500 ml. Los subcultivos, tercero y cuarto, son la primera fase de expansión y son llevados a cabo en matraces de agitación de 2000 ml con un volumen de trabajo de 800 ml. Para estos cuatro pasos iniciales, el medio de crecimiento precalentado (a $36,8 \pm 1^\circ\text{C}$) (medio no. 3001772, adquirido de PAA), complementado con 6 mM de L-glutamina y 50 nM de MTX (concentraciones finales), se utiliza como medio de cultivo.

La medición de la viabilidad y concentración celular se lleva a cabo antes de cada etapa de cultivo utilizando un contador de células Cedex. El siguiente subcultivo se prepara dependiendo del crecimiento celular.

En el subcultivo no. 5, los matraces de agitación se agrupan en una botella de vidrio de 5 litros. Este grupo se muestrea para la viabilidad y concentración celular. Dependiendo de la VCC actual, el volumen de cultivo celular requerido se transfiere entonces hacia un biorreactor de semilla de 50 litros.

1.4 Biorreactor de semilla (50 litros)

El biorreactor de semilla de 50 litros se encuentra equipado con un sistema de agitador de arrastre magnético montado en la parte inferior y discos rociadores de 1 mm. Antes de la inoculación, el biorreactor de 50 litros se llena con aproximadamente 20 litros de medio de crecimiento (medio no. 3001772, adquirido de PAA) complementado con 6 mM de L-glutamina (concentración final). Estos parámetros se aplican al pre-acondicionamiento del medio y al proceso de cultivo en tren de semilla.

Cuando los parámetros de proceso son estables dentro de sus intervalos aceptables, la transferencia del inoculo se inicia. Después de la inoculación, el reactor es llenado con medio a un volumen de trabajo final de 25 litros. Durante la expansión de la masa celular en el biorreactor de 50 litros, no se aplica ninguna adición de alimento al proceso. El pH se controla con CO_2 por medio de un tubo rociador. El nivel de oxígeno se controla por aireación sumergida con oxígeno a demanda. Un flujo de gas sobrepuesto de aire se aplica al espacio de cabeza. La aireación sumergida con aire presurizado con una tasa de flujo de 0,1 l/minuto que puede adaptarse para ajustar pCO_2 , se lleva a cabo. El tiempo de cultivo esperado en el biorreactor de semilla es de 3 días antes de la inoculación de un biorreactor de semilla de 200 litros.

1.5 Biorreactor de semilla (200 litros)

El biorreactor de semilla de 200 litros se encuentra equipado con un sistema de agitador de arrastre magnético montado en la parte inferior y discos rociadores de 1 mm. Antes de la inoculación, el biorreactor de 200 litros se llena con aproximadamente 100 litros de medio de crecimiento (medio no. 3001772, adquirido de PAA) complementado con 6 mM de L-glutamina (concentración final). Estos parámetros se aplican al pre-acondicionamiento de medio y al proceso de cultivo en tren de semilla.

5 Cuando los parámetros de proceso son estables dentro de sus intervalos aceptables, la transferencia del inoculo se inicia. Después de la inoculación, el medio se agrega a un volumen de trabajo final de 120 litros. Durante la expansión de la masa celular en el biorreactor de 200 litros, no se aplica ninguna adición de alimento al proceso. El pH se corrige con gas CO₂. El nivel de oxígeno se controla por aireación sumergida con oxígeno a demanda. Un flujo de gas sobrepuesto de aire se aplica al espacio de cabeza. La aireación sumergida con aire presurizado con una tasa de flujo de 0,4 l/minuto, que puede adaptarse para ajustar pCO₂, se lleva a cabo. El tiempo de cultivo esperado en el biorreactor de semilla es de 3 días antes de que las células se transfieran hacia un biorreactor de producción de 1000 litros.

1.6 Proceso de producción de alimentación por lotes

- 10 El proceso de producción de una composición que comprende isoformas APG101 es un cultivo de alimentación por lotes. Un biorreactor de producción de 1000 litros se encuentra equipado con un sistema de agitador de arrastre magnético montado en la parte inferior y discos rociadores de 1 mm. Antes de la inoculación, el biorreactor de 1000 litros se llena con aproximadamente 580 litros de medio de crecimiento (medio no. 3001829, adquirido de Beckton Dickison) y complementado con 6 mM de L-glutamina (concentración final, calculada en el volumen de inicio final de 720 litros).
- 15 Cuando los parámetros de proceso se encuentran dentro de sus intervalos aceptables, la transferencia de inoculo del biorreactor de semilla hacia el biorreactor de producción, se inicia. La concentración celular objetivo después de la inoculación en el biorreactor de producción es $0,3 \times 10^6$ de células viables/ml en un volumen total de 720 litros. El volumen requerido del cultivo celular del biorreactor de semilla se transfiere al reactor de producción, el cual entonces se llena con medio de crecimiento (medio no. 3001829, adquirido de Becton Dickinson) hasta que el volumen de inicio de 720 litros se alcanza. El cultivo celular se alimenta con medio de alimentación A (PM30728) comenzando en el día 3, y el medio de alimentación de Glucosa B (PM30729).
- 20

La alimentación diaria se inicia con la Alimentación B por separado, la Alimentación A y la Glucosa pueden alimentarse simultáneamente.

-Medio de Alimentación B:

- 25 La alimentación en bolo se inicia el día 3 después del muestreo.

Tasa de alimentación día 3-6:5,184 g/l/d (calculada en el volumen de inicio de 720 litros).

Tasa de alimentación día 7-12:2,592 g/l/d (calculada en el volumen de inicio de 720 litros).

-Medio de Alimentación A:

La alimentación en bolo se inicia en el día 3 después del muestreo.

- 30 Tasa de alimentación día 3-5:43,2 g/l/d (calculada en el volumen de inicio de 720 litros).

Tasa de alimentación día 6-12:21,6 g/l/d (calculada en el volumen de inicio de 720 litros).

-Alimento de D-Glucosa: Se agrega glucosa cuando la concentración de D-glucosa real es < 5 g/l empezando el día 7. La concentración de D-glucosa se ajusta a 5 g/l al agregar las cantidades requeridas de la alimentación de D-Glucosa.

- 35 El nivel de oxígeno se controla por la aplicación de una cascada de controlador de oxígeno con 3 prioridades: Prioridad 1 consiste en un flujo de aire de proceso en demanda hasta que se alcanza un flujo de gas de 10 l/minutos. Después de la agitación (prioridad 2) se incrementa continuamente hasta que se alcanza una velocidad de agitación de 100 rpm. La tercera prioridad consiste en burbujeo de O₂ sumergido a demanda.

Un flujo sobrepuesto de aire se aplica al espacio de cabeza.

- 40 El pH se controla con CO₂. Si es necesario se prepara 1 M de Na₂CO₃ para agregarse si fuera necesario. Se observa regularmente la formación de espuma y se agrega anti-espumante, si fuera necesario.

El procedimiento de recolección se inicia en el día de cultivo 13, o antes, si la viabilidad cae por debajo del $< 61\%$ (CedeX). La primera etapa del procedimiento es la sedimentación de células, en donde el caldo de células se enfría a $10 \pm 5^\circ\text{C}$. Cuando la temperatura se encuentra por debajo de 20°C , el agitador, la aireación y el control de pH se apagan. Después de un mínimo de 12 horas de sedimentación, la etapa de clarificación se inicia. El sobrenadante se clarifica por un filtración profunda de dos etapas y filtración de $0,2 \mu\text{m}$.

45

1.7. Sedimentación

El procedimiento de recolección se inicia por una etapa de sedimentación. El caldo de cultivo se enfría a finalmente $10 \pm 5^\circ\text{C}$. Cuando la temperatura es $< 20^\circ\text{C}$, la agitación, pO₂ y el control del pH se inactivan. Después de un mínimo de 12 horas y un máximo de 22 horas de sedimentación, se inicia la filtración profunda.

50

1.8 Filtración

La filtración profunda se lleva a cabo con Sistemas de Filtro de Profundidad Desechables Stax™ de Pall, cargando filtros de profundidad 7X de PDK5 y 2X de PDD1. La clarificación se sigue por una filtración de 0,2 µm. Los filtros de profundidad se nivelan con aproximadamente 900 litros de PBS a una tasa de flujo de ≤ 100 litros/m²/h. El líquido residual se extingue del sistema con aire. El proceso de filtración se ejecuta con una tasa de flujo de bomba de $\leq 3,5$ litros/minutos y una presión máxima de 1,0 bares. Para incrementar la recuperación del producto, los filtros se enjuagan después con aproximadamente 60 litros de PBS, pH 7,2, y se inactivan con aire presurizado a una presión máxima a 0,8 bares. La recolección filtrada se transfiere directamente a través del conducto de pared en el juego GD, se colecta en un Mixtainer de 1000 litros y se almacena a temperatura ambiente.

10 2. Proceso corriente abajo

Para propósitos de ilustración, una descripción de las etapas de purificación individuales durante el proceso corriente abajo se dará en lo siguiente.

2.1 Captura de Proteína A (C10)

15 El material de filtración de lo anterior se transfirió por filtración profunda (0,2 µm) y se templo a $5 \pm 3^\circ\text{C}$. Antes del procesamiento, la recolección se dividió en cuatro alícuotas iguales y se almacenó a temperatura ambiente durante la noche para lograr una temperatura de proceso final de $21 \pm 3^\circ\text{C}$. El procesamiento de recolección se llevó a cabo sin ningún acondicionamiento adicional en cuatro ciclos.

La elución se indujo por medio de una etapa baja en pH. Los perfiles de UV280 de los cuatro ciclos fueron altamente congruentes y muestran la forma esperada incluyendo el valor máximo único típico dentro de la etapa de elución.

20 Los rendimientos de las pruebas de Proteína A variaron entre 94 y 98%. Por tanto, la recuperación del producto de las pruebas de Proteína A estaba en el intervalo esperado. Además, todas las recuperaciones fueron comparables entre sí y confirmaron los datos adquiridos durante la transferencia de proceso y adaptación.

2.2 Inactivación del virus (V10)

25 Inmediatamente después de recolectar el eluido de Proteína A, se realizó una adición de volumen fijo (especificación: pH $3,5 \pm 0,2$) con 20 mM de ácido cítrico en 5 minutos para inactivar los virus envueltos. Las soluciones de inactivación de virus obtenidas se incubaron por separado durante 75 ± 15 minutos a temperatura ambiente ($21 \pm 3^\circ\text{C}$). Finalmente, el pH de las soluciones de inactivación se ajustó a pH $5,0 \pm 0,2$ por medio de la adición de un volumen fijo de 20 mM de Na₃-Citrato para detener la inactivación del virus. Los esquemas de acondicionamiento completos fueron como sigue:

30 Posteriormente, las soluciones de inactivación de virus acondicionadas se filtraron por medio de un filtro de 0,22 µm (Sartobran P) para separar los precipitados potencialmente formados y para inhibir el crecimiento microbiano en la solución de proceso. Cada lote de inactivación de virus acondicionado se almacena a $21 \pm 3^\circ\text{C}$ y finalmente se agrupó previo al procesamiento por medio de la etapa AIEX (C20).

2.3 AIEX (C20) --Columna

35 Posteriormente a la inactivación del virus, la filtración y el ajuste de pH, el grupo de inactivación de los virus acondicionado se procesó sobre una columna Capto Q en modo FT en dos ciclos. El método comprende una etapa de limpieza en su lugar 1 (tampón 0,5 M de NaOH), una etapa de equilibrio (20 mM de Na-citrato, pH 5), una etapa de carga de la solución de inactivación del virus acondicionado, una etapa de lavado (20 mM de Na-citrato, pH 5,0), una etapa de regeneración (20 mM de Na-citrato, 1 M de Na-Cl, pH 5,5), una una etapa de limpieza en su lugar 2 (0,5M de NaOH) y una etapa de almacenamiento (0,01M de NaOH) .

Los perfiles UV280 de los dos ciclos son congruentes y muestran el incremento esperado del perfil de absorción UV280 durante la aplicación del eluido de Proteína A acondicionado.

45 Cada fracción de flujo continuo obtenido fue finalmente 0,22 µm filtrado (Sartobran P) a fin de remarcar la reducción de biocarga. Más tarde, las fracciones separadas se agruparon y se almacenaron a $21 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta el procesamiento adicional por medio de la etapa MMC (C30). Una comparación de las fracciones AIEX de una mezcla de isoformas APG101 obtenidas por el método inventivo y de APG101 obtenida por un método no inventivo por IEF se muestra en las Figuras 4a y 4b.

Los rendimientos de las pruebas de AIEX fueron aproximadamente 100%.

2.4 MMC (C30) --Columna

50 Después de la etapa C20, el grupo de producto AIEX se procesó sobre una columna Capto MMC en tres ciclos. El método comprendió una etapa de limpieza en su lugar (tampón 0,5 M de NaOH), una etapa de equilibrio (20 mM de Na-citrato, pH 5,0), una etapa de carga utilizando el producto/lavado AIEX, una etapa de lavado (20 mM de Na-

citrato, pH 5,0), una etapa de elución (50 mM de Na--fosfato, 105 mM de NaCl, pH 7,4), una etapa de regeneración (3 M de NaCl, pH 11), una etapa de limpieza en su lugar (0,5 M de NaOH), una etapa de acondicionamiento (50 mM de Na-fosfato, 105 mM de NaCl, pH 7,4) y una etapa de almacenamiento (20 mM de Na-fosfato, 20% de etanol, pH 7,5).

- 5 La elución se indujo por medio de un incremento del pH. Los perfiles UV280 de los tres ciclos son altamente congruentes y muestran la forma esperada incluyendo el valor máximo único típico dentro de la etapa de elución.

Posteriormente, las fracciones eluidas se filtraron cada una sobre un filtro de 0,22 µm (Sartobran P) y se almacenaron a $21 \pm 3^\circ\text{C}$. Antes del procesamiento adicional por medio de la etapa de filtración de virus, las fracciones eluidas Capto MMC particulares se agruparon.

- 10 Los rendimientos de las pruebas de MMC varían aproximadamente 100%.

2.5 Filtración de virus (I10)

- 15 Posterior a la etapa C30, el grupo de eluido Capto MMC (1181 ml) se pasó sobre un filtro de 0,1 µm de Durapore (Millipak 20) previo a la filtración del virus. La filtración del virus se realizó aplicando una alícuota del filtrado de 0,1 µm (887 ml) en un filtro de virus Planova 15N (100 cm²) equilibrado con 50 mM de PBS, pH 7,4 (tampón de elución Capto MMC) a una presión de trabajo de $0,8 \pm 0,1$ bares. El volumen de post-lavado fue 0,5 ml/cm² utilizando el tampón de equilibrio. La prueba de filtro se hizo previa al uso del filtro con base en la detección del burbujeo de aire presurizado. El flujo del filtrado permaneció constante durante el procesamiento (aprox. 22 L/m²*h).

La filtración del virus dio como resultado un 99% de rendimiento.

- 20 Posteriormente, el filtrado de 0,1 µm residual y la fracción de filtrado de la filtración de virus se agrupó y almacenó a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ hasta el procesamiento adicional por medio de la etapa UF/DF posterior.

2.6 Ultrafiltración/Diafiltración (I20)

Previo a la diafiltración, el filtrado I10 se concentró en un sistema de Flujo Cruzado AKTA a una concentración de proteína de $25,0 \pm 2,0$ mg_{APG101}/ml utilizando dos casetes de 30 kDa de Pellicon 3. Más tarde, se realizó una diafiltración para cambiar el sistema tampón al siguiente tampón:

- 25 50 mM de Na-Fosfato, 5% de Sorbitol, pH 6,5.

El material se ultrafiltró a la concentración arriba mencionada y se diafiltró por el factor $7,0 \pm 0,5$. Los parámetros para la ultra- y diafiltración fueron:

Flujo de Retención: 450 L/(m²*h)

TMP: $1,2 \pm 0,1$ bares.

- 30 La UF/DF produjo 97% de recuperación del producto.

2.7 Ajuste de concentración de sustrato de fármaco

Para el ajuste de concentración final, se agregó un volumen definido (107 ml) del tampón de formulación (50 mM de Na-Fosfato, 5% de Sorbitol, pH 6,5) al grupo de parte retenida de UF/DF. La concentración de sustancia de fármaco final obtenida por A280 fue 20,4 mg/ml. Finalmente, la sustancia de fármaco fue 0,22 µm de filtrado (Sartobran P).

- 35 Posteriormente, las alícuotas de la sustancia farmacéutica con un volumen de 200 µL se embotellaron en envases de 500 µL.

2.8 Rendimiento total

Los rendimientos en total y de etapa obtenidos de ProA-HPLC y el análisis A280 se enlistan en la Tabla 1. El muestreo de la molécula objetivo no se tomó en cuenta para el cálculo de los rendimientos.

- 40 Tabla 1: Resumen del rendimiento por etapas

Muestra	Rendimiento total (%)	
Captura de Proteína A (C10)	96 ^{#1}	101 ^{#2}
Inactivación de virus (V10)	90	94
ALEX (C20)	90	94
MMC (C30)	90	94

Muestra	Rendimiento total (%)	
Filtración de virus (I10)	89	93
UF/DF (I20)	86	90
Formulación (I30)	86	90

#1 Carga determinada por medio del método de recolección ProA-HPLC, Eluido por medio de ProA-HPLC.

#2 Carga determinada por medio del método de recolección ProA-HPLC, Eluido por medio de A280.

5 La identidad de la mezcla de isoformas APG101 se confirmó por medio de SDS Page no reductora e IEF. El modelo de isoforma mostró bandas básicas adicionales en comparación con el material de referencia y un ligero cambio de la distribución de la isoforma hacia el ácido.

Esto se muestra, por ejemplo, por una comparación de un gel IEF de las fracciones AX obtenidas por el método de la presente invención y una mezcla APG101 obtenida por el método no inventivo de acuerdo con la Figura 1.

10 La mezcla de isoforma APG101 de la presente invención además difiere en la presencia de carbohidratos (ácido siálico de N-glucanos).

Carbohidratos (antigenicidad/N-glucanos)

En la Tabla 2, se resume el análisis de la estructura del carbohidrato. A pesar de una estructura de carbohidrato comparable entre el material de referencia y la composición inventiva, la distribución de las estructuras de carbohidratos difiere.

15 Tabla 2: Resultado de análisis de N-glucanos (carbohidratos)

Valor máximo/Muestra	Material de referencia (% de Mol)	Composición inventiva (% de Mol)
cF1GN2	34,1	18,2
cF1GN2G1	19,2	17,8
cF1GN2G3	30,1	51,5
cF1GN2G3	9,1	7,6
Otros	7,6	4,9

Carbohidratos (ácidos siálicos)

El análisis de la cantidad de ácido siálico por mol de APG101 de la composición inventiva se resume en la Tabla 3.

Tabla 3: Análisis de ácido siálico (carbohidrato)

Muestra	Contenido de ácido siálico (NeuAc mol/APG101 mol)
Composición inventiva	5,1
Material de referencia	3,9

20 El material de referencia siempre se refiere a una mezcla APG101 que no se produjo por el método de la presente invención.

Finalmente, se llevó a cabo un ensayo para medir la bioactividad de la mezcla de acuerdo con la presente invención que comprende las isoformas APG101.

25 3. Método para la determinación de la potencia in vitro de isoformas APG101

Un ensayo celular con una línea de células T permanente de Jurkat A3 se utiliza para la determinación de la actividad biológica de APG101. Este ensayo de potencia se muestra de manera esquemática en la Figura 5.

Con este ensayo de apoptosis que emplea células Jurkat A3, se determinan los valores EC50 para la inhibición de la apoptosis inducida por APG293 (=CD95L-T4; 250 ng/ml) por APG101.

5 En breve, se cultivan células Jurkat A3 en matraces con medio RPMI 1640 + GlutaMAX (GibCo) complementado con 10% de FBS, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se siembran 100.000 células por pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se incuba CD95L-T4 (APG293) a una concentración constante de 250 ng/ml en una placa de microtitulación de 96 pocillos separada durante 30 minutos a 37°C con diferentes concentraciones de APG101. La adición de la mezcla APG101/CD95L-T4 a las células se sigue durante 3 horas de incubación a 37°C. Las células se lisan al agregar tampón de lisis (250 mM de HEPES, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de EGTA, 5% de Triton-X-100, 100 mM de DTT, 10 mM de AEBSF, pH 7,5) y las placas se colocan en hielo durante 30 minutos a 2 horas. La apoptosis se iguala por una actividad incrementada de Caspasas (por ejemplo, las caspasas 3 y 7). Por tanto, el desdoblamiento del sustrato de Caspasa Ac-DEVD-AFC se utiliza para determinar el grado de apoptosis. De hecho, la actividad de caspasa se correlaciona con el porcentaje de las células apoptóticas determinadas morfológicamente después de tinar las células con yoduro de propidio y Hoechst-33342.

15 Para el ensayo de actividad de caspasa, se transfieren 20 µl de lisado celular a una placa de microtitulación de 96 pocillos negra. Después de la adición de 80 µl de tampón que contiene 50 mM de HEPES, 1% de Sacarosa, 0,1% de CHAPS, 50 µM de Ac-DEVD-AFC, y 25 mM de DTT, pH 7,5, la placa se transfiere a un lector de placa de microtitulación Tecan y el incremento en la intensidad de fluorescencia durante una estructura de tiempo dado se monitorea (longitud de onda de excitación 400 nm, longitud de onda de emisión 505 nm). Empleando el software GraphPad Prism, se calculan los valores EC50 para APG101 (es decir, la reducción de la inducción de apoptosis de la concentración dada de CD95L por 50%).

La determinación de la actividad biológica de APG101 que emplea el ensayo de potencia permite:

- Una alta especificidad. Por medio de su interacción con CD95, CD95L-T4 induce la apoptosis en células Jurkat A3. La interacción de CD95/CD95L-T4 se bloquea específicamente por la adición de APG101.
- El uso de un sistema celular relevante; la inducción de la apoptosis es una característica fisiológica importante de la señalización de CD95/CD95L y puede monitorearse en la muy caracterizada línea de células T humanas Jurkat A3.
- Un alto rendimiento de muestra debido a la aplicación de placas de microtitulación de 96 pocillos y tiempos de incubación cortos.

30 La Figura 6 muestra la actividad biológica (EC50) de las mezclas de isoformas APG101 obtenidas por el método inventivo (muestras inventivas) en comparación con APG101 obtenida por los métodos no inventivos. La actividad es comparable.

4. Ensayos de termofluorescencia de la formulación APG101

La estabilidad de las formulaciones de acuerdo con la presente invención se confirmó por los ensayos de termofluorescencia (cf. Figuras 8 y 9).

35 La determinación de los puntos de transición térmica de APG101 se llevó a cabo por medio de ensayos de termofluorescencia (TF). De ese modo, el tinte fluorescente se adhiere a los parches hidrofóbicos de la proteína. Durante el incremento de temperatura, la proteína se desnaturaliza y más tinte puede adherirse, lo cual da como resultado un incremento de la señal fluorescente. Por consiguiente, los puntos de transición térmica más altos (temperaturas de fusión, T_m) indican las condiciones más estables para APG101. La configuración del ensayo se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Configuración del ensayo de termofluorescencia

Parámetro	Valor
Tinte	Naranja Sypro (Sigma)
Concentración de Tinte	1:1000
Volumen de muestra	50 µl
Concentración de muestra	100 µg/ml
Gradiente de temperatura	de 35°C a 95°C
Etapas de temperatura	de 0,2°C a 0,5°C
Tiempo de mantenimiento	10 s

El punto de transición térmica se definió por ser el punto de inflexión del incremento de señal fluorescente durante el incremento de temperatura. La estabilidad de APG101 en diferentes sistemas tampones se probó (Figura 8).

5 Por medio de los ensayos de termofluorescencia, los puntos de transición térmica de APG101 se determinaron con la materia prima 3 con respecto a los diferentes excipientes, principalmente azúcar, poli-alcohol, aminoácidos y poliglicol. El procedimiento experimental fue idéntico como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 9. Los valores T_m se incrementaron con concentraciones crecientes de sacarosa, sorbitol y glicina. La adición de glicilglicina (Gly-Gly) o PEG no mostró efectos estabilizadores positivos.

10 Además, se hizo un ensayo de termofluorescencia para comparar los lotes de APG101 preparados de acuerdo con la invención con la muestra Fas/Fc comercialmente disponible. Una concentración de muestra (APG101 o Fas/Fc) de 50 $\mu\text{g/ml}$ se empleó.

El ensayo de termofluorescencia claramente revela la superioridad de los dos lotes APG101 de la invención (lote F10176 y lote 1011626) en comparación con Fas/Fc comercialmente disponible de Sigma con respecto a la estabilidad térmica (Figura 11).

15

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Apogenix GmbH
- <120>
- 5 <130> 53445P WO
<160> 1 Composición que comprende una mezcla de isoformas CD95-Fc
<170> PatentIn versión 3.5
- 10 <210> 1
<211> 400
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
- 15 <220>
<223> Proteína de fusión recombinante que consiste en un dominio CD95 extracelular humano con parte IgG1 FC en su terminal C
- 20 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(16)
<223> Sitios de desdoblamiento variable
- 25 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(20)
<223> Sitios de desdoblamiento variable
- 30 <220>
<221> SEÑAL
<222> (1)..(25)
<223> Sitios de desdoblamiento variable
- 35 <220>
<221> DOMAIN
<222> (26)..(172)
<223> Dominio CD95 extracelular humano
- 40 <220>
<221> MOD_RES
<222> (26)..(26)
<223> ÁCIDO PIRROLIDONA CARBOXÍLICO
- 45 <220>
<221> DISULFURO
<222> (59)..(73)
- 50 <220>
<221> DISULFURO
<222> (63)..(82)
- 55 <220>
<221> DISULFURO
<222> (85)..(101)
- 60 <220>
<221> DISULFURO
<222> (107)..(127)

ES 2 674 662 T3

<220>
 <221> CARBOHID
 <222> (118)..(118)
 5 <223> N-linked Glycosylation at Position N118

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> (129)..(143)
 10

<220>
 <221> DISULFURO
 <222> (135)..(140)

15 <220>
 <221> CARBOHID
 <222> (136)..(136)
 <223> Glicosilación enlazada por N en la posición N136

20 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (146)..(157)

25 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (149)..(165)

30 <220>
 <221> DOMINIO
 <222> (172)..(400)
 <223> Dominio IgG1-FC humano

35 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (173)..(173)
 <223> Residuo formador de cistina entre cadenas del homodímero APG101.

40 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (179)..(179)
 <223> Residuo formador de cistina entre cadenas del homodímero APG101.

45 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (182)..(182)
 <223> Residuo formador de cistina entre cadenas del homodímero APG101.

50 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (214)..(274)

55 <220>
 <221> CARBOHID
 <222> (250)..(250)
 <223> Glicosilación enlazada por N en la posición N250

60 <220>
 <221> DISULFURO
 <222> (320)..(378)

<400> 1
 Met Val Gly Ile Trp Thr Leu Leu Pro Leu Val Leu Thr Ser Val Ala
 1 5 10 15
 Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser
 20 25 30

ES 2 674 662 T3

Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn
 35 40 45
 Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro
 50 55 60
 Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp Glu Pro
 65 70 75 80
 Asp Cys Val Pro Cys Gln Glu Gly Lys Glu Tyr Thr Asp Lys Ala His
 85 90 95
 Phe Ser Ser Lys Cys Arg Arg Cys Arg Leu Cys Asp Glu Gly His Gly
 100 105 110
 Leu Glu Val Glu Ile Asn Cys Thr Arg Thr Gln Asn Thr Lys Cys Arg
 115 120 125
 Cys Lys Pro Asn Phe Phe Cys Asn Ser Thr Val Cys Glu His Cys Asp
 130 135 140
 Pro Cys Thr Lys Cys Glu His Gly Ile Ile Lys Glu Cys Thr Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Asn Thr Lys Cys Lys Glu Glu Gly Ser Arg Ser Cys Asp Lys Thr
 165 170 175
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 180 185 190
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 195 200 205
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 210 215 220
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 225 230 235 240
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 245 250 255
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 260 265 270
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 275 280 285
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 290 295 300

ES 2 674 662 T3

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
305 310 320

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
325 330 335

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
340 345 350

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
355 360 365

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
370 375 380

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
385 390 395 400

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende una mezcla de isoformas APG101, en la que APG101 no modificado está representado por SEQ ID NO: 1, comprendiendo dicha mezcla variantes APG101 truncadas en el extremo N y cuyo primer aminoácido es el aminoácido 17, 21 y 26 con respecto a SEQ ID NO: 1 y menos de 1% en moles de APG101 no modificado de acuerdo con la SEQ ID NO: 1 y que se distribuye dentro de un intervalo de pl de 4,0 - 8,5, y en el que dicha mezcla de isoformas APG101 se puede obtener mediante un método que comprende las etapas:
- 5 (a) producir una mezcla de isoformas APG101 mediante un proceso de producción alimentado por lotes que proporciona una recolección celular utilizando un medio basal que contiene peptona, y
- 10 (b) aislar la mezcla de isoformas APG101 de la recolección celular,
- en donde la etapa (a) comprende una serie de etapas de cultivo de un lote de células principales dado hasta que se alcanzan parámetros de recolección relevantes, seguido de sedimentación celular y filtración del sobrenadante que contiene la proteína de fusión, en donde los parámetros de recolección relevantes son un título APG101 dentro de un intervalo de 0,5 g/l - 5 g/l y una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 - 1×10^8 células/ml y
- 15 la etapa (b) comprende cromatografía de captura, inactivación de virus, una serie de cromatografía de aniones y/o cationes, filtración de virus y ajuste a una concentración de proteína final deseada.
2. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el intervalo de pl es de 4,5 a 7,8, preferiblemente de 5,0 a 7,5.
- 20 3. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, que comprende 0,0 - 5,0% en mol de formas de alto peso molecular APG101, tales como dímeros y/o agregados.
4. La composición farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende una cantidad de ácidos siálicos de 4,0 a 7,0 moles de NeuAc/mol de APG101.
- 25 5. La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende variantes de APG101 bloqueadas en el extremo N-terminal, tales como variantes de APG101 bloqueadas por modificación piro-Glu y/o que comprenden variantes de APG101 que tienen un extremo N libre.
6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende 80-99% en moles de variantes de APG101 N-terminalmente bloqueadas y/o variantes de APG101 al 1-20% en moles que tienen un extremo N libre.
7. Una formulación que comprende una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 1-6.
- 30 8. La formulación de la reivindicación 7
- (a) que comprende adicionalmente fosfato, preferiblemente de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 100 mM de fosfato, más preferiblemente aproximadamente 50 mM de fosfato,
- (b) que comprende además un agente potenciador de la viscosidad, tal como sorbitol, preferiblemente aproximadamente 0,1-10% en peso de un agente potenciador de la viscosidad, más preferiblemente aproximadamente 5% en peso de un agente potenciador de la viscosidad, y/o
- 35 (c) que tiene un valor de pH en el intervalo de 4-8.
9. Un método para producir una composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 que comprende las etapas
- 40 (a) producir una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 mediante un proceso de producción alimentado por lotes que proporciona una recolección de células usando un medio basal que contiene peptona, y
- (b) aislar la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 de la recolección de células,
- en donde la etapa (a) comprende una serie de etapas de cultivo de un lote de células principales dado hasta que se alcanzan los parámetros de recolección relevantes, seguido de sedimentación celular y filtración del sobrenadante que contiene la proteína de fusión, en donde los parámetros de recolección relevantes son un título APG101 dentro de un intervalo de 0,5 g/l - 5 g/l y una densidad celular de aproximadamente 1×10^6 - 1×10^8 células/ml y
- 45 la etapa (b) comprende cromatografía de captura, inactivación de virus, una serie de cromatografía de aniones y/o cationes, filtración de virus y ajuste a una concentración de proteína final deseada.

Figura 1

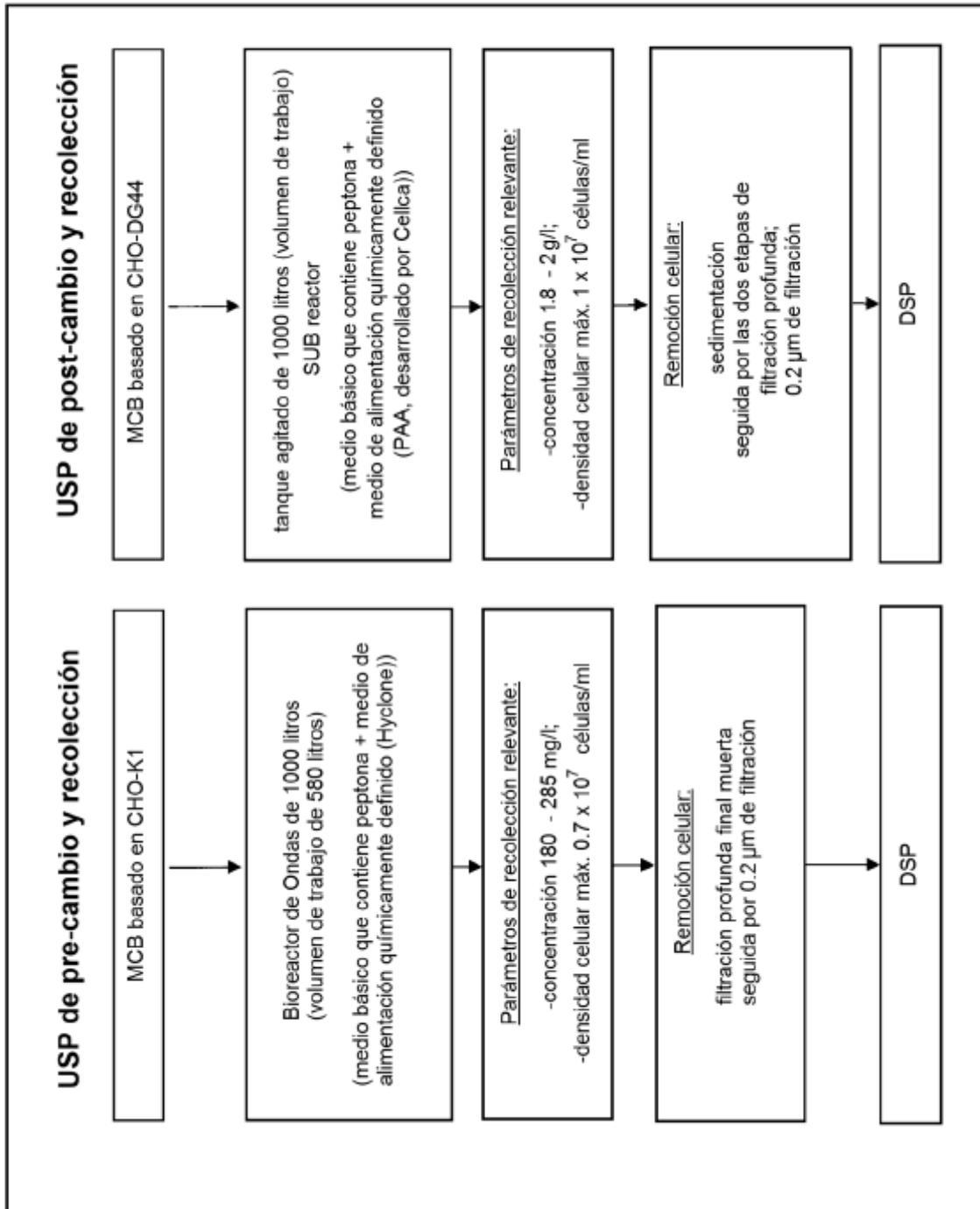


Figura 2

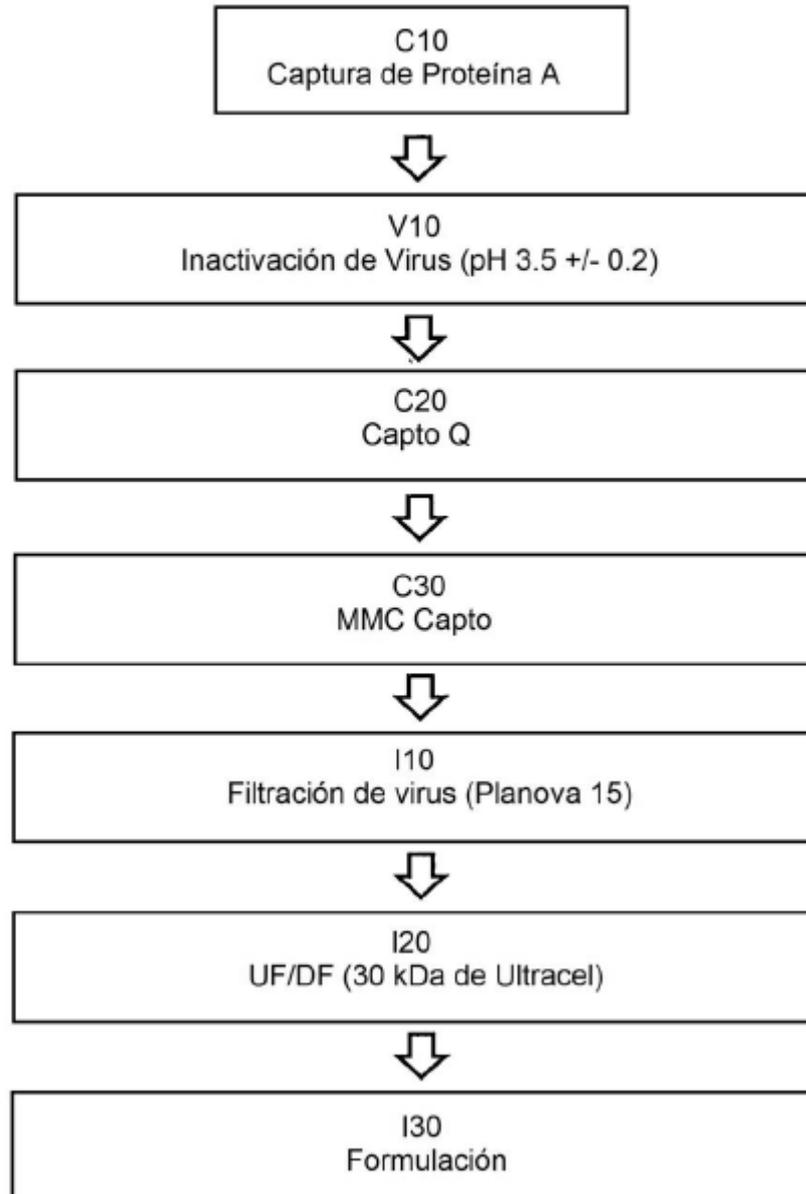


Figura 3

Proceso Aguas Abajo conocido de la técnica anterior

Proceso Aguas Abajo Inventivo

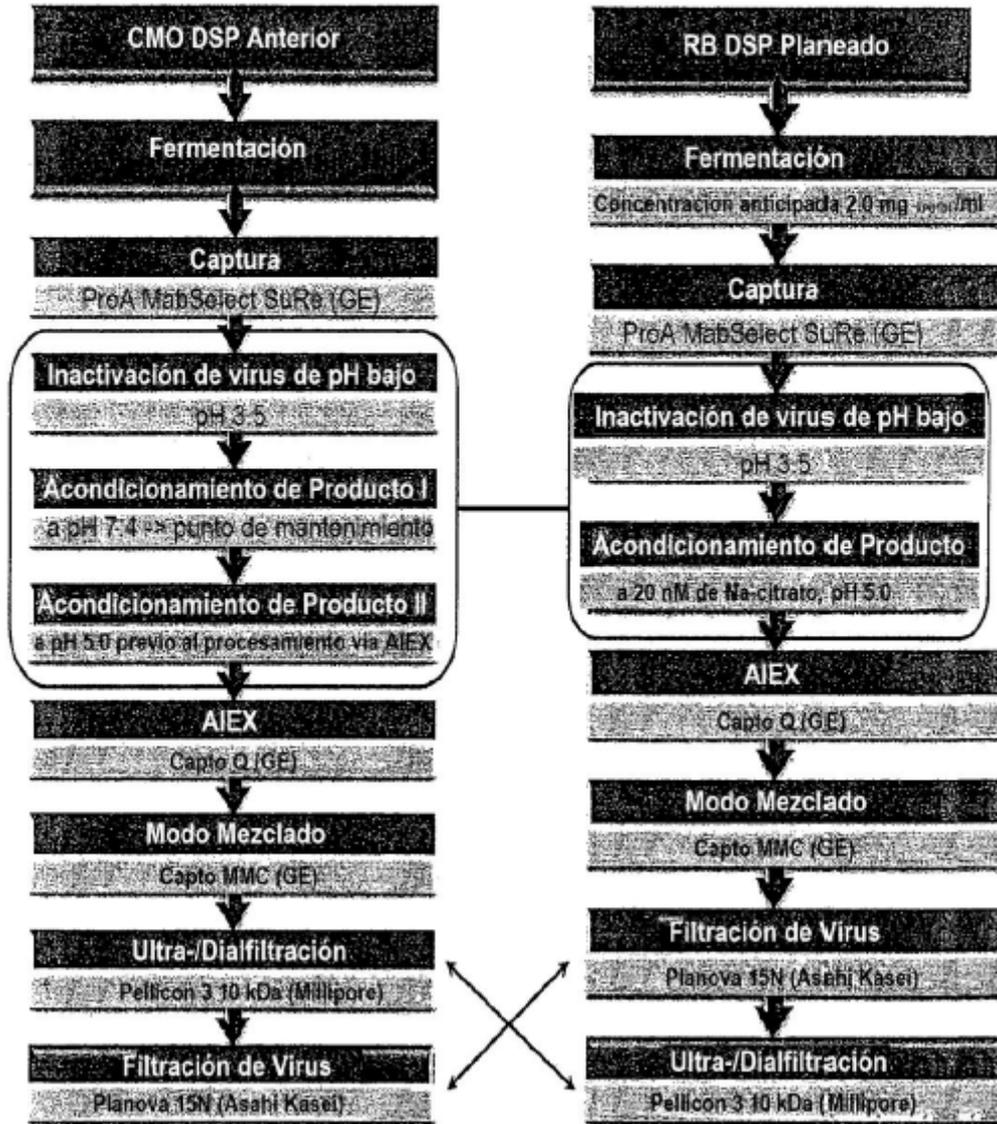


Figura 4a

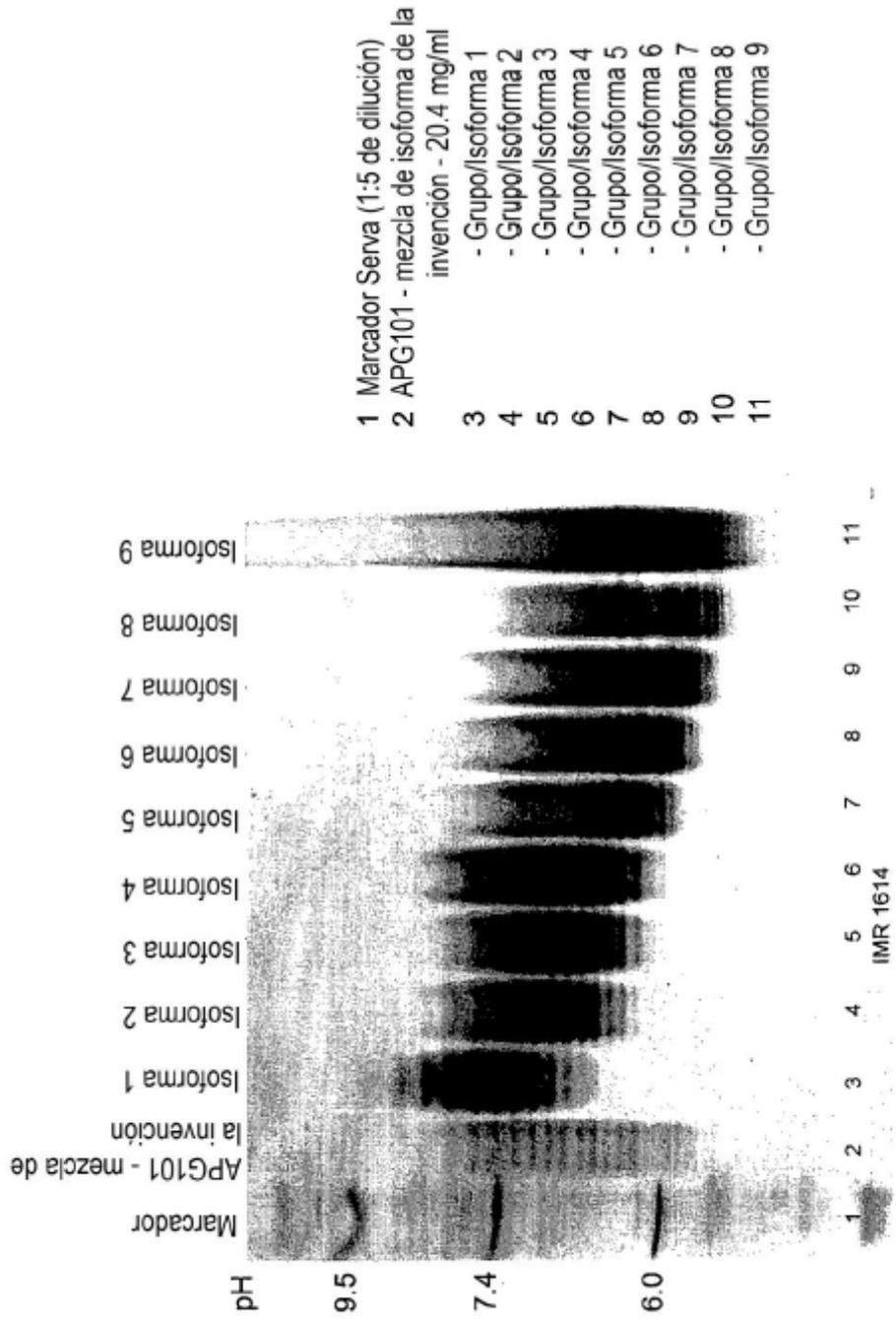


Figura 4b

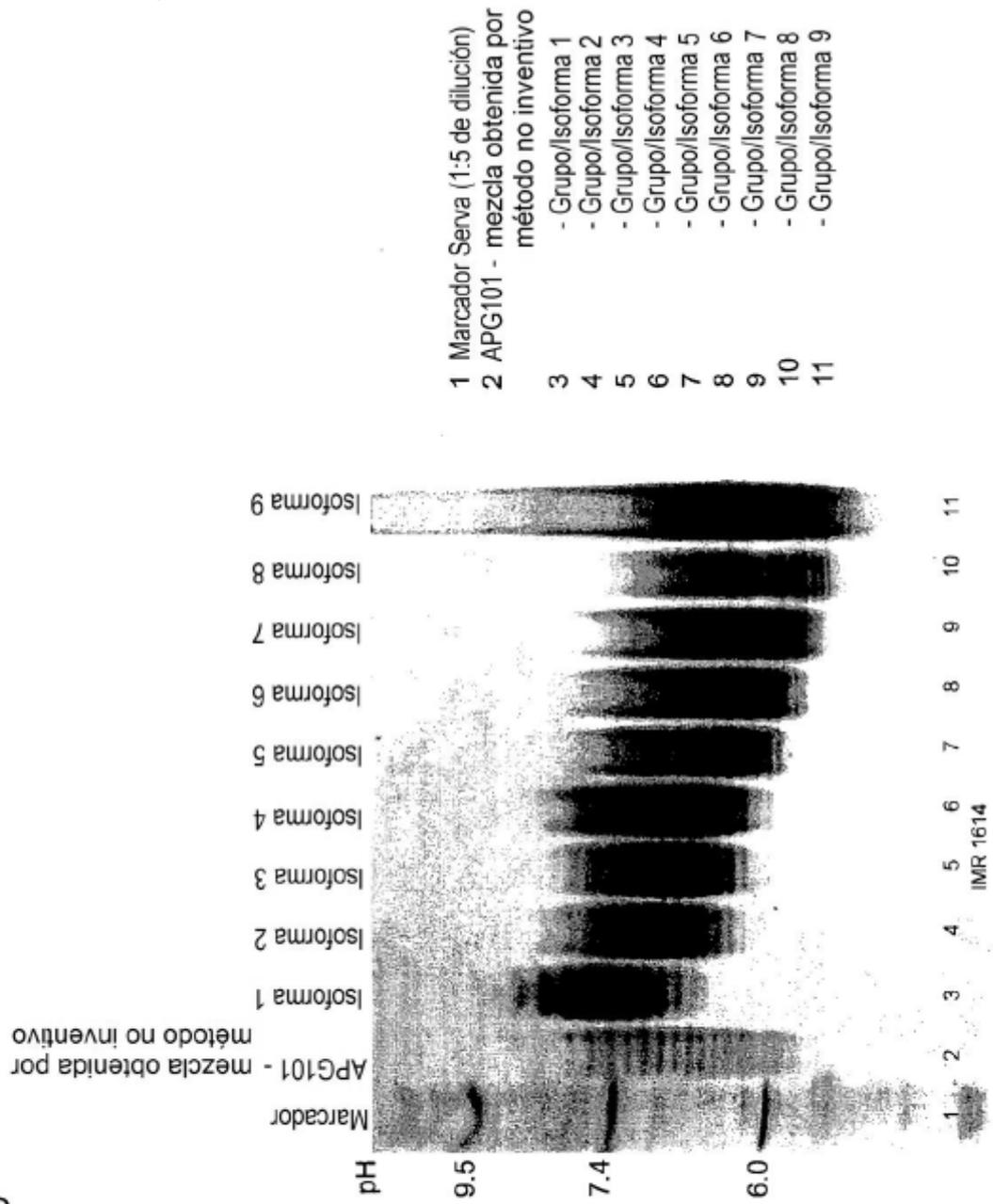
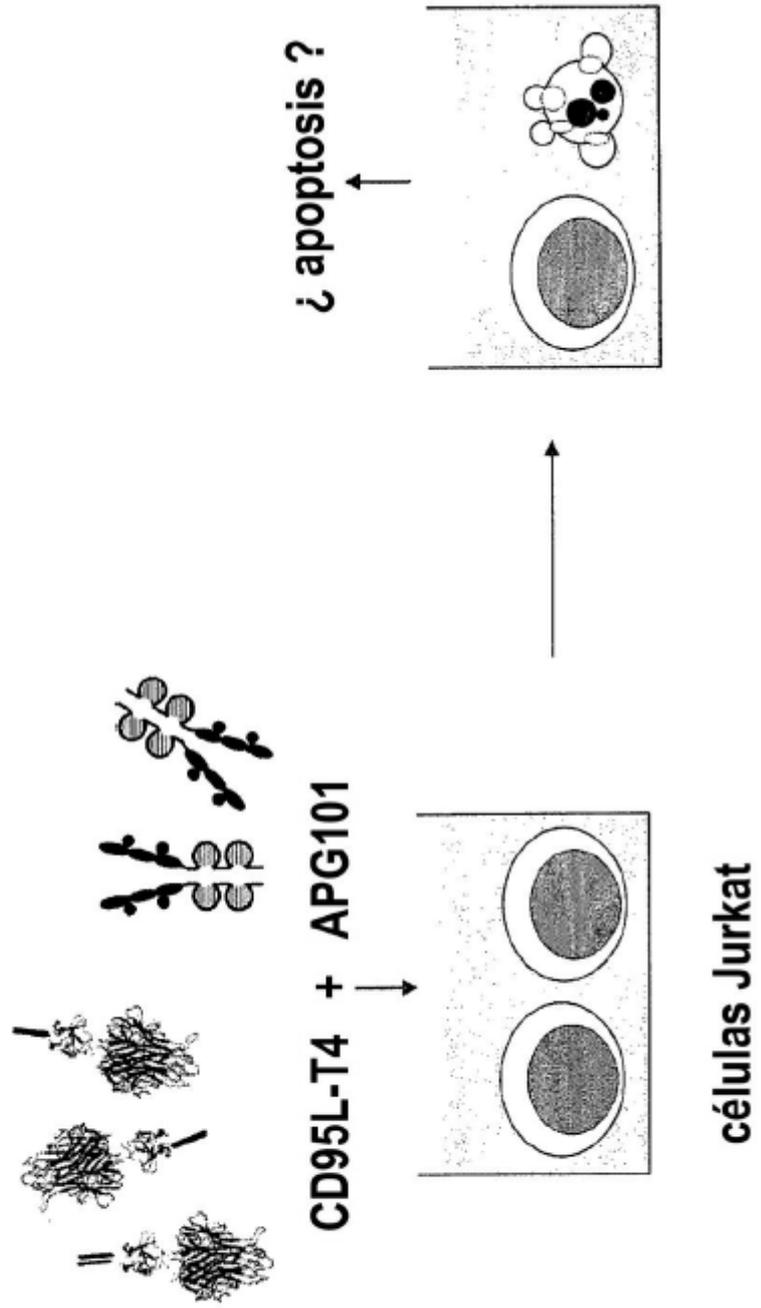


Figura 5



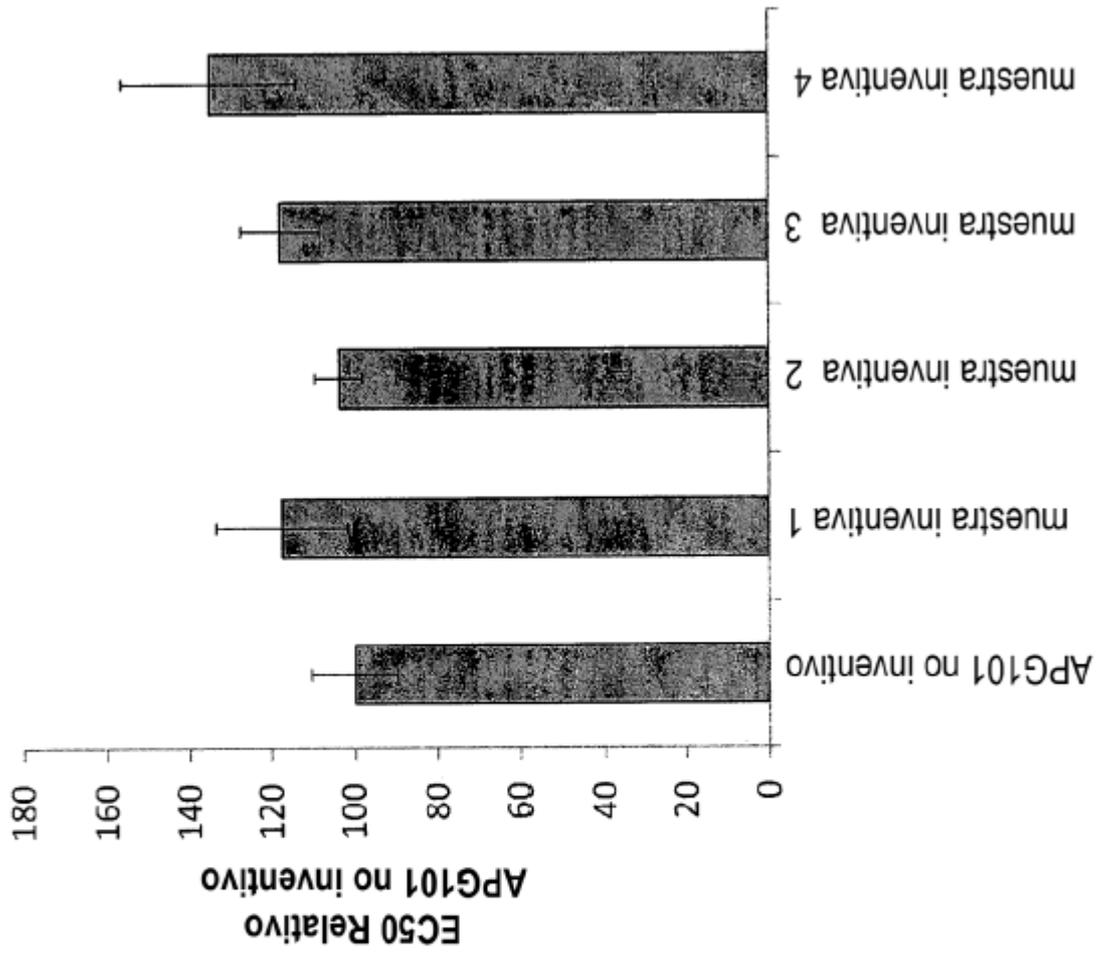


Figura 6

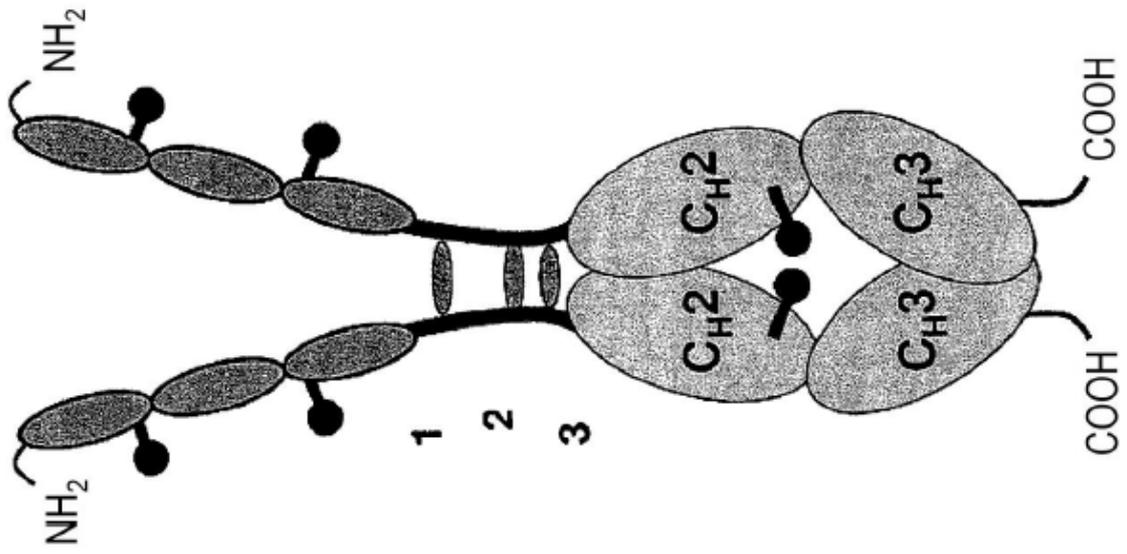


Figura 7

Figura 8

Regulador		pH 7.5	pH 7.0	pH 6.5	pH 6.0	PBS
Histidina/ HCl	50 mM	67.3	67.0	66.5	N/A	67.1
	30 mM	66.9	66.9	66.2		
	10 mM	66.9	66.8	66.4		
	5 mM	N/A	66.9	66.5		
50 mM de Histidina	25 mM NaCl	67.1	67.1	66.2	N/A	
	50 mM NaCl	67.5	67.0	66.2		
	100 mM NaCl	67.7	67.0	66.3		
L-Histidina/ Fosfato	50 mM	67.3	67.0	66.5	N/A	
	30 mM	66.9	66.9	66.2		
	10 mM	66.9	66.8	66.4		
	5 mM	N/A	66.9	66.5		
Na-Acetato	150 mM	67.3	67.5	67.6	N/A	
	50 mM	67.3	67.4	67.5		
	30 mM	67.2	67.4	67.3		
	10 mM	66.9	67.1	67.2		
	5 mM	67.1	67.1	66.9		
Na-Fosfato	50 mM	67.3	67.5	67.5	67.0	67.1
	30 mM	67.4	67.5	67.3	67.0	
	10 mM	67.4	67.3	67.2	66.9	
	5 mM	67.3	67.3	67.1	66.9	
Na-Succinato	50 mM	67.5	67.5	67.4	N/A	67.3
	30 mM	67.5	67.5	67.5		
	10 mM	67.4	67.4	67.3		
	5 mM	67.5	67.5	67.3		
Arginina/ Fosfato	50 mM	67.3	67.3	67.2	N/A	
	30 mM	67.3	67.4	67.4		
	10 mM	67.4	67.3	67.4		
	5 mM	67.4	67.5	67.3		
Na-Citrato	50 mM	N/A			67.3	
	30 mM	67.0	67.3	66.8		66.1
	10 mM	67.3	67.5	67.2		66.9
	5 mM	67.2	67.1	67.1		66.9

Figura 9

Excipientes	Sacarosa		Sorbitol		Glicina		Gly-Gly		PEG 6000	
	0.0 %	2.5 %	5.0 %	5.0 %	125 mM	250 mM	5.0 %	10.0 %	2.5 %	5.0 %
concentración										
150 mM de Na-Acetato, pH 6.5	66.6	68.1	N/A	N/A	67.7	N/A	66.4	N/A	67.3	N/A
50 mM de Histidina/ 100 mM de NaCl, pH 7.5	67.5	68.1	68.3	68.1	67.9	68.1	66.7	66.4	67.3	66.7
30 mM de Na-Succinato, pH 7.0	67.6	68.0	68.5	68.1	67.8	68.3	66.3	66.1	67.2	66.8
30 mM de Na-Fosfato, pH 6.5	67.3	67.8	68.3	67.7	67.6	68.0	66.7	66.1	67.5	67.2
50 mM de Na-Fosfato, pH 6.5	66.7	67.8	68.3	67.9	67.9	68.1	67.1	66.7	67.5	67.3

Figura 10

	Regulador	SE-HPLC (%)			MFI	red. SDS-PAGE		IEF
		Agregados	Homodímero	Fragmentos		Partículas (#/mL)	Azul coloidal	
1	PBS (control sin tensión)	4.98	95.02	n.d.	15011			
2	50 mM de Histidina, 100 mM de NaCl, 5.0% de Sorbitol, pH 7.5	4.13	94.48	1.39	13432	-	-	-
3	50 mM de Histidina, 100 mM de NaCl, 5.0% de Sorbitol, 20 μ M de EDTA, pH 7.5	4.17	94.55	1.28	7051	-	-	-
4	30 mM de Na-Fosfato, 5% de Sacarosa, pH 6.5	6.18	92.85	0.96	5386	-	-	+
5	30 mM de Na-Fosfato, 5% de Sorbitol, pH 6.5	5.95	93.22	0.83	9769	+	+	+
6	50 mM de Na-Fosfato, 5% de Sorbitol, pH 6.5	5.72	93.43	0.85	7056	+	+	+
7	50 mM de Na-Fosfato, 250 mM de Glicina, pH 6.5	5.08	94.24	0.68	8629	+	+	-

Figura 11

Ensayo de termofluorescencia para evaluar la estabilidad térmica de dos lotes APG101 de Aopenix en comparación directa con Fas/Fc (Sigma) disponible comercialmente

