



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 883**

51 Int. Cl.:
C07K 14/52 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06850998 .3**

96 Fecha de presentación : **19.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1973942**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **01.10.2008**

54 Título: **Producción recombinante de proteínas de unión a heparina.**

30 Prioridad: **22.12.2005 US 753615 P**
14.07.2006 US 807432 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.05.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.05.2011

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 Dna Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Butler, Michelle D.;**
Cleland, Jeffrey L.;
Kahn, David W.;
Pizarro, Shelly;
Schmelzer, Charles H. y
Winkler, Marjorie E.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 359 883 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

Producción recombinante de proteínas de unión a heparina

5 Solicitud relacionada

[0001] Esta solicitud reivindica la prioridad y el beneficio de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/753.615, presentada el 22 de diciembre de 2005, y de la solicitud provisional de EE.UU. nº de serie 60/807.432, presentada el 14 de julio de 2006.

1.0

Campo de la invención

1.5

[0002] Esta invención se refiere a procedimientos para la obtención de proteínas de unión a heparina producidas en cultivo celular. La invención incluye procedimientos para recuperar y purificar proteínas de unión a heparina replegadas que se han producido en células hospedadoras eucarióticas y están presentes en estas células, típicamente en el espacio periplasmático o intracelular. Las proteínas de unión a heparina producidas en células hospedadoras procarióticas pueden encontrarse también como proteínas solubles o una mezcla de proteínas solubles e insolubles.

2.0

Antecedentes

2.5

[0003] Es conocido que una gran variedad de polipéptidos biológicamente activos de origen natural se unen a heparina. Dichos polipéptidos de unión a heparina incluyen citocinas tales como factor de plaquetas 4 e IL-8 (Barber y col., (1972) Biochim. Biophys. Acta, 286:312-329; Handin y col., (1976) J. Biol. Chem., 251: 4273-422; Loscalzo y col., (1985) Arch. Biochem. Biophys., 240: 446-455; Zucker y col., (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86: 7571-7574; Talpas y col., (1991) Biochim. Biophys. Acta, 1078:208-218; Webb y col., (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7158-7162), factores de crecimiento de unión a heparina (Burgess y Maciag, (1989) Annu. Rev. Biochem., 58: 576-606; Klagsbrun, (1989) Prog. Growth Factor Res., 1: 207-235) tales como factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF); factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF); factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Liu y col., (1992) Gastrointest. Liver Physiol. 26: G642-G649) y selectinas tales como L-selectina, E-selectina y P-selectina (Norgard-Sumnicht y col., (1993) Science, 261: 480-483). Véase también Muñoz y Linhardt., (2004) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 24: 1549-1557.

3.0

3.5

4.0

[0004] La publicación internacional nº WO 95/07097 describe formulaciones de proteínas de unión a heparina que incluyen factores de crecimiento de unión a heparina tales como VEGF, con heparina nativa purificada u otros compuestos polianiónicos para uso terapéutico. Se ha mostrado que los oligosacáridos derivados de heparina y diversos otros compuestos polianiónicos estabilizan la conformación activa de los factores de crecimiento de unión a heparina (Barzu y col., (1989) J. Cell. Physiol. 140: 538-548; Dabora y col., (1991) J. Biol. Chem. 266: 23627-23640) y se ha empleado la cromatografía de afinidad por heparina en diversos esquemas de purificación (véase, en general, la publicación internacional nº WO 96/02562).

4.5

5.0

5.5

[0005] Muchas de las proteínas de unión a heparina de origen mamífero se han producido mediante tecnología recombinante y son clínicamente relevantes (Muñoz y Linhardt, (2004) Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol., 24: 1549-1557; Favard y col. (1996) Diabetes and Metabolism 22(4): 268-73; Matsuda y col., (1995) J. Biochem. 118(3): 643-9; Roberts y col., (1995) Brain Research 699(1): 51-61). Por ejemplo, el VEGF es un potente mitógeno para células endoteliales vasculares. Es también conocido como factor de permeabilidad vascular (VPF). Véase Dvorak y col., (1995) Am. J. Pathol. 146: 1029-39. El VEGF desempeña papeles importantes tanto en vasculogénesis, el desarrollo de los vasos embrionarios, como en angiogénesis, el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los preexistentes. Véanse, por ejemplo, Ferrara, (2004) Endocrine Reviews 25(4): 581-611; Risau y col., (1988) Dev. Biol. 125: 441-450; Zachary, (1998) Intl. J. Biochem. Cell. Bio. 30: 1169-1174; Neufeld y col., (1999) FASEB J. 13: 9-22; Ferrara (1999) J. Mol. Med. 77: 527-543 y Ferrara y Davis-Smyth, (1997) Endocrin. Rev. 18: 4-25. Las aplicaciones clínicas para el VEGF incluyen aquellas en que está indicado el crecimiento de nuevos lechos capilares como, por ejemplo, en la promoción de la curación de heridas (véase, por ejemplo, la publicación internacional nº WO

91/02058 y de expediente de agente nº P2358R1, titulada "Curación de heridas " presentada el 16 de junio de 2006), en la promoción del crecimiento y reparación de tejido, por ejemplo, hepático (véase, por ejemplo, el documento W02003/0103581), óseo (véase, por ejemplo, el documento W02003/094617), etc. Véase también Ferrara, (2004) Endocrine Reviews 25(4): 581-611.

5

[0006] Típicamente, se producen proteínas recombinantes terapéuticamente relevantes en una variedad de organismos hospedadores. La mayoría de proteínas puede expresarse en su forma nativa en hospedadores eucarióticos tales como células CHO. El cultivo de células animales requiere generalmente tiempos de crecimiento prolongados para conseguir la máxima densidad celular y consigue en última instancia una menor densidad celular que los cultivos de células procarióticas (Cleland, J. (1993) ACS Symposium Series 526, "Protein Folding: In Vivo and In Vitro", American Chemical Society). Adicionalmente, los cultivos de células animales requieren a menudo medios caros que contienen componentes de crecimiento que pueden interferir con la recuperación de la proteína deseada. Los sistemas de expresión de hospedador bacteriano proporcionan una alternativa económica para la producción a escala de fabricación de proteínas recombinantes. Existen numerosas patentes de EE.UU. sobre la expresión bacteriana genérica de proteínas recombinantes, incluyendo las patentes de EE.UU. nº 4.565.785, 4.673.641, 4.795.706 y 4.710.473. Es una ventaja importante del procedimiento de producción la capacidad de aislar fácilmente el producto a partir de los componentes celulares mediante centrifugación o microfiltración. Véanse, por ejemplo, Kipriyanov y Little, (1999) Molecular Biotechnology, 12: 173-201 y Skerra y Pluckthun, (1988) Science, 240: 1038-1040.

10

15

20

[0007] Se han recuperado y purificado factores de crecimiento de unión a heparina recombinantes tales como factor de crecimiento de fibroblastos ácido, factor de crecimiento de fibroblastos básico y factor de crecimiento endotelial vascular a partir de una serie de fuentes incluyendo bacterias (Salter D.H. y col., (1996) Labor. Invest. 74(2): 546-556 (VEGF); Siemeister y col., (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun. 222(2): 249-55 (VEGF); Scrofani y col., (2001) J. Microbiol. Biotechnol. 11(4): 543-551 (VEGF); Cao y col., (1996) J. Biol. Chem. 261(6): 3154-62 (VEGF); Yang y col., (1994) Gaojishu Tongxun, 4:28-31 (VEGF); Anspach y col., (1995) J. Chromatogr. A 711(1): 129-139 (aFGF y bFGF); Gaulandris (1994) J. Cell. Physiol. 161(1): 149-59 (bFGF); Estape y Rinas (1996) Biotech. Tech. 10(7): 481-484 (bFGF); McDonald y col., (1995) FASEB J. 9(3): A410 (bFGF)). Sin embargo, los sistemas de expresión bacteriana tales como *E. coli* carecen de la maquinaria celular para facilitar el repliegamiento apropiado de las proteínas, y generalmente no dan como resultado la secreción de proteínas grandes en los medios de cultivo. Las proteínas recombinantes expresadas en células hospedadoras bacterianas se encuentran a menudo como cuerpos de inclusión consistentes en masas densas de proteína reducida parcialmente plegada y plegada erróneamente. De esta forma, la proteína recombinante es generalmente inactiva. Por ejemplo, la forma activa predominante del VEGF es un homodímero de dos polipéptidos de 165 aminoácidos (VEGF-165). En esta estructura, cada subunidad contiene 7 pares de enlaces disulfuro intracatenarios y dos pares adicionales que afectan al ligamiento covalente de las dos subunidades (Ferrara y col., (1991) J. Cell. Biochem. 47: 211-218). La conformación nativa incluye un dominio fuertemente básico que se ha mostrado que se une fácilmente a heparina (Ferrara y col. (1991) supra). La dimerización covalente de VEGF es necesaria para una unión a receptor y actividad biológica eficaces (Pötgens y col., (1994) J. Biol. Chem. 269: 32879-32885; Claffey y col., (1995) Biochim. et Biophys. Acta 1246: 1-9). El producto bacteriano contiene potencialmente varios intermedios plegados erróneamente y con puentes disulfuro desorganizados.

25

30

35

40

45

[0008] Adicionalmente, el repliegamiento produce a menudo dímeros, trímeros y multímeros plegados erróneamente y ligados por disulfuro (Morris y col., (1990) Biochem. J., 268: 803-806; Toren y col., (1988) Anal. Biochem., 169:287-299). Este fenómeno de asociación es muy común durante el repliegamiento de proteínas, particularmente a concentraciones altas de proteína, y parece implicar a menudo la asociación mediante interacción hidrófoba de intermedios parcialmente plegados (Cleland y Wang, (1990) Biochemistry, 29: 11072-11078).

50

[0009] El plegamiento erróneo ocurre en la célula durante la fermentación o durante el procedimiento de aislamiento. Las proteínas recuperadas del espacio periplasmático o intracelular deben solubilizarse y la proteína soluble replegarse al estado nativo. Los procedimientos *in vitro* para replegar las proteínas en la conformación correcta biológicamente activa son esenciales para obtener proteínas funcionales. El procesamiento típico posterior de proteínas recuperadas a partir de cuerpos de inclusión incluye la disolución del cuerpo de inclusión en un desnaturante a alta concentración

55

tal como urea, seguido de dilución del desnaturizante para permitir que ocurra el replegamiento (véanse las patentes de EE.UU. nº 4.512.922, 4.511.502 y 4.511.503). Véanse también Rudolph y Lilie, (1996) FASEB J. 10: 49-56 y Fischer y col., (1993), Biotechnology and Bioengineering, 41: 3-13. Dichos procedimientos de recuperación se considera que son universalmente aplicables, con modificaciones menores, a la recuperación de proteínas recombinantes biológicamente activas a partir de cuerpos de inclusión. Estos procedimientos se han aplicado a proteínas de unión a heparina tales como VEGF (Siemeister y col. (1996) supra). Estos procedimientos buscan eliminar los enlaces disulfuro aleatorios antes de lograr la proteína recombinante en su conformación biológicamente activa mediante sus demás fuerzas de estabilización, y pueden no eliminar los intermedios plegados inapropiadamente o no proporcionar poblaciones homogéneas de producto plegado apropiadamente.

[0010] Se han usado micelas inversas o cromatografía de intercambio iónico para ayudar al replegamiento de proteínas desnaturizadas incluyendo una sola proteína en micelas o aislándolas sobre una resina y retirando entonces el desnaturizante (Hagen y col., (1990) Biotechnol. Bioeng. 35: 966-975; Creighton (1985) en "Protein Structure Folding and Design" (Oxender, D.L. Ed.) pág. 249-251, Nueva York: Alan R. Liss, Inc.). Estos procedimientos han sido útiles para prevenir la agregación de proteína y facilitar el replegamiento apropiado. Para alterar la velocidad o extensión del replegamiento, se ha efectuado un replegamiento específico de conformación con ligados y anticuerpos de la estructura nativa de la proteína (Cleland y Wang, (1993), en "Biotechnology", (Rehm H.-J. y Reed G. Eds.) pág. 528-555, Nueva York, VCH). Por ejemplo, la creatina cinasa se ha replegado en presencia de anticuerpos de la estructura nativa (Morris y col., (1987) Biochem. J. 248: 53-57). Además de anticuerpos, se han usado ligandos y cofactores para potenciar el replegamiento. Sería más probable que estas moléculas interaccionaran con la proteína plegada después de la formación de la proteína nativa. Por lo tanto, el equilibrio de plegamiento puede "desplazarse" al estado nativo. Por ejemplo, la velocidad de replegamiento del ferricitocromo c se ha potenciado por el ligando extrínseco de la posición axial del hierro de hemo (Brems y Stellwagon, (1983) J. Biol. Chem. 258: 3655-3661). Se han usado también proteínas chaperonas para ayudar al plegamiento de proteínas. Véase, por ejemplo, Baneyx, (1999) Current Opinion in Biotechnology, 10:411-421. Heparina y sulfato de heparina se han indicado para ayudar a estabilizar la proteína de unión a heparina VEGF (Brandner y col., 2005), Biochem. Biophys. Res. Commun. 340: 826-839; Gengrinovitch y col., (1999) J. Biol. Chem. 274: 10816-10822).

[0011] Existe la necesidad de procedimientos nuevos y más eficaces de plegamiento y/o recuperación de proteínas de unión a heparina a partir de un cultivo de células hospedadoras, por ejemplo, para la producción eficaz y económica de proteínas de unión a heparina en un cultivo de células bacterianas, que proporcionen la eliminación o reducción de intermedios biológicamente inactivos y una recuperación mejorada de una proteína replegada apropiadamente biológicamente activa y altamente purificada que, y que sean aplicables en general a la producción a escala de fabricación de las proteínas. La invención se dirige a estas y otras necesidades, como resultará evidente tras la revisión de la siguiente divulgación.

Sumario de la invención

[0012] La invención proporciona un procedimiento para la recuperación y purificación de proteínas de unión a heparina replegadas a partir de un cultivo celular, en particular a partir de células hospedadoras procarionóticas, por ejemplo células bacterianas, según las reivindicaciones. Por ejemplo, el procedimiento comprende las etapas de (a) aislar una proteína de unión a heparina insoluble del espacio periplasmático o intracelular de dichas células bacterianas; (b) solubilizar dicha proteína de unión a heparina insoluble aislada en una primera disolución tamponada que comprende un agente caotrópico y un agente reductor y c) incubar dicha proteína de unión a heparina solubilizada en una segunda disolución tamponada que comprende un agente caotrópico y un agente polianiónico sulfatado durante un tiempo y condiciones tales que ocurra el replegamiento de la proteína de unión a heparina, y (d) recuperar dicha proteína de unión a heparina replegada, en el que hay un aumento de 2 a 10 veces en la concentración de proteína recuperada mediante incubación con un agente polianiónico sulfatado en comparación con un control según las reivindicaciones. En una realización, la segunda disolución tamponada comprende adicionalmente arginina. En una realización, la segunda disolución tamponada comprende adicionalmente cisteína o un agente reductor suave.

[0013] Según la invención, hay un aumento de 2-5 veces en la concentración de proteína de la

proteína replegada biológicamente activa recuperada. Puede haber un aumento de 3-5 veces en la concentración de proteína replegada biológicamente activa recuperada, o un aumento de 2-3 veces en la concentración de proteína replegada biológicamente activa recuperada. Puede haber un aumento, por ejemplo, mayor de 2,0 veces, 2,5 veces, 2,8 veces, 3,0 veces o 5 veces en la concentración de proteína replegada biológicamente activa recuperada. En una realización de la invención, hay un aumento de 3 a 5 veces en la concentración de proteína de VEGF replegado biológicamente activo.

[0014] Los procesos de la invención son aplicables al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Los procesos descritos en la presente memoria son aplicables en sentido amplio a proteínas de unión a heparina y especialmente a factores de crecimiento de unión a heparina, y en particular, al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). En ciertas realizaciones de la invención, el agente polianiónico sulfatado es de entre aproximadamente 3.000 y 10.000 Da. El agente polianiónico sulfatado utilizado en los procesos de producción es un sulfato de dextrano o sulfato de sodio. En un aspecto, el sulfato de dextrano es de entre 3.000 Da y 10.000 Da.

[0015] La invención incluye adicionalmente procesos y procedimientos para la purificación de la proteína de unión a heparina VEGF en relación con la recuperación de la proteína de unión a heparina como se describe en la presente memoria. En una realización particular, los procedimientos de purificación incluyen poner en contacto dicha proteína de unión a heparina replegada con un soporte cromatográfico de hidroxapatito, un primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, un soporte cromatográfico catiónico y un segundo soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte. En otra realización, un procedimiento de purificación comprende poner en contacto dicha proteína de unión a heparina replegada con un soporte de intercambio catiónico, un primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba y un soporte de intercambio iónico o cromatográfico de medios mixtos, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte. Se contempla que las etapas de recuperación pueden efectuarse en cualquier orden, por ejemplo, secuencialmente o alterando el orden de los soportes cromatográficos. En ciertas realizaciones de la invención, se proporcionan procedimientos para recuperar y purificar proteínas de unión a heparina replegadas a partir de un cultivo celular a escala de fabricación o industrial.

Breve descripción de los dibujos

[0016] La **Figura 1** ilustra un cromatograma de VEGF producido por la cepa bacteriana W3110 cargado en una columna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA). Por ejemplo, la columna POROS HE2/M se equilibra con fosfato de sodio 10 mM, pH 7, que contiene cloruro de sodio 0,15 M. Se eluye la columna usando un gradiente lineal de cloruro de sodio 0,15-2 M, fosfato de sodio 10 mM, pH 7, durante 10 minutos. Se controla el eluyente a 280 nm. La proteína recuperada en cada pico corresponde a VEGF, sin embargo solo el pico 3 corresponde a VEGF replegado apropiadamente biológicamente activo.

La **Figura 2** ilustra un gráfica que representa la estabilización por heparina de VEGF plegado apropiadamente nativo. El VEGF se suspende en HEPES 50 mM, pH 8, que contiene EDTA 5 mM, NaCl 0,2 mM y cisteína 10 mM.

Las **Figuras 3A - 3D** ilustran cromatografías de VEGF producido por la cepa bacteriana W3110 e incubado con sulfato de dextrano de 5.000 Da 12 µg/ml (**Figura 3A**); sulfato de dextrano de 8.000 Da 12 µg/ml (**Figura 3B**); sulfato de dextrano de 10.000 Da 12 µg/ml (**Figura 3C**) o heparina de 3.000 Da 25 µg/ml (**Figura 3D**), y cargado en una columna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA). Por ejemplo, la columna se equilibra con fosfato de sodio 10 mM, pH 7, que contiene cloruro de sodio 0,15 M. Se eluye la columna usando un gradiente lineal de cloruro de sodio 0,15-2 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 7, durante 10 minutos. Se controla el eluyente a 280 nm. La proteína recuperada en cada pico corresponde a VEGF, sin embargo solo el pico 3 corresponde a un VEGF replegado apropiadamente biológicamente activo.

La **Figura 4** ilustra el efecto de la escala sobre el replegamiento de VEGF.

La **Figura 5** ilustra el efecto de la heparina de bajo peso molecular (PM) y alto PM y del sulfato de dextrano de 10.000 Da sobre el replegamiento de VEGF. El pico 3 corresponde a un VEGF replegado apropiadamente biológicamente activo.

La **Figura 6** ilustra el efecto del sulfato de sodio sobre el replegamiento de VEGF. El pico 3

corresponde a un VEGF replegado apropiadamente biológicamente activo.

La **Figura 7** ilustra el efecto de la heparina de bajo peso molecular (PM) y alto PM y del sulfato de dextrano de 5.000 Da, 8.000 Da y 10.000 Da, sobre el replegamiento de VEGF. El pico 3 corresponde a VEGF replegado apropiadamente biológicamente activo.

La **Figura 8** ilustra el efecto de heparina y sulfato de dextrano sobre el replegamiento de VEGF. El pico 3 corresponde a VEGF replegado apropiadamente biológicamente activo.

La **Figura 9** ilustra el efecto de urea y DTT sobre la extracción de VEGF a partir de cuerpos de inclusión bacterianos.

La **Figura 10** ilustra el efecto de la concentración de urea y DTT sobre el replegamiento de VEGF.

La **Figura 11** ilustra la secuencia aminoacídica de VEGF₁₆₅ con los puentes disulfuro indicados (SEQ ID NO.:1).

La **Figura 12** ilustra el efecto de la presencia de aminoácidos cargados. A una concentración de 0,75 M en la segunda disolución tamponada, tanto arginina como lisina son beneficiosas, mientras que la histidina tiene poco efecto aditivo en comparación con la disolución tamponada sin ella. Adicionalmente, se ha mostrado que la arginina tiene un efecto similar a concentraciones de 0,1 a 1 M.

La **Figura 13** ilustra el efecto de la disolución sobre el % de eficacia de replegamiento, en que, aunque la concentración de VEGF total es menor a medida que aumenta la dilución, el % de eficacia de replegamiento es mayor con más dilución.

Descripción detallada
Definiciones

[0017] "Heparina" (también designada como ácido heparínico) es un grupo heterogéneo de mucopolisacáridos aniónicos de cadena lineal altamente sulfatados denominados glucosaminoglucanos. Aunque pueden estar presentes otros, los azúcares principales en la heparina son: 2-sulfato del ácido α -L-idurónico, 6-sulfato de 2-desoxi-2-sulfamino- α -glucosa, ácido β -D-glucurónico, 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glucosa y ácido L-idurónico. Estos, y opcionalmente otros azúcares, están unidos por enlaces glucosídicos, formando polímeros de tamaños variables. Debido a la presencia de sus grupos sulfato y ácido carboxílico ligados covalentemente, la heparina es fuertemente ácida. El peso molecular de la heparina varía desde aproximadamente 3.000 hasta aproximadamente 20.000 Da dependiendo de la fuente y del procedimiento de determinación.

[0018] La heparina nativa es un constituyente de diversos tejidos, especialmente hígado y pulmón, y de mastocitos en varias especies de mamífero. La heparina y las sales de heparina (heparina de sodio) están comercialmente disponibles y se usan principalmente como anticoagulantes en diversas situaciones clínicas.

[0019] "Sulfato de dextrano" es un sulfato de dextrano cuya estructura principal es un polímero de D-glucosa. La glucosa, y opcionalmente otros azúcares, están unidos por enlaces glucosídicos α -D(1-6), formando polímeros de tamaños variables. Debido a la presencia de sulfato ligado covalentemente, el sulfato de dextrano es fuertemente ácido. El contenido de azufre es generalmente no menor de un 10%, y típicamente de aproximadamente 15-20%, con hasta 3 grupos sulfato por molécula de glucosa. El peso molecular medio del sulfato de dextrano es de aproximadamente 1.000 a aproximadamente 40.000.000 Da. Los ejemplos de sulfato de dextrano empleables en la invención incluyen el sulfato de dextranos producidos a partir de microorganismos tales como *Leuconostoc mesenteroides* y *L. dextranicum*.

[0020] "Agente polianiónico" como se usa dentro del alcance de la invención pretende describir preparaciones de heparina nativa purificada comercialmente disponibles y compuestos que son capaces de unirse a proteínas de unión a heparina, incluyendo otros "agentes polianiónicos" tales como sulfato de sodio, sulfato de heparina, sulfato de heparano, (poli)sulfato de pentosano, dextrano, sulfato de dextrano, ácido hialurónico, condroitina, sulfato de condroitina, sulfato de dermatano y sulfato de queratano. Es particularmente útil dentro del contexto de la invención un "agente polianiónico sulfatado" tal como, por ejemplo, un derivado sulfato de un polisacárido, tal como sulfato de heparina, sulfato de dextrano, sulfatos de ciclodextrina producidos por microorganismos tales como *Bacillus macerans* descritos en la patente de EE.UU. n° 5.314.872, así como sulfatos de otros glucanos tales como sulfatos de β -1,3-glucanos, produciéndose el β -1,3-glucano por microorganismos que pertenecen al género *Alcaligenes* o *Agrobacterium*, y sulfato de condroitina así como fragmentos de heparina sulfatada.

[0021] Los agentes mencionados anteriormente están disponibles en general y son reconocidos por el experto. Por ejemplo, los fragmentos de heparina sulfatada pueden obtenerse a partir de una colección de oligosacáridos derivados de heparina que se han fraccionado mediante cromatografía de exclusión molecular. La preparación de oligosacáridos derivados de heparina fraccionados por afinidad se ha notificado por Ishihara y col., (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 4675-4683. Estos oligosacáridos se prepararon a partir de heparina porcina comercial después de despolimerización parcial con ácido nitroso, reducción con borohidruro de sodio y fraccionamiento mediante cromatografía de exclusión molecular. Se aplicaron los conjuntos resultantes de di-, tetra-, hexa-, octa- y deca-sacáridos secuencialmente a una columna de afinidad de bFGF recombinante humano unido covalentemente a SEPHAROSE™ 4B, y se fraccionaron adicionalmente en subconjuntos basándose en su elución de esta columna en respuesta a gradientes de cloruro de sodio. Esto dio como resultado cinco conjuntos, designados Hexa-1 a Hexa-5, cuyas estructuras y actividades biológicas se evaluaron adicionalmente. Se muestran la estructura de Hexa-5C y su espectro de RMN a 500 MHz en la Figura 4 de Tyrell y col., (1993) *J. Biol. Chem.*, 268: 4684-4689. Este hexasacárido tiene la estructura [IdoA(2-OSO₃)α1-4GlcNSO₃(6-OSO₃)α1-4]₂IdoA(2-OSO₃)α1-4AMan_R(6-OSO₃). Todos los oligosacáridos derivados de heparina debatidos anteriormente, así como otros oligosacáridos de tipo heparina, son adecuados y pueden usarse según la invención. En una realización de la invención, se usan hexasacáridos y polisacáridos de heparina de alto tamaño unitario (por ejemplo, hepta-, octa-, nona- y deca-sacáridos). Además, se usan ventajosamente los oligosacáridos derivados de heparina o de tipo heparina con una gran carga neta negativa, por ejemplo, debido a un alto grado de sulfatación.

[0022] El término “proteína de unión a heparina” o “HPB” como se usa en la presente memoria designa un polipéptido capaz de unión a heparina (como se define anteriormente en la presente memoria). La definición incluye las formas madura, pre, prepro y pro de proteínas de unión a heparina nativas y producidas recombinantemente. Son ejemplos típicos de proteínas de unión a heparina los “factores de crecimiento de unión a heparina” incluyendo, pero sin limitación, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (también conocido como factor de dispersión, SF) y factor de crecimiento nervioso (NGF), IL-8, etc.

[0023] Como se usa en la presente memoria, “factor de crecimiento endotelial vascular” o “VEGF” designa un factor de crecimiento de mamíferos derivado originalmente de células foliculares de pituitaria bovina que tienen la secuencia aminoacídica dada a conocer en Castor, C.W. y col., (1991) *Methods in Enzymol.* 198: 391-405, junto con derivados funcionales del mismo que tienen la actividad biológica cualitativa de un VEGF nativo correspondiente incluyendo, pero sin limitación, la secuencia aminoacídica de VEGF humano como se notifica en Houck y col., (1991) *Mol. Endocrin.* 5: 1806-1814. Véanse también Leung y col. (1989) *Science*, 246: 1306 y Robinson y Stringer, (2001) *Journal of Cell Science*, 144(5): 853-865, patente de EE.UU. n° 5.332.671. La forma predominante del VEGF es un homodímero de 165 aminoácidos que tiene 16 restos de cisteína que forman 7 enlaces disulfuro intramoleculares y dos enlaces disulfuro intermoleculares. Se ha implicado un corte y empalme alternativos en la formación de polipéptidos de VEGF humano múltiples constituidos por 121, 145, 165, 189 y 206 aminoácidos, sin embargo, la variante VEGF₁₂₁ carece del dominio de unión a heparina de las demás variantes y por lo tanto no entra dentro de la definición de proteína de unión a heparina expuesta en la presente memoria. Todas las isoformas de VEGF comparten un dominio aminoterminal común, pero difieren en la longitud de la porción carboxiterminal de la molécula. La forma activa preferida de VEGF, VEGF₁₆₅, tiene enlaces disulfuro entre los restos aminoacídicos Cys26-Cys68; Cys57-Cys104; Cys61-Cys102; Cys117-Cys135; Cys120-Cys137; Cys139-Cys158; Cys146-Cys160 en cada monómero. Véase la **Figura 11**. Véase también, por ejemplo, Keck y col., (1997) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344(1): 103-113. La molécula de VEGF₁₆₅ está compuesta por dos dominios: un dominio de unión a receptor aminoterminal (homodímero ligado por disulfuro de aminoácidos 1-110) y un dominio de unión a heparina carboxiterminal (restos 111-165). Véase, por ejemplo, Keyt y col., (1996) *J. Biol. Chem.*, 271 (13): 7788-7795. En ciertas realizaciones de la invención, el VEGF₁₆₅ aislado y purificado no está glucosilado en el resto 75 (Asn). Véase, por ejemplo, Yang y col., (1998) *Journal of Pharm. & Experimental Therapeutics*, 284: 103-110. En ciertas realizaciones de la invención, el VEGF₁₆₅ aislado y purificado está sustancialmente no desamidado en el resto Asn10. En ciertas realizaciones de la invención, el VEGF₁₆₅ aislado y purificado es una mezcla

de proteína desamidada (en el resto Asn10) y proteína no desamidada, típicamente con la mayoría de la proteína estando no desamidada. Puesto que el VEGF₁₆₅ es un homodímero, la desaminación puede ocurrir en una o ambas cadenas polipeptídicas.

5 **[0024]** Como se usa en la presente memoria, VEGF u otra HBP y similares “plegado apropiadamente” o “biológicamente activo” designa una molécula con una conformación biológicamente activa. El experto reconocerá que los intermedios plegados erróneamente y de disulfuros desorganizados pueden tener actividad biológica. En dicho caso, el VEGF o HBP plegado apropiadamente o biológicamente activo corresponde al patrón de plegamiento nativo del VEGF
10 (descrito anteriormente) u otra HBP. Por ejemplo, el VEGF plegado apropiadamente tiene los pares disulfuro indicados anteriormente, además de dos enlaces disulfuro intermoleculares en la molécula dimérica; sin embargo, pueden producirse otros intermedios mediante el cultivo de células bacterianas (**Figura 1 y 3A-3D**). Para el VEGF plegado apropiadamente, los dos enlaces disulfuro intermoleculares pueden ocurrir entre los mismos restos, Cys51 y Cys60, de cada monómero. Véase, por ejemplo, la patente WO98/16551. Las actividades biológicas del VEGF incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, promover la permeabilidad vascular, promover el crecimiento de células endoteliales vasculares, la unión a un receptor de VEGF, la unión y señalización mediante un receptor de VEGF (véase, por ejemplo, Keyt y col., (1996) Journal of Biological Chemistry, 271(10): 5638-5646), inducir la angiogénesis, etc.

20 **[0025]** Los términos “purificado” o “HBP pura” y similares designan un material exento de sustancias que lo acompañan normalmente cuando se encuentra en su producción recombinante y especialmente en cultivo de células procarióticas o bacterianas. Por tanto, los términos designan una HBP recombinante que está exenta de ADN contaminante, proteínas de células hospedadoras u otras moléculas asociadas a su entorno *in situ*. Los términos designan un grado de pureza que es de al menos aproximadamente un 75%, al menos aproximadamente un 80%, al menos aproximadamente un 85%, al menos aproximadamente un 90%, al menos aproximadamente un 95% o al menos aproximadamente un 98% o más.

30 **[0026]** Los términos “cuerpos de inclusión” o “cuerpos refringentes” designan las masas intracelulares densas del polipéptido de interés agregado, que constituyen una porción significativa de la proteína celular total, incluyendo todos los componentes celulares. En algunos casos, pero no en todos, estos agregados de polipéptido pueden reconocerse como puntos brillantes visibles dentro del contorno de las células con un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos.

35 **[0027]** Como se usa en la presente memoria, el término proteína “plegada erróneamente” designa polipéptidos precipitados o agregados que están contenidos en los cuerpos refringentes. Como se usa en la presente memoria, VEGF u otras HBP “insolubles” o “plegados erróneamente” designa VEGF precipitado o agregado que está contenido en el periplasma o espacio intracelular de células hospedadoras procarióticas, o que está asociado de otro modo a una célula hospedadora procariótica, y adopta una conformación biológicamente inactiva con puentes disulfuro no coincidentes o no formados. La HBP insoluble está contenida generalmente, pero no necesariamente, en los cuerpos refringentes, concretamente, puede ser visible o no con un microscopio de contraste de fases.

45 **[0028]** Como se usa en la presente memoria, “agente caotrópico” designa un compuesto que, en una concentración adecuada en disolución acuosa, es capaz de cambiar la configuración espacial o conformación de polipéptidos mediante alteraciones en la superficie de los mismos, de modo que se vuelve al polipéptido soluble en el medio acuoso. Las alteraciones pueden ocurrir, por ejemplo, cambiando el estado de hidratación, el entorno de disolvente o la interacción disolvente-superficie. La concentración de agente caotrópico afectará directamente a su potencia y eficacia. Una disolución caotrópica fuertemente desnaturizante contiene un agente caotrópico a altas concentraciones que, en disolución, desplegará eficazmente un polipéptido presente en la disolución, eliminando eficazmente la estructura secundaria de las proteínas. El desplegamiento será relativamente extenso, pero reversible. Una disolución caotrópica moderadamente desnaturizante contiene un agente caotrópico que, en concentraciones suficientes en disolución, permite el plegamiento parcial de un polipéptido desde cualquier conformación distorsionada que el polipéptido haya adoptado mediante intermedios solubles en disolución hasta la conformación espacial en que se encuentra cuando funciona en su forma activa en condiciones fisiológicas endógenas u homólogas. Los ejemplos de agentes caotrópicos incluyen clorhidrato de guanidina, urea e hidróxidos tales como hidróxido de sodio

o potasio. Los agentes caotrópicos incluyen una combinación de estos reactivos, tal como una mezcla de un hidróxido con urea o clorhidrato de guanidina.

[0029] Como se usa en la presente memoria, “agente reductor” designa un compuesto que, en concentración adecuada en disolución acuosa, mantiene los grupos sulfhidrilo libres de modo que se desestabilizan químicamente los puentes disulfuro intra- o intermoleculares. Los ejemplos representativos de agentes reductores adecuados incluyen ditioneitol (DTT), ditioneitol (DTE), β-mercaptoetanol (BME), cisteína, cisteamina, tioglicolato, glutation, tris-[2-carboxietil]fosfina (TCEP) y borohidruro de sodio.

[0030] Como se usa en la presente memoria, “disolución tamponada” designa una disolución que resiste cambios en el pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido/base.

[0031] Las “bacterias” con los fines de la presente memoria incluyen eubacterias y arqueobacterias. En ciertas realizaciones de la invención, se usan eubacterias, incluyendo bacterias grampositivas y gramnegativas, en los procedimientos y procesos descritos en la presente memoria. En una realización de la invención, se usan bacterias gramnegativas, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*. Los ejemplos de bacterias que pertenecen a las *Enterobacteriaceae* incluyen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia* y *Shigella*. Otros tipos de bacterias adecuadas incluyen *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla* y *Paracoccus*. En una realización de la invención, se usa *E. coli*. Los hospedadores *E. coli* adecuados incluyen *E. coli* W3110 (ATCC 27.325), *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B y *E. coli* X1776 (ATCC 31.537). Estos ejemplos son ilustrativos más que limitantes, y W3110 es un ejemplo. Pueden emplearse también células mutantes de cualquiera de las bacterias anteriormente mencionadas. Por supuesto, es necesario seleccionar las bacterias apropiadas teniendo en consideración la replicabilidad del replicón en las células de una bacteria. Por ejemplo, las especies *E. coli*, *Serratia* o *Salmonella* pueden usarse adecuadamente como hospedador cuando se usan plásmidos bien conocidos tales como pBR322, pBR325, pACYC177 o pKN410 para suministrar el replicón. Véase más adelante con respecto a ejemplos de células hospedadoras bacterianas adecuadas.

[0032] Como se usan en la presente memoria, las expresiones “célula”, “línea celular”, “cepa” y “cultivo celular” se usan intercambiamente y todas dichas denominaciones incluyen la progenie. Por tanto, las palabras “transformantes” y “células transformadas” incluyen la célula objeto primario y los cultivos derivados de la misma sin consideración del número de transferencias. Se entiende también que toda la progenie puede no ser exactamente idéntica en el contenido de ADN, debido a mutaciones deliberadas o inadvertidas. Se incluye la progenie mutante que tiene la misma función o actividad biológica que se cribó en la célula transformada originalmente. Cuando se pretendan denominaciones distintas, resultará claro a partir del contexto.

[0033] Como se usa en la presente memoria “polipéptido” designa en general péptidos y proteínas de cualquier fuente celular que tengan más de aproximadamente 10 aminoácidos. Los polipéptidos “heterólogos” son aquellos polipéptidos extraños a la célula hospedadora que se esté utilizando, tales como una proteína humana producida por *E. coli*. Aunque el polipéptido heterólogo puede ser procariótico o eucariótico, es preferiblemente eucariótico, más preferiblemente mamífero, y lo más preferiblemente humano. En ciertas realizaciones de la invención, es un polipéptido producido recombinantemente o recombinante.

Proteínas de unión a heparina

Aislamiento de proteína de unión a heparina

[0034] Se aísla proteína de unión a heparina (HBP) soluble plegada erróneamente a partir de células hospedadoras procarióticas que expresan la proteína mediante cualquiera de una serie de técnicas estándares. Por ejemplo, se aísla la HBP insoluble en un tampón de aislamiento adecuado exponiendo las células a un tampón de fuerza iónica adecuada para solubilizar la mayoría de proteínas hospedadoras, pero en que la proteína objeto sea sustancialmente insoluble, o desestabilizando las células de modo que liberen los cuerpos de inclusión o la proteína desde el espacio periplasmático o intracelular y los pongan a disposición para recuperación, por ejemplo, mediante centrifugación. Esta técnica es bien conocida y se describe, por ejemplo, en la patente de

EE.UU. nº 4.511.503. Kleid y col. dan a conocer la purificación de cuerpos refringentes mediante homogeneización seguida de centrifugación (Kleid y col., (1984) en "Developments in Industrial Microbiology", (Society for Industrial Microbiology, Arlington, VA) 25: 217-235). Véase también, por ejemplo, Fischer y col., (1993) Biotechnology and Bioengineering 41: 3-13.

5

[0035] La patente de EE.UU. nº 5.410.026 describe un procedimiento típico para la recuperación de proteína a partir de cuerpos de inclusión y se resume a continuación. Se suspenden las células procarióticas en un tampón adecuado. Típicamente, el tampón consiste en un agente de tamponación adecuado para tamponar a entre pH 5 y 9, o aproximadamente 6 y 8, y una sal. Es útil cualquier sal adecuada, incluyendo NaCl, para mantener una fuerza iónica suficiente en la disolución tamponada. Típicamente, se emplea una fuerza iónica de aproximadamente 0,01 a 2 M, o de 0,1 a 0,2 M. Se desestabilizan o lisan las células, suspendidas en este tampón, usando técnicas empleadas comúnmente tales como, por ejemplo, procedimientos mecánicos, por ejemplo, homogeneizador (prensa de Manton-Gaulin, microfluidizador o Niro-Soavi), prensa de French, molino de bolas u oscilador ultrasónico, o mediante procedimientos químicos o enzimáticos.

1.0

1.5

[0036] Los ejemplos de procedimientos químicos o enzimáticos de desestabilización celular incluyen esferoplastia, que conlleva el uso de lisozima para lisar la pared bacteriana (H. Neu y col., (1964) Biochem. Biophys. Res. Comm., 17: 215) y choque osmótico, que implica el tratamiento de células viables con una disolución de alta tonicidad y con un lavado con agua fría de baja tonicidad para liberar los polipéptidos (H. Neu y col., 1965 J. Biol. Chem., 240(9): 3685-3692). La sonicación se usa generalmente para la desestabilización de bacterias contenidas en volúmenes a escala analítica de caldo de fermentación. A mayores escalas, se usa típicamente la homogenización a alta presión.

2.0

2.5

[0037] Después de desestabilizar las células, se centrifuga típicamente la suspensión a baja velocidad, generalmente de aproximadamente 500 a 15.000 x g, por ejemplo, en una realización de la invención se usan aproximadamente 12.000 x g, en una centrifuga estándar, durante un tiempo suficiente para sedimentar sustancialmente toda la proteína insoluble. Dichos tiempos pueden determinarse sencillamente y dependen del volumen que se esté centrifugando así como del diseño de la centrifuga. Típicamente, es suficiente con aproximadamente 10 minutos a 0,5 horas para sedimentar la proteína insoluble. En una realización, la suspensión se centrifuga a 12.000 x g durante 10 minutos.

3.0

3.5

[0038] El sedimento resultante contiene sustancialmente toda la fracción de proteína insoluble. Si el proceso de desestabilización celular no es completo, el sedimento puede contener también células intactas o fragmentos de células rotas. Puede ensayarse la completitud de la desestabilización celular resuspendiendo el sedimento en una pequeña cantidad de la misma disolución tampón y examinando la suspensión con un microscopio de contraste de fases. La presencia de fragmentos de células rotas o células enteras indica que es necesaria una sonicación adicional, u otro medio de desestabilización, para retirar los fragmentos o células y los polipéptidos no refringentes asociados. Después de dicha desestabilización, si es necesario, se centrifuga de nuevo la suspensión y se recupera el sedimento, se resuspende y se reexamina. Se repite el proceso hasta que el examen visual revela la ausencia de fragmentos de células rotas en el material sedimentado o hasta que el tratamiento adicional no consigue reducir el tamaño del sedimento resultante.

4.0

4.5

[0039] El proceso anterior puede emplearse si la proteína insoluble es intracelular o está en el espacio periplasmático. Las condiciones dadas en la presente memoria para aislar proteína de unión a heparina están dirigidas a cuerpos de inclusión precipitados en el espacio periplasmático o espacio intracelular, y se refieren en particular a VEGF según la invención. Sin embargo, se cree que los procesos y procedimientos son aplicables a proteínas de unión a heparina en general con modificaciones menores como se observan a lo largo del siguiente texto. En ciertas realizaciones de la invención, los procesos y procedimientos son aplicables para fabricación o producción a escala industrial, replegamiento y purificación de la HBP.

5.0

5.5

Replegamiento de proteínas de unión a heparina

[0040] Se incuba la proteína de unión a heparina plegada erróneamente insoluble aislada en una primera disolución tamponada que contiene una cantidad de agente caotrópico y agente reductor

suficiente para solubilizar sustancialmente la proteína de unión a heparina. Esta incubación tiene lugar en condiciones de concentración, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permitan la solubilización de parte o sustancialmente toda la proteína de unión a heparina, y para que ocurra el despliegamiento.

5

[0041] La medida del grado de solubilización en la disolución tamponada puede determinarse sencillamente y se lleva a cabo adecuadamente, por ejemplo, mediante la determinación de la turbidimetría, analizando el fraccionamiento entre el sobrenadante y el sedimento después de la centrifugación, en geles de PAGE-SDS reducido, mediante ensayo de proteína (por ejemplo, el ensayo de proteína con reactivo de Bradford (por ejemplo, Pierce, Bio-Rad etc.)), o mediante HPLC.

1.0

[0042] La primera disolución tamponada comprende un agente de tamponación adecuado para mantener el intervalo de pH al menos a aproximadamente 7,0, siendo el intervalo típico de 7,5-10,5. En una realización, el pH para el VEGF es de pH 8,0. Los ejemplos de tampones adecuados que proporcionarán un pH en este último intervalo incluyen TRIS-HCl (tris[hidroximetil]aminometano), HEPPS (ácido *N*-[2-hidroxi-etil]piperazin-*N'*-[3-propanosulfónico]), HEPES (ácido *N*-[2-hidroxi-etil]piperazin-*N'*-[2-etanosulfónico]), CAPSO (ácido 3-[ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propanosulfónico), AMP (2-amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico), CHES (ácido 2-[*N*-ciclohexilamino]etanosulfónico), glicina y acetato de sodio. En una realización de la invención, el tampón en la presente memoria es HEPPS a aproximadamente pH 8,0. En una realización adicional, los tampones, por ejemplo tales como HEPPS, están sulfatados.

1.5

2.0

[0043] Los agentes caotrópicos adecuados para la práctica de esta invención incluyen, por ejemplo, urea y sales de guanidina o tiocianato, por ejemplo, urea, clorhidrato de guanidina, tiocianato de sodio, etc. La cantidad de agente caotrópico que es necesario que esté presente en el tampón es una cantidad suficiente para desplegar la HBP en disolución. En ciertas realizaciones de la invención, está presente un caotrópico a aproximadamente entre 4 y 10 M. En una realización, el agente caotrópico es urea a aproximadamente 5-8 M, o a aproximadamente 7 M. En otro ejemplo, el agente caotrópico es clorhidrato de guanidina a aproximadamente 6-8 M.

2.5

3.0

[0044] Los ejemplos de agentes reductores adecuados incluyen, pero sin limitación, ditiotritol (DTT), ditioeritritol (DTE), β-mercaptoetanol (BME), cisteína, DTE, etc. La cantidad de agente reductor que está presente en el tampón dependerá principalmente del tipo de agente reductor y de agente caotrópico, del tipo y pH del tampón empleado, de la cantidad de oxígeno atrapado o introducido en la disolución y de la concentración de proteína en el tampón. Por ejemplo, con 0,5-1,5 mg/ml de proteína en una disolución tamponada a pH 7,0-10,0 que contiene urea 4-8 M, el agente reductor es, por ejemplo, DTT a una concentración de aproximadamente 1-15 mM o BME a una concentración de aproximadamente 0,2-2 mM o cisteína a una concentración de aproximadamente 2-10 mM. En una realización, el agente reductor es DTT a aproximadamente 0,5 a aproximadamente 4 mM, o 2-4 mM. La **Figura 9** ilustra el efecto de urea y DTT sobre la extracción de VEGF. VEGF del pico 3 designa VEGF biológicamente activo plegado apropiadamente. En una realización, el agente reductor es DTT aproximadamente 10 mM. Puede usarse un solo agente reductor o una combinación de agentes reductores en un tampón de la presente memoria.

3.5

4.0

4.5

[0045] La concentración de proteína en la disolución tamponada debe ser tal que la proteína se solubilice sustancialmente como se determina mediante la densidad óptica. La cantidad exacta a emplear dependerá, por ejemplo, de las concentraciones y tipos de los demás ingredientes en la disolución tamponada, particularmente la concentración de proteína, agente reductor y pH del tampón. En una realización de la invención, la concentración de proteína de unión a heparina está en el intervalo de 0,5-5,5 mg por ml, o de 1,5-5,0 mg/ml. La solubilización se lleva a cabo típicamente a aproximadamente 0-45°C, o a aproximadamente 20-40°C, o a aproximadamente 23-37°C, o a aproximadamente 25-37°C, o a aproximadamente 25°C durante al menos aproximadamente 1 a 24 horas. En una realización, la solubilización se lleva a cabo durante al menos aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente. Típicamente, la temperatura no está afectada aparentemente por los niveles de sal, agente reductor y agente caotrópico.

5.0

5.5

[0046] Después de solubilizar el polipéptido, se dispone o diluye en una segunda disolución tamponada que contiene el agente caotrópico y un agente polianiónico sulfatado como se describe anteriormente, sin embargo, a una concentración de agente caotrópico que permita el replegamiento

de la proteína de unión a heparina.

5 **[0047]** Las condiciones de esta segunda incubación de la proteína soluble plegada erróneamente serán generalmente tales que tenga lugar un replegamiento parcial o sustancial o completo de la proteína. Las condiciones exactas dependerán, por ejemplo, de pH del tampón y de los tipos y concentraciones de agentes polianiónicos sulfatos y de los agentes caotrópicos y reductores presentes, si los hubiera. La temperatura de incubación es generalmente de aproximadamente 0-40°C o 10-40°C, y la incubación se llevará a cabo generalmente durante al menos aproximadamente 1 h para efectuar el replegamiento. En ciertas realizaciones, la reacción se lleva a cabo, por ejemplo, a 1.0 aproximadamente 15-37°C, o a 20-30°C, durante al menos aproximadamente 6 horas, durante al menos aproximadamente 10 horas o a entre aproximadamente 10 y 48 horas, o a entre aproximadamente 15 y 20 horas, o a entre 6 y 20 horas, o a entre 12 y 24 horas.

1.5 **[0048]** Se determina adecuadamente el grado de replegamiento mediante valoración por radioinmunoensayo (RIA) de la HPB o mediante análisis de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) usando, por ejemplo, una columna POROS HE2/M (PerSeptive BioResearch Products) u otra columna de afinidad por heparina apropiada. El aumento del valor de RIA o del tamaño de pico de HBP plegada correctamente se correlaciona directamente con las cantidades crecientes de HPB plegada correctamente biológicamente activa presentes en el tampón. La incubación se lleva a cabo para maximizar la relación de HPB plegada correctamente a HPB plegada erróneamente recuperada, como se determina mediante RIA o HPLC.

2.5 **[0049]** En una realización, se valora la calidad y cantidad de VEGF plegado apropiadamente usando un ensayo de unión a heparina. Se cargan muestras que contienen la proteína de unión a heparina diluida, por ejemplo, en una columna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA) u otra columna de afinidad por heparina adecuada. Por ejemplo, se equilibra la columna de afinidad por heparina con fosfato de sodio 10 mM, pH 7, que contiene cloruro de sodio 0,15 M. A un caudal de 1 ml/min o 2 ml/min, se eluye la columna usando un gradiente lineal de cloruro de sodio 0,15-2 M en fosfato de sodio 10 mM, pH 7, durante 10 minutos. Se controla el eluyente a 280 nm. En una realización, se recupera la proteína en un solo pico correspondiente a la HBP replegada apropiadamente biológicamente activa. En una realización de la invención, es un ensayo para determinar la HBP replegada apropiadamente la HPLC-FI. Los enlaces disulfuro pueden confirmarse opcionalmente mediante cartografía peptídica. Puede usarse también 3.5 difracción circular para determinar la estructura bi- y tridimensional/plegamiento.

4.0 **[0050]** El tampón de la segunda disolución tamponada puede ser cualquiera de los enumerados anteriormente para la primera disolución tamponada, por ejemplo, HEPES pH 8,0, por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 50 mM para replegar VEGF. El polipéptido puede diluirse con el tampón de replegamiento, por ejemplo al menos 5 veces o al menos aproximadamente 10 veces, aproximadamente 20 veces o aproximadamente 40 veces. Como alternativa, el polipéptido puede dializarse frente al tampón de replegamiento.

4.5 **[0051]** La segunda disolución tamponada contiene un agente caotrópico a una concentración tal que ocurra el replegamiento de la HPB. Generalmente, está presente un caotrópico a aproximadamente entre 0,5 y 2 M. En una realización de la invención, el agente caotrópico en la presente memoria es urea a aproximadamente 0,5-2 M o aproximadamente 1 M. En una realización, el agente caotrópico es urea a una concentración de aproximadamente 1,3 M. En otra realización de la invención, el agente caotrópico es clorhidrato de guanidina aproximadamente 1 M. La **Figura 10** ilustra el efecto de urea y el agente reductor DTT sobre el replegamiento de VEGF. VEGF del pico 3 designa 5.0 VEGF plegado apropiadamente biológicamente activo.

5.5 **[0052]** Como se observa, la disolución contiene opcionalmente también un agente reductor. El agente reductor se selecciona adecuadamente de aquellos descritos anteriormente para la etapa de solubilización en el intervalo de concentración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 10 mM para cisteína, 0,1-1,0 mM para DTT y/o menos de aproximadamente 0,2 mM para BME. En una realización de la invención, el agente reductor es DTT a aproximadamente 0,5-2 mM. En una realización de la invención, el agente reductor es DTT a aproximadamente 0,5 mM. Los ejemplos de agentes reductores adecuados incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, ditiotritol (DTT), β-mercaptopetanol (BME), cisteína, DTE, etc. Aunque que DTT y BME pueden usarse con respecto a los

procedimientos proporcionados en la presente memoria para proteínas de unión a heparina en general, es un ejemplo de recuperación de VEGF una combinación de cisteína de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 mM y DTT de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 mM como se describe en la presente memoria.

5

[0053] La etapa de replegamiento incluye un agente polianiónico sulfatado a una concentración suficiente para conseguir el replegamiento completo de la proteína solubilizada. Se describen anteriormente en la presente memoria ejemplos de agentes polianiónicos adecuados, por ejemplo, un derivado sulfato de un polisacárido como se observa anteriormente con agentes polianiónicos sulfatados tales como sulfato de heparina, sulfato de dextrano, sulfato de heparina y sulfato de condroitina, así como fragmentos de heparina sulfatada. Para los sulfatos de heparina, los pesos moleculares son generalmente de entre aproximadamente 3.000 y 10.000 Da, o de entre aproximadamente 3.000 y 6.000 Da.

10

15

[0054] En una realización de la invención, se emplea sulfato de dextrano en el contexto de la invención. El peso molecular del agente polianiónico sulfatado u otros tales como sulfato de dextrano empleados en la invención depende del tamaño de la proteína de unión a heparina particular que se esté recuperando. Generalmente, se emplea sulfato de dextrano de entre aproximadamente 3.000 y 10.000 Da. En una realización de la invención, se usa sulfato de dextrano de entre aproximadamente 5.000 Da y 10.000 Da, por ejemplo, para la recuperación de VEGF. En otra realización, se usa un sulfato de dextrano a entre aproximadamente 5.000 Da y 8.000 Da para la recuperación de HBP. Las **Figuras 3A-3D** muestran la recuperación de VEGF con diversas concentraciones y pesos moleculares de sulfato de dextrano (**Figuras 3A-C**) y heparina (**Figura 3D**) analizada mediante cromatografía de afinidad por heparina. El pico 3 corresponde a VEGF plegado apropiadamente.

20

25

[0055] La concentración del compuesto polianiónico empleado depende de la proteína que se esté recuperando y de su concentración y de condiciones tales como temperatura y pH del tampón de replegamiento. Las concentraciones típicas están entre aproximadamente 50 y 500 mM para sulfato de sodio, entre aproximadamente 10 y 200 µg/ml para heparinas de bajo peso molecular tales como heparina de 6.000 Da (Sigma Chemical Co.), entre aproximadamente 10 y 200 µg/ml para heparinas de alto peso molecular tales como heparina I-A porcina (Sigma Chemical Co.) y entre aproximadamente 10 y 400 µg/ml o entre aproximadamente 10 y 200 µg/ml para sulfatos de dextrano.

30

35

[0056] El tampón de replegamiento puede contener opcionalmente agentes adicionales tales como cualquiera de una variedad de detergentes no iónicos tales como TRITON™ X-100, NONIDET™ P-40, la serie TWEEN™ y la serie BRIJ™. El detergente no iónico está presente a aproximadamente entre 0,01% y 1,0%. En un ejemplo, las concentraciones de detergente no iónico están entre aproximadamente 0,025% y 0,05%, o aproximadamente 0,05%.

40

45

50

[0057] Opcionalmente, pueden estar presentes en el tampón de replegamiento aminoácidos cargados positivamente, por ejemplo, arginina (por ejemplo, L-arginina/HCl), lisina, etc. En ciertas realizaciones de la invención, la concentración de arginina es, por ejemplo, de aproximadamente 0-1000 mM, o de aproximadamente 25 a 750 mM, o de aproximadamente 50-500 mM, o de aproximadamente 50-250 mM, o de aproximadamente 100 mM de concentración final, etc. En ciertas realizaciones de la invención, la proteína está en una disolución tampón a pH 7,0-9,0 que contiene urea 0,5-3 M, sulfato de dextrano 0-30 mg/l, Triton X-100 0-0,2%, cisteína 2-15 mM, DTT 0,1-1 mM y arginina 0-750 mM de concentración final. En una realización, se usa HEPPS 50 mM. En una realización, la concentración final de la disolución tampón de replegamiento es urea 1 M, HEPPS 50 mM, sulfato de dextrano 15 mg/ml, 0,05% de Triton X-100, cisteína 7,5 mM, arginina 100 mM, pH 8,0. En una realización, la concentración final de la disolución tampón de replegamiento es urea 1,3 M, HEPPS 50 mM, sulfato de dextrano 15 mg/l, 0,05% de Triton X-100, cisteína 7,5 mM, DTT 0,5 mM, arginina 100 mM, pH 8,0.

55

Recuperación y purificación de proteínas de unión a heparina

[0058] Aunque la recuperación y purificación de proteína de unión a heparina a partir de medios de cultivo puede emplear diversos procedimientos conocidos para la separación de dichas proteínas tales como, por ejemplo, fraccionamiento salino y con disolvente, adsorción con materiales coloidales, filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad,

5 cromatografía de inmunoafinidad, electroforesis y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), se describe un ejemplo de un procedimiento cromatográfico de cuatro etapas que comprende poner en contacto dicha proteína de unión a heparina replegada con un soporte cromatográfico de hidroxapatito, un primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, un soporte cromatográfico catiónico y un segundo soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte. Como alternativa, se describe otro procedimiento cromatográfico que comprende poner en contacto dicha proteína de unión a heparina replegada con un soporte de intercambio catiónico, un soporte cromatográfico de interacción hidrófoba y un soporte cromatográfico de intercambio iónico, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte. Se contempla que las etapas de cada procedimiento pueden efectuarse en cualquier orden. En una realización de la invención, se efectúan secuencialmente las etapas.

15 **[0059]** Una primera etapa adecuada en la recuperación y purificación adicional de la proteína de unión a heparina proporciona característicamente la concentración de la proteína de unión a heparina y la reducción del volumen de muestra. Por ejemplo, la segunda etapa de incubación descrita anteriormente puede dar como resultado un gran aumento del volumen de proteína de unión a heparina recuperada y una dilución simultánea de la proteína en el tampón de replegamiento. Los primeros soportes cromatográficos adecuados proporcionan una reducción de volumen de proteína de unión a heparina recuperada y pueden proporcionar ventajosamente cierta purificación de la proteína de proteínas contaminantes indeseadas. Las primeras etapas cromatográficas adecuadas incluyen soportes cromatográficos que pueden eluirse y cargarse directamente en un soporte cromatográfico de interacción hidrófoba. Por ejemplo, se usan soportes cromatográficos de los que puede eluirse proteína de unión a heparina con alta concentración de sal adecuada para cargar un soporte cromatográfico de interacción hidrófoba.

25 **[0060]** Los primeros soportes cromatográficos ejemplares incluyen, pero sin limitación, soportes cromatográficos de hidroxapatito, por ejemplo, cerámica CHT de tipo I y tipo II (anteriormente conocido como cerámica MacroPrep), Bio-Gel HT, Bio-Gel HTP, Biorad, Hercules, CA, etc.; soportes cromatográficos quelantes de metal constituidos por una resina inerte de iones metálicos inmovilizados tales como cobre, níquel, etc.; así como geles de sílice no derivatizados. En una realización de la invención, los primeros soportes cromatográficos para la purificación y recuperación de VEGF son soportes cromatográficos de hidroxapatito. En otra realización de la invención, los primeros soportes cromatográficos para la purificación y recuperación de VEGF son soportes de intercambio catiónico, por ejemplo, descritos a continuación con más detalle.

35 **[0061]** Se logra la elución del primer soporte cromatográfico según prácticas estándares en la técnica. Las condiciones de elución y los tampones adecuados facilitarán la carga de la HPB eluida directamente en el primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba como se describe a continuación.

40 **[0062]** La cromatografía de interacción hidrófoba es bien conocida en la técnica e implica la interacción de las porciones hidrófobas de la molécula que interaccionan con los ligandos hidrófobos unidos a los "soportes cromatográficos". Un ligando hidrófobo acoplado con una matriz se designa diversamente como un soporte cromatográfico de HIC, gel de HIC o columna de HIC y similares. Se aprecia adicionalmente que la fuerza de la interacción entre la proteína y la columna de HIC no es solo una función de la proporción de superficies no polares a polares en la proteína, sino de la distribución de las superficies no polares también.

50 **[0063]** Pueden emplearse una serie de matrices en la preparación de columnas de HIC. La usada más extensamente es agarosa, aunque pueden usarse sílice y resinas poliméricas orgánicas. Los ligandos hidrófobos útiles incluyen, pero sin limitación, grupos alquilo que tienen de aproximadamente 2 a aproximadamente 10 átomos de carbono, tales como butilo, propilo u octilo, o grupos arilo tales como fenilo. Pueden obtenerse comercialmente soportes de HIC convencionales para geles y columnas a partir de suministradores tales como de GE Healthcare, Uppsala, Suecia con los nombres de producto butil-SEPHAROSE™, fenil-SEPHAROSE™ CL-4B, octil-SEPHAROSE™ FF y fenil-SEPHAROSE™ FF y de Tosoh Corporation, Tokio, Japón, con los nombres de producto TOYOPEARL™-butilo 650M (Fractogel TSK Butyl-650) o TSK-GEL fenil 5PW. En una realización, la purificación y recuperación de VEGF es en un primer soporte cromatográfico de HIC que es butilagarosa y un segundo soporte cromatográfico hidrófobo que es fenilagarosa. En otra realización,

el primer soporte cromatográfico de HIC es fenilagarosa.

- 5 **[0064]** La densidad de ligando es un parámetro importante en el que influye no solo la fuerza de la interacción de la proteína, sino la capacidad de la columna también. La densidad de ligando de los geles de fenilo u octilfenilo comercialmente disponibles es del orden de 5-40 $\mu\text{mol/ml}$ de lecho de gel. La capacidad de gel es una función de la proteína particular en cuestión, así como del pH, temperatura y concentración salina, pero puede esperarse generalmente que entre en el intervalo de 3-20 mg/ml de gel.
- 10 **[0065]** La elección del gel particular puede determinarse por el experto en la técnica. En general, la fuerza de la interacción de la proteína y el ligando de HIC aumenta con la longitud de cadena de los ligandos alquilo, pero los ligandos que tienen de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 átomos de carbono son adecuados para la mayoría de separaciones. Un grupo fenilo tiene aproximadamente la misma hidrofobicidad que un grupo pentilo, aunque la selectividad puede ser diferente debido a la posibilidad de interacción pi-pi con los grupos aromáticos de la proteína.
- 15 **[0066]** La adsorción de la proteína a una columna de HIC está favorecida por la alta concentración salina, pero la concentración real puede variar en un amplio intervalo dependiendo de la naturaleza de la proteína y del ligando de HIC particular elegido. En general, son útiles concentraciones salinas de entre aproximadamente 1 y 4 M.
- 20 **[0067]** La elución de un soporte de HIC, tanto por etapas o en forma de gradiente, puede lograrse en una variedad de modos tales como a) cambiando la concentración salina, b) cambiando la polaridad del disolvente o c) añadiendo detergentes. Al reducir las concentraciones salinas, se eluyen las proteínas adsorbidas para aumentar la hidrofobicidad. Los cambios de polaridad pueden efectuarse mediante adiciones de disolventes tales como etilenglicol o isopropanol, reduciendo así la fuerza de las interacciones hidrófobas. Los detergentes funcionan como desplazadores de proteínas y se han usado principalmente en relación con la purificación de proteínas de membrana.
- 25 **[0068]** Pueden unirse diversos constituyentes aniónicos a matrices para formar soportes catiónicos para cromatografía. Los constituyentes aniónicos incluyen carboximetilo, grupos sulfoetilo, grupos sulfopropilo, fosfato y sulfonato (S). Las resinas de intercambio iónico celulósicas tales como SE52, SE53, SE92, CM32, CM52, CM92, P11, DE23, DE32, DE52, EXPRESS ION™ S y EXPRESS ION™ C están disponibles en Whatman LTD, Maidstone Kent R.U. Los intercambiadores iónicos basados en SEPHADEX™ y SEPHAROSE™ y reticulados son también conocidos con los nombres de producto CM SEPHADEX™ C-25, CM SEPHADEX™C-50 y SP SEPHADEX™ C-25 SP SEPHADEX™ C-50 y SP-SEPHAROSE™ High Performance, SP-SEPHAROSE™ Fast Flow, SP-SEPHAROSE XL, CM-SEPHAROSE™ Fast Flow y CM-SEPHAROSE™, CL-6B, todos disponibles en GE Healthcare. Los ejemplos de intercambiadores iónicos para la práctica de la invención incluyen, pero sin limitación, por ejemplo, intercambiadores iónicos con los nombres de producto MACROPREP™ tales como, por ejemplo, soporte MACROPREP™ S, soporte MACROPREP™ High S y soporte MACROPREP™ CM de BioRad, Hercules, CA.
- 30 **[0069]** La elución de soportes cromatográficos catiónicos se logra generalmente aumentando las concentraciones salinas. Debido a que la elución de columnas iónicas implica la adición de sal y debido a que, como se ha mencionado, la HIC tiene una concentración salina potenciada, se usa opcionalmente la introducción de la etapa de HIC después de la etapa iónica u otra etapa salina. En una realización de la invención, una etapa cromatográfica de intercambio catiónico precede a la etapa de HIC.
- 35 **[0070]** Se describen ejemplos de procedimientos para purificar VEGF a continuación en la presente memoria, por ejemplo, véanse los Ejemplos V y VI. Después del replegamiento, se retira el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se carga entonces el conjunto clarificado en hidroxipatito cerámico (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrado con HEPPS 5 mM/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Se retira la proteína no unida lavando con tampón de equilibrado y se eluye el VEGF usando una etapa isocrática de HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. Se carga el conjunto de VEGF en una columna de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15
- 40 **[0070]** Se describen ejemplos de procedimientos para purificar VEGF a continuación en la presente memoria, por ejemplo, véanse los Ejemplos V y VI. Después del replegamiento, se retira el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se carga entonces el conjunto clarificado en hidroxipatito cerámico (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrado con HEPPS 5 mM/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Se retira la proteína no unida lavando con tampón de equilibrado y se eluye el VEGF usando una etapa isocrática de HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. Se carga el conjunto de VEGF en una columna de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15
- 45 **[0070]** Se describen ejemplos de procedimientos para purificar VEGF a continuación en la presente memoria, por ejemplo, véanse los Ejemplos V y VI. Después del replegamiento, se retira el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se carga entonces el conjunto clarificado en hidroxipatito cerámico (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrado con HEPPS 5 mM/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Se retira la proteína no unida lavando con tampón de equilibrado y se eluye el VEGF usando una etapa isocrática de HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. Se carga el conjunto de VEGF en una columna de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15
- 50 **[0070]** Se describen ejemplos de procedimientos para purificar VEGF a continuación en la presente memoria, por ejemplo, véanse los Ejemplos V y VI. Después del replegamiento, se retira el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se carga entonces el conjunto clarificado en hidroxipatito cerámico (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrado con HEPPS 5 mM/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Se retira la proteína no unida lavando con tampón de equilibrado y se eluye el VEGF usando una etapa isocrática de HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. Se carga el conjunto de VEGF en una columna de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15
- 55 **[0070]** Se describen ejemplos de procedimientos para purificar VEGF a continuación en la presente memoria, por ejemplo, véanse los Ejemplos V y VI. Después del replegamiento, se retira el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se carga entonces el conjunto clarificado en hidroxipatito cerámico (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrado con HEPPS 5 mM/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Se retira la proteína no unida lavando con tampón de equilibrado y se eluye el VEGF usando una etapa isocrática de HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. Se carga el conjunto de VEGF en una columna de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con HEPPS 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15

M/pH 8. Se lava la columna con tampón de equilibrado y se recoge el VEGF en el efluente de columna. Se carga el conjunto de butil-SEPHAROSE™ en una columna Macro Prep High S (BioRad, Hercules, CA) que está equilibrada con HEPES 50 mM/pH 8. Después de reducir por lavado la absorbancia del efluente a 280 nm hasta el valor de referencia, se lava la columna con dos volúmenes de columna de HEPES 50 mM/cloruro de sodio 0,25 M/pH 8. Se eluye el VEGF usando un gradiente lineal de 8 volúmenes de columna de cloruro de sodio 0,25-0,75 M en HEPES 50 mM/pH 8. Se recogen las fracciones y se combinan aquellas con VEGF apropiadamente plegado, como se determina mediante un ensayo de unión a heparina.

1.0 **[0071]** El conjunto de Macro Prep High S se acondiciona con un volumen igual de HEPES 50 mM/citrato de sodio 0,8 M/pH 7,5. Se carga entonces el conjunto acondicionado en una columna de fenil-5PW TSK (Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA) que está equilibrada con HEPES 50 mM/citrato de sodio 0,4 M/pH 7,5. Después de lavar la proteína no unida a la columna con tampón de equilibrado, se eluye el VEGF de la columna usando un gradiente de 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 0,4-0 M en HEPES 50 mM, pH 7,5. Se ensayan las fracciones mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS y se combinan aquellas que contienen VEGF de suficiente pureza.

Expresión de proteína de unión a heparina en células hospedadoras

2.0 **[0072]** Brevemente, se introducen en la célula hospedadora vectores de expresión capaces de replicación autónoma y expresión de proteína respecto al genoma de la célula procariótica hospedadora. La construcción de vectores de expresión apropiados es bien conocida en la técnica, incluyendo las secuencias nucleotídicas de las proteínas de unión a heparina descritas en la presente memoria. Véanse, por ejemplo, Sambrook y col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nueva York) (2001); Ausubel y col., "Short Protocols in Molecular Biology, Current Protocols" John Wiley and Sons (Nueva Jersey) (2002) y Baneyx, (1999) Current Opinion in Biotechnology, 10: 411-421. Están comercialmente disponibles vectores de expresión en células procarióticas apropiadas, incluyendo bacterias, por ejemplo en la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para el crecimiento a gran escala de células procarióticas, y especialmente el cultivo de células bacterianas, y estos procedimientos pueden usarse en el contexto de la invención.

3.5 **[0073]** Por ejemplo, se transfectan células hospedadoras procarióticas con vectores de expresión o clonación que codifican la proteína de unión a heparina de interés y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas. El ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés es adecuadamente ARN, ADNc o ADN genómico de cualquier fuente, a condición de que codifique el polipéptido o polipéptidos de interés. Son bien conocidos los procedimientos para seleccionar el ácido nucleico apropiado para la expresión de polipéptidos heterólogos (incluyendo variantes de los mismos) en hospedadores microbianos. Las moléculas de ácido nucleico que codifican el polipéptido se preparan mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se aísla y secuencia un ADN que codifica VEGF, por ejemplo, usando sondas oligonucleotídicas que son capaces de unirse específicamente al gen que codifica VEGF.

4.5 **[0074]** Se inserta adecuadamente el ácido nucleico heterólogo (por ejemplo, ADNc o ADN genómico) en un vector replicable para expresión en el microorganismo bajo el control de un promotor adecuado. Están disponibles muchos vectores con este fin, y la selección del vector apropiado dependerá principalmente del tamaño del ácido nucleico para insertar en el vector y de la célula hospedadora particular para transformar con el vector. Cada vector contiene diversos componentes dependiendo de la célula hospedadora particular con la que sea compatible. Dependiendo del tipo particular de hospedador, los componentes del vector incluyen generalmente, pero sin limitación, uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

5.5 **[0075]** En general, se usan vectores plasmídicos que contienen secuencias de replicación y de control que derivan de especies compatibles con la célula hospedadora con respecto a los hospedadores microbianos. El vector porta normalmente un sitio de replicación, así como secuencias marcadoras que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas. Por

ejemplo, *E. coli* se transforma típicamente usando pBR322, un plásmido derivado de una especie de *E. coli* (véase, por ejemplo, Bolivar y col., (1977) Gene, 2: 95). pBR322 contiene genes para resistencia a ampicilina y tetraciclina y por tanto proporciona un medio sencillo para identificar células transformadas. El plásmido pBR322, u otro plásmido o fago bacteriano, contiene también
5 generalmente, o está modificado para contener, promotores que pueden usarse por el hospedador para la expresión de los genes de marcador seleccionable.

(i) Secuencia señal

1.0 **[0076]** Los polipéptidos de la invención pueden producirse recombinantemente no solo de forma directa, sino también como polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es típicamente una secuencia señal u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada típicamente es aquella que es reconocida y procesada (concretamente, escindida por una peptidasa
1.5 señal) por la célula hospedadora. Para células hospedadoras procarióticas que no reconocen y procesan la secuencia señal del polipéptido nativo, se sustituye la secuencia señal por una secuencia señal procariótica seleccionada, por ejemplo, del grupo de secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, 1pp y enterotoxina II termoestable.

2.0 (ii) Componente de origen de replicación

[0077] Los vectores de expresión contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita que el vector se replique en una o más células hospedadoras seleccionadas. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de microbios. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado
2.5 para la mayoría de bacterias gramnegativas tales como *E. coli*.

(iii) Componente de gen de selección

3.0 **[0078]** Los vectores de expresión contienen generalmente un gen de selección, denominado también un marcador seleccionable. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o el crecimiento de células hospedadoras transformantes crecidas en un medio de cultivo selectivo. Las células hospedadoras no transformadas con el vector que contiene el gen de selección no sobrevivirán en el medio de cultivo. Este marcador seleccionable está separado de los marcadores genéticos como se utilizan y definen por esta invención. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a)
3.5 confieren resistencia a antibióticos u otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, (b) complementan deficiencias auxotróficas distintas de las causadas por la presencia del marcador o marcadores genéticos, o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica D-alanina racemasa de bacilos.

4.0 **[0079]** Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula hospedadora. En este caso, aquellas células que se transforman exitosamente con el ácido nucleico de interés producen un polipéptido que confiere resistencia a fármacos y por tanto sobrevive al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina (Southern y col., (1982) J. Molec. Appl. Genet., 1: 327), ácido micofenólico (Mulligan y col.,
4.5 (1980) Science 209: 1422) o higromicina (Sugden y col., (1985) Mol. Cell. Biol., 5: 410-413). Los tres ejemplos dados anteriormente emplean genes bacterianos bajo control eucariótico para transmitir resistencia al fármaco apropiado G418 o neomicina (genética), xgpt (ácido micofenólico) o higromicina, respectivamente.

5.0 (iv) Componente de promotor

[0080] El vector de expresión para producir la proteína de unión a heparina de interés contiene un promotor adecuado que es reconocido por el organismo hospedador y está ligado operativamente con el ácido nucleico que codifica el polipéptido de interés. Los promotores adecuados para uso con
5.5 hospedadores procarióticos incluyen los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa (Chang y col., (1978) Nature, 275: 615; Goeddel y col., (1979) Nature, 281: 544), el sistema promotor de arabinosa (Guzmán y col., (1992) J. Bacteriol., 174: 7716-7728), fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (trp) (Goeddel, (1980) Nucleic Acids Res., 8: 4057 y documento EP 36.776) y promotores híbridos tales como el promotor tac (deBoer y col., (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80: 21-25). Sin

embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Sus secuencias nucleotídicas se han publicado, posibilitando así al experto ligarles operativamente con ADN que codifica el polipéptido de interés (Siebenlist y col., (1980) Cell, 20: 269) usando ligadores o adaptadores para suministrar cualquier sitio de restricción necesario. Véanse también, por ejemplo, Sambrook y col., supra y Ausubel y col., supra.

[0081] Los promotores para uso en sistemas bacterianos contienen generalmente también una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) ligada operativamente con el ADN que codifica el polipéptido de interés. El promotor puede retirarse del ADN fuente bacteriano mediante digestión con enzima de restricción e insertarse en el vector que contiene el ADN deseado.

(v) Construcción y análisis de vectores

[0082] La construcción de vectores adecuados que contienen uno o más de los componentes anteriormente enumerados emplea técnicas de ligamiento estándares. Los plásmidos aislados o fragmentos de ADN se escinden, ajustan y religan en la forma deseada para generar los plásmidos necesarios: Para el análisis para confirmar las secuencias correctas en los plásmidos construidos, se usan mezclas de ligamiento para transformar *E. coli* K12 cepa 294 (ATCC 31.446) u otras cepas, y se seleccionan los transformantes exitosos mediante resistencia a ampicilina o tetraciclina cuando sea apropiado. Se preparan plásmidos a partir de los transformantes, se analizan mediante digestión con endonucleasa de restricción y/o se secuencian mediante el procedimiento de Sanger y col., (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74: 5463-5467 o Messing y col., (1981) Nucleic Acids Res., 9: 309, o mediante el procedimiento de Maxam y col., (1980) Methods in Enzymology, 65: 499. Véanse también, por ejemplo, Sambrook y col., supra y Ausubel y col., supra.

[0083] El ácido nucleico que codifica la proteína de unión a heparina de interés se inserta en las células hospedadoras. Típicamente, esto se logra transformando las células hospedadoras con los vectores de expresión anteriormente descritos y cultivando en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir los diversos promotores.

Cultivo de células hospedadoras

[0084] Las células procarióticas adecuadas para uso para expresar las proteínas de unión a heparina de interés son bien conocidas en la técnica. Se usan típicamente células hospedadoras que expresan la proteína recombinante abundantemente en forma de cuerpos de inclusión o en el espacio periplasmático o intracelular. Los procariotas adecuados incluyen bacterias, por ejemplo, eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, *E. coli*, bacilos tales como *B. subtilis*, especies de *Pseudomonas* tales como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* o *Serratia marcescens*. Es un ejemplo de hospedador de *E. coli* la *E. coli* 294 (ATCC 31.446). Son también adecuadas otras cepas tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes. La cepa W3110 es un hospedador típico porque es una cepa hospedadora común para fermentaciones de producto de ADN recombinante. En un aspecto de la invención, la célula hospedadora debería secretar cantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por ejemplo, la cepa W3110 puede modificarse para efectuar una mutación genética en los genes que codifican proteínas, incluyendo los ejemplos de dichos hospedadores *E. coli* W3110 cepas 1A2, 27A7, 27B4 y 27C7 descritos en la patente de EE.UU. n° 5.410.026, expedida el 25 de abril de 1995. Por ejemplo, es una cepa para la producción de VEGF la *E. coli* cepa W3110 que tiene el genotipo *tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 degP41 ilvG* designado 49B3. En otro ejemplo, es una cepa para la producción de VEGF *E. coli* cepa (62A7) que tiene el genotipo *ΔfhuA (ΔtonA) ptr3, lacI^d, lacL8, ΔompT Δ(nmpC-fepE) ΔdegP ilvG⁺*. Véase también, por ejemplo, la tabla que abarca las páginas 23-24 del documento W02004/092393.

[0085] Las células procarióticas usadas para producir la proteína de unión a heparina de interés se cultivan en medios conocidos en la técnica y adecuados para el cultivo de las células hospedadoras seleccionadas, incluyendo los medios descritos en general por Sambrook y col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nueva York) (2001). Los medios que son adecuados para bacterias incluyen, pero sin limitación, medio AP5, caldo nutriente, caldo Luria-Bertani (LB), medio mínimo de Neidhardt y medio mínimo o completo C.R.A.P., más los complementos nutrientes necesarios. En ciertas realizaciones, los medios

contienen también un agente de selección, elegido basándose en la construcción del vector de expresión, para permitir selectivamente el crecimiento de células procarióticas que contienen el vector de expresión. Por ejemplo, se añade ampicilina a los medios para el crecimiento de células que expresan el gen de resistencia a ampicilina. Puede incluirse también cualquier complemento necesario

5 además de fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato inorgánico a las concentraciones apropiadas, introducidos, solo o como mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. Opcionalmente, el medio de cultivo puede contener uno o más agentes reductores seleccionados del grupo consistente en glutatión, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditiotritol y ditiotritol.

1.0

[0086] Se dan ejemplos de medios adecuados en las patentes de EE.UU. nº 5.304.472 y 5.342.763. Los medios limitantes de fosfato C.R.A.P. consisten en 3,57 g de $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$, 0,71 g de citrato de sodio-2 H_2O , 1,07 g de KCl, 5,36 g de extracto de levadura (certificado), 5,36 g de HycaseSF™-Sheffield, de pH ajustado con KOH a 7,3, volumen cs ajustado a 872 ml con H_2O desionizada y sometido a autoclave; enfriado a 55°C y complementado con 110 ml de MOPS 1 M pH

1.5 7,3, 11 ml de glucosa al 50% y 7 ml de MgSO_4 1 M). Puede añadirse entonces carbenicilina al cultivo de inducción a una concentración de 50 µg/ml.

2.0

[0087] Se cultivan las células hospedadoras procarióticas a temperaturas adecuadas. Para el crecimiento de *E. coli*, por ejemplo, la temperatura está en el intervalo de, por ejemplo, aproximadamente 20°C a aproximadamente 39°C, o de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C, o aproximadamente 30°C.

2.5

[0088] Cuando se emplea el promotor de fosfatasa alcalina, se cultivan las células de *E. coli* usadas para producir el polipéptido de interés de esta invención en medios adecuados en que el promotor de fosfatasa alcalina pueda inducirse parcial o completamente como se describe en general, por ejemplo, en Sambrook y col., "Molecular Cloning, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nueva York) (2001). El cultivo nunca tiene que tener lugar en ausencia de fosfato inorgánico o a niveles de privación de fosfato. Inicialmente, el medio contiene fosfato inorgánico en una cantidad superior al nivel de inducción de la síntesis de proteína y suficiente para el crecimiento de la bacteria. A medida que las células crecen y utilizan fosfato, reducen el nivel de fosfato en el medio, causando así la inducción de la síntesis de polipéptido.

3.0

3.5

[0089] Si el promotor es un promotor inducible, para que ocurra inducción, se cultivan típicamente las células hasta conseguir una cierta densidad óptica, por ejemplo, una A_{550} de aproximadamente 200 usando un proceso de alta densidad celular, en cuyo punto se inicia la inducción (por ejemplo, mediante la adición de un inductor, la privación de un componente del medio, etc.) para inducir la expresión del gen que codifica el polipéptido de interés.

4.0

4.5

[0090] Puede incluirse también cualquier complemento necesario a las concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica, introducido solo o como mezcla con otro complemento o medio tal como una fuente de nitrógeno compleja. El pH del medio puede ser cualquier pH de aproximadamente 5-9, dependiendo principalmente del organismo hospedador. Para *E. coli*, el pH es, por ejemplo, de aproximadamente 6,8 a aproximadamente 7,4, o de aproximadamente 7,0.

Formulaciones de proteínas de unión a heparina

5.0

5.5

[0091] El polipéptido recuperado, por ejemplo usando los procedimientos descritos en la presente memoria, puede formularse en un portador farmacéuticamente aceptable y se usa para diversos usos de diagnóstico, terapéutico u otros conocidos para dichas moléculas. Por ejemplo, el VEGF descrito en la presente memoria puede usarse en inmunoensayos, tales como inmunoensayos enzimáticos. Se contemplan también los usos terapéuticos para las proteínas de unión a heparina obtenidas usando los procedimientos descritos en la presente memoria. Por ejemplo, puede usarse un factor de crecimiento u hormona, por ejemplo VEGF, para potenciar el crecimiento como se desee. Por ejemplo, puede usarse VEGF para promover la curación de heridas, por ejemplo, de una herida aguda (por ejemplo, quemadura, herida quirúrgica, herida normal, etc.) o una herida crónica (por ejemplo, úlcera diabética, úlcera de presión, úlcera de decúbito, úlcera venosa, etc.), para promover el crecimiento del cabello, para promover el crecimiento y reparación de tejido (por ejemplo, óseo,

hepático, etc.), etc.

5 **[0092]** Las formulaciones terapéuticas de proteínas de unión a heparina se preparan para
almacenamiento mezclando una molécula, por ejemplo un polipéptido, que tenga el grado deseado de
pureza con portadores, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales
10 (“Remington’s Pharmaceutical Sciences” 18ª edición, Gennaro, A. Ed. (1995)), en forma de
formulaciones liofilizadas o disoluciones acuosas. Los portadores, excipientes o estabilizantes
aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e
incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido
15 ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de
hexametonio, cloruro de benzalconio, cloruro de bencenotio, fenol, alcohol butílico o bencilico,
alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-
cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menor de aproximadamente 10 restos); proteínas tales
como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona;
20 aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos,
disacáridos y otros carbohidratos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales
como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de
sal tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o tensioactivos
no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

25 **[0093]** En ciertas realizaciones, las formulaciones para usar en administración *in vivo* son
estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. La
HBP puede almacenarse en forma liofilizada o como disolución acuosa o en forma de gel. El pH de las
preparaciones de HBP puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 5 a 8, aunque pueden ser
también apropiados valores de pH mayores o menores en ciertos casos. Se entenderá que el uso de
ciertos excipientes, portadores o estabilizantes puede dar como resultado la formación de sales de la
HBP.

30 **[0094]** Típicamente para la curación de heridas, la HBP se formula para suministro específico
de sitio. Cuando se aplica por vía tópica, la HBP se combina adecuadamente con otros ingredientes
tales como portadores y/o coadyuvantes. No hay limitaciones sobre la naturaleza de dichos otros
ingredientes, excepto que deben ser farmacéuticamente aceptables y eficaces para su administración
pretendida, y no pueden degradar significativamente la actividad de los ingredientes activos de la
35 composición. Los ejemplos de vehículos adecuados incluyen ungüentos, cremas, geles,
pulverizaciones o suspensiones, con o sin colágeno purificado. Las composiciones pueden estar
también impregnadas en apósitos estériles, parches transdérmicos, esparadrapos y vendas,
opcionalmente en forma líquida o semilíquida.

40 **[0095]** Para obtener una formulación de gel, la HBP formulada en una composición líquida
puede mezclarse con una cantidad eficaz de polisacárido o polímero sintético hidrosoluble tal como
polietilenglicol, formando un gel de la viscosidad apropiada para aplicarse por vía tópica. El
polisacárido que puede usarse incluye, por ejemplo, derivados de celulosa tales como derivados de
45 celulosa eterificados, incluyendo alquilcelulosas, hidroxialquilcelulosas y alquilhidroxialquilcelulosas,
por ejemplo, metilcelulosa, hidroxietilcelulosa, carboximetilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa e
hidroxipropilcelulosa; almidón y almidón fraccionado; agar; ácido alginico y alginatos; goma arábica;
pululano; agarosa; carragenina; dextranos; dextrinas; fructanos; inulina; mananos; xilanos; arabinanos;
quitosanos; glucógenos; glucanos y biopolímeros sintéticos, así como gomas tales como goma
50 xantana, goma guar, goma de algarrobbillo, goma arábica, goma de tragacanto y goma karaya y
derivados y mezclas de los mismos. En ciertas realizaciones de la invención, el agente gelificante en
la presente memoria es aquel que es, por ejemplo, inerte ante sistemas biológicos, no tóxico, sencillo
de preparar y/o no demasiado fluido o viscoso, y no desestabilizará la HBP mantenida en él.

55 **[0096]** En ciertas realizaciones, el polisacárido es un derivado de celulosa eterificado, en otra
realización, es uno bien definido, purificado y listado en la USP, por ejemplo, metilcelulosa y derivados
de hidroxialquilcelulosa tales como hidroxipropilcelulosa, hidroxietilcelulosa e
hidroxipropilmetilcelulosa. En una realización, el polisacárido es metilcelulosa. Si se emplea
metilcelulosa en el gel, por ejemplo, comprende típicamente aproximadamente un 2-5%, o
aproximadamente un 3% o aproximadamente un 4% o aproximadamente un 5% del gel, y la HBP está
presente en una cantidad de aproximadamente 300-1000 mg/ml de gel.

[0097] El polietilenglicol útil para gelificación es típicamente una mezcla de polietilenglicoles de alto y bajo peso molecular para obtener la viscosidad apropiada. Por ejemplo, una mezcla de un polietilenglicol de peso molecular 400-600 con uno de peso molecular 1500 sería eficaz con este fin cuando se mezclaran en la relación apropiada obteniendo una pasta.

[0098] El término "hidrosoluble" como se aplica a los polisacáridos y polietilenglicoles se pretende que incluya disoluciones y dispersiones coloidales. En general, la solubilidad de los derivados de celulosa está determinada por el grado de sustitución de grupos éter, y los derivados estabilizantes útiles en la presente memoria deberían tener una cantidad suficiente de dichos grupos éter por unidad de anhidroglucosa en la cadena de celulosa para volver los derivados hidrosolubles. Es generalmente suficiente un grado de sustitución éter de al menos 0,35 grupos éter por unidad de anhidroglucosa. Adicionalmente, los derivados de celulosa pueden estar en forma de sales de metales alcalinos, por ejemplo, sales de Li, Na, K o Cs.

[0099] Los ingredientes activos pueden atraparse también en microcápsulas o preparaciones de liberación prolongada. Véase, por ejemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences" 18ª edición, Gennaro, A. Ed. (1995). Véanse también Johnson y col., Nat. Med., 2: 795-799 (1996); Yasuda, Biomed. Ther., 27: 1221-1223 (1993); Hora y col., Bio/Technology, 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polyglycolide Microsphere Systems," en "Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach", Powell and Newman, eds, (Plenum Press: Nueva York, 1995), pág. 439-462; los documentos WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399; patente de EE.UU. n° 5.654.010; DE 3.218.121; Epstein y col., (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688-3692; Hwang y col., (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 40304034; EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; solicitud de patente japonesa 83-118008; patentes de EE.UU. n° 4.485.045 y 4.544.545 y EP 102.324.

[0100] Los siguientes ejemplos se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación.

EJEMPLOS

EJEMPLO I: VEGF humano recombinante expresado en *Escherichia coli*

[0101] Se expresó VEGF humano recombinante en *Escherichia coli*. Durante la síntesis, se secretó la proteína en el espacio periplasmático y se acumuló como cuerpos refringentes. Se realizaron por lo tanto estudios para conseguir la extracción y replegamiento de la proteína. Estos estudios revelaron que se aislaban al menos 3 especies de VEGF (**Figura 1**) usando las técnicas de recuperación estándares sin la adición de un agente polianiónico. Los estudios con VEGF nativo mostraron que la adición de heparina aumentaba la resistencia a la desnaturalización inducida por caotrópicos y tiol (**Figura 2**). Además, la heparina aumentaba significativamente la cantidad de VEGF replegado apropiadamente en experimentos de replegamiento a pequeña escala. Para adaptar este resultado a un proceso a gran escala, se descubrieron las condiciones que permitían el replegamiento de VEGF en presencia de sulfato de dextrano, una molécula estructuralmente análoga a la heparina. La adición de sulfato de dextrano mejoró los rendimientos de VEGF biológicamente activo plegado apropiadamente 3-5 veces respecto a los controles.

Procedimientos

[0102] Plásmido para la expresión de VEGF₁₆₅- Se diseñó el plásmido pVEGF171 para la expresión de VEGF₁₆₅ humano (véase, por ejemplo, Leung y col., (1989) Science, 246: 1306-1309) en el periplasma de *E. coli*. Se dispuso la transcripción de la secuencia de codificación de VEGF bajo control estrecho del promotor de fosfatasa alcalina (AP) (véase, por ejemplo, Kikuchi y col., (1981) Nucleic Acids Research, 9: 5671-8), mientras que las secuencias necesarias para el inicio de la traducción se proporcionaron por la región Shine-Dalgarno de trp (véase, por ejemplo, Yanofsky y col., (1981) Nucleic Acids Research, 9: 6647-68). Se fusionó la secuencia de codificación de VEGF en dirección 3' de la secuencia señal de enterotoxina II termoestable bacteriana (STII) (véase, por ejemplo, Lee y col., (1983) Infect. Immun. 42: 264-8 y Picken y col., (1983) Infect. Immun. 42: 269-75) para la posterior secreción en el periplasma de *E. coli*. Las modificaciones de codón en la secuencia señal de STII proporcionaron un nivel de traducción ajustado, que dio como resultado un nivel óptimo

de acumulación de VEGF en el periplasma (véase, por ejemplo, Simmons y Yansura, (1996) Nature Biotechnology, 14: 629-34). El terminador transcripcional de lambda (véase, por ejemplo, Scholtissek y Grosse, (1987) Nucleic Acids Research 15: 3185) se localizó en dirección 3' del codón de terminación traduccional. El origen de replicación y ambos genes de resistencia a ampicilina y tetraciclina se proporcionaron por el plásmido pBR322. Véase, por ejemplo, Bolivar y col., (1977) Gene 2: 95-113.

[0103] Homogeneización celular y preparación de cuerpos refringentes- Se congelaron células recogidas de *Escherichia coli* y se almacenaron a -70°C . Se recogieron las células por centrifugación con BTUX (centrífuga, Alfa laval) y congelación usando BEPEX (congelador a gran escala). Se suspendieron las células en 5 volúmenes de HEPES 50 mM/NaCl 150 mM/EDTA 5 mM, pH 7,5 (5 l/kg de sedimento) y se homogeneizaron en un homogeneizador de laboratorio modelo 15 M Gaulin 15M (a pequeña escala) o M3 (gran escala) (Gaulin Corporation, Everett, MA). Se diluyó entonces la suspensión celular con un volumen igual del mismo tampón y se recogieron los cuerpos refringentes mediante centrifugación en una centrífuga de alimentación continua BTPX 205 (Alfa Laval Separation AB (Tumba, Suecia)). Como centrífuga a escala intermedia se usó SA1. Como alternativa, las células pueden homogeneizarse y el sedimento puede recogerse directamente sin congelación mediante BEPEX y rehidratación.

EJEMPLO II: Extracción y replegamiento de VEGF humano recombinante expresado en *Escherichia coli*-I

Procedimientos

[0104] Extracción y replegamiento- Se suspendió el sedimento refringente en tampón de extracción que contenía urea 7 M/HEPPS 50 mM/pH 8 (concentración final) a 5 l de tampón/kg de sedimento. Se añadió entonces ditiotreitól sólido a 3,7 g/kg sedimento para una concentración final de 4 mM. Véase, por ejemplo, la **Figura 9** para el efecto de urea y DTT sobre la extracción de VEGF. Se mezcló concienzudamente la suspensión durante 1-2 h a 20°C . El pH puede ajustarse con hidróxido de sodio al 50% (p/p) a pH 8,0. Se inició el replegamiento mediante la adición de 19 volúmenes de tampón de replegamiento por volumen de tampón de extracción. El tampón de replegamiento contenía HEPPS 50 mM/urea 1 M-2 M/cisteína 2-5 mM/0,05%-0,2% de TRITON™ X100/pH 8, concentración final. Véase, por ejemplo, la **Figura 10** para el efecto de la concentración de urea y DTT presente durante el replegamiento. Se añadió sulfato de dextrano, heparina o sulfato de sodio según se indica. Se realizó la incubación de replegamiento a temperatura ambiente durante 4-24 horas. Opcionalmente, la incubación puede realizarse a temperatura ambiente durante hasta aproximadamente 48 horas. Se controló el plegamiento mediante PAGE-SDS y/o HPLC de heparina. Se clarificó el producto mediante filtración profunda con un filtro Cuno 90SP seguida de filtración por $0,45\ \mu\text{m}$.

[0105] Ensayo HPLC de unión a heparina- Se determinó la calidad y cantidad del VEGF replegado apropiadamente usando una columna que contiene heparina inmovilizada. Se equilibró la columna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, HE2/M de PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA) con fosfato de sodio 10 mM, pH 7, que contenía cloruro de sodio 0,15 M. A un caudal de 1 ml/min, o 2 ml/min, se eluyeron las columnas usando un gradiente lineal de cloruro de sodio de 0,15 M a 2 M en tampón de equilibrado durante 10 min. En algunos ensayos, se realizó la elución en 16 min. Se controló el eluyente a 280 nm. Típicamente, eluyó la mayoría de proteína en el volumen vacío y pudieron identificarse tres clases de VEGF. Se identificó la especie de mayor afinidad y que eluye por último como VEGF plegado correctamente, y se identificó posteriormente como "VEGF de pico 3".

Resultados

[0106] La heparina protege al VEGF frente a la desnaturalización mediada por cisteína- La adición de cisteína 10 mM a VEGF nativo dio como resultado una gran reducción de la molécula plegada apropiadamente (**Figura 2**). Se evitó esta desnaturalización mediante la adición de 2 formas diferentes de heparina a concentraciones tan bajas como 20 mM.

TABLA Ia
Efecto de heparina y sulfato de dextrano sobre el replegamiento de VEGF

Adición	Concentración (µg/ml)						Aumento en %	Aumento en veces
	0	10	55	100	200	400		
<u>Aumento</u>								
Ninguno	5,3*						-	-
Heparina de bajo PM (3 kDa)		12,2	14,2	14,8	14,1		179%	2,8
Heparina de alto PM (6 kDa)		15,3	16,6	13,9	15,3		213%	3,1
Sulfato de dextrano (10 kDa)		15,9	15,4	13,6	7,4	8,3	191%	2,9

Los valores en la tabla son la cantidad de VEGF de pico 3 formada (en mg) por g de sedimento refringente. La concentración de cada adición es como se indica. *Control medio (5,6+5,0= 5,3)

5 TABLA Ib
Efecto del sulfato de sodio sobre el replegamiento de VEGF

Adición	Concentración (µg/ml)						Aumento en %	Aumento en veces
	0	50	98	195	293	455		
<u>Aumento</u>								
Ninguno	5,3						-	-
Sulfato de sodio		6,9	9,1	10,4	10,9	10,4	106%	2,1

Los valores en la tabla son la cantidad de VEGF de pico 3 formada (en mg) por g de sedimento refringente. La concentración de sulfato de sodio es como se indica

TABLA II
Efecto de heparinas y sulfato de dextrano sobre el replegamiento de VEGF

Adición	Concentración (µg/ml)					Aumento en %	Aumento en veces
	0	2,5	12,5	50	100		
Ninguna	2,2					-	-
Sulfato de dextrano (5 kDa)		10,1	13,7	13,4	11,2	523%	6,2
Sulfato de dextrano (8 kDa)		9,9	17,2	14,0	12,9	682%	7,8
Sulfato de dextrano (10 kDa)		13,8	19,2	14,6	10,1	773%	8,7
Heparina de bajo PM (3 kDa)		10,4	16,9	14,7		668%	7,7
Heparina de alto PM (6 kDa)		14,1	18,8	20,2		818%	9,2

Los valores en la tabla son la cantidad de VEGF de pico 3 formada (en mg) por g de sedimento refringente

10 Sumario

15 **[0107]** La heparina y el sulfato de dextrano aumentan los rendimientos de replegamiento- Debido a las propiedades protectoras frente a la desnaturalización descritas anteriormente, se investigó el efecto de varias formas diferentes de polímeros sulfatados sobre el replegamiento de VEGF. Como se observa en la TABLA Ia (y en la **Fig. 5**), ambas formas de bajo y alto peso molecular de la heparina aumentaban el rendimiento de VEGF replegado aproximadamente 3 veces. Como se observa en la TABLA Ib (y en la **Figura 6**), el sulfato de sodio aumentaba el rendimiento de VEGF replegado aproximadamente 2 veces. La forma de 10 kDa de sulfato de dextrano era también eficaz para aumentar los rendimientos de replegamiento; sin embargo, el intervalo de mayor concentración investigado condujo a la inhibición por sustrato. Investigaciones adicionales demostraron que las formas de 5 kDa, 8 kDa y 10 kDa de sulfato de dextrano aumentaban todas significativamente el rendimiento del VEGF en el replegamiento (TABLA II). Véase la **Figura 7**. Véase también la **Figura 8**.

25 **EJEMPLO III:** Efecto de diferentes tampones y TRITON™ X- 100 sobre la recuperación de VEGF

Resultados

[0108]

<u>Tampón</u>	<u>VEGF (mg/g de sedimento)</u>
HEPES, pH 8	13,3
HEPES, pH 8 con TRITON™	14,3
HEPPS, pH 8	16,6
TrisHCl, pH 8	16,6
HEPES, pH 7,2	9,1
HEPPS, pH 7,2	10,7
HEPES, pH 8	10,3
HEPPS, pH 8	12,8
HEPES, pH 8 + TRITON™ X-100	12,4
HEPPS, pH 8 + TRITON™ X-100	13,9

5 Sumario

[0109] Los datos combinados de los ejemplos I, II y III demuestran una mejora significativa (2-5 veces) del rendimiento al incluir sulfatos de heparina o sulfatos de dextrano cuando se repliega VEGF, un factor de crecimiento de unión a heparina, así como de las condiciones de recuperación. Este procedimiento se ha ejecutado exitosamente a escala industrial. Se espera que este procedimiento sea aplicable en el repliegamiento de otros factores de crecimiento básicos y otras proteínas que se unen a heparina.

EJEMPLO IV: Extracción y repliegamiento de VEGF humano recombinante expresado en *Escherichia coli*-II

15 Procedimientos

[0110] Extracción y repliegamiento- Se suspendió el sedimento refringente en tampón de extracción en que la concentración final era urea 7 M, DTT 2-30 mM (por ejemplo, DTT 10 mM), HEPPS 50 mM/pH 7-9 (por ejemplo, pH 8) a 5 l de tampón/kg de sedimento. Se mezcló concienzudamente la suspensión durante 1-2 h a temperatura ambiente. Se inició el repliegamiento mediante la adición de 19 volúmenes de tampón de repliegamiento por volumen de tampón de extracción. El tampón de repliegamiento contenía como concentración final urea 1 M o 1,3 M, cisteína 2-15 mM (por ejemplo, cisteína 7,5 mM), DTT 0,5 mM, arginina 0-0,75 M (por ejemplo, arginina 100 mM), sulfato de dextrano 15 mg/l, HEPPS 50 mM, 0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Véase, por ejemplo, la **Figura 12** para el efecto sobre el repliegamiento en presencia de aminoácidos cargados, en que la adición de histidina producía el mismo efecto que sin aditivos aminoacídicos. Se realizó la incubación de repliegamiento a temperatura ambiente durante 12-24 horas. Opcionalmente, la incubación puede realizarse a temperatura ambiente durante hasta aproximadamente 48 horas. Opcionalmente, puede añadirse aire u oxígeno durante el proceso de repliegamiento (0,3-1 cm³/min/l). Se controló el plegamiento mediante PAGE-SDS y/o HPLC de heparina. Se clarificó el producto mediante filtración profunda con un filtro Cuno 90SP seguida de filtración por 0,45 µm.

[0111] La dilución global de las etapas de extracción y repliegamiento fue de 1:100. Aumentar la dilución global de las etapas de extracción y repliegamiento, por ejemplo, a 1:100 a 1:200, aumentó la cantidad total de VEGF activo, aunque la concentración sea menor. Véase la **Figura 13**.

[0112] Puede determinarse la eficacia del repliegamiento determinando la cantidad de dímero/monómero, en que los monómeros pueden determinarse mediante una columna de HPLC en fase inversa C18 y la formación de dímeros puede determinarse mediante cromatografía en columna de heparina o ensayo de cromatografía de intercambio catiónico SP-5PW.

EJEMPLO V: Repliegamiento a gran escala

[0113] Para ensayar la escalabilidad de las condiciones de repliegamiento optimizadas, se realizaron estudios para examinar la cinética de repliegamiento a escala pequeña (0,1 l), intermedia (1 l) y de planta piloto (250 l a 400 l). Como se muestra en la **Figura 4**, la cinética de repliegamiento a

gran escala era indistinguible de las escalas menores y el valor final de VEGF replegado aumentaba ligeramente. Estos datos demuestran la escalabilidad del replegamiento con sulfato de dextrano. Se clarificó adicionalmente el producto mediante filtración profunda con un filtro Cuno 90SP seguido de filtración de 0,45 µm.

5

EJEMPLO VI: Purificación I de rhVEGF después de replegamiento

[0114] Cromatografía de hidroxapatito cerámico MacroPrep- Después del replegamiento, se retiró el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se cargó entonces el conjunto clarificado en una columna de hidroxapatito cerámico (35D x 31H= 30L) (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrada con HEPES 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. Se retiró la proteína no unida mediante lavado con tampón de equilibrado y se eluyó el VEGF usando una etapa isocrática de HEPES 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. El caudal era de 120 cm/h. Se determinaron las fracciones de combinación mediante análisis por HPLC de heparina de las fracciones.

1.0

1.5

[0115] Cromatografía de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow- Se cargó el conjunto de VEGF sobre una columna de butil-SEPHAROSE™ Fast Flow (35 D x 26 H=25L) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) equilibrada con HEPES 50 mM/0,05% de TRITON™ X100/fosfato de sodio 0,15 M/pH 8. El caudal era de 100 cm/h. Se lavó la columna con tampón de equilibrado y se recogió el VEGF en el efluente de columna. Se recogieron las fracciones y se combinaron las fracciones que contenían proteína, midiendo la A280 nm.

2.0

[0116] Cromatografía de Macro Prep High S- Se cargó el conjunto de butil-SEPHAROSE™ en una columna Macro Prep High S (30D x 39 H=27 L) (BioRad, Hercules, CA) que estaba equilibrada con HEPES 50 mM/pH 8. Después de reducir por lavado la absorbancia del efluente a 280 nm hasta el valor de referencia, se lavó la columna con dos volúmenes de columna de HEPES 50 mM/cloruro de sodio 0,25 M/pH 8. Se eluyó el VEGF usando un gradiente lineal de 8 volúmenes de columna de cloruro de sodio 0,25-0,75 M en HEPES 50 mM/pH 8. El caudal era de 75-200 cm/h. Se recogieron las fracciones y se combinaron aquellas que contenían VEGF plegado apropiadamente, como se determina mediante un ensayo de unión a heparina, por ejemplo, HPLC de heparina.

2.5

3.0

[0117] Cromatografía de fenil-5PW TSK- Se acondicionó el conjunto de Macro Prep High S con un volumen igual de HEPES 50 mM/citrato de sodio 0,8 M/pH 7,5. Se cargó entonces el conjunto acondicionado en una columna de fenil-5PW TSK (18D x 43 H= 11L) (Tosohaas, Montgomeryville, PA) que se equilibró con HEPES 50 mM/citrato de sodio 0,4 M/pH 7,5. Después de lavar la proteína no unida de la columna con tampón de equilibrado, se eluyó el VEGF de la columna usando un gradiente de 10 volúmenes de columna de citrato de sodio 0,4-0 M en HEPES 50 mM, pH 7,5. Se ensayaron las fracciones mediante electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS y se combinaron aquellas que contenían VEGF de suficiente pureza.

3.5

4.0

[0118] Ultrafiltración/diafiltración- Se ultrafiltró el VEGF combinado en membrana de celulosa regenerada de 5 kDa (G30619); Unit Pellicon; velocidad de alimentación 17,1 l/min. Se acondicionó la membrana con polisorbato 20. Se ultrafiltró el VEGF combinado a una concentración de 6 g/l (UF1). Se diafiltró la muestra con 7-14 DV (diavolúmenes) de succinato de sodio 5 mM/trehalosa 275 mM/pH 5,0. La formulación final era succinato de sodio 5 mM/trehalosa 275 mM/0,01% de polisorbato 20/pH 5,0, a una concentración de 5 mg/ml.

4.5

EJEMPLO VII: Purificación II de rhVEGF después de replegamiento

5.0

[0119] Cromatografía líquida de intercambio catiónico- Después del replegamiento, puede retirarse el material insoluble del conjunto mediante filtración profunda. Se acondiciona el conjunto replegado a pH 5,0-7,5 y aproximadamente 2 a 6,5 mS/cm. En una realización, se acondiciona el conjunto a pH 6,5 y 5 mS/cm. El conjunto replegado puede cargarse entonces en una columna de carga extrema de sulfopropilo (SPXL) y eluirse usando un gradiente de concentración salina creciente. Las fracciones de combinación pueden determinarse mediante análisis por HPLC de heparina de las fracciones.

5.5

[0120] Columna de interacción hidrófoba (HIC)- El conjunto de elución SPXL de VEGF puede

acondicionarse a 50mS/cm para cargar en una columna de cromatografía fenil-TSK (Tosohaas, Montgomeryville, PA). Se recogen las fracciones y se combinan las fracciones que contienen proteína.

- 5 **[0121]** IEX o modo mixto- El conjunto de fenil-TSK puede cargarse en una columna de cromatografía de intercambio iónico (IEX) o cromatografía de modo mixto. Se recogen las fracciones y se combinan aquellas que contienen VEGF plegado apropiadamente, como se determina mediante los ensayos descritos en la presente memoria.
- 1.0 **[0122]** Ultrafiltración/diafiltración- El VEGF combinado puede ultrafiltrarse en una membrana de celulosa regenerada de 5 kDa (G30619); Unit Pellicon; velocidad de alimentación 17,1 l/min. Por ejemplo, la membrana se acondiciona con polisorbato 20. Se ultrafiltra el VEGF combinado a una concentración de 6 g/l (UF1). Se diafiltra la muestra con 7-14 DV (diavolumenes) de succinato de sodio 5 mM/trehalosa 275 mM/pH 5,0.
- 1.5 **[0123]** En los procedimientos y procesos descritos en la presente memoria, puede valorarse la pureza y/o actividad finales mediante cartografía peptídica, cartografía de disulfuro, PAGE-SDS (tanto reducido como no reducido), dicroísmo circular, lisado de amebocito de Limulus (LAL), cromatografía de heparina, HPLC de heparina (por ejemplo, puede usarse HPLC de heparina para determinar la concentración de dímero de VEGF), cromatografía HPLC en fase inversa (fi) (por ejemplo, puede usarse la HPLC-FI para determinar la concentración de VEGF monomérico), unión a heparina, unión a receptor (por ejemplo, para VEGF, por ejemplo, la unión al receptor KDR de Bioanalytic R&D y/o la unión al receptor Flt1), análisis SEC, ensayos celulares, ensayos de potencia de HUVEC, ELISA con anticuerpos de VEGF, análisis de espectroscopia de masas, etc.
- 2.0
- 2.5 **[0124]** Se entiende que los depósitos, ejemplos y realizaciones descritos en la presente memoria son solo con fines ilustrativos y que sugerirán diversas modificaciones o cambios a la vista de los mismos a los expertos en la técnica.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para recuperar una proteína de unión a heparina a partir de un cultivo de células procarióticas, en el que dicha proteína de unión a heparina es el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que se une a heparina, comprendiendo el proceso las etapas de:
- 5 (a) aislar dicha proteína de unión a heparina del periplasma de dicho cultivo de células procarióticas;
- (b) desnaturalizar dicha proteína de unión a heparina en una primera disolución tamponada que comprende un agente caotrópico y un agente reductor;
- 10 (c) incubar dicha proteína de unión a heparina en una segunda disolución tamponada que comprende un agente caotrópico y un agente polianiónico sulfatado, en el que dicho agente polianiónico sulfatado es sulfato de dextrano o sulfato de sodio, durante un tiempo y en condiciones tales que ocurra el replegamiento de dicha proteína de unión a heparina; y
- 15 (d) recuperar dicha proteína de unión a heparina, en el que hay un aumento de aproximadamente 2 a 5 veces en la proteína de unión a heparina replegada en comparación con la incubación sin agente polianiónico sulfatado.
2. El proceso de la reivindicación 1, en el que el VEGF es VEGF₁₆₅.
- 20 3. El proceso de la reivindicación 1, en el que el sulfato de dextrano es de entre aproximadamente 3.000 Da y 10.000 Da.
4. El proceso de la reivindicación 1, en el que el sulfato de dextrano es de entre aproximadamente 8.000 y 10.000 Da.
- 25 5. El proceso de la reivindicación 1, en el que dichas primera y segunda disoluciones tamponadas comprenden HEPPS pH 8.0.
6. El proceso de la reivindicación 1, en el que la concentración de sulfato de sodio está entre aproximadamente 50 y 500 mM.
- 30 7. El proceso de la reivindicación 1, en el que dicha segunda disolución tamponada comprende adicionalmente
- (i) un agente reductor;
- 35 (ii) un detergente no iónico; y
- (iii) arginina y/o lisina.
8. El proceso de la reivindicación 7, en el que el agente reductor de la segunda disolución tamponada comprende una combinación de cisteína y DTT.
- 40 9. El proceso de la reivindicación 1, en el que dicha etapa de recuperación (d) comprende
- (i) poner en contacto secuencialmente dicha proteína de unión a heparina replegada con un soporte cromatográfico de hidroxapatito, un primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, un soporte cromatográfico catiónico y un segundo soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte, o
- 45 (ii) poner en contacto secuencialmente dicha proteína de unión a heparina con un soporte de intercambio catiónico, un soporte cromatográfico de interacción hidrófoba y un soporte cromatográfico de intercambio iónico, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte.
- 50 10. El proceso de la reivindicación 9(i), en el que dichos primer y segundo soportes cromatográficos de interacción hidrófoba se seleccionan del grupo constituido por resinas de butil-, propil-, octil- y arilagarosa.
- 55 11. El proceso de la reivindicación 9(i), en el que dicho primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba es un soporte de butilagarosa y dicho segundo soporte cromatográfico de interacción hidrófoba es una resina de soporte de fenilagarosa.
12. Un procedimiento para recuperar una proteína de unión a heparina a partir de un cultivo de células procarióticas, en el que dicha proteína de unión a heparina es el factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF) que se une a heparina, comprendiendo el procedimiento las etapas de:

(a) aislar dicha proteína de unión a heparina del periplasma de dicho cultivo de células procarióticas;

5 (b) desnaturalizar dicha proteína de unión a heparina aislada en una primera disolución tamponada que comprende un agente caotrópico y un agente reductor;

1.0 (c) incubar dicha proteína de unión a heparina desnaturalizada en una segunda disolución tamponada que comprende un agente caotrópico y un agente polianiónico sulfatado, en el que el agente polianiónico sulfatado es sulfato de dextrano o sulfato de sodio, durante un tiempo y en condiciones tales que ocurra el replegamiento de dicha proteína de unión a heparina, en el que hay un aumento de aproximadamente 2-5 veces de la proteína de unión a heparina replegada recuperada en comparación con incubar sin agente polianiónico sulfatado; y

1.5 (d) poner en contacto secuencialmente dicha proteína de unión a heparina replegada con (i) un soporte cromatográfico de hidroxapatito, un primer soporte cromatográfico de interacción hidrófoba y un segundo soporte cromatográfico de interacción hidrófoba, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte; o (ii) un soporte de intercambio catiónico, un soporte cromatográfico de interacción hidrófoba y un soporte cromatográfico de intercambio iónico, y eluir selectivamente la proteína de unión a heparina de cada soporte.

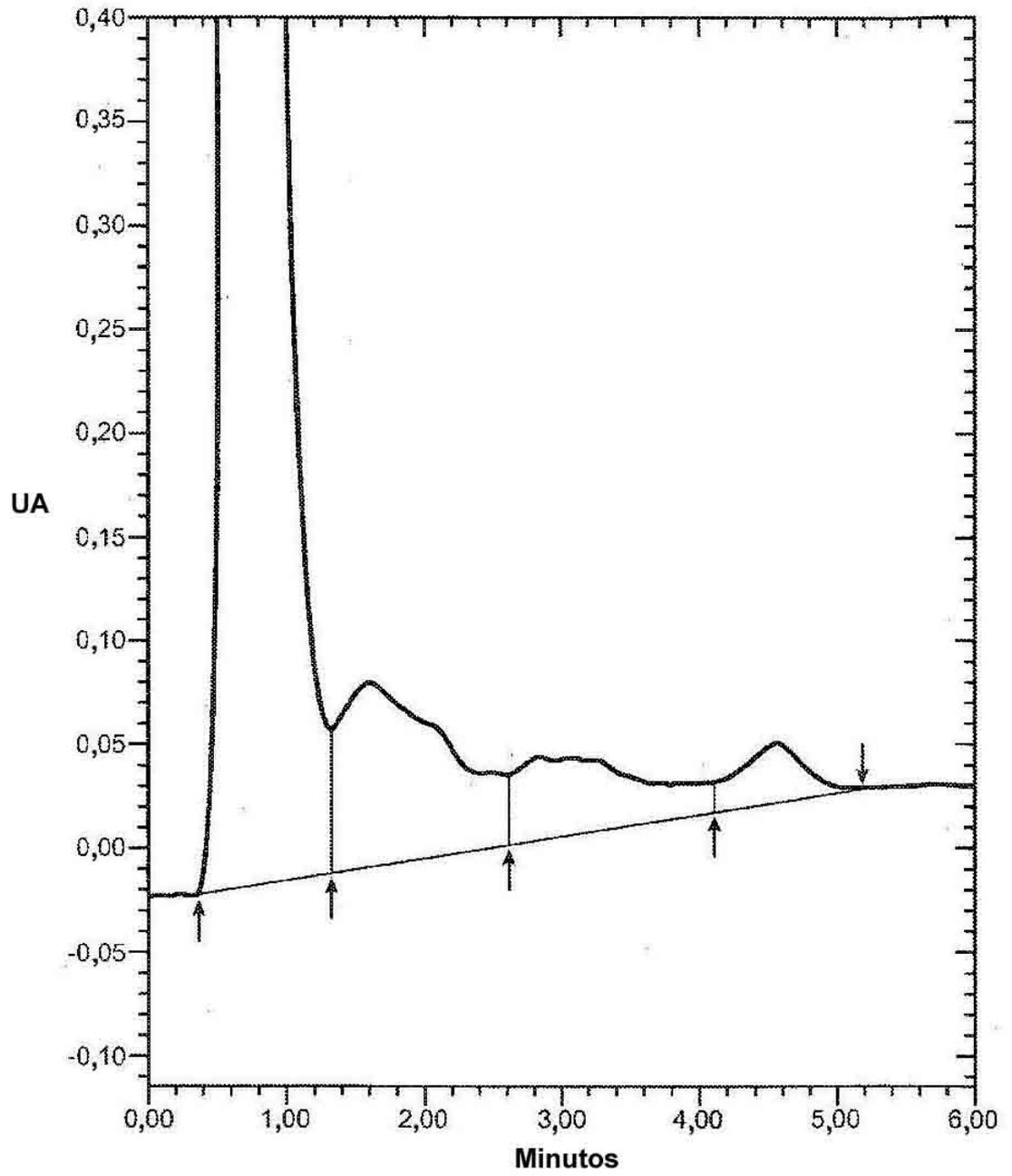
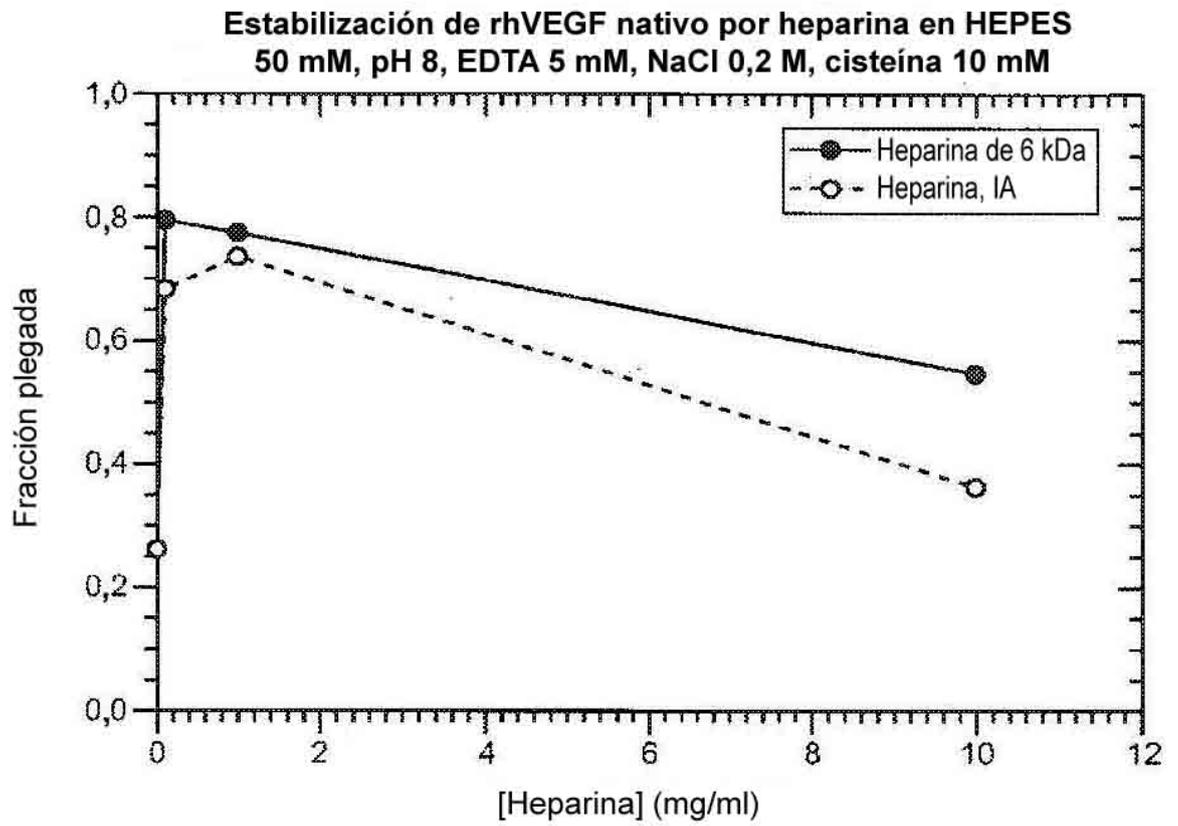


FIG. 1

**FIG. 2**

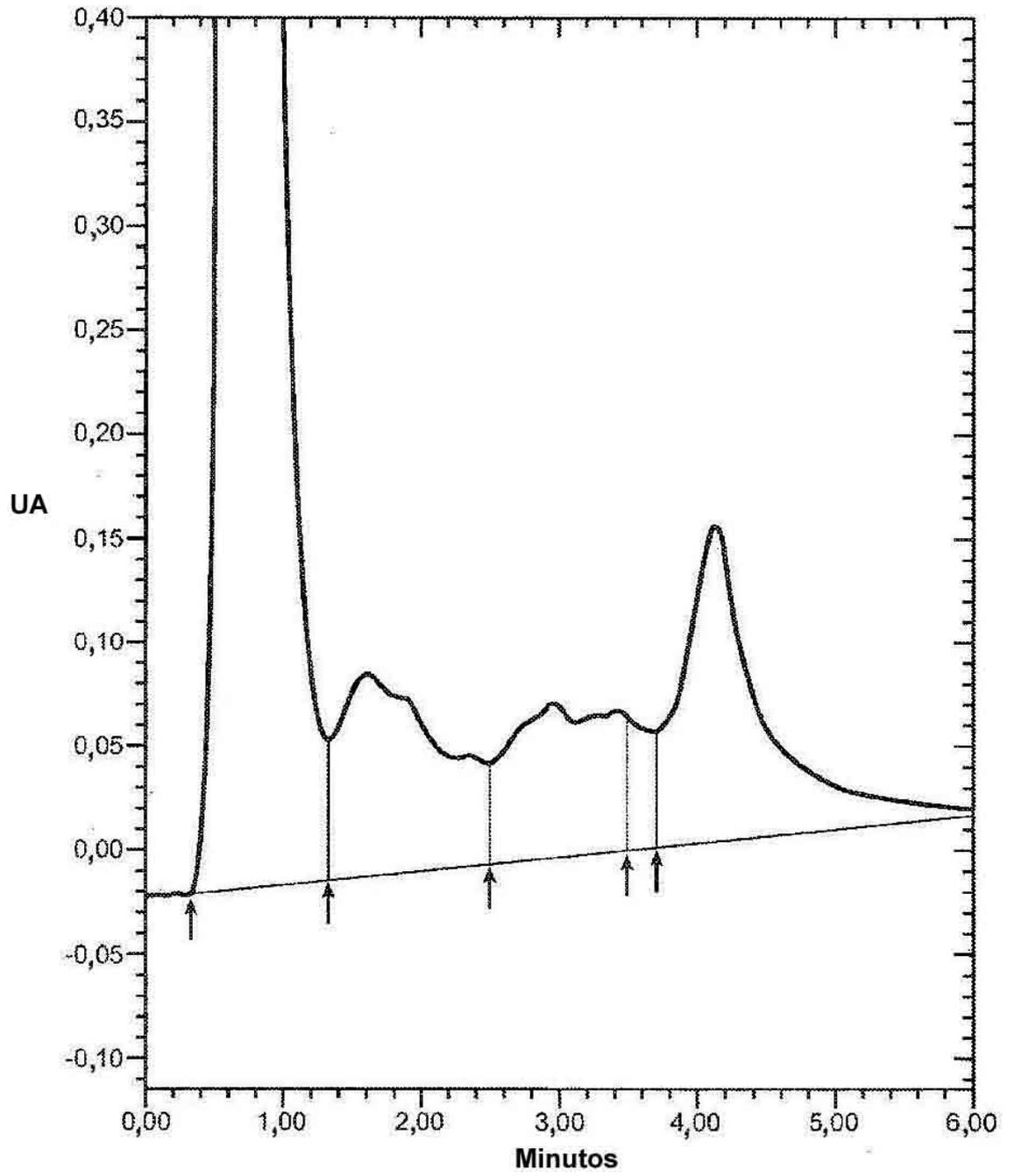


FIG. 3A

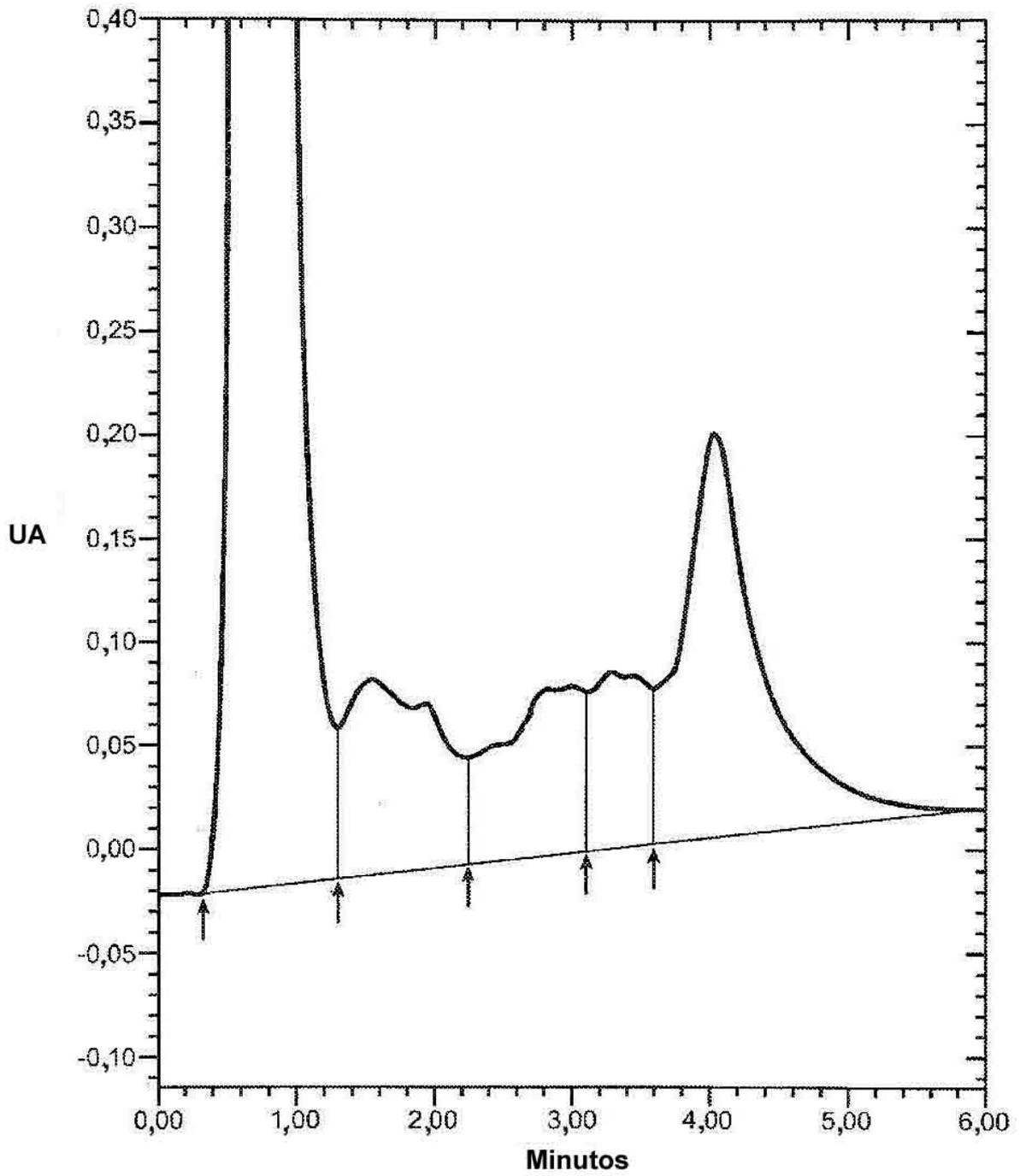


FIG. 3B

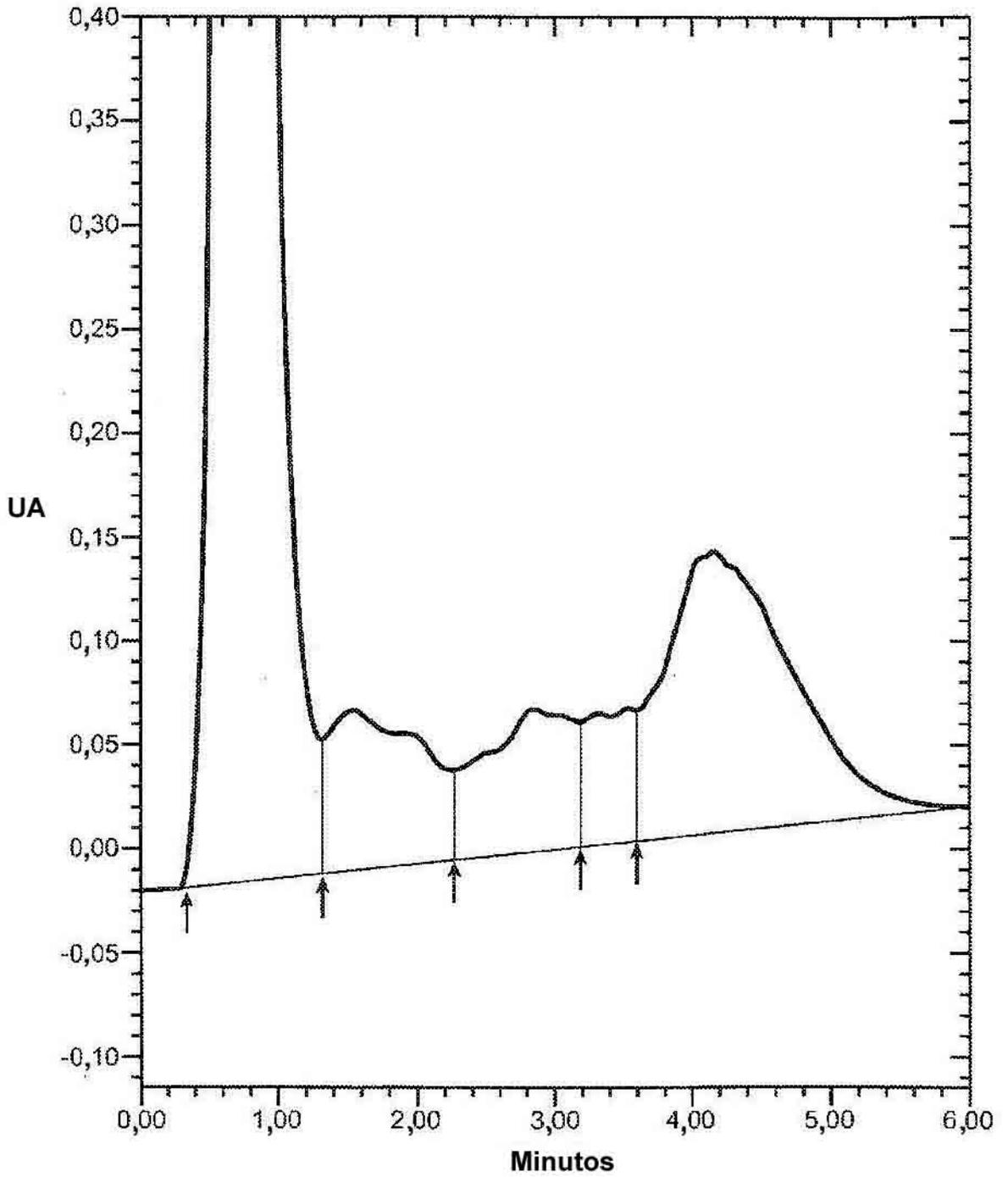


FIG. 3C

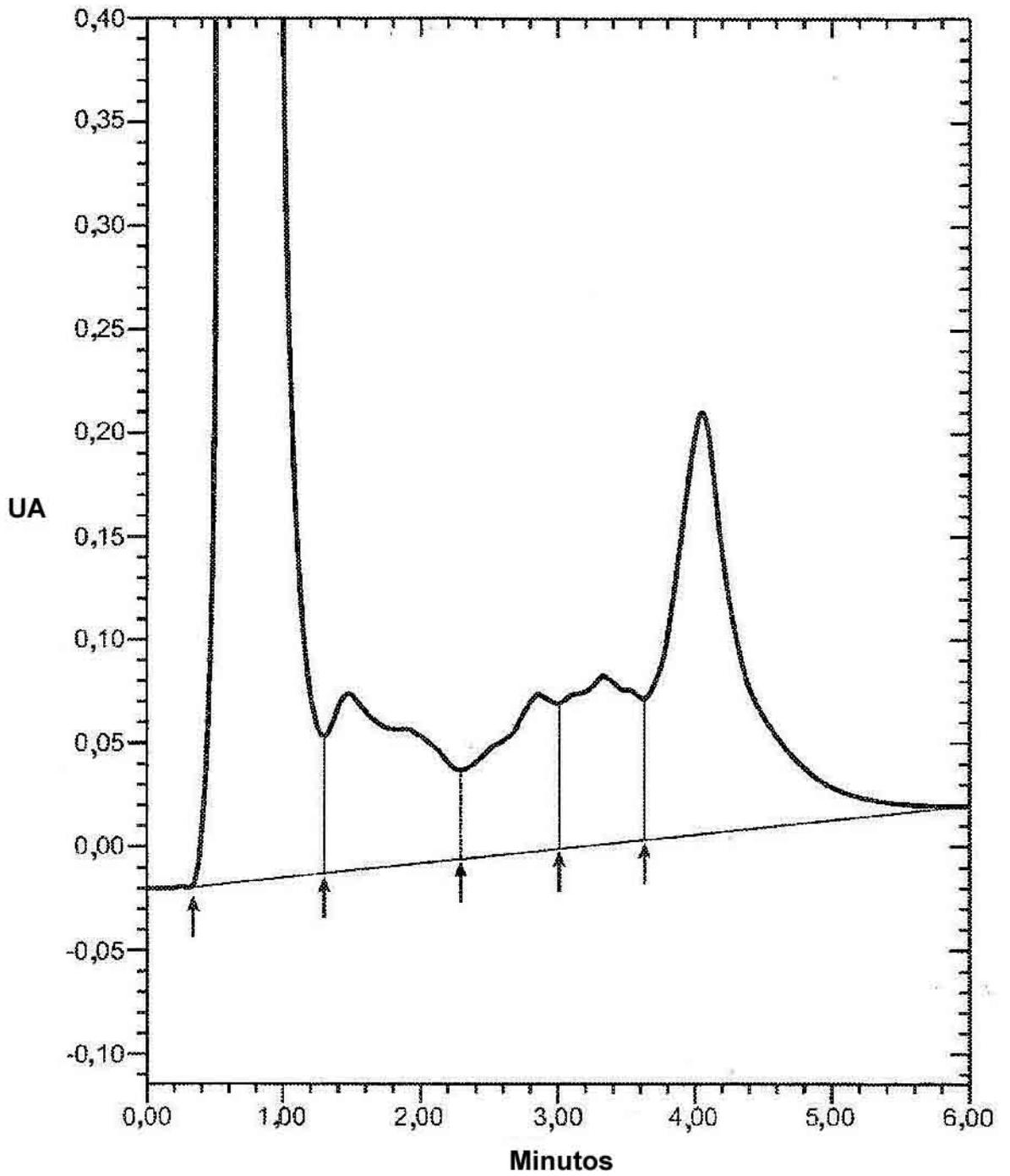


FIG. 3D

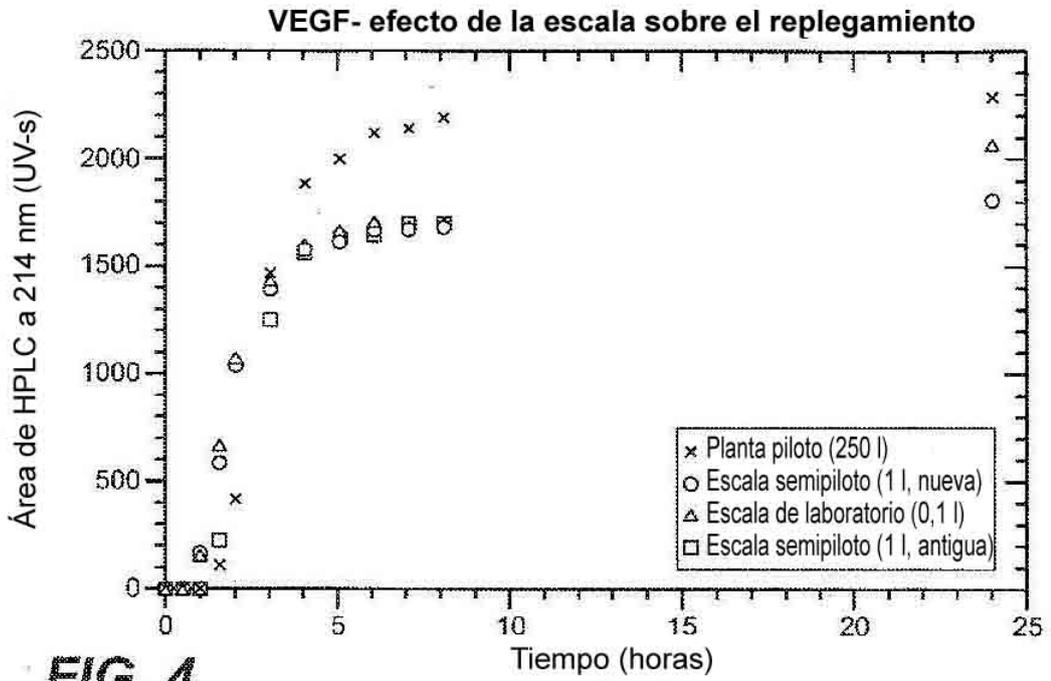


FIG. 4

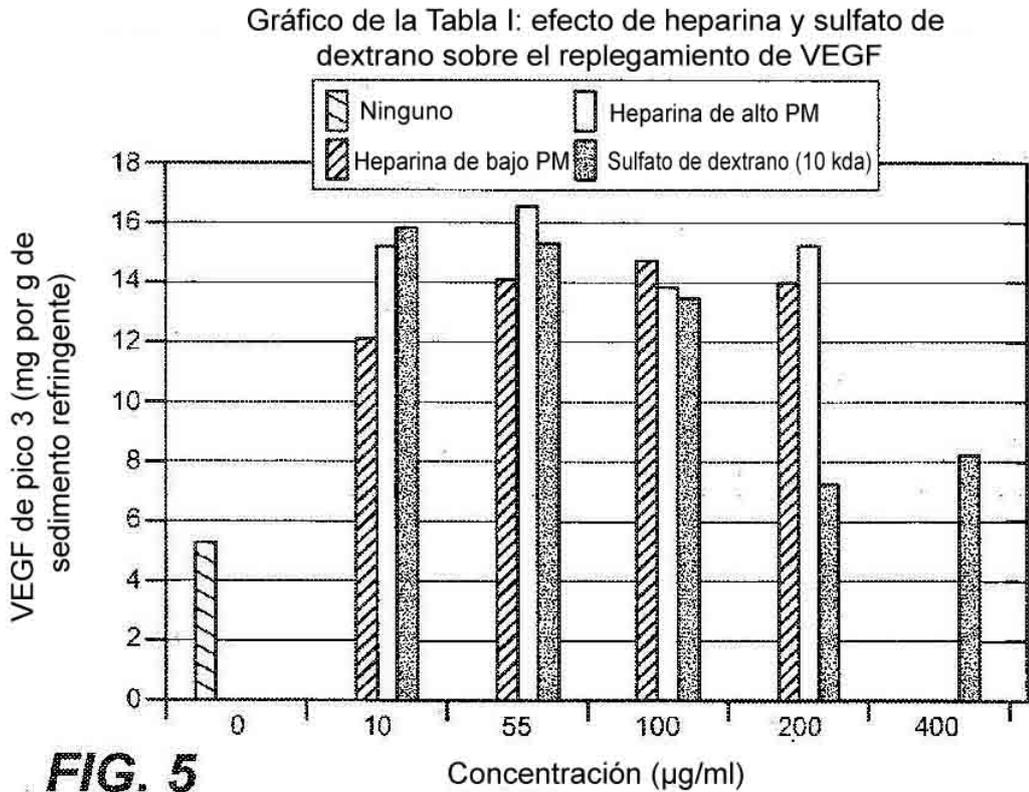
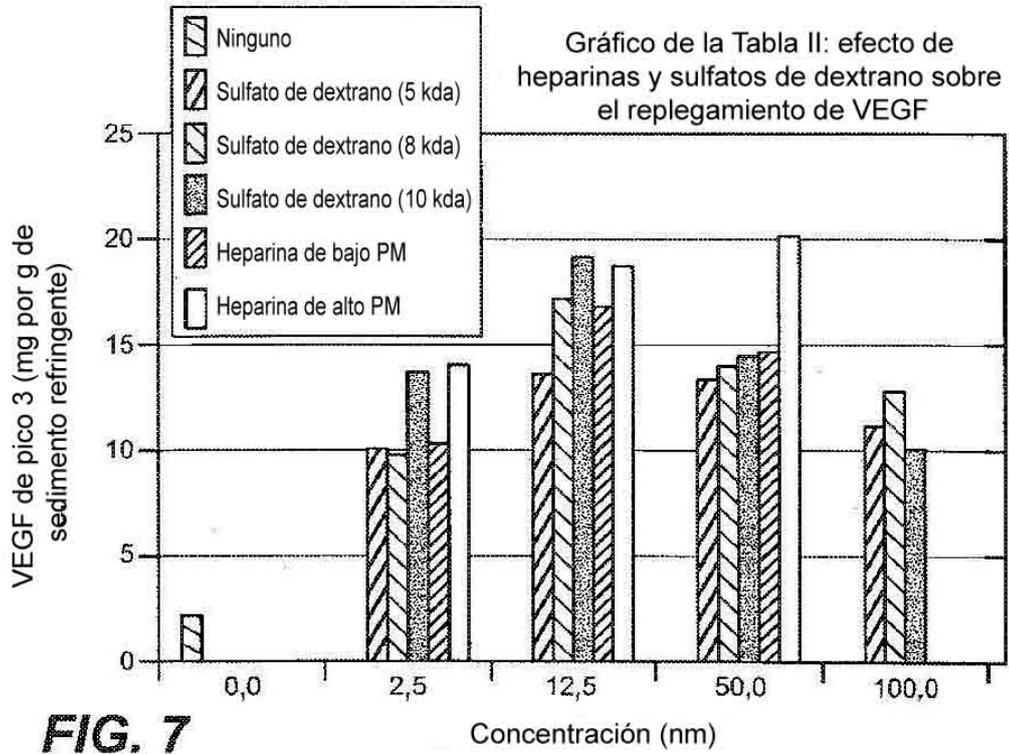
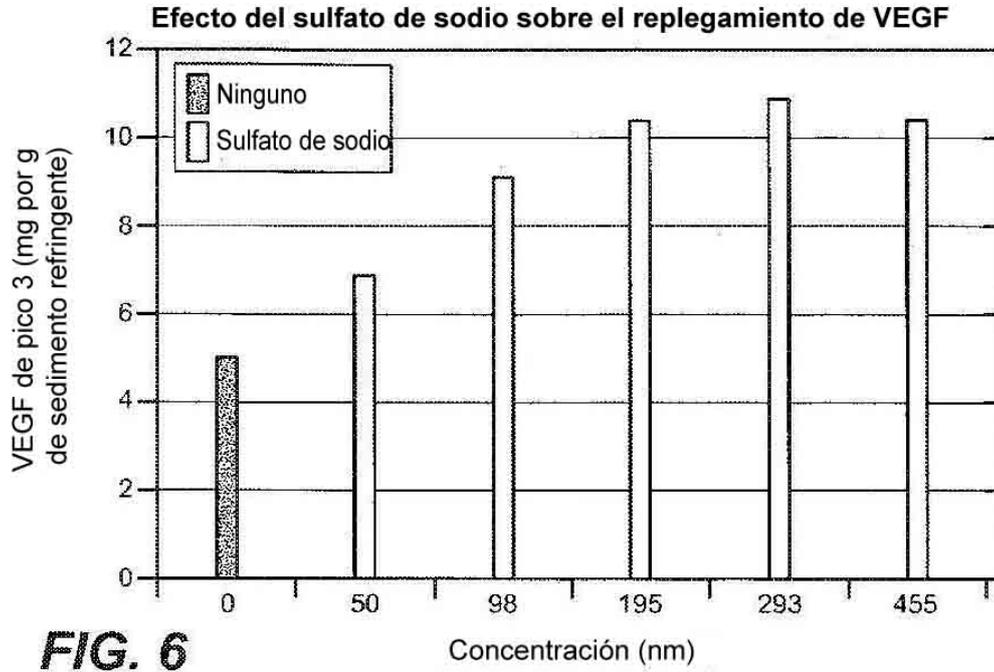


FIG. 5



Efecto de la heparina y el sulfato de dextrano sobre el replegamiento de VEGF

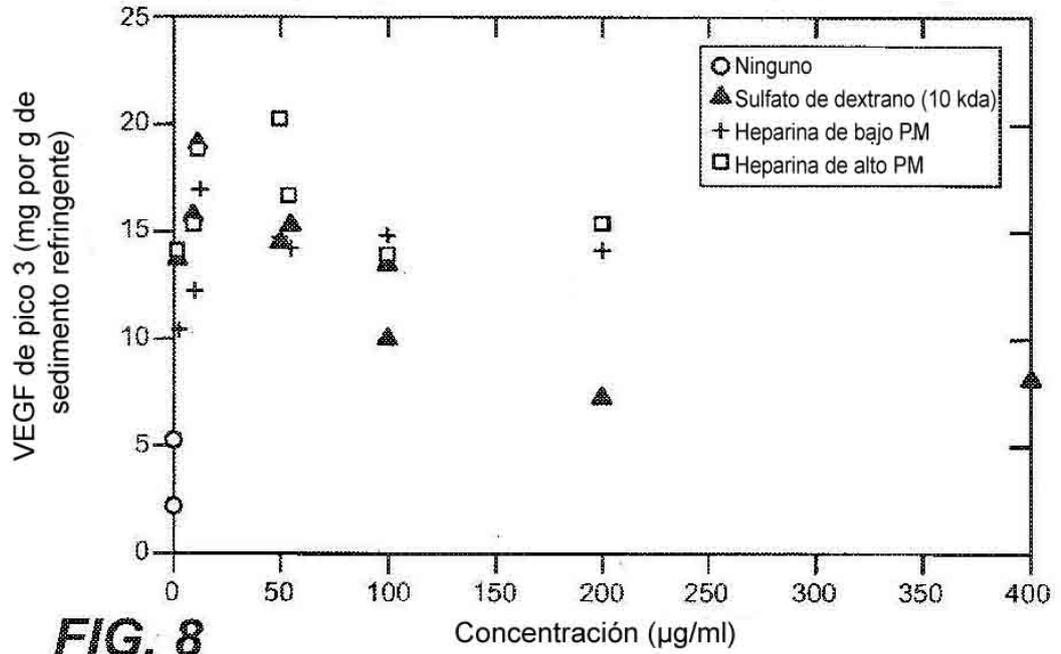


FIG. 8

Efectos de urea y DTT sobre la extracción de VEGF

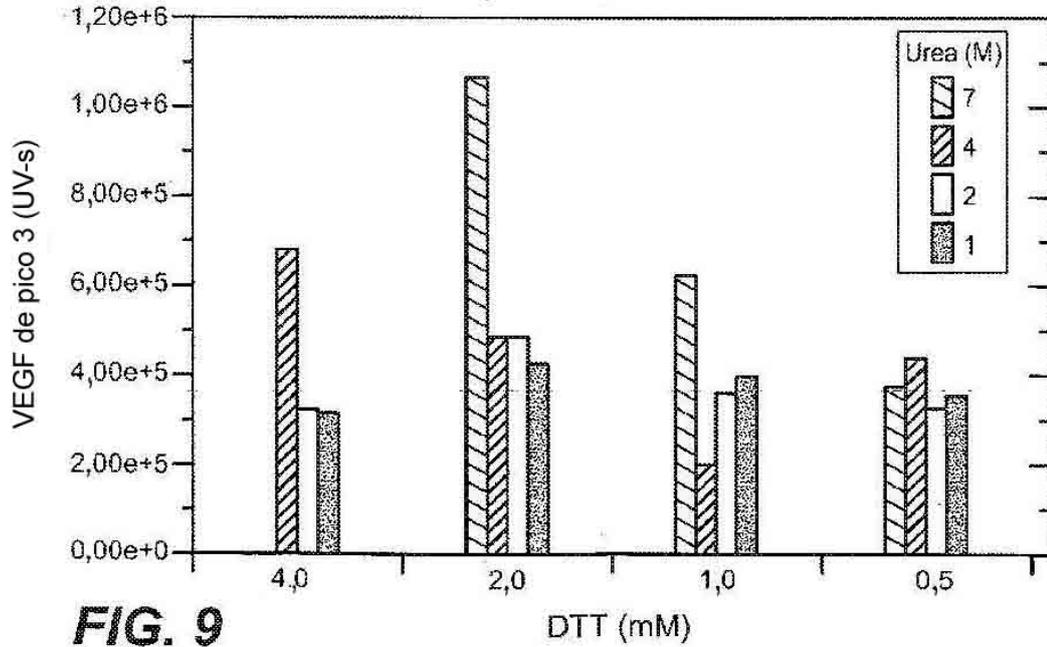
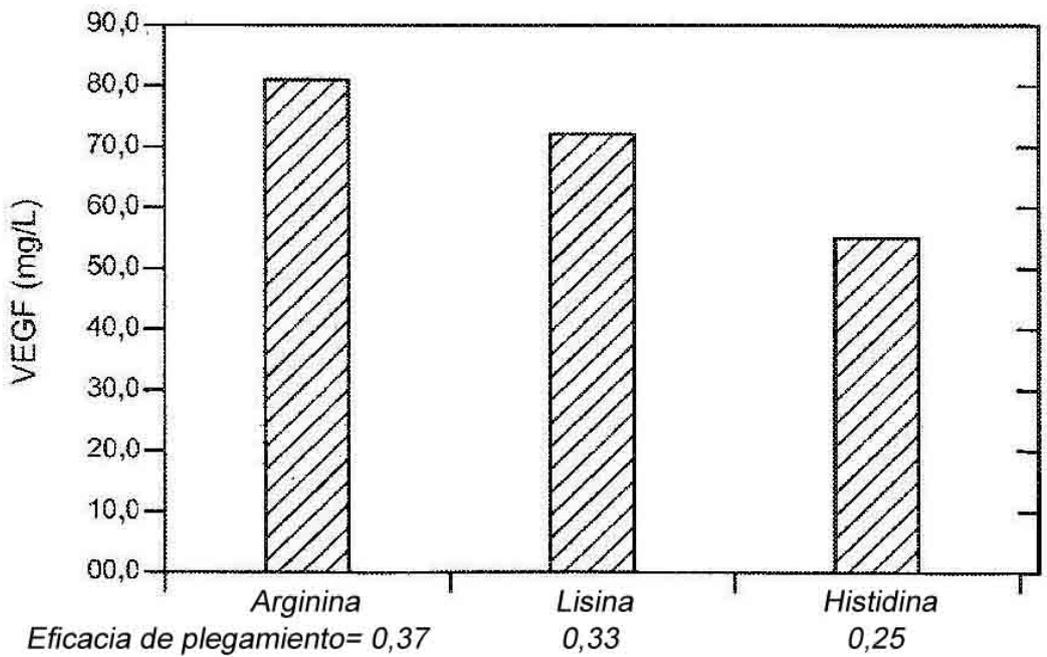
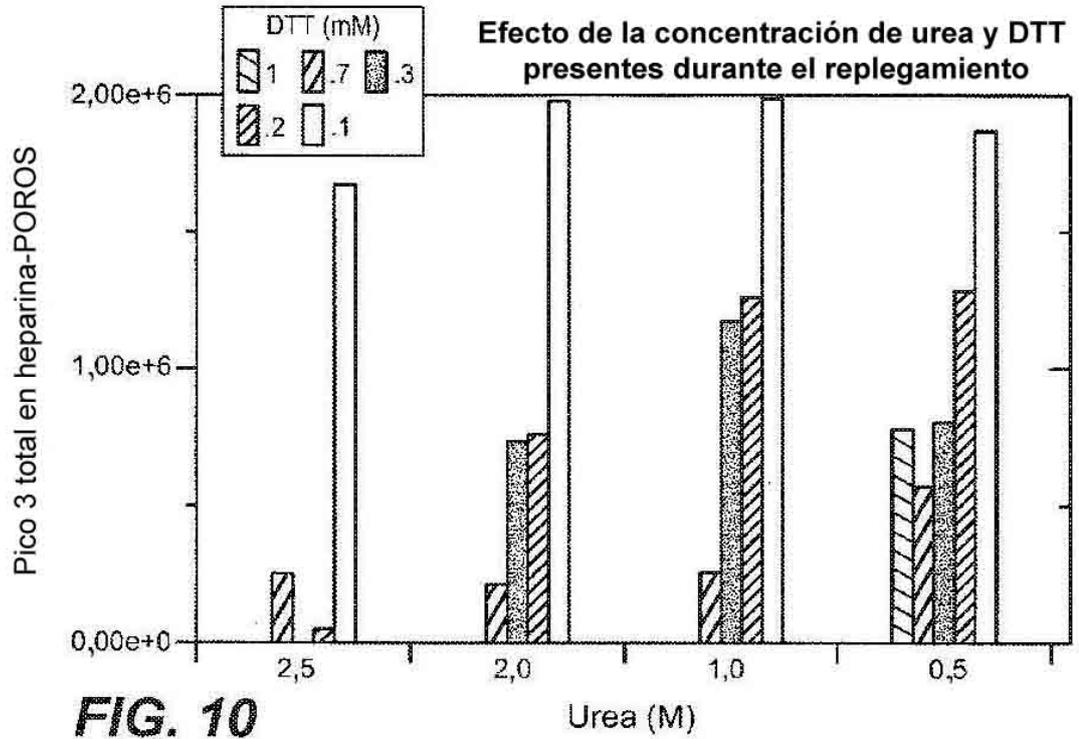
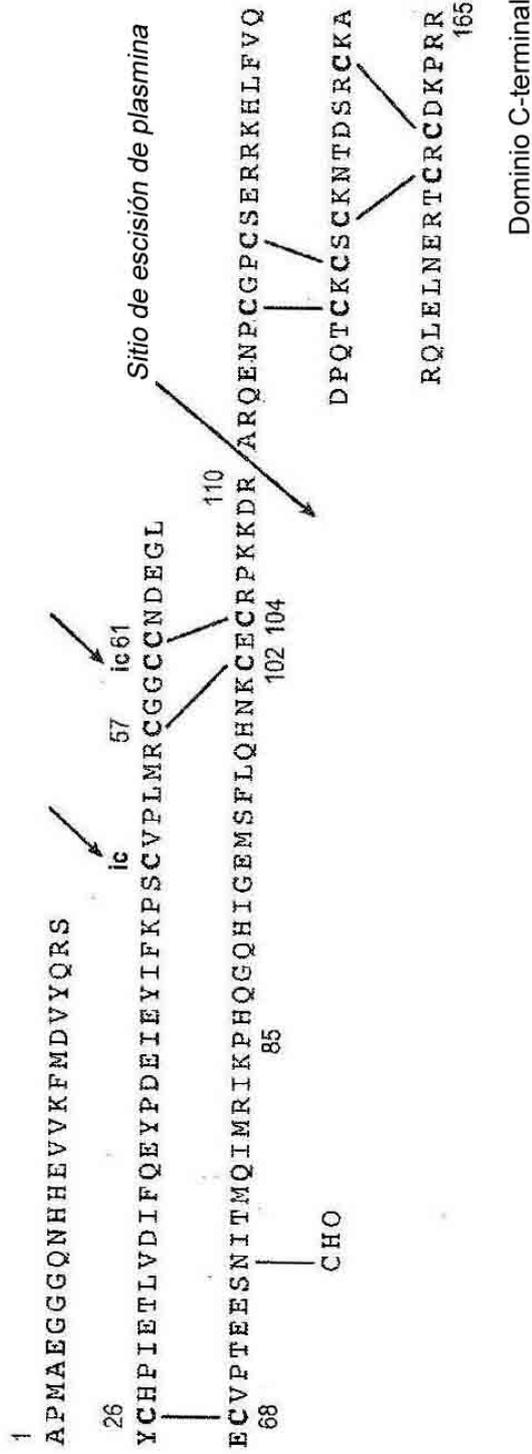


FIG. 9



Secuencia aminoacídica de VEGF₁₆₅

Dominio de unión a receptor (1-110)
 Dominio N-terminal



Dominio de unión a heparina (110-165)

FIG. 11

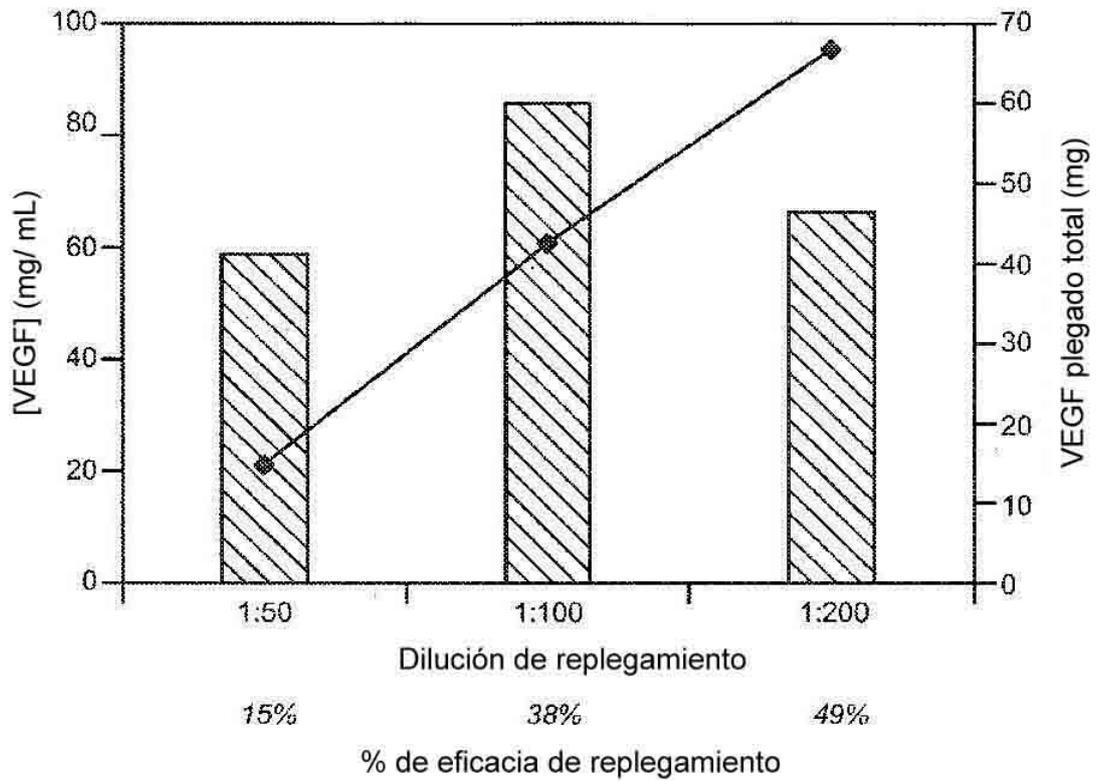


FIG. 13