

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 371 208**

51 Int. Cl.:
C12N 9/00

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06846013 .8**

96 Fecha de presentación: **21.12.2006**

97 Número de publicación de la solicitud: **1966371**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.09.2008**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA ACTIVAR LA PRETROMBINA 1.**

30 Prioridad:
22.12.2005 US 753914 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
28.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
28.12.2011

73 Titular/es:
**ZYMOGENETICS, INC.
1201 EASTLAKE AVENUE EAST
SEATTLE, WA 98102, US**

72 Inventor/es:
**MALLET, Robert, W.;
STENLAND, Christopher, J.;
BOONE, Jonathon, C.;
FORSTROM, John, W. y
DE JONGH, Karen, S.**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 371 208 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

Procedimiento para activar la pretrombina 1

Antecedentes de la invención

- 5 La penúltima etapa de la cascada de la coagulación es la conversión catalizada por complejo de Factor Xa del zimógeno protrombina en la enzima activa trombina. La protrombina es una glicoproteína dependiente de vitamina K de cadena sencilla que se sintetiza en el hígado. Contiene un dominio gla, dos regiones kringle, una cadena A y un dominio de serina proteasa (cadena B). La conversión en trombina requiere que la protrombina se escinda en dos sitios, eliminando el dominio gla y las regiones kringle, escindiendo entre las cadenas A y B para producir la proteasa activa, denominada "trombina α ".
- 10 La trombina se usa terapéuticamente para promover la hemostasia en la cirugía y como componente de adhesivos y selladores tisulares. Las trombinas humana y bovina, ambas derivadas de plasma, están actualmente autorizadas para su uso terapéutico.
- 15 Sería ventajoso obtener la trombina a partir de una fuente recombinante para evitar el potencial de contaminación que es intrínseco a los productos derivados de plasma. La trombina bovina se ha asociado con anomalías hemostáticas que son el resultado de la inmunogenicidad de la propia trombina bovina y/o proteínas contaminantes (Ortel y col., Ann. Surg. 233(1): 88-96, 2001; Lawson y col., Ann. Thorac. Surg. 79(3): 1037-1038, 2005) y lleva un aviso de "recuadro negro" que advierte del uso repetido en pacientes que han desarrollado anticuerpos contra la trombina bovina. Sin embargo, la producción de protrombina recombinante ha demostrado ser problemática y los rendimientos han continuado siendo reducidos.
- 20 Como alternativa a la purificación a partir de plasma, la trombina puede prepararse a partir de una pretrombina recombinante (por ejemplo, pretrombina 1), como se desvela en la Patente de Estados Unidos N° 5.476.777. La pretrombina 1 es un precursor de trombina inactivo que no contiene el dominio gla o la primera región kringle de la protrombina, que puede producirse por expresión de un ADN de protrombina truncado en células recombinantes. La trombina activa se produce a partir de la pretrombina 1 por tratamiento con cualquiera de varias proteasas activantes, incluyendo activadores de la protrombina obtenidos de veneno de serpiente. Véase, por ejemplo, Speijer y col., J. Biol. Chem. 261: 13258-13267, 1986; Masci y col., Biochemistry International 17: 825-835, 1988; y Morita y col., Meth. Enzym. 80: 303-311, 1980.
- 25 La activación de pretrombina 1 en trombina se complica por la actividad proteolítica de la trombina α sobre la pretrombina. Esta actividad, que puede reducir el rendimiento global de la trombina α , puede aumentarse por las condiciones necesarias para estabilizar la proteína. Continúa existiendo la necesidad en la técnica de procedimientos para activar eficazmente la pretrombina 1 en trombina α .
- 30

Descripción de la invención

- 35 La presente invención proporciona procedimientos para convertir la pretrombina 1 en trombina. Los procedimientos de la invención comprenden las etapas de (a) proporcionar la pretrombina 1 a una concentración de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml en una solución acuosa de NaCl de 30 mM a 110 mM a pH 6,4-8,0, (b) proporcionar la oscutarina C inmovilizada en un soporte sólido, y (c) aplicar la solución acuosa a la oscutarina C inmovilizada para proporcionar de 500 mg a 4000 mg de pretrombina 1 por ml del soporte sólido y un tiempo de contacto entre la pretrombina 1 y la oscutarina C de 1,8 a 3,5 minutos, ambos inclusive, por lo que la pretrombina 1 se escinde para producir trombina, y se obtiene una solución que contiene trombina. Dentro de una realización de la invención, la solución acuosa de pretrombina 1 está a pH = 7,4. Dentro de otra realización de la invención, la pretrombina 1 es pretrombina 1 humana. Dentro de realizaciones adicionales de la invención, la oscutarina C está inmovilizada en el soporte sólido a una concentración de 0,1 a 20 mg de oscutarina C por ml de soporte. Dentro de realizaciones relacionadas, la oscutarina C está inmovilizada en el soporte sólido a una concentración de 0,1 a 5,0 mg de oscutarina C por ml de soporte. Dentro de otra realización de la invención, el soporte sólido comprende una matriz de agarosa reticulada. Dentro de una realización adicional, la concentración de NaCl en la solución acuosa de pretrombina 1 es de 70 mM. Dentro de otras realizaciones, los procedimientos de la invención se llevan a cabo a una temperatura de 17°C a 45°C, una temperatura de 20°C a 37°C, una temperatura de 20°C a 30°C, o una temperatura de 25°C.
- 40
- 45 Dentro de ciertas realizaciones de la invención, los procedimientos comprenden además las etapas de (d) aplicar la solución que contiene trombina a un medio de captura seleccionado del grupo que consiste en un medio de cromatografía de intercambio iónico y un medio de cromatografía de afinidad, por lo que la trombina está unida al medio de captura, (e) lavar la trombina unida, y (f) recuperar la trombina unida del medio de captura. Dentro de ciertas realizaciones, el medio de captura es un medio de cromatografía de afinidad, tal como un medio que comprende *para*-aminobenzamidina (PABA) inmovilizada en un soporte sólido. Dentro de una realización relacionada, el medio de captura comprende PABA inmovilizada, y la etapa de recuperación comprende lavar la
- 50
- 55 PABA inmovilizada con NaCl e isopropanol a concentraciones suficientes para eluir la trombina unida.

Estos y otros aspectos de la invención se harán evidentes al hacerse referencia a la descripción detallada de la invención y los dibujos adjuntos siguientes. En los dibujos:

La Fig. 1 ilustra los efectos sobre la eficacia de activación de tiempo de contacto con activador y concentración de pretrombina 1 variables.

La Fig. 2 muestra los índices de conversión de pretrombina 1 (PT-1) y pretrombina 2 (PT-2) en trombina en función del caudal a través de la columna de activador.

5 Las Figs. 3, 4 y 5 ilustran los efectos del pH sobre la activación de pretrombina 1 en trombina.

Las Figs. 6, 7 y 8 ilustran los efectos de la concentración de NaCl de la activación de pretrombina 1 en trombina.

La Fig. 9 ilustra el efecto de la temperatura sobre la conversión de PT-1 y PT-2 en trombina.

La Fig. 10 muestra las cantidades relativas de trombina, PT-1 y PT-2 en un procesamiento de activación usando una carga de PT-1 de 4,0 mg/ml y un tiempo de contacto de 2,5 minutos.

10 Como se usa en el presente documento, el término "trombina" denota la enzima activada, también conocida como trombina α , que se obtiene como resultado de la escisión proteolítica de la protrombina (factor II). El término "trombina" se usa en el presente documento para denotar esta proteína independientemente de su origen. La trombina humana es una proteína de 295 aminoácidos compuesta por dos cadenas polipeptídicas unidas por un enlace disulfuro. Pueden usarse dentro de la presente invención trombinas tanto humanas como no humanas. La
15 trombina se usa médicamente como agente hemostático y como componente de adhesivos tisulares.

La "pretrombina 1" es una proteína que se obtiene como resultado de la eliminación de los dominios gla y primer dominio kringle (en su conjunto denominados fragmento de protrombina 1) de la protrombina. La pretrombina 1 puede producirse por escisión de la protrombina con trombina o directamente por producción recombinante. La pretrombina 1 puede activarse en trombina mediante una escisión proteolítica adicional.

20 Los intervalos numéricos enumerados en el presente documento incluyen sus puntos finales.

Todas las referencias citadas en el presente documento se incorporan por referencia en su totalidad.

La presente invención proporciona procedimientos para la activación del precursor de trombina pretrombina 1 (PT-1) en la enzima activa trombina. Aunque, con fines ilustrativos, la invención se describe en los términos de la PT-1 humana recombinante, la invención también incluye la activación de formas no humanas y no recombinantes de la
25 pretrombina 1. Por lo tanto, la invención incluye, sin limitación, procedimientos para activar la PT-1 derivada de plasma humana y no humana (por ejemplo, bovina) y la PT-1 recombinante.

Dentro de la presente invención, la activación de pretrombina 1 (PT-1) en trombina se consigue enzimáticamente por hidrólisis de la cadena principal polipeptídica de PT-1 en dos sitios específicos. La enzima usada para catalizar esta conversión se obtiene del veneno de la serpiente taipán de la costa (*Oxyuranus scutellatus*). Una serina proteasa compleja (Oscutarina C) purificada a partir del veneno bruto es capaz de mimetizar las funciones de los Factores Va y Xa que son necesarios para la activación de la protrombina en trombina *in situ*.
30

Dentro de una realización de la invención, la trombina activada se captura por cromatografía de afinidad pasando el eluyente que contiene trombina de la columna de activador sobre una columna de *para*-aminobenzidina (PABA) inmovilizada. La PABA está inmovilizada en un soporte de perlas polimérico. Los soportes adecuados incluyen
35 polímeros de metacrilato, acrilamida, agarosa y similares, funcionalizados con químicas tales como químicas de epoxi, ésteres activos, tiol y bromuro de cianógeno. Se conocen en la técnica una diversidad de soportes y químicas de activación. Véase, por ejemplo, Hermanson y col., Immobilized Affinity Ligand Techniques, Academic Press, Nueva York, 1992. Los contaminantes, incluyendo el fragmento de protrombina 2 y proteínas de células huésped, pueden eluirse de la columna usando NaCl de 70 mM a 500 mM, isopropanol del 5% al 20% en volumen o una
40 combinación de NaCl e isopropanol. Dentro de una realización de la invención, los contaminantes se eluyen usando NaCl 264 mM en isopropanol al 7,1 % (v/v), tamponado hasta un pH aproximadamente neutro. La trombina activada puede eluirse después usando concentraciones aumentadas de NaCl (de 300 mM a 500 mM, preferentemente de aproximadamente 500 mM), isopropanol (del 10% al 20% en volumen, preferentemente de aproximadamente el 15,7% en volumen) o una combinación de NaCl e isopropanol a estas concentraciones. Dentro de una realización, la
45 trombina se eluye usando NaCl 500 mM en isopropanol al 15,7% (v/v). Dicha combinación de NaCl e isopropanol confiere estabilidad a la trombina después de su extracción por elución de la columna de PABA. Las eluciones pueden llevarse a cabo usando un gradiente de concentración o de una forma por etapas. Aunque la trombina y el fragmento 2 pueden eluirse usando los mismos intervalos de concentración, eluyéndose primero el fragmento 2, el uso de menores concentraciones de NaCl y/o isopropanol para la elución del fragmento 2 y mayores
50 concentraciones para la elución de trombina da como resultado menores volúmenes de elución y una separación mejorada.

La trombina eluida de la columna de activador también puede capturarse por otros procedimientos cromatográficos, tales como cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de inmutioafinidad o cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad de heparina).

La oscutarina C (también denominada en el presente documento "activador de protrombina" o "PTA") es un tetrámero que consiste en dos subunidades análogas a Factor Xa y dos subunidades análogas a Factor Va. Aunque sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, se cree que las subunidades de tipo Factor Xa son responsables de la actividad catalítica del complejo, y las subunidades de tipo Factor Va son necesarias para estabilizar la molécula de PT-1 en la configuración apropiada para permitir la activación. Véase, Speijer y col. (ibídem). Para usar el PTA purificado como agente de activación para convertir la PT-1 en trombina, la enzima se inmoviliza en un soporte sólido. Los soportes adecuados incluyen cualquier resina cromatográfica activada con químicas reactivas con restos de amina, sulfhidrilo, carboxilo, hidroxilo o carbohidrato en la molécula de PTA, por lo que dicha reacción da como resultado un enlace covalente del PTA con la resina. Los ejemplos de dichos soportes incluyen agarosa, celulosa, sílice y soportes sintéticos, tales como resinas preparadas a partir de derivados de acrilamida, poliestireno y metacrilato.

La resina de soporte se carga con Oscutarina C a una proporción de 0,1 mg a 20 mg de activador por ml de resina estable. Como apreciarán los expertos en la materia, las capacidades de las resinas individuales pueden variar algo, y las condiciones reales se establecerán mediante optimización de procedimientos de rutina. En general, podrán conseguirse densidades de carga de resina tan elevadas como de 10 a 20 mg de activador por ml de resina con soportes de resina convencionales, y pueden permitir mayores proporciones de activación de pretrombina 1 respecto a resina (>2,0 g/ml de resina) o tiempos de activación más cortos. Se descubrió que una resina de agarosa reticulada cargada con 1,0 mg de PTA por ml de resina era suficiente para activar al menos 2,0 gramos de PT-1 en trombina por ml de resina acoplada, con un rendimiento molar global de trombina en exceso del 70% en condiciones óptimas. Esta proporción de PTA respecto a resina tiene el potencial de activar más de 4 gramos de PT-1 por ml de resina consiguiendo una conversión en trombina sólo ligeramente inferior.

Las condiciones de inmovilización se optimizaron usando una resina de agarosa reticulada activada con bromuro de cianógeno (utilizando SEPHAROSE FAST FLOW de Amersham Biosciences). Se usaron inicialmente condiciones de inmovilización convencionales (según especificaba el fabricante). Sin embargo, se descubrió que el PTA era susceptible a la inactivación por lavados a bajo pH, dando como resultado una inactivación irreversible cuando se lavaba por debajo de un pH de 4,5, y la inestabilidad de la molécula de PTA se empeoró por adición de NaCl 0,5 M a la mezcla de reacción. Se descubrió que el lavado a pH 5,0 era suficiente para eliminar cualquier impureza al tiempo que se preservaba la actividad de la resina. Por lo tanto, debería evitarse el lavado a un pH por debajo de 4,5. La enzima no se veía afectada por el lavado a niveles de pH superiores (hasta al menos 8,3). El tratamiento de la resina con un tampón de bajo pH (por ejemplo, pH 4,0) puede tolerarse durante intervalos de tiempo cortos al tiempo que se mantiene la actividad de la resina. Sin embargo, el lavado de la resina con tampones por debajo de un pH de 4,5 inactivará la resina de una forma dependiente del tiempo. Cuanto menor el pH, menos tiempo es necesario para la pérdida de actividad.

La resina de PTA puede almacenarse en condiciones ligeramente ácidas. A partir de una serie de experimentos de optimización se determinó que la estabilidad de la resina es máxima a pH 6,0 en tampón fosfato sódico que contiene azida sódica al 0,02% como agente bacteriostático. La resina es sólo ligeramente menos estable en EtOH al 20% a pH 6,0.

Varios parámetros influyen en la eficacia de activación de la resina de PTA. Entre estos están el pH, la conductividad, el tiempo de contacto de PT-1, la concentración de PT-1 y la temperatura. Aunque el pH es un parámetro importante en la determinación del equilibrio de reacción (conversión de PT-1 en PT-2), el pH óptimo para la conversión de PT-1 en trombina es amplio, entre pH 6,8 y pH 8,0. La afinidad máxima de serina proteasas por p-aminobenzamidina (PABA) es a aproximadamente pH 8,0, por lo tanto es deseable mantener el pH de la reacción de conversión próximo a pH 8,0. Aunque las concentraciones crecientes de NaCl inhibían la reacción de activación, se incluye algo de NaCl en el tampón de reacción para mantener la estabilidad de la PT-1 en solución. Pruebas experimentales mostraron que hay una caída significativa en la conversión de PT-1 en trombina cuando la carga contenía NaCl 0,3 M, y que concentraciones decrecientes de NaCl daban como resultado mayores proporciones de conversión de PT-1 en trombina. A través de una serie de experimentos se determinó que el NaCl 70 mM proporcionaba una buena combinación de estabilidad de PT-1 y eficacia de activación. Dentro de la presente invención, puede utilizarse una concentración de NaCl de 30 mM a 110 mM sin incurrir en pérdidas inaceptables. Se ha descubierto que la eficacia de activación aumenta con la temperatura; se obtuvieron mayores velocidades de conversión a mayores temperaturas (véase la Fig. 9). La activación a gran escala a 25° proporciona una eficacia de activación aceptable, aunque pueden emplearse temperaturas tan elevadas como de 45°C. Sin embargo, temperaturas menores pueden proporcionar una vida útil del activador más prolongada.

El tiempo de permanencia de la PT-1 en la columna de activador influye enormemente en la eficacia de conversión. Tiempos de contacto más cortos (como pueden obtenerse a través de caudales mayores) dan como resultado una conversión más escasa de PT-1 en trombina. La relación entre la concentración de PT-1 y el tiempo de contacto con PTA de 0,6 a 1,8 minutos se muestra en la Fig. 1. A mayores concentraciones de PT-1 (entre 4 y 6 mg/ml) un tiempo de contacto de 2,5 minutos da como resultado una buena conversión. La Fig. 10 muestra las cantidades relativas de trombina, PT-1 y PT- 2 en un procesamiento de activación usando una carga de PT-1 de 4,0 mg/ml y un tiempo de contacto de 2,5 minutos. Por lo tanto, a medida que aumenta la concentración de PT-1, el tiempo de contacto puede aumentarse para mantener una elevada velocidad de conversión de PT-1 en trombina. Por manipulación de la concentración de carga de PT-1 y del tiempo de contacto de PT-1-resina de PTA, un experto en la materia puede

desarrollar una matriz de combinaciones de reacción adecuadas. Por ejemplo, se ha descubierto que los parámetros de procedimiento mostrados en la Tabla 1 proporcionan eficacias de conversión adecuadas.

Tabla 1

Concentración de PT-1	Tiempo de contacto
1 mg/ml	1,8 min
5 mg/ml	2,5 min
10 mg/ml	3,5 min

5 Sorprendentemente, la concentración de PT-1 en la solución de carga no influyó mucho en la eficacia de conversión hasta aproximadamente 9,0 mg/ml. Hubo cierta pérdida de eficacia a mayores concentraciones de PT-1, pero la eficacia de conversión podía recuperarse aumentando ligeramente el tiempo de contacto como se muestra en la Fig. 1.

10 Antes y durante el procedimiento de activación de la PT-1, una porción de la PT-1 puede hidrolizarse parcialmente por trombina o proteasas endógenas. La forma parcialmente hidrolizada se denomina pretrombina 2 (PT-2) y carece de actividad proteolítica. La PT-2 mencionada en este documento puede existir en dos formas que varían en tamaño en 13 aminoácidos. Es posible convertir la PT-2 en trombina mediante la ruta de activación de la Oscutarina C, pero las cinéticas de activación son más lentas que las observadas para la PT-1 (Fig. 2). Debido a que la conversión de PT-2 en trombina es más lenta que la conversión de PT-1, es deseable limitar la producción de PT-2 en la mezcla de reacción. Cuando se trabaja con cultivos celulares recombinantes, la recogida del cultivo celular a mayor viabilidad celular (>50%) reduce la producción de PT-2. Se cree que los aumentos en la PT-2 en cultivos celulares de baja viabilidad son debidos a un aumento en el nivel de proteasas de cultivo celular producidas endógenamente, que causan la conversión de PT-1 en PT-2 después de que la viabilidad celular caiga por debajo del 50%.

20 Después de la recuperación de trombina activada, puede conseguirse una purificación adicional usando una o más técnicas de fraccionamiento de proteínas convencionales. Los procedimientos adecuados incluyen, por ejemplo, cromatografía de intercambio iónico, intercambio de tampón, filtración (incluyendo nanofiltración para eliminar virus) y concentración.

25 Para su uso como agente terapéutico, la trombina purificada se formula con un vehículo fisiológicamente aceptable. Las formulaciones preferidas incluyen soluciones acuosas débilmente tamponadas que contienen sacarosa, manitol, cloruro sódico, un tensioactivo o polietilenglicol de alto peso molecular (HMW-PEG) y, opcionalmente, cloruro cálcico. Los intervalos de concentración típicos de estos componentes se muestran en la Tabla 2. Las concentraciones expresadas como porcentaje son en base a peso respecto a volumen.

Tabla 2

trombina	0,01-5,0 mg/ml
sacarosa	2%-4%
manitol	3,5%-5%
NaCl	50-300 mM
tensioactivo o HMW-PEG	0,03%-1%
CaCl ₂	0-5 mM
pH	5,7-7,4

Para el almacenamiento a largo plazo, la solución acuosa se divide en alícuotas en viales estériles, ampollas u otros recipientes, y se liofiliza de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica.

30 Para su uso, la composición de trombina liofilizada se reconstituye con un diluyente adecuado a la concentración deseada, generalmente de aproximadamente 100 U NIH/ml a aproximadamente 5.000 U NIH/ml, típicamente de aproximadamente 1.000 U NIH/ml, aunque la concentración real se determinará por el médico de acuerdo con las necesidades del paciente individual. La trombina puede aplicarse a tejido sangrante para conseguir la homeostasis, con frecuencia en combinación con una esponja de gelatina absorbible o como una pulverización. La trombina también puede usarse como componente de un adhesivo tisular o pegamento de fibrina. Estos y otros usos de la trombina se conocen en la técnica.

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Ejemplo 1

5 Se produjo pretrombina 1 recombinante en células CHO DG44 transformadas con el vector de expresión THR101 desvelado en la Patente de Estados Unidos N° 5.527.692. Las células se cultivaron en un biorreactor en modo de perfusión. El medio de cultivo acondicionado se recogió y se aclaró a través de una serie graduada de filtros de profundidad y, finalmente, por ultrafiltración/diafiltración a través de un filtro bicapa de PES (polietersulfona) de 0,2 μm . Se usó un sistema de ultrafiltración de flujo tangencial configurado con membranas de polietersulfona de límite de peso molecular nominal de 30 kDa (PELLICON BIOMAX; Millipore Corp, Billerica, MA) para concentrar el medio
10 aclarado 10 veces. El medio concentrado se diafiltró después de forma continua con seis volúmenes de diafiltración de tampón de equilibrado (Tris 20 mM, NaCl 120 mM, pH 9,1 \pm 0,1) a una concentración de pretrombina 1 de 9.0 g/l.

La inactivación viral de la pretrombina 1 se consiguió por tratamiento con detergente. Se añadió una solución al 10% (p/v) de 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil)fenil-polietilenglicol (TRITON X-100) a la solución de PT-1 concentrada a una concentración final del 0,5% (p/v). La solución se mezcló y se mantuvo durante cuatro horas a 12°C \pm 2°C. La
15 solución se enfrió después por debajo de 8°C.

La pretrombina 2 contaminante y las impurezas de procedimiento se eliminaron por cromatografía de intercambio aniónico. La solución tratada con detergente se calentó a 16-22°C y se filtró para eliminar precipitados. El filtrado se cargó sobre una columna de 80 cm de diámetro x 20 cm de largo de resina de agarosa derivatizada (Q SEPHAROSE XL; GE Healthcare) que se había equilibrado con Tris 20 mM, NaCl 120 mM, pH 9,1. La columna se lavó después con 10 volúmenes de columna del mismo tampón, seguido de 10 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 142 mM, pH 8,8. La proteína se eluyó después con 5 volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 300 mM, pH 7,3. Todos los flujos de columna fueron a una velocidad lineal de 150 cm/h. El eluido se controló por la absorbancia (A_{280}), y el pico se recogió y se enfrió por debajo de 8°C.

La solución de PT-1 se concentró después por ultrafiltración a través de filtros de membrana de polietersulfona de límite de peso molecular nominal de 30 kDa en un dispositivo de filtración de flujo tangencial (PELLICON BIOMAX; Millipore Corporation, Billerica, MA) a una concentración de 20 \pm 3 g/l. El concentrado se filtró después a través de
25 filtros de 0,2 μm y se congeló a -80°C.

La PT-1 se activó usando oscutarina C inmovilizada, y la trombina se capturó en una columna de *para*-aminobenzamida (PABA). El activador se inmovilizó a través de aminas reactivas presentes en la superficie de la molécula de PTA sobre perlas de agarosa activadas con bromuro de cianógeno (SEPHAROSE FF; GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, pero con un lavado a pH 5,0. Después de la inmovilización, la resina se envasó en una columna de 5 cm de DI x 10 cm de altura de lecho (volumen de columna = 200 ml) en tampón de equilibrado de PTA (Tris 20 mM, NaCl 70 mM, pH 7,3). La columna de PTA se acopló directamente a una columna de 60 cm de DI por 20 cm de altura de lecho (57 l) de resina de PABA (obtenida en ProMetic Biosciences, Wayne, NJ). La resina de PABA se envasó en la columna, se saneó con NaOH 0,5 M, después se neutralizó con Tris 100 mM, pH 7,5, y se almacenó en fosfato sódico 25 mM, isopropanol al 20%, pH 7,0. Las columnas de PTA y PABA se equilibraron con cinco volúmenes de columna de Tris 20 mM, NaCl 70 mM, pH 7,3 antes del acoplamiento.

Para activar la PT-1, PT-1 congelada concentrada (400 g de PT-1) se descongeló y se diluyó a una conductividad de 9,2 \pm 0,2 mS/cm con Tris 20 mM, pH 7,3, después se diluyó adicionalmente a una concentración de 5 mg/ml de PT-1 con Tris 20 mM, NaCl 70 mM, pH 7,3. El pH de la solución se ajustó después a 7,4 \pm 0,1 con fosfato sódico 1,5 M, pH 6,0, y la solución se filtró a través de un filtro de 0,2 μm . La solución filtrada se aplicó después a la columna de PTA usando un caudal diseñado para permitir un tiempo de contacto de 2,5 minutos en la columna de PTA (80 ml/min). Después de la finalización de la carga la columna de PTA se lavó con al menos cinco volúmenes de columna de tampón de equilibrado al caudal de carga. Las columnas se desconectaron después para permitir la elución de la trombina de la columna de PABA. La activación y la captura se realizaron a 25°C y 17°C, respectivamente.

La trombina se eluyó de la columna de PABA en condiciones que separaban el fragmento de protrombina 2 (F2) y las proteínas de célula huésped contaminantes de la trombina. Todas las etapas se llevaron a cabo a un caudal de 38 cm/h en la misma dirección en la que se cargó la columna. La columna se lavó con al menos 5 volúmenes de columna de tampón A (tampón de equilibrado; Tris 20 mM, NaCl 70 mM, pH 7,3). El F2 se eluyó con un lavado intermedio de 3 volúmenes de columna usando Tris 20 mM que contenía NaCl 264 mM e isopropanol al 7,1%. La elución de trombina se realizó usando tampón tris 20 mM y aumentando las concentraciones de NaCl e isopropanol hasta 500 mM y el 15,7%, respectivamente. La recogida de la producción se realizó basándose en la absorbancia a A_{280} .

55 La trombina activada se purificó adicionalmente usando cromatografía de intercambio catiónico. El eluido de PABA se diluyó con histidina 10 mM, pH 6,3, a una conductividad de no más de 13 mS/cm. La solución de trombina se aplicó después a una columna de 45 cm de diámetro x 12 cm de largo (volumen de lecho de 19 litros) de resina de

agarosa de sulfopropilo (SP SEPHAROSE Fast Flow; GE Healthcare) que se había equilibrado con histidina 10 mM, NaCl 50 mM, pH 6,3. Después de la carga, la columna se lavó con tres volúmenes de columna del mismo tampón. La trombina se eluyó con histidina 10 mM, NaCl 400 mM, pH 6,3, y el pico también se recogió. Todos los flujos de columna fueron a una velocidad lineal de 200 cm/h.

- 5 Los virus adventicios se eliminaron usando nanofiltración. El eluido de la columna de intercambio catiónico se pasó a través de un filtro de 0,1 μm , seguido en serie con un filtro de membrana de cartucho de 30 pulgadas (ULTIPOR DV20; Pall Corporation, Northborough, Mass.), y se recogió el filtrado.

En experimentos posteriores, la resina de PABA se saneó usando ácido acético 0,1 M + EtOH al 20%. Este procedimiento dio como resultado una estabilidad mejorada de la resina.

10 Ejemplo 2

Se estudió el efecto del pH sobre la conversión de PT-1 recombinante en trombina. Los experimentos se llevaron a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, usando una proporción de 2000:1 de PT-1 respecto a Ocutarina C inmovilizada y un tiempo de contacto de 2,5 minutos, variando el pH de la reacción de activación de 6,8 a 8,0. Dentro de este intervalo de pH la mejor conversión de PT-1 en trombina se describió a pH 7,4. A pH 6,8, la reacción de PT-1 en trombina era menos eficaz, dando como resultado menores rendimientos de trombina. A pH 8,0 había una tendencia de que la PT-1 se convirtiera en PT-2, dando como resultado de nuevo menores rendimientos de trombina. Véanse las Figs. 3-5.

- 15 Una segunda serie de experimentos realizados a pH de 6,0 a 7,4 mostró que el rendimiento de trombina cayó aproximadamente el 20% a pH 6,0 frente a pH 7,4. Curiosamente, en este conjunto de cuatro experimentos en el que se realizaron activaciones a pH 7,4, 6,8, 6,4 y 6,0, la conversión de PT-1 en trombina era bastante constante hasta que se consiguió un pH de 6,0. Además, se descubrió que la resina era menos estable a niveles de pH menores en comparación con niveles mayores.

20 Ejemplo 3

La activación de PT-1 se llevó a cabo esencialmente como se describe en el Ejemplo 1, usando concentraciones variables de NaCl a pH 7,4. Se descubrió que concentraciones crecientes de NaCl inhiben la reacción de activación como se muestra en la Fig. 6 (NaCl 300 mM; 29,4 mS/cm), la Fig. 7 (NaCl 120 mM; 14,3 mS/cm) y la Fig. 8 (NaCl 70 mM; 8,7 mS/cm). Sin embargo, tenía que incluirse algo de NaCl en el tampón de reacción para mantener la estabilidad de la PT-1 en la solución. A través de una serie de experimentos se determinó que el NaCl 70 mM proporcionaba una combinación adecuada de estabilidad de PT-1 y eficacia de activación.

- 25 Los experimentos también se realizaron a NaCl 30 mM observándose un ligero aumento en el rendimiento de producto, aunque a cierta pérdida de estabilidad.

30 Ejemplo 4

El efecto sobre la activación del tiempo de permanencia de la PT-1 en la columna de activador se estudió variando el caudal con condiciones de activación esencialmente como se describen en el Ejemplo 1. Se inyectaron volúmenes de bolo de 1,0 ml de PT-1 sobre una columna de PTA a escala reducida. Se recogieron fracciones, se inactivaron en una solución que contenía benzamidina soluble, y se ensayaron mediante HPLC de fase inversa para determinar las concentraciones de PT-1, PT-2 y trombina. Tiempos de contacto más cortos (caudales mayores) dieron como resultado una conversión más escasa de PT-1 en trombina. Estos estudios también demostraron que sólo había una modesta caída en la activación de PT-1 al final del procedimiento de conversión en comparación con las mediciones de conversión iniciales. Se muestra una representación gráfica de estos datos en la Fig. 1.

- 35 A concentraciones de PT-1 de entre 4 y 6 mg/ml, un tiempo de contacto de 2,5 minutos dio como resultado una buena conversión. Como se muestra en la Fig. 10, se obtuvieron resultados adecuados con una carga de PT-1 de 4,0 mg/ml (2000 mg de PT-1/ml de resina) y un tiempo de contacto de 2,5 minutos.

40 Ejemplo 5

Se estudió el efecto de parámetros de procedimiento sobre la activación de PT-1 y PT-2. 20 ml de cada de PT-1 y PT-2 se dializaron en Tris 20 mM, NaCl 120 mM, pH 7,4 durante 17,5 horas a 2-8°C. Las proteínas dializadas se diluyeron después hasta 1 mg/ml en el mismo tampón. Las soluciones de proteínas se aplicaron a la columna de activador a caudales de 0,2-0,5 ml/min a inyecciones equimolares. Como se muestra en la Fig. 2, la velocidad de conversión de PT-1 en trombina era superior a la velocidad de conversión de PT-2. También como se muestra en la Fig. 2, la velocidad de disminución de la conversión en función del tiempo de contacto para PT-1 era menor que para PT-2, indicando que la conversión de PT-2 está más influenciada por el tiempo de contacto en el activador.

- 45 50

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para convertir la pretrombina 1 en trombina, que comprende:
 - proporcionar pretrombina 1 a una concentración de 0,1 mg/ml a 10 mg/ml en una solución acuosa de NaCl de 30 mM a 110 mM a pH 6,4-8,0;
 - proporcionar oscutarina C inmovilizada en un soporte sólido; y
 - aplicar la solución acuosa a la oscutarina C inmovilizada para proporcionar de 500 mg a 4000 mg de pretrombina 1 por ml del soporte sólido y un tiempo de contacto entre la pretrombina 1 y la oscutarina C de 1,8 a 3,5 minutos ambos inclusive, por lo que la pretrombina 1 se escinde para producir trombina, y se obtiene una solución que contiene trombina.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además:
 - aplicar la solución que contiene trombina a un medio de captura seleccionado del grupo que consiste en un medio de cromatografía de intercambio iónico y un medio de cromatografía de afinidad, por lo que la trombina se une al medio de captura;
 - lavar la trombina unida; y
 - recuperar la trombina unida del medio de captura.
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que el medio de captura es un medio de cromatografía de afinidad.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que el medio de cromatografía de afinidad comprende PABA inmovilizada en un soporte sólido.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la oscutarina C se inmoviliza en una matriz de agarosa reticulada.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la concentración de oscutarina C en la matriz es de 1,0 mg/ml.
7. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la solución acuosa de pretrombina 1 es a pH = 7,4.
8. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la pretrombina 1 es pretrombina 1 humana.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que se lleva a cabo a una temperatura de 17°C a 45°C, preferentemente de 20°C a 37°C, y más preferentemente de 20°C a 30°C.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, que se lleva a cabo a una temperatura de 25°C.
11. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la oscutarina C se inmoviliza en el soporte sólido a una concentración de 0,1 a 20 mg de oscutarina C por ml de soporte.
12. El procedimiento de la reivindicación 11, en el que la concentración es de 0,1 a 5,0 mg de oscutarina C por ml de soporte.
13. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración de NaCl en la solución acuosa de pretrombina 1 es de 70 mM.
14. Un procedimiento para convertir la pretrombina 1 en trombina, que comprende:
 - proporcionar pretrombina 1 a una concentración de 1,0 mg/ml a 10 mg/ml en una solución acuosa de NaCl de 30 mM a 110 mM a pH = 6,8-8,0,
 - proporcionar oscutarina C inmovilizada en un soporte sólido a una concentración de 0,1 mg a 20 mg de oscutarina C por ml de soporte;
 - aplicar la pretrombina 1 a la oscutarina C inmovilizada para proporcionar una proporción de pretrombina 1:oscutarina C de 500 mg a 4000 mg de pretrombina 1 por ml del soporte sólido y un tiempo de contacto entre la pretrombina 1 y la oscutarina C de 1,8 a 3,5 minutos a una temperatura de 20°C-30°C, por lo que la pretrombina 1 se escinde para producir trombina, y se obtiene una solución que contiene trombina;
 - aplicar la solución que contiene trombina a PABA inmovilizada, por lo que la trombina se une a la PABA;
 - lavar la trombina unida para eliminar impurezas; y
 - recuperar la trombina unida de la PABA inmovilizada.
15. El procedimiento de la reivindicación 14, en el que la etapa de recuperación comprende lavar la PABA inmovilizada con NaCl e isopropanol a concentraciones suficientes para eluir la trombina unida.

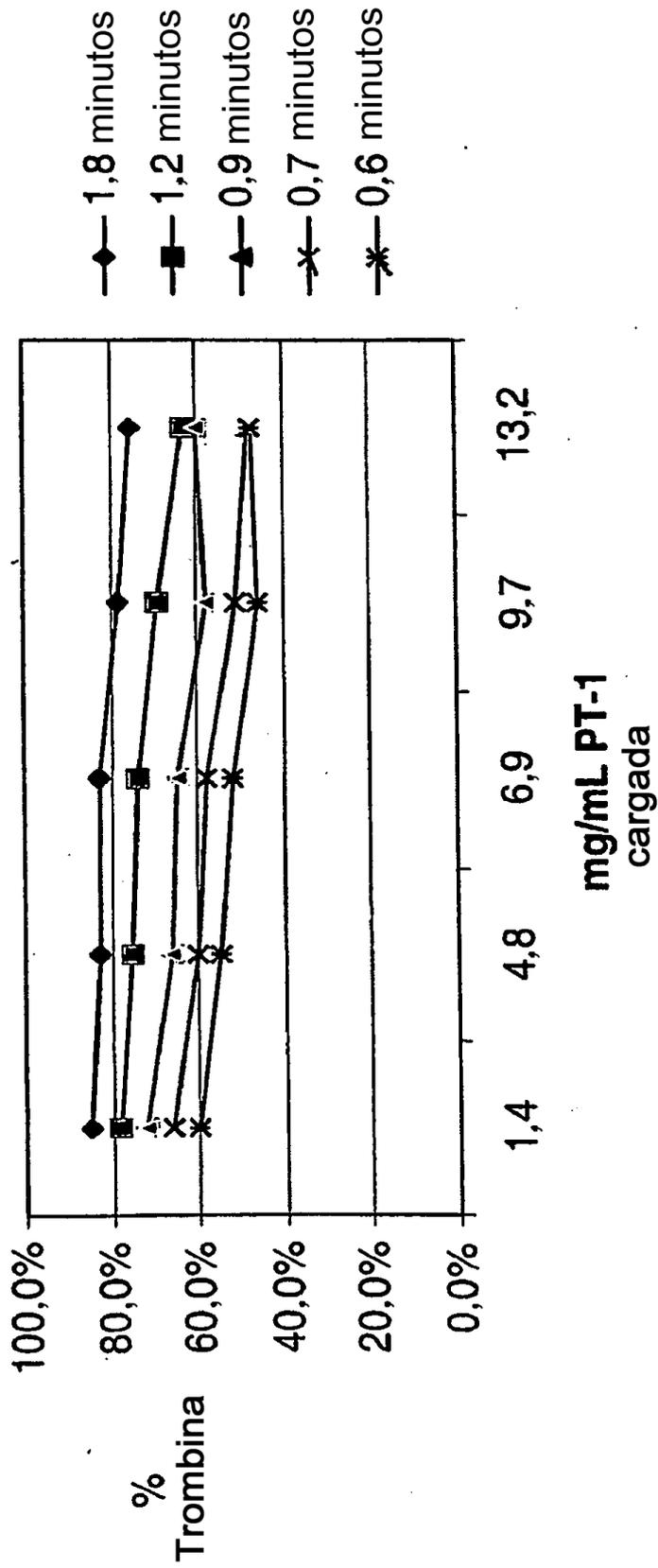


Fig. 1

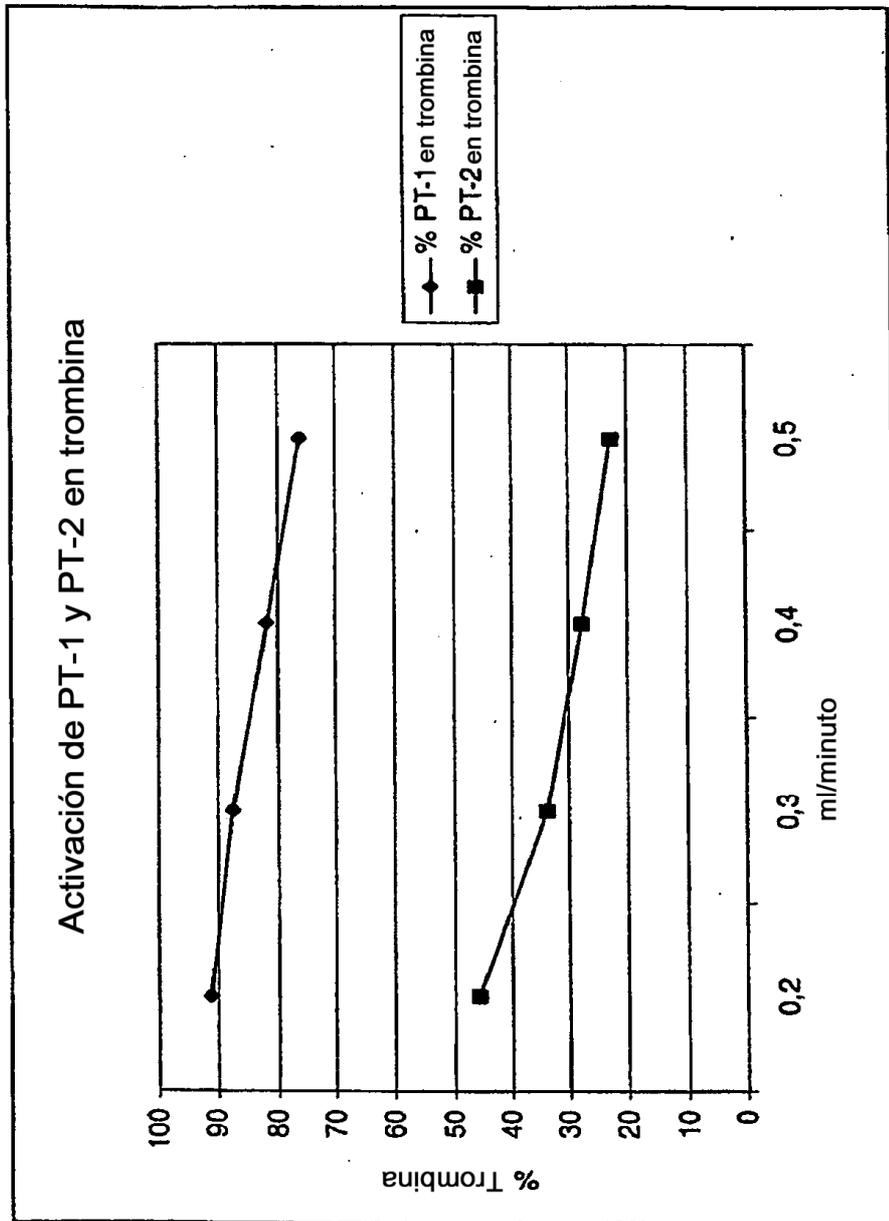


Fig. 2

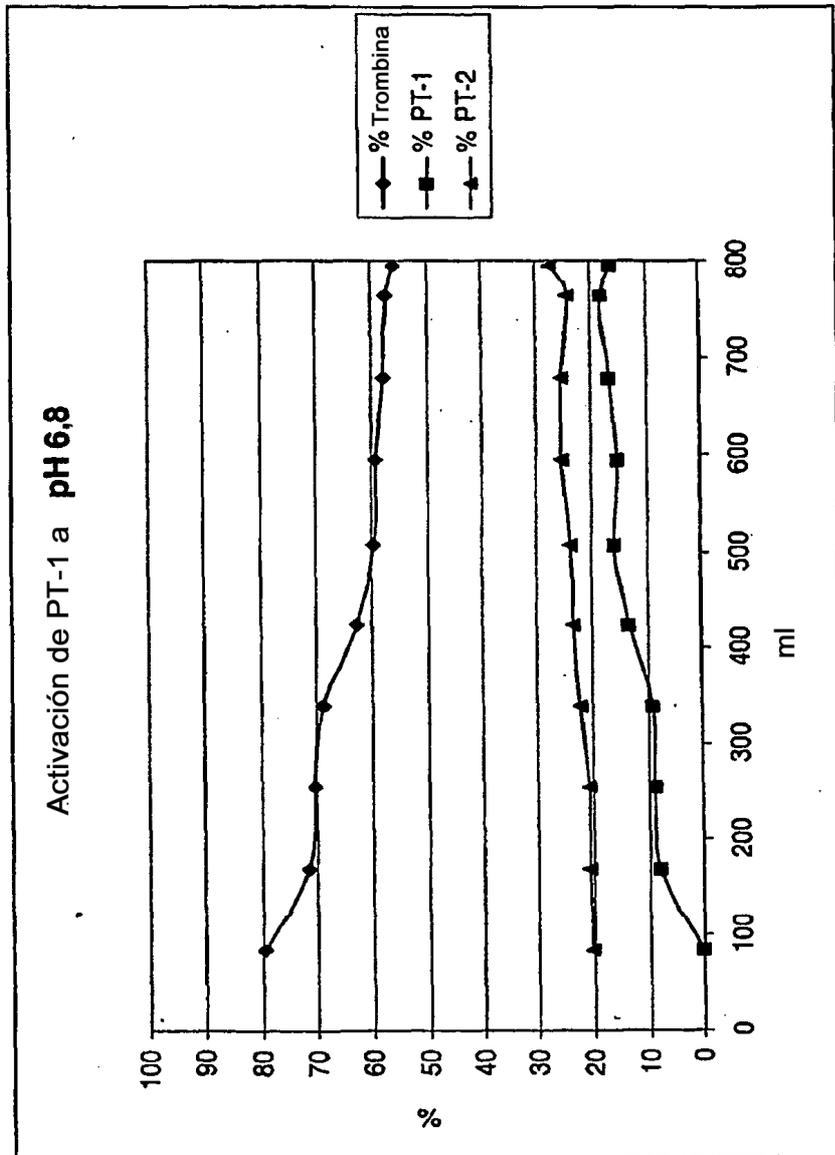


Fig. 3

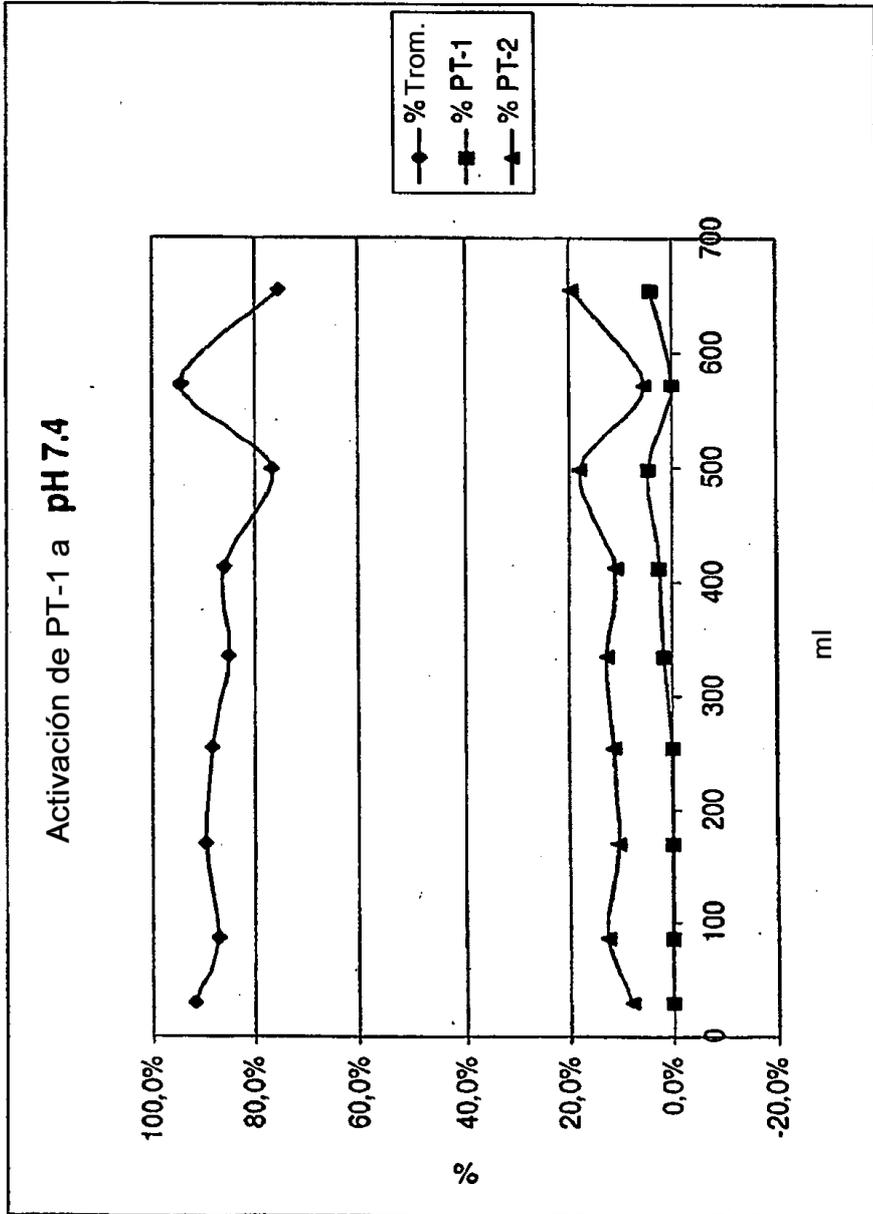


Fig. 4

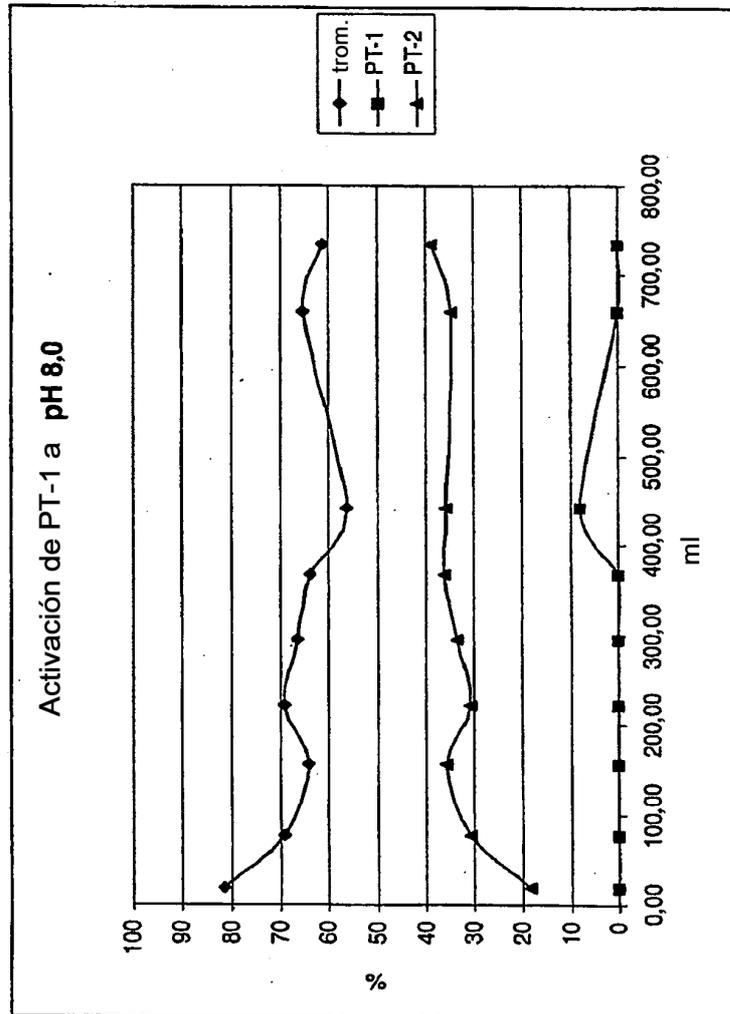


Fig. 5

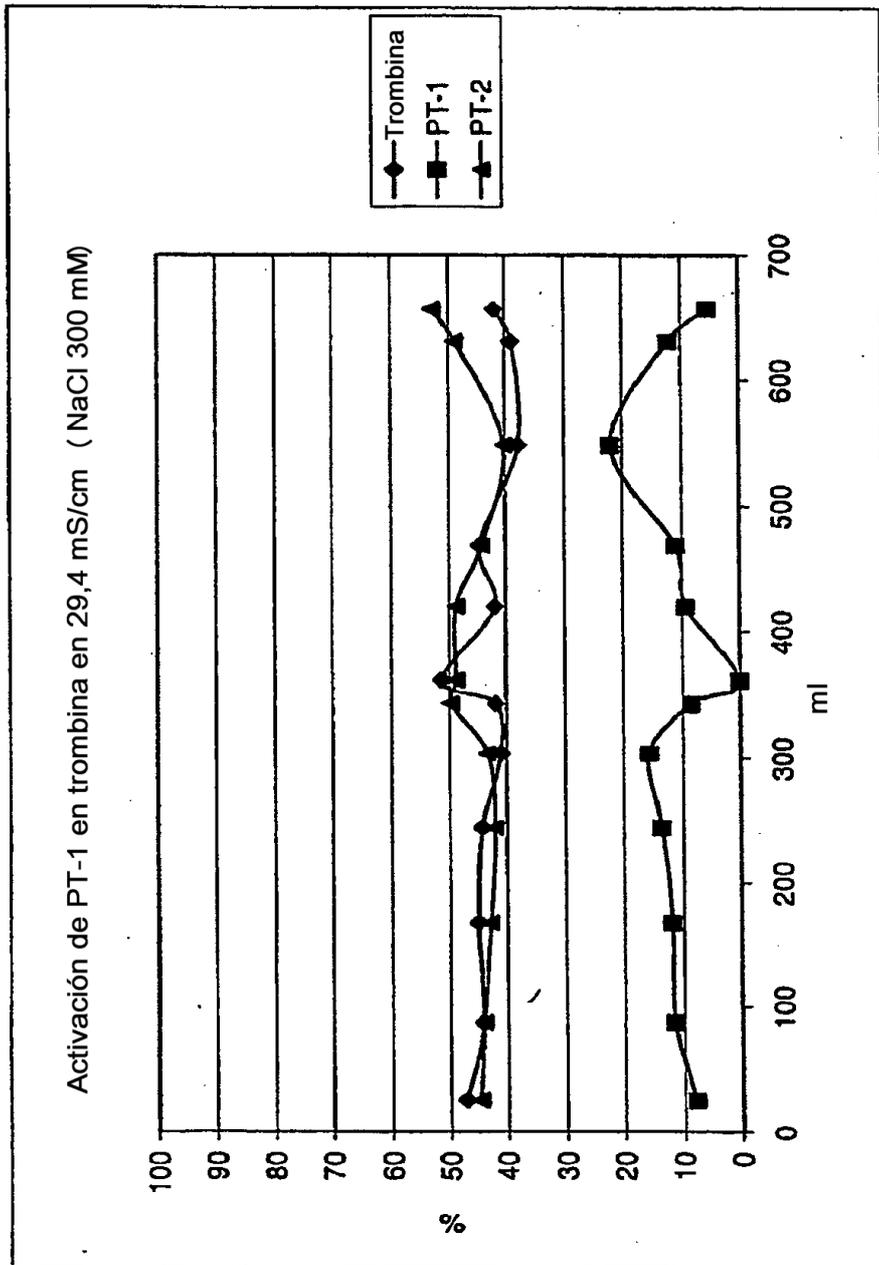


Fig. 6

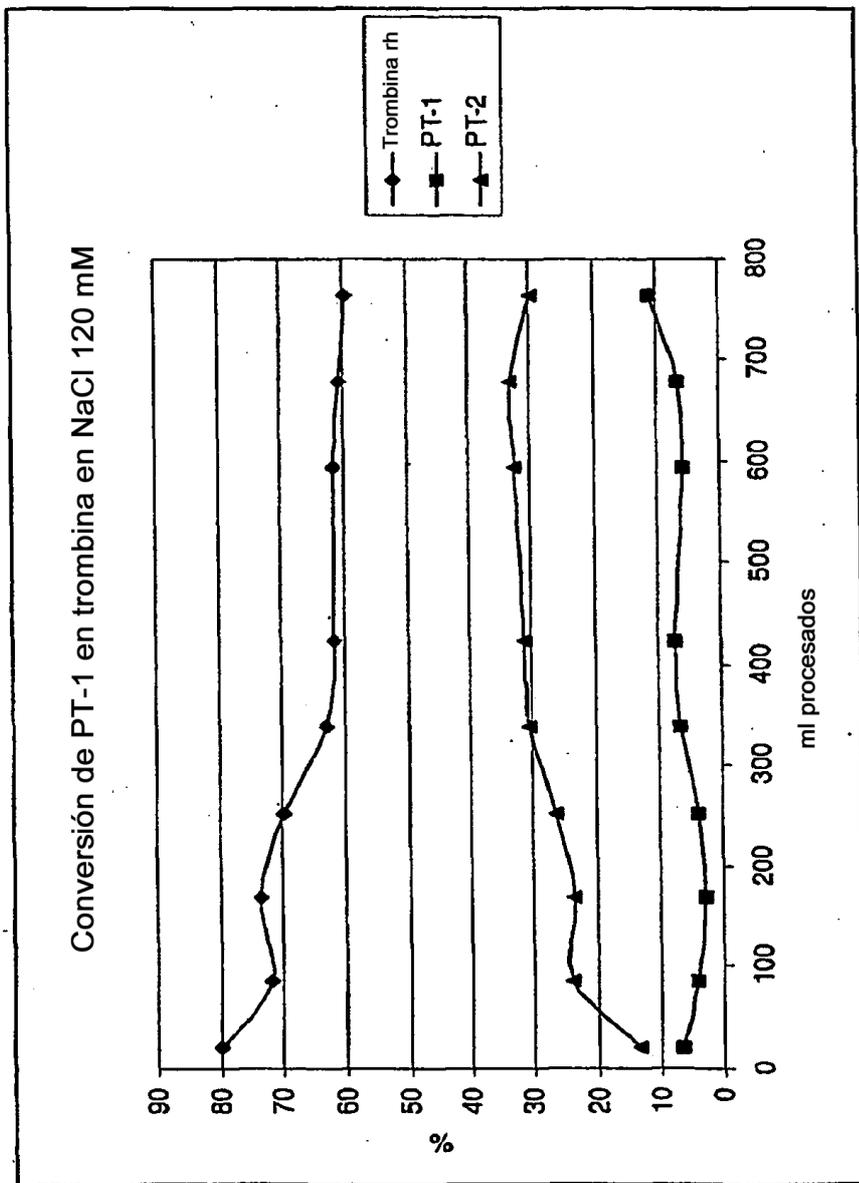


Fig. 7

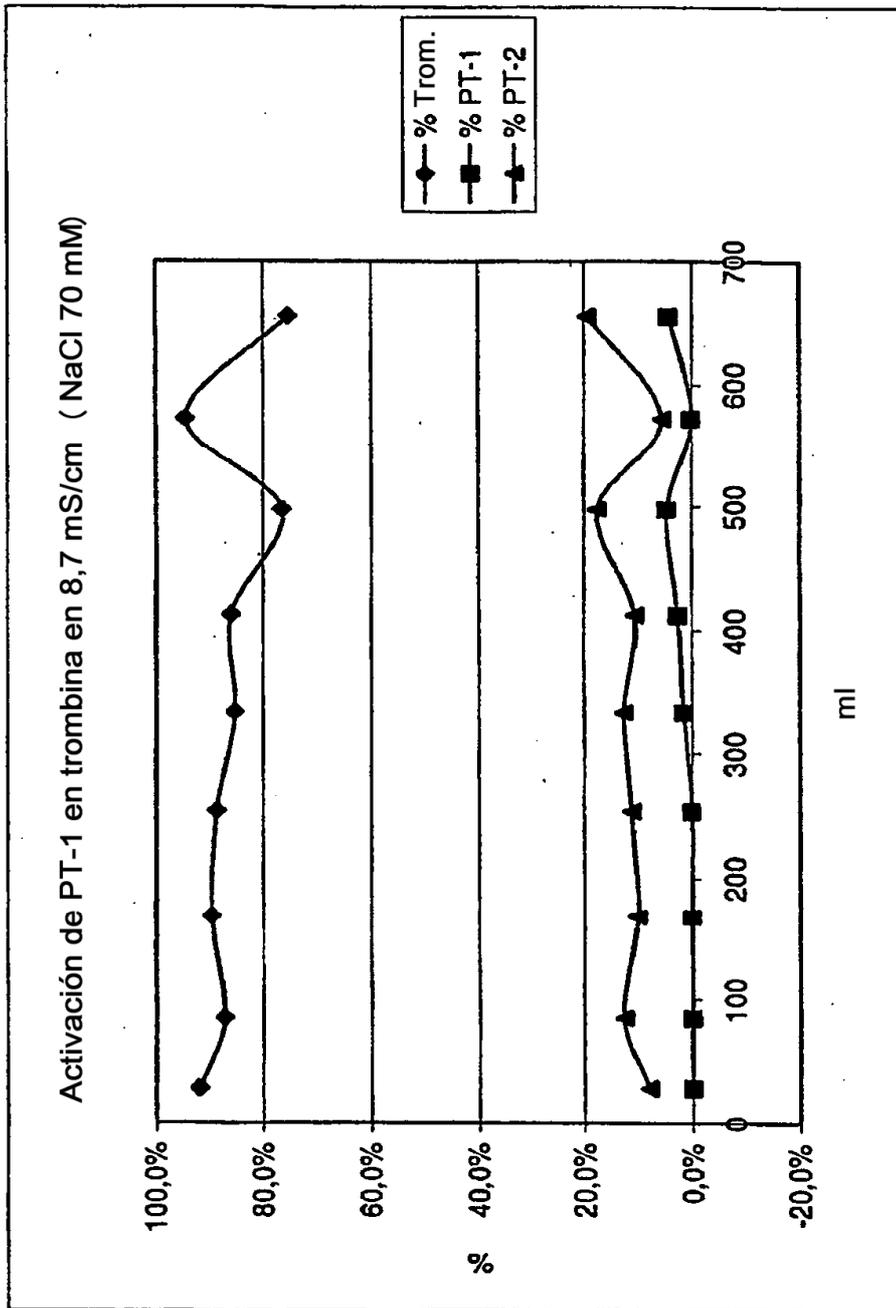


Fig. 8

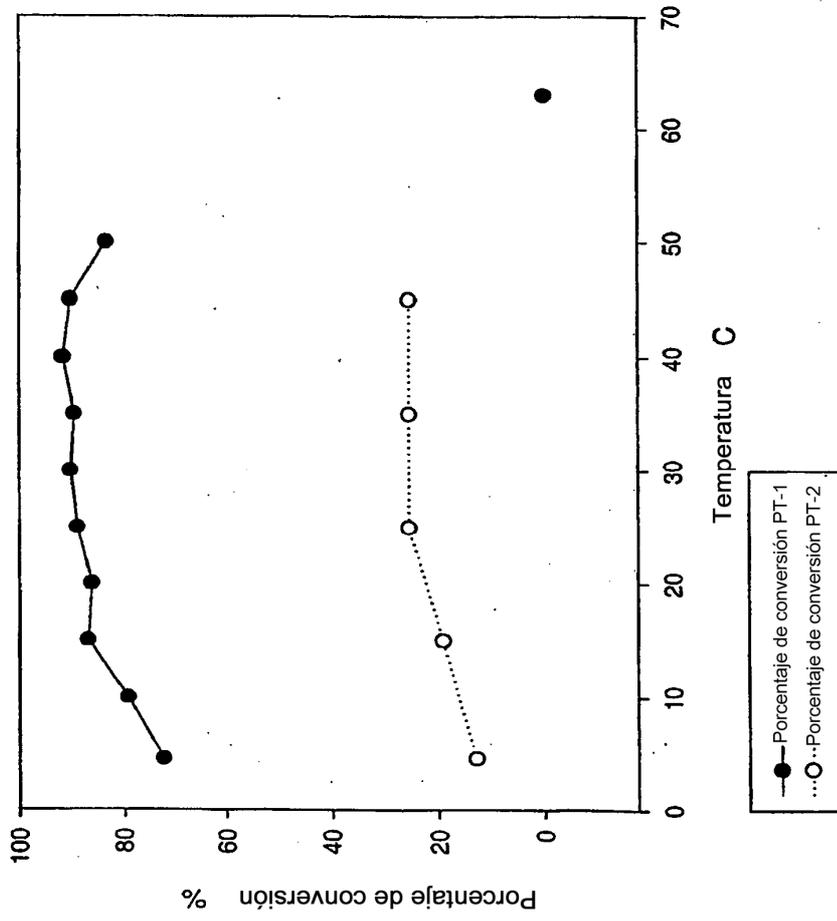


Fig. 9

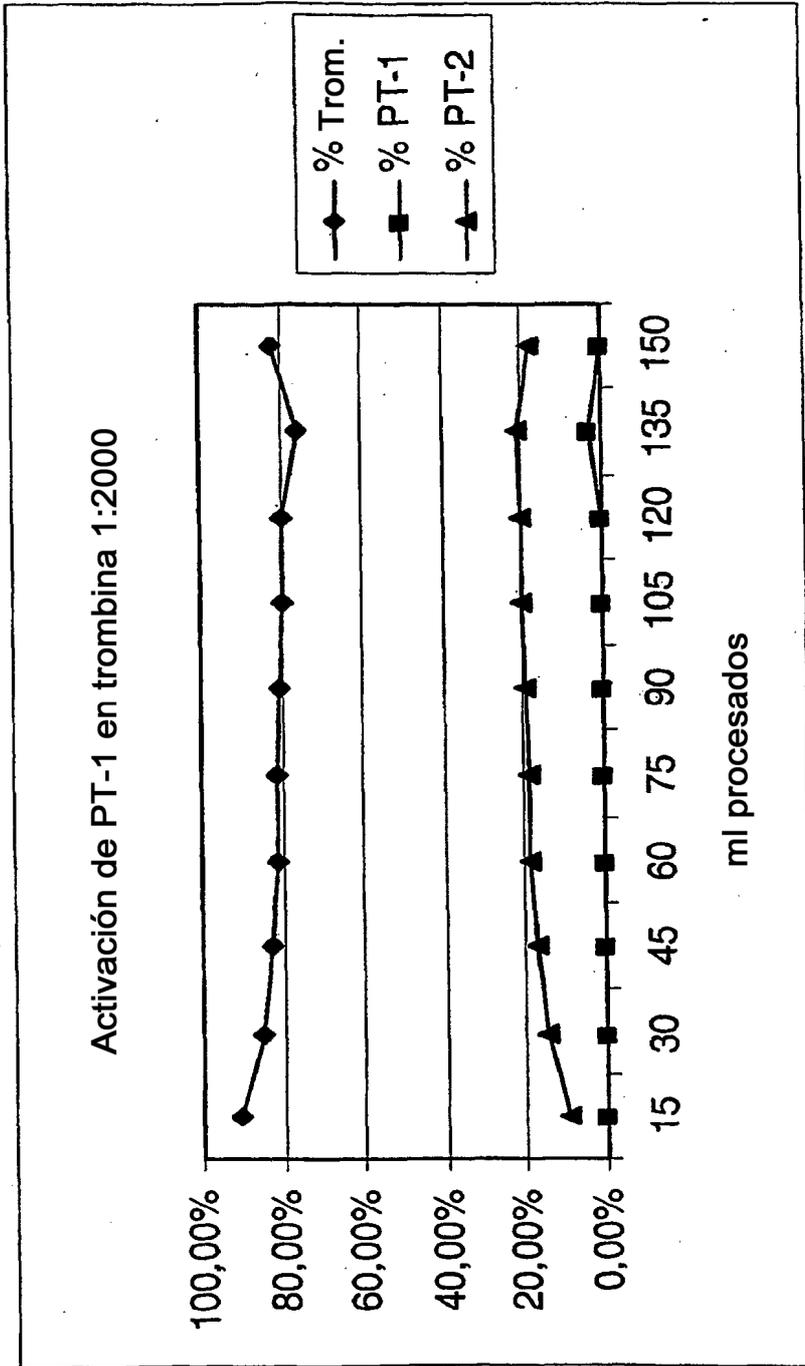


Fig. 10