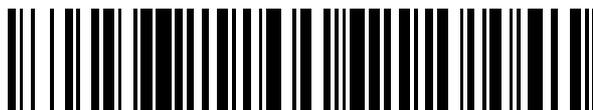


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 596**

51 Int. Cl.:

C07K 14/745 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

C07K 1/18 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2008 E 08722575 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.08.2014 EP 2138505**

54 Título: **Método para producir trombomodulina soluble de gran pureza**

30 Prioridad:

23.03.2007 JP 2007077389

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

19.09.2014

73 Titular/es:

**ASAHI KASEI PHARMA CORPORATION (100.0%)
1-105 KANDA JINBOCHO CHIYODA-KU
TOKYO 101-8101, JP**

72 Inventor/es:

OHIGASHI, SUSUMU

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 496 596 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

Método para producir trombomodulina soluble de gran pureza

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a un método para producir una trombomodulina soluble de gran pureza que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble que puede ser generado en condiciones ácidas.

Técnica anterior

10 Se sabe que la trombomodulina actúa como una sustancia que se une específicamente a la trombina de modo que inhiba su actividad de coagulación de la sangre y, al mismo tiempo, actúe para promover significativamente la capacidad de la trombina para activar la proteína C. También se sabe que la trombomodulina tiene una fuerte acción inhibidora de la coagulación de la sangre. También se sabe que la trombomodulina prolonga el tiempo de coagulación por trombina, o que suprime la agregación plaquetaria debida a la trombina. La proteína C es una proteína dependiente de la vitamina K que desempeña un papel importante en un sistema fibrinolítico de coagulación de la sangre. La proteína C es activada por la acción de la trombina, de manera que se convierta en proteína C
15 activada. Se sabe que la proteína C activada inactiva *in vivo* un factor V de coagulación de la sangre activado y un factor VIII de coagulación de la sangre activado, y que está implicada en la generación de un activador de plasminógeno que tiene acción trombolítica (Documento que no es patente 1). Por consiguiente, se considera que la trombomodulina promueve la activación de la proteína C por la trombina y por tanto que es útil como un anticoagulante o un agente trombolítico. También, está documentado en un experimento con animales, que la trombomodulina es eficaz para la terapia o prevención de enfermedades asociadas a la aceleración de la coagulación (Documento que no es patente 2).
20

25 Convencionalmente, la trombomodulina se descubrió y obtuvo como una glicoproteína que se expresa en las células endoteliales vasculares de varias especies animales, incluyendo seres humanos como ejemplos típicos, y después se clonó con éxito. Es decir, un gen precursor de la trombomodulina humana que contiene un péptido de señal se clonó por ingeniería genética a partir de una genoteca de cDNA de pulmón humano, y se analizaron todas las secuencias del gen de la trombomodulina. Como resultado, se clarificó una secuencia de aminoácidos que consistía en 575 residuos que contenían un péptido de señal (en general, se ilustraron 18 residuos de aminoácidos) (Documento de patente 1). Se sabe que una trombomodulina madura, a partir de la cual se escinde el péptido de señal, está compuesta de 5 regiones, a saber, una región N-terminal (aminoácidos 1-226: esta es la posición determinada cuando se supone que el péptido de señal consta de 18 residuos de aminoácidos, y lo mismo puede decirse de otras regiones), una región que tiene seis estructuras similares al EGF (factor de crecimiento epidérmico) (aminoácidos 227-462), una región de glicosilación unida por O (aminoácidos 463-498), una región transmembránica (aminoácidos 499 a 521) y una región intracitoplásmica (aminoácidos 522-557), desde el lado N-terminal del péptido maduro. También se sabe que, entre las seis estructuras similares al EGF, las porciones 4^a, 5^a y 6^a de estructuras
30 similares al EGF procedentes del lado N-terminal (es decir, unidades mínimas de actividad) tienen principalmente la misma actividad que la trombomodulina de longitud completa (Documento que no es patente 3).
35

40 Salvo que esté presente un tensioactivo, la trombomodulina de longitud completa se disuelve difícilmente. Por lo tanto, es necesaria la adición de un tensioactivo para obtener una preparación de trombomodulina. Por el contrario, también existe una trombomodulina soluble que se puede disolver completamente, incluso en ausencia de un tensioactivo. La trombomodulina soluble se puede preparar eliminando al menos una parte de la región transmembránica o la región transmembránica completa. Por ejemplo, se ha confirmado que se puede obtener una trombomodulina soluble que conste sólo de 3 regiones, a saber, una región N-terminal, una región que tiene seis estructuras similares al EGF y una región de glicosilación unida por O (es decir, una trombomodulina soluble que tiene un secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos 19 a 516 de la SEQ ID NO: 1), aplicando técnicas de recombinación, y que esta trombomodulina soluble recombinante tiene la misma actividad que una trombomodulina natural (Documento de patente 1). Además, hay algunos otros documentos que se refieren a trombomodulinas solubles (Documentos de patentes 2 a 9). También, se han ilustrado como trombomodulinas naturales una trombomodulina soluble derivada de orina humana y similares (Documentos de patentes 10 y 11).
45

50 Como se reconoce en muchos casos, como resultado de mutaciones espontáneas o mutaciones que ocurren cuando se obtienen trombomodulinas, se han encontrado mutaciones polimórficas incluso en genes humanos. Actualmente, se han identificado genes de trombomodulina en los que el aminoácido en la posición 473 de un precursor de trombomodulina humana, que tiene la secuencia de aminoácidos antes mencionada que consiste en 575 residuos de aminoácidos, se convierte en Val o Ala. En una secuencia de nucleótidos que codifica este aminoácido, el nucleótido en la posición 1418 se convierte en T o C (Documento que no es de patente 4). Sin embargo, las dos trombomodulinas son completamente idénticas en cuanto a su actividad y propiedades físicas. Por lo tanto, se puede considerar que son sustancialmente idénticas.
55

Está documentado que la trombomodulina tiene efectos sobre la terapia de la coagulación intravascular diseminada (CID) (Documento que no es patente 5). Además de los usos previstos antes mencionados, se prevé que la

trombomodulina se usará en la terapia y prevención de diversas enfermedades, tales como síndrome coronario agudo (SCA), trombosis, obstrucción vascular periférica, arteriosclerosis obliterante, vasculitis, trastorno funcional que ocurre después de cirugía cardíaca, complicación provocada por trasplante de órganos, angina de pecho, ataque isquémico transitorio, toxemia del embarazo, diabetes, EVO hepática (enfermedad veno-oclusiva hepática, por ejemplo, hepatitis fulminante, enfermedad veno-oclusiva del hígado que ocurre después de trasplante de médula ósea), trombosis venosa profunda (TVP) y síndrome de dificultad respiratoria del adulto (SDRA).

Como productos desnaturalizados de la trombomodulina, se conocen un agregado generado en un proceso de liofilización y un agregado generado durante la conservación a largo plazo en estado liofilizado (Documentos de patentes 12 a 16).

Los métodos conocidos para producir trombomodulina soluble a nivel industrial para uso en productos farmacéuticos incluyen: un método que utiliza cromatografía de afinidad en la que un anticuerpo que reacciona con la trombomodulina se mantiene en una etapa de purificación; un método para producir trombomodulina soluble de gran pureza que no contiene sustancialmente ni productos derivados de suero ni productos derivados de anticuerpos, que se caracteriza por que la trombomodulina soluble se obtiene como una fracción de paso en una etapa que permite que la trombomodulina soluble obtenida por cromatografía de afinidad se ponga en contacto con un intercambiador catiónico en condiciones que consisten en una conductividad específica de 25 a 34 mS/cm y pH de 3 a 4 (Documento de patente 17); y un método para purificar trombomodulina, que se caracteriza porque comprende purificar en primer lugar una muestra que contiene trombomodulina de orina humana por cromatografía de afinidad de trombina fijada y a continuación purificar la muestra por cromatografía de adsorción utilizando hidroxapatita como adsorbente (Documento de patente 18).

Documento de patente 1: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 64-6219 A (1989)

Documento de patente 2: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 2-255699 A (1990)

Documento de patente 3: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 3-133380 A (1991)

Documento de patente 4: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 3-259084 A (1991)

Documento de patente 5: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 4-210700 A (1992)

Documento de patente 6: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 5-213998 A (1993)

Documento de patente 7: WO92/00325

Documento de patente 8: WO92/03149

Documento de patente 9: WO93/15755

Documento de patente 10: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 3-86900 A (1991)

Documento de patente 11: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 3-218399 A (1991)

Documento de patente 12: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 6-321085 A (1994)

Documento de patente 13: Patente japonesa N° 3007785

Documento de patente 14: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 11-171790 A (1999)

Documento de patente 15: WO95/16460

Documento de patente 16: Patente japonesa N° 3822383

Documento de patente 17: Publicación de patente japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999)

Documento de patente 18: Patente japonesa N° 3745805

Documento que no es patente 1: Koji Suzuki, *Igaku no Ayumi* (Progression of Medicines), Vol. 125, p. 901 (1983)

Documento que no es patente 2: K. Gomi et al., *Blood* 75, 1396-1399 (1990)

Documento que no es patente 3: M. Zushi et al., *J. Biol. Chem.*, 246, 10351-10353 (1989)

Documento que no es patente 4: D. Z. Wen et al., *Biochemistry*, 26, 4350-4357 (1987)

Documento que no es patente 5: S. M. Bates et al., *Br. J. of Pharmacol.*, 144, 1017-1028 (2005)

Descripción de la invención

Objeto que ha de ser resuelto por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un método para producir trombomodulina que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble con alta productividad.

Medios para resolver el objeto

En un proceso para producir trombomodulina soluble a nivel industrial o en un método para producir trombomodulina soluble que comprende una etapa de inactivación de virus en condiciones ácidas, el autor de la presente invención ha encontrado un nuevo objeto que consiste en que se genera un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble cuando la trombomodulina soluble se deja en condiciones ácidas y que debe eliminarse eficazmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Con el fin de eliminar el producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, el autor de la presente invención ha estudiado el uso de cromatografía de filtración en gel (CFG), cromatografía de exclusión por tamaños (CET) y similares. Sin embargo, el autor de la presente invención ha encontrado que la cromatografía de filtración en gel (CFG) o la cromatografía de exclusión por tamaños (CET) tiene pequeña capacidad de procesamiento y por tanto que debe aumentarse su volumen de columna (volumen de columna común: 5% o menos) o se necesitan múltiples ciclos. Además, como un método para aumentar la eficacia, se considera un aumento de la velocidad lineal de la cromatografía. Sin embargo, no es adecuado dicho aumento de

la velocidad lineal debido a que disminuye la capacidad de separación. Además, como otro método, también se considera un aumento de la concentración de la proteína procesada. Sin embargo, este método es problemático debido a la adición de una etapa de concentración para aumentar la concentración de la proteína, una disminución de la capacidad de separación causada por la alta viscosidad debido a una alta concentración de proteína, y similares.

Por tanto, con el fin de producir trombomodulina soluble a nivel industrial para conseguir el objeto antes mencionado de la presente invención, el autor de la presente invención ha considerado que es importante separar un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble por un método que implique alta productividad, por el cual se consiga el objeto antes mencionado. Con el fin de lograr el nuevo objeto antes mencionado, el autor de la presente invención ha realizado estudios intensivos con relación a diversas condiciones utilizando diversos soportes cromatográficos. Como resultado, el autor de la presente invención ha tenido éxito encontrando un método para separar eficaz y establemente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble utilizando un intercambiador aniónico o hidroxapatita como soporte y determinando las condiciones adecuadas para cada uno de los soportes.

Específicamente, la presente invención incluye las siguientes características.

[A1] Un método para producir trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble que puede ser generado a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas, que comprende:

(0) una etapa en la que se deja la trombomodulina soluble en condiciones ácidas de pH 5 o menor; (1) una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble que a su vez contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, que se obtiene en la etapa (0) anterior, a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita; y (2) una etapa en la que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en condiciones de separación, en las que la trombomodulina soluble se puede separar de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

[A2-1] El método de producción de acuerdo con [A1] anterior, en el que la etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico.

[A2-2] El método de producción de acuerdo con [A1] anterior, en el que la etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene la trombomodulina soluble a través de hidroxapatita.

[A3] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1], [A2-1] y [A2-2] anteriores, en el que el contenido de la trombomodulina soluble es 80% o más, respecto a las proteínas totales en el material que contiene trombomodulina soluble.

[A3-2] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3] anteriores, en el que el contenido de la trombomodulina soluble es 90% o más, respecto a las proteínas totales en el material que contiene trombomodulina soluble.

[A3-3] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3] anteriores, en el que el contenido de la trombomodulina soluble es 95% o más, respecto a las proteínas totales en el material que contiene trombomodulina soluble.

[A3-4] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3] anteriores, en el que el contenido de la trombomodulina soluble es 99% o más, respecto a las proteínas totales en el material que contiene trombomodulina soluble.

[A4] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, de modo que se obtenga una fracción de elución que contenga trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

Ha de observarse que, en el caso en el que los párrafos citados se indican como un intervalo (por ejemplo, [A1] a [A3-4] como se ha descrito anteriormente) y está incluido en el intervalo un párrafo que tiene un sub-número, tal como [A3-2], se entiende que también se cita el párrafo que tiene un sub-número, tal como [A3-2]. Esta regla se aplica también a las siguientes descripciones.

[A5] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (2) es una etapa en la que se obtiene una fracción de paso, en la que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

[A6] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución isocrática para obtener una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

5 [A7] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico utilizando una solución tampón de pH 4 a 9; y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, utilizando una solución tampón de pH 5 a 9 que tiene una
10 concentración de sal de 0 a 1 M, de modo que se obtenga una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

[A8] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico utilizando una solución tampón de pH 5 a 8 que tiene una concentración de sal de 0,1 a 0,2 M; y la etapa
15 (2) es una etapa en la que se obtiene una fracción de paso usando una solución tampón de pH 5 a 8 que tiene una concentración de sal de 0,1 a 0,2 M, de modo que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

[A9] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de hidroxiapatita usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 8 mM o menor; y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, utilizando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 0 a 0,5 M, de modo que se obtiene una
20 fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble.
25

[A10] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A3-4] anteriores, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de hidroxiapatita usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 20 mM o menor; y la etapa
30 (2) es una etapa en la que se obtiene una fracción de paso usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 20 mM, de modo que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

[A11] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A10] anteriores, que no comprende una etapa en la que se ajusta el pH de una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble a pH 4 o menor, después que se ha
35 obtenido la fracción de elución.

[A12] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A11] anteriores, que es un método de producción que comprende una etapa de concentración y/o una etapa de desalación, en la que el pH de una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble no se ajusta a pH 4 o menor después de que se ha obtenido la fracción de elución, en el que el método de producción se utiliza para convertir la trombomodulina soluble en un material farmacéutico.
40

En el método de la invención, el contenido de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble es 3% o menos.

[A13] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A12] anteriores, en el que la trombomodulina soluble es trombomodulina obtenida a partir de células transformantes preparadas por transfección de células hospedantes con DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 u 11.
45

También se describe en la presente memoria un método que contiene las siguientes características.

[A15] Un método para purificar trombomodulina soluble, de tal modo que la trombomodulina soluble no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble que se puede generar a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas, que comprende: (1) una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble que a su vez contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxiapatita, y (2) una etapa en la que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en condiciones de separación, en las que puede separarse
50 trombomodulina soluble de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble; o el método de purificación, en el que, en la etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxiapatita, se prepara una solución tampón del material que contiene trombomodulina
55

soluble y se obtiene como fracción de paso la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

[A15-2] El método de purificación de acuerdo con [A15] anterior, que tiene el rasgo característico de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A14] anteriores.

- 5 [A16] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [A1] a [A15] anteriores, en el que el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble en la trombomodulina que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble es 3,0% o menos.

También se describen en la presente memoria métodos que contienen las siguientes características.

- 10 [B1] Un método para producir trombomodulina que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble a partir de un material que contiene trombomodulina soluble que a su vez contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble que se puede generar a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas, que comprende: (1) una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita, y (2) una etapa en la que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en condiciones de separación, en las que se puede separar la trombomodulina soluble a partir del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

- 15 [B2] Un método para producir trombomodulina que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble a partir de un material que contiene trombomodulina soluble que a su vez contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble que se puede generar a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas, que comprende un etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita, en la que se prepara una solución tampón del material que contiene trombomodulina soluble y se obtiene como una fracción de paso la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

- 20 [B3] El método de producción de acuerdo con [B1] anterior, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico, usando una solución tampón de pH 4 a 9, y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, utilizando una solución tampón de pH 5 a 9 que tiene una concentración de sal de 0 a 1 M, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, después que ha sido confirmada previamente la posición de la fracción de elución o mientras se confirma la presencia de la fracción de elución.

- 25 [B4] El método de producción de acuerdo con [B1] anterior, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico, usando una solución tampón de pH 4 a 5, y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, utilizando una solución tampón de pH 5 a 9 que tiene una concentración de sal de 0 a 1 M, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, después que ha sido confirmada previamente la posición de la fracción de elución o mientras se confirma la presencia de la fracción de elución.

30 [B5] El método de producción de acuerdo con [B2] anterior, en el que se usa una solución tampón de pH 5 a 8 que tiene una concentración de sal de 0,1 a 0,2 M y un material que contiene trombomodulina soluble se hace pasar a través de un intercambiador aniónico para obtener trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente como fracción de paso un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

- 35 [B6] El método de producción de acuerdo con [B1] anterior, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de hidroxapatita, usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 8 mM o menor, y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, utilizando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 0 a 0,5 M, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, después que se ha confirmado previamente la fracción de elución o mientras se confirma la presencia de la fracción de elución

- 40 [B7] El método de producción de acuerdo con [B1] anterior, en el que la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de hidroxapatita, usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 1 a 4 mM, y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente que combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, utilizando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una

concentración de fosfato de 1 a 40 mM, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, después que se ha confirmado previamente la fracción de elución o mientras se confirma la presencia de la fracción de elución.

5 [B8] El método de producción de acuerdo con [B2] anterior, en el que se usa una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 20 mM y un material que contiene trombomodulina soluble se hace pasar a través de hidroxapatita para obtener trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente como fracción de paso un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

10 [B9] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [B1] a [B8] anteriores, en donde, después que se ha obtenido una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, el pH de la fracción de elución no se ajusta a pH 4 o menor.

15 [B10] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [B1] a [B8] anteriores, en donde, después que se ha obtenido una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, se realiza una etapa de concentración o una etapa de desalación sin ajustar el pH de la fracción de elución a pH 4 o menor, de modo que se convierte la trombomodulina soluble en un material farmacéutico.

[B11] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [B1] a [B10] anteriores, en el que el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos.

20 [B12] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [B1] a [B11] anteriores, en el que el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 1% o menos.

25 [B13] El método de producción de acuerdo con una cualquiera de [B1] a [B12] anteriores, en el que la trombomodulina soluble es un péptido obtenido a partir de células transformantes preparadas por transfección de células hospedantes con DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 u 11.

Efecto de la invención

30 El método de producción de la presente invención no requiere una etapa de concentración para aumentar la concentración de una proteína procesada. Así, el uso del método de producción de la presente invención permite la separación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble de la trombomodulina soluble, con alta productividad, independientemente de la limitación por un volumen procesado. Como resultado, se puede obtener una trombomodulina soluble de gran pureza que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.

Mejor modo de realizar la invención

35 Se sabe que la trombomodulina usada en la presente invención tiene la acción de: (1) unirse selectivamente a la trombina y (2) promover la activación de la proteína C realizada por la trombina. Además, es preferible que la presente trombomodulina tenga generalmente (3) la acción de prolongar el tiempo de coagulación por trombina y/o (4) la acción de suprimir la agregación plaquetaria causada por la trombina. Dicha acción de la trombomodulina puede denominarse actividad de trombomodulina.

40 En cuanto a actividad de trombomodulina, la trombomodulina tiene preferiblemente las acciones (1) y (2) anteriores, y más preferiblemente, todas las acciones (1) a (4) anteriores.

45 En cuanto a la acción de promover la activación de la proteína C realizada por la trombina, el nivel de actividad de la acción de promover la activación de la proteína C o la presencia o ausencia de dicha acción se puede confirmar fácilmente aplicando los métodos de ensayo descritos claramente en diversos tipos de publicaciones conocidas, que incluyen la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 64-6219 A (1989). Por otra parte, también se puede confirmar de la misma manera anterior la acción de prolongar el tiempo de coagulación realizada por la trombina o la acción de suprimir la agregación plaquetaria realizada por la trombina.

50 Un ejemplo de la trombomodulina soluble descrito en la presente invención es trombomodulina soluble que es soluble en agua en ausencia de un tensioactivo. Como ejemplo preferido de la solubilidad de dicha trombomodulina soluble es una solubilidad de 1 mg/mL o mayor, o 10 mg/mL o mayor, en agua, por ejemplo, en agua destilada usada para preparaciones inyectables (en general, alrededor de un intervalo neutro en ausencia de un tensioactivo, tal como Triton X-100 o Polidocanol). Dicha solubilidad es preferiblemente 15 mg/mL o mayor, o 17 mg/mL o mayor; más preferiblemente 20 mg/mL o mayor, 25 mg/mL o mayor o 30 mg/mL o mayor; y particular y preferiblemente 60 mg/mL o mayor. En algunos casos, dicha solubilidad puede ser 80 mg/mL o mayor o 100 mg/mL o mayor. Con el fin de determinar si estaba o no disuelta la trombomodulina soluble, después que se haya disuelto la trombomodulina soluble, se observa la solución a simple vista, por ejemplo, directamente bajo una fuente de luz blanca, en una

posición de brillo de aproximadamente 1.000 lux. Cuando la solución es transparente y no contiene sustancias insolubles que se vean claramente, se puede entender como un indicador claro de disolución de la trombomodulina soluble. Además, también es posible filtrar la solución y confirmar la presencia o ausencia de un residuo.

5 La trombomodulina utilizada en la presente invención comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, que se conoce como la porción central de la actividad de trombomodulina de la trombomodulina humana. La secuencia de aminoácidos de la presente trombomodulina no está limitada particularmente, siempre que comprenda una secuencia de aminoácidos que consista en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las
10 posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos descrita anteriormente mostrada en SEQ ID NO: 1 puede ser natural o mutada artificialmente, siempre que tenga acción para promover la activación de la proteína C realizada por la trombina, a saber, actividad de trombomodulina. Es decir, la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 puede comprender una sustitución, delección o adición de uno o múltiples aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1. El nivel aceptable de mutación no está limitado particularmente, siempre que la secuencia de aminoácidos antes mencionada tenga actividad de
15 trombomodulina. La secuencia de aminoácidos mutada que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 muestra una homología de, por ejemplo, 50% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, particular y preferiblemente 95% o más y lo más preferiblemente 98% o más, con la secuencia de aminoácidos original. Dicha secuencia de aminoácidos se denomina una secuencia homóloga obtenida por mutación. Como se describe más adelante, dicha secuencia de aminoácidos mutada se puede producir fácilmente por una técnica de ingeniería genética usual.

25 En la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3, Val, que es el aminoácido en la posición 125 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1, ha sido sustituido por Ala. La trombomodulina usada en la presente invención también incluye preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 3.

30 Así, el tipo de trombomodulina usado en la presente invención no está limitado particularmente, siempre que tenga, al menos, una secuencia de aminoácidos que consista en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o 3, o una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia antes mencionada, y que comprenda al menos una secuencia peptídica que tenga actividad de trombomodulina. Los ejemplos preferidos de la presente trombomodulina incluyen un péptido que consiste en una secuencia de los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 o en las posiciones 17 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o 3, y un péptido que consiste en una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia antes mencionada y que tiene al menos actividad de trombomodulina. Es más preferido un péptido que consiste en una secuencia de los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 1 o 3. Además, en otra realización más preferida, también se puede aplicar un péptido que consiste en una secuencia homóloga obtenida por mutación de los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 o en las posiciones 17 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 3 y que tiene al menos actividad de trombomodulina.

40 En otra realización, la trombomodulina usada en la presente invención comprende preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. El tipo de la presente trombomodulina en esta realización no está limitado particularmente, siempre que comprenda dicha secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5. La secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos antes mencionada mostrada en la SEQ ID NO: 5 se puede mutar homológamente, siempre que tenga una acción de promover la activación de la proteína C realizada por la trombina, principalmente, actividad de trombomodulina.

50 En la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7, Val, que es el aminoácido en la posición 473 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5, ha sido sustituido por Ala. La trombomodulina usada en la presente invención también incluye preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7.

55 Así, el tipo de la trombomodulina usado en la presente invención no está limitado particularmente, siempre que tenga, al menos, una secuencia de aminoácidos que consista en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o 7, o una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia antes mencionada, y comprenda al menos una secuencia peptídica que tenga actividad de trombomodulina. Los ejemplos preferidos de la presente trombomodulina incluyen un péptido que consiste en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 o en las posiciones 17 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o 7, y un péptido que consiste en una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia antes mencionada y que tiene al menos actividad de trombomodulina. Es más preferido un péptido que consiste en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o 7. Además, en una realización aún más preferida, se
60

puede aplicar también un péptido que consiste en una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia de aminoácidos consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 o en las posiciones 17 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o 7 y que tiene al menos actividad de trombomodulina.

5 En una realización adicional, la trombomodulina usada en la presente invención incluye preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9. El tipo de la presente trombomodulina en esta realización no está limitado particularmente, siempre que comprenda dicha secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9. La secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos antes mencionada mostrada en la SEQ ID NO: 9 puede ser mutada homológamente, siempre que tenga acción de promover la activación de la proteína C realizada por la trombina, a saber, actividad de trombomodulina.

10 En la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11, Val, que es el aminoácido en la posición 473 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9, ha sido sustituido por Ala. La trombomodulina usada en la presente invención también incluye preferiblemente una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11.

15 Así, el tipo de la trombomodulina usado en la presente invención no está limitado particularmente, siempre que tenga, al menos, una secuencia de aminoácidos que consista en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11, o una secuencia peptídica que tenga una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia antes mencionada y que tenga al menos actividad de trombomodulina. Los ejemplos más preferidos de la presente trombomodulina incluyen un péptido que consiste en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516, en las posiciones 19 a 515, en las posiciones 17 a 516 o en las posiciones 17 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11, y un péptido que consista en una secuencia homóloga obtenida por mutación de la secuencia antes mencionada y que tenga al menos actividad de trombomodulina. Es particularmente preferido un péptido que consiste en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516, en las posiciones 19 a 515, en las posiciones 17 a 516 o en las posiciones 17 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9. Además, una de sus mezclas es también un ejemplo preferido. Por otra parte, en otra realización particularmente preferida, se puede aplicar también un péptido que consiste en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516, en las posiciones 19 a 515, en las posiciones 17 a 516 o en las posiciones 17 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11. Una de sus mezclas es también un ejemplo preferido de la trombomodulina de la presente invención. Además, un péptido que consiste en una de sus secuencias homólogas obtenida por mutación y que tiene al menos actividad de trombomodulina es también otro ejemplo preferido de la presente trombomodulina.

20 Un péptido que tiene una secuencia homóloga obtenida por mutación es como se ha descrito anteriormente. Dicho péptido que tiene una secuencia homóloga obtenida por mutación incluye también un péptido que puede comprender una sustitución, delección o adición de uno o más, a saber: uno o múltiple, y preferiblemente varios (por ejemplo, 1 a 20, preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 5 y en particular preferiblemente 1 a 3) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido diana. El nivel aceptable de mutación no está limitado particularmente, siempre que el péptido tenga actividad de trombomodulina. El péptido mutado muestra una homología de, por ejemplo, 50% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, particular y preferiblemente 95% o más, y lo más preferiblemente 98% o más, al nivel de secuencia de aminoácidos con el péptido diana.

25 Un péptido que tiene una secuencia homóloga obtenida por mutación es como se ha descrito anteriormente. Dicho péptido que tiene una secuencia homóloga obtenida por mutación incluye también un péptido que puede comprender una sustitución, delección o adición de uno o más, a saber: uno o múltiple, y preferiblemente varios (por ejemplo, 1 a 20, preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 5 y en particular preferiblemente 1 a 3) aminoácidos en la secuencia de aminoácidos del péptido diana. El nivel aceptable de mutación no está limitado particularmente, siempre que el péptido tenga actividad de trombomodulina. El péptido mutado muestra una homología de, por ejemplo, 50% o más, preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, más preferiblemente 90% o más, particular y preferiblemente 95% o más, y lo más preferiblemente 98% o más, al nivel de secuencia de aminoácidos con el péptido diana.

30 Por otra parte, otros ejemplos preferidos de la trombomodulina usada en la presente invención incluyen un péptido que consiste en una secuencia (462 residuos de aminoácidos) mostrada en la SEQ ID NO: 14, un péptido que consiste en una secuencia (272 residuos de aminoácidos) mostrada en la SEQ ID NO: 8 y un péptido que consiste en una secuencia (236 residuos de aminoácidos) mostrada en la SEQ ID NO: 6, que están descritos en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 64-6219 (1989) A.

35 El tipo de trombomodulina usado en la presente invención no está limitado particularmente, siempre que tenga al menos una secuencia de aminoácidos que consista en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 3. Entre otros, se prefiere un péptido que tiene al menos una secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 o 7, y es más preferido un péptido que tiene al menos una secuencia de aminoácidos consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11. Un ejemplo más preferido del péptido que tiene al menos una secuencia de aminoácidos consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11 es un péptido que consiste en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516, en las posiciones 19 a 515, en las posiciones 17 a 516 o en las posiciones 17 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11. Además, una mezcla obtenida de dichos péptidos, que consiste cada uno en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516, en las posiciones 19 a 515, en las posiciones 17 a 516 o en las posiciones 17 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11 es también un ejemplo preferido de la trombomodulina de la presente invención.

En el caso de la mezcla antes mencionada, la relación en la mezcla entre un péptido que comienza desde la posición 17 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11 y un péptido que comienza desde la posición 19 de la misma es de (30 : 70) a (50 : 50), y preferiblemente de (35 : 65) a (45 : 55).

5 Además, la relación en la mezcla entre un péptido que termina en la posición 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11 y un péptido que termina en la posición 516 es de (0 : 100) a (90 : 10), y puede ser de (70 : 30) a (90 : 10), o puede ser de (0 : 100) a (30 : 70).

La relación en la mezcla de dichos péptidos se puede obtener por un método habitual.

10 Se ha de observar que la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 corresponde a la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 367 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9, y que la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 5 corresponde a la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9.

15 Además, la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 132 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 3 corresponde a la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 367 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11, y la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 7 corresponde a la secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 480 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 11.

20 Aún más, cada una de las secuencias que consisten en los aminoácidos en las posiciones 1 a 18 de las secuencias de aminoácidos mostradas en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 y 11 son todas idénticas entre sí.

25 Como se describe a continuación, la trombomodulina utilizada en la presente invención se puede obtener a partir de células transformantes que se preparan incorporando DNA que codifica el péptido que tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, etc., (específicamente, la secuencia de nucleótidos mostrada en las SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10, 12, etc., respectivamente) a un vector y luego transfectando células hospedantes con el vector. Como trombomodulina usada en la presente invención, se prefiere la trombomodulina obtenida a partir de células transformantes preparadas por transfección de células hospedantes con un vector que comprende el DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 u 11 (específicamente, el DNA mostrado en la SEQ ID NO: 10 o 12, respectivamente).

30 Sólo es necesario que dichos péptidos tengan las secuencias de aminoácidos antes mencionadas. Así, se puede añadir o no una cadena de azúcar. La adición de una cadena de azúcar no está limitada particularmente. Además, en las técnicas de ingeniería genética, el tipo de dicha cadena de azúcar, la posición en la que se añade dicha cadena de azúcar y el nivel de adición difieren dependiendo del tipo de célula hospedante utilizado, y no están limitados particularmente. La posición de unión de dicha cadena de azúcar y su tipo están descritos en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Nº 11-341990 (1999) A. En el caso de la trombomodulina de la presente invención, se puede añadir la misma cadena de azúcar en la misma posición que las descritas en la publicación antes mencionada. Como se describe más adelante, el método para obtener la trombomodulina de la presente invención no está limitado a la ingeniería genética. Sin embargo, en el caso de la obtención de la presente trombomodulina por ingeniería genética, como secuencia de señal que se puede utilizar en la expresión, se pueden usar una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 18 de la secuencia de aminoácidos antes mencionada mostrada en la SEQ ID NO: 9, una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos que consiste en los aminoácidos en las posiciones 1 a 16 de la secuencia de aminoácidos antes mencionada mostrada en la SEQ ID NO: 9, y otras secuencias de señal conocidas, tales como la secuencia de señal de un activador de plasminógeno tisular humano (Publicación internacional WO88/9811 y Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Nº 11-341990 (1999) A).

45 Cuando se introduce una secuencia de DNA que codifica trombomodulina en células hospedantes, se aplica preferiblemente un método, que comprende incorporar la secuencia de DNA que codifica trombomodulina a un vector y más preferiblemente a un vector de expresión capaz de expresarse en células de animales, y luego introducir el vector en las células hospedantes. Dicho vector de expresión es una molécula de DNA que está constituida por una secuencia promotora, una secuencia para añadir un sitio de unión a ribosoma al mRNA, una secuencia de DNA que codifica una proteína que ha de ser expresada, una señal de corte y empalme, una secuencia terminadora para la terminación de la transcripción, una secuencia origen de replicación y otras. Ejemplos de un vector de expresión de células de animales preferidos incluyen: pSV2-X documentado por R. C. Mulligan et al., [*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78, 2072 (1981)]; y pBP69T (69-6) documentado por P. M. Howley et al., [*Methods in Emzymology*, 101, 387, Academic Press (1983)].

Ejemplos de células hospedantes que se pueden utilizar en la producción de dichos péptidos incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células COS-1, células COS-7, células VERO (ATCC CCL-81), células BHK, células MDCK derivadas de riñón canino y células AV-12-664 de hámster. Además, los ejemplos de dichas células

hospedantes derivadas de células humanas incluyen células HeLa, células WI38 y células 293 humanas. De estas células, las células CHO son extremadamente comunes y preferibles. Entre las células CHO, son más preferidas las células DHFR-CHO.

5 En un proceso de ingeniería genética o en un proceso de producción de péptidos, se utilizan con frecuencia microorganismos, tal como *Escherichia coli*. Se utiliza preferiblemente un sistema hospedante-vector adecuado para cada proceso. Se puede seleccionar un sistema vector adecuado dependiente incluso de las células hospedantes antes mencionadas. Se clonó un gen de trombomodulina usado en una técnica de recombinación genética. Se han descrito ejemplos de producción de trombomodulina por dicha técnica de recombinación genética. Además, también se conoce un método para purificar trombomodulina para obtener un producto purificado [Publicación de Patente Japonesa (Kokai) Nos. 64-6219 (1989) A, 2-255699 (1990) A, 5-213998 (1993) A, 5-310787 (1993) A y 7-155176 (1995) A; y *J. Biol. Chem.*, 264: 10351-10353 (1989)]. Por consiguiente, la trombomodulina utilizada en la presente invención se puede producir por los métodos descritos en los documentos antes mencionados o por métodos equivalentes a ellos. Por ejemplo, la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 64-6219 (1989) A describe la cepa DH5 de *Escherichia coli* K-12 (ATCC N° de acceso 67283) que comprende un plásmido pSV2TMJ2 que contiene DNA que codifica la trombomodulina de longitud completa. También se puede usar una cepa (*Escherichia coli* DH5/pSV2TM J2) (FERM BP-5570), en la que la cepa antes mencionada ha sido re-depositada en el antiguo *National Institute of Bioscience and Human-Technology* (el actual *National Institute of Advanced Industrial Science and Technology*, una institución administrativa independiente del Ministry of Economy, Trade and Industry (AIST) de EE.UU.). La trombomodulina de la presente invención se puede preparar por una técnica de ingeniería genética conocida utilizando como materia prima el DNA que codifica la trombomodulina de longitud completa.

La trombomodulina utilizada en la presente invención se puede preparar por un método convencionalmente conocido o un método equivalente. Por ejemplo, la presente trombomodulina se puede preparar con referencia al método antes mencionado de Yamamoto et al., [Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 64-6219 A (1989)] o al método descrito en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 5-213998 A (1993). Es decir, un gen de trombomodulina derivado de un ser humano se puede someter a ingeniería genética para convertirlo en DNA que, por ejemplo, codifique la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9, y si es necesario, se puede modificar aún más. Para dicha modificación, un codón que codifica el aminoácido en la posición 473 de la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9 (particularmente, el nucleótido en la posición 1418) se somete a mutagénesis dirigida al sitio de acuerdo con el método descrito en *Method in Enzymology*, 100: 468 (1983), Academic Press, de modo que se obtenga DNA que, por ejemplo, codifique la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 11 (que consiste específicamente en la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 12). Utilizando el DNA sintético usado para la mutación que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en SEQ ID NO: 13, el nucleótido T en la posición 1418 de la SEQ ID NO: 10 se puede convertir en el nucleótido C, de modo que se obtenga, por ejemplo, DNA mutado.

35 El DNA así preparado se incorpora en, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO) para obtener células transformantes. A continuación, se seleccionan dichas células, según sea apropiado. A continuación, se cultivan las células seleccionadas para obtener una solución de cultivo y se puede producir trombomodulina a partir de la solución de cultivo purificándola de acuerdo con un método conocido. Como se indicó anteriormente, se prefiere que las células hospedantes antes mencionadas sean transfectadas con el DNA (SEQ ID NO: 10) que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en SEQ ID NO: 9. Un método para producir la trombomodulina utilizado en la presente invención no está limitado al método antes mencionado. Por ejemplo, dicha trombomodulina se puede extraer y purificar también de orina, sangre, otros tipos de fluidos corporales, etc. Por otra parte, también se puede extraer y purificar de tejidos que producen trombomodulina, una solución de cultivo de dichos tejidos, etc. Además, la trombomodulina se puede someter además a un tratamiento de escisión usando proteasa, si fuera necesario.

45 Cuando la trombomodulina usada en la presente invención se produce por el método de cultivo celular antes mencionado, puede haber casos en los que el aminoácido N-terminal llegue a diversificarse como resultado de la modificación post-traducciona de la proteína. Por ejemplo, los aminoácidos en las posiciones 17, 18, 19 o 22 de la SEQ ID NO: 9 pueden en algunos casos llegar a ser los extremos N. Además, también puede haber casos en los que el aminoácido N-terminal esté modificado de tal manera que el ácido glutámico en la posición 22 podría convertirse en ácido piroglutámico. Es preferible que el aminoácido en la posición 17 o 19 llegue a ser el extremo N. Es más preferido que el aminoácido en la posición 19 llegue a ser el extremo N. Además, en otra realización preferida, el aminoácido en la posición 17 puede llegar a ser el extremo N. Con relación a la modificación, diversificación, etc., antes mencionada, lo mismo se cumple para la SEQ ID NO: 11.

55 Además, cuando la trombomodulina usada en la presente invención se produce usando DNA que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 10, el aminoácido C-terminal puede llegar a diversificarse y, como resultado, un residuo de aminoácido puede producir en algunos casos un péptido que es más corto que el péptido ordinario. Es decir, puede haber casos en los que el aminoácido en la posición 515 llegue a ser el extremo C y además esté amidado, de modo que se pueda modificar el aminoácido C-terminal. Como resultado, se puede producir un péptido con aminoácido N-terminal y aminoácido C-terminal diversificados, o una de sus mezclas. El aminoácido en la posición 515 puede llegar a ser preferiblemente el extremo C. Por otra parte, en otra realización preferida, el aminoácido en la posición 516 puede llegar a ser el extremo C. Con relación a la modificación,

diversificación, etc., antes mencionada, lo mismo se cumple para el DNA que tiene la secuencia de nucleótidos mostrada en la SEQ ID NO: 12.

La trombomodulina obtenida por el método antes mencionado puede ser una mezcla de péptidos con el extremo N y el extremo C diversificados. Un ejemplo específico es una mezcla de péptidos que consisten en una secuencia consistente en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516, en las posiciones 19 a 515, en las posiciones 17 a 516 o en las posiciones 17 a 515 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9.

La presente invención proporciona un método para producir trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble que puede ser generado a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas. El presente método de producción no está limitado particularmente, siempre que comprenda: (1) una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble que contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita y (2) una etapa en la que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en condiciones de separación en las que la trombomodulina soluble se puede separar de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble y (0) una etapa en la que se deja trombomodulina soluble en condiciones ácidas de pH 5 o menor, antes de la etapa (1) y comprende más preferiblemente (0) una etapa en la que se deja trombomodulina soluble en condiciones ácidas de pH 5 o menor y (*) una etapa en la que se purifica la trombomodulina soluble, antes de la etapa (1). En el método de producción de la presente invención, el momento en el que se realiza la etapa (*) no está limitado particularmente. La etapa (*) se realiza preferiblemente antes de la etapa (1).

Las condiciones ácidas bajo las que se genera un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble a partir de la trombomodulina soluble en la presente invención incluyen pH 5 o menor, preferiblemente a pH 4 o menor y más preferiblemente pH 3 o menor. El límite inferior de dicho pH es, por ejemplo, pH 1 o mayor, preferiblemente pH 2 o mayor y más preferiblemente pH 3 o mayor. Además, el tiempo requerido bajo dichas condiciones ácidas es, por ejemplo, 0,5 horas o más, preferiblemente 1 hora o más y más preferiblemente 2 horas o más. Por otra parte, la temperatura aplicada bajo dichas condiciones ácidas es, por ejemplo, la temperatura ambiente, preferiblemente 15°C o menor y más preferiblemente 8°C o menor. El límite inferior de dicha temperatura es generalmente 0°C o mayor, preferiblemente 2°C o mayor y más preferiblemente 5°C o mayor. Bajo las condiciones ácidas antes mencionadas, la trombomodulina soluble está presente en forma de una mezcla de la trombomodulina soluble y uno de sus productos desnaturalizados.

El límite superior del contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble en la "trombomodulina que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble" producida por el método de la presente invención es 3,0% o menos, más preferiblemente 2,0% o menos, más preferiblemente 1,0% o menos y particularmente preferido 0,5% o menos. El límite inferior del contenido mencionado es 0,01% o más. Sin embargo, es preferiblemente un límite de detección o menos. El contenido en porcentaje de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble se puede medir por cromatografía. Por ejemplo, 150 µL de una muestra analítica se somete a una cromatografía analítica de exclusión por tamaños, TSK-GEL G3000SWXL (D.I. 7,8 mm x 30 cm; TOSOH). Se utiliza una fase móvil de un tampón de fosfato que contiene sulfato de sodio y la absorbancia a 280 nm se mide a un caudal de 0,9 mL/min. Por lo tanto, el contenido en porcentaje se puede obtener basándose en el área del pico de la trombomodulina soluble.

Cuando 150 µL de una muestra analítica se somete a una cromatografía analítica de exclusión por tamaños, TSK-GEL G3000SWXL (D.I. 7,8 mm x 30 cm; TOSOH), usando una fase móvil de un tampón de fosfato que contiene sulfato de sodio y a continuación se realiza el análisis a un caudal de 0,9 mL/min, un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble que puede ser generado de la trombomodulina soluble de la presente invención en condiciones ácidas se detecta en un tiempo de retención de aproximadamente 90% del tiempo de retención de la trombomodulina soluble. (Cuando el tiempo de retención de la trombomodulina soluble es aproximadamente 9 minutos, por ejemplo, el tiempo de retención de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble es aproximadamente 8 minutos). Además, en un método electroforético (Native-PAGE), se desplazó dicho producto desnaturalizado de trombomodulina soluble que puede ser generado a partir de la trombomodulina soluble de la presente invención en condiciones ácidas y se observó en el lado de alto peso molecular de trombomodulina. En SDS-PAGE, no se detectó dicho producto desnaturalizado.

La clase de material que contiene trombomodulina soluble utilizada en la presente invención, que contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble que puede ser generado en condiciones ácidas (de aquí en adelante abreviadamente a veces "material que contiene producto desnaturalizado"), no está limitada particularmente, siempre que contenga una trombomodulina soluble y un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Un ejemplo de dicho material que contiene trombomodulina soluble es una solución de trombomodulina soluble obtenida a partir de un líquido sobrenadante de cultivo preparado cultivando células capaces de producir trombomodulina soluble en un medio que contiene componentes séricos o en un medio exento de suero. Los ejemplos preferidos de dicho material que contiene trombomodulina soluble incluyen: una solución de trombomodulina soluble obtenida realizando una etapa de purificación de un líquido sobrenadante de cultivo preparado cultivando células capaces de producir trombomodulina soluble en un medio que contiene componentes

séricos o en un medio exento de suero; y una solución de trombomodulina soluble dejada en condiciones ácidas después de preparar el líquido sobrenadante de cultivo antes mencionado. Un ejemplo más preferido de dicha solución que contiene trombomodulina soluble es una solución de trombomodulina soluble obtenida realizando una etapa de purificación de un líquido sobrenadante de cultivo preparado cultivando células capaces de producir trombomodulina soluble en un medio que contiene componentes séricos o en un medio exento de suero. Además, en otra realización de la presente invención, se prefiere una solución de trombomodulina soluble dejada en condiciones ácidas después de preparar el líquido sobrenadante de cultivo antes mencionado.

La etapa de purificación antes mencionada no está limitada particularmente, siempre que sea capaz de eliminar al menos proteínas distintas de la trombomodulina soluble. Ejemplos de dicha etapa de purificación incluyen una etapa en la que se eluye y recupera trombomodulina soluble en condiciones ácidas, usando cromatografía de afinidad en la que está soportado un anticuerpo que reacciona con la trombomodulina, y una etapa en la que se permite que la trombomodulina soluble obtenida por la cromatografía de afinidad antes mencionada entre en contacto con un intercambiador catiónico en condiciones que consisten en una conductividad específica de 25 a 34 mS/cm y un pH de 3 a 4, de modo que se recupere la trombomodulina soluble como una fracción de paso.

El material que contiene trombomodulina soluble antes mencionado (material que contiene el producto desnaturalizado) no está limitado particularmente, siempre que contenga trombomodulina soluble y un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. Un ejemplo de dicho material que contiene trombomodulina soluble es un material que no contiene sustancialmente proteínas distintas de trombomodulina soluble y un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. Específicamente, el límite inferior del contenido de trombomodulina soluble con respecto a las proteínas totales en dicho material que contiene trombomodulina soluble es, por ejemplo, 50% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más particular y preferiblemente 90% o más, extremada y preferiblemente 95% o más, y lo más preferiblemente 99% o más. Además, puede haber casos en los que es preferible el contenido de 99,9% o más. El contenido antes mencionado de trombomodulina soluble indica generalmente el contenido de trombomodulina soluble propiamente dicho. Sin embargo, también puede haber casos en los que dicho contenido significa el contenido tanto de trombomodulina soluble como de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. Incluso en un caso en el que el contenido de trombomodulina soluble significa el contenido tanto de trombomodulina soluble como de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, el límite inferior del contenido de trombomodulina soluble con respecto a las proteínas totales en dicho material que contiene trombomodulina soluble es, por ejemplo, 50% o más, preferiblemente 60% o más, más preferiblemente 70% o más, más preferiblemente 80% o más, particular y preferiblemente 90% o más, extremada y preferiblemente 95% o más, y lo más preferiblemente 99% o más. Además, también puede haber casos en los que es preferible el contenido de 99,9% o más.

El contenido antes mencionado de trombomodulina soluble se puede medir usando cromatografía. Por ejemplo, se emplea una cromatografía analítica en fase inversa, Asahipak C4P-50 (D.I. 4,6 mm × 15 cm; Showa Denko KK), y 150 µL de una muestra analítica se hace pasar a través de la columna a un caudal de 0,8 mL/min, utilizando una fase móvil que consiste en agua destilada que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% (líquido A) y acetonitrilo que contiene ácido trifluoroacético al 0,1% (líquido B). La relación de mezcla entre el líquido A y el líquido B se cambia linealmente desde 96:4 hasta 0:100 (48 minutos más tarde). Después se mide y analiza la absorbancia a 280 nm de un eluato. Así, el contenido de trombomodulina soluble se puede obtener basándose en las áreas de los picos de la trombomodulina soluble y otras proteínas. Alternativamente, las cantidades de proteínas distintas de trombomodulina soluble se miden por el método ELISA descrito en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999), de modo que se puede obtener el contenido de la trombomodulina soluble.

En la presente invención, después de realizar una etapa en la que deja la trombomodulina en condiciones ácidas de pH 5 o menor, un material que contiene dicha trombomodulina que contiene, o se sospecha que contiene, un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble se hace pasar preferiblemente a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita. El límite superior de dichas condiciones ácidas es preferiblemente pH 5 o menor, más preferiblemente pH 4 o menor, y más preferiblemente pH 3 o menor. El límite inferior de dichas condiciones es preferiblemente pH 1 o mayor, más preferiblemente pH 2 o mayor, y aún más preferiblemente pH 3 o mayor.

Además, el tiempo requerido bajo dichas condiciones ácidas es, por ejemplo, 0,5 horas o más, preferiblemente 1 hora o más, y más preferiblemente 2 horas o más. Por otra parte, la temperatura aplicada en dichas condiciones ácidas es, por ejemplo, la temperatura ambiente, preferiblemente 15°C o inferior, y más preferiblemente 8°C o inferior. El límite inferior de dicha temperatura es generalmente 0°C o superior, preferiblemente 2°C o superior, y más preferiblemente 5°C o superior.

Una sal preferida utilizada en la presente invención es un cloruro. La sal más preferida es cloruro de sodio. Además, los fosfatos preferidos con hidroxapatita son fosfato de sodio y fosfato de potasio.

Las condiciones de separación para separar trombomodulina soluble de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble incluyen: condiciones de elución en gradiente lineal; condiciones de elución en gradiente escalonado; condiciones de elución en gradiente en las que se combina la elución en gradiente lineal con elución en gradiente escalonado; condiciones en las que la trombomodulina soluble no se eluye de una fracción de paso; y condiciones de elución isocrática. De estas condiciones, se prefieren las condiciones de elución en gradiente lineal,

las condiciones de elución en gradiente escalonado, las condiciones de elución en gradiente en las que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, y las condiciones en las que la trombomodulina soluble no se eluye de una fracción de paso. Además son más preferibles las condiciones de elución en gradiente lineal, las condiciones de elución en gradiente escalonado y las condiciones de elución en gradiente en las que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado. Además, en otra realización, son preferibles las condiciones en la que la trombomodulina soluble no se eluye de una fracción de paso. Aún más, también puede haber un caso en el que son preferibles las condiciones isocráticas.

Como fracción de paso, hay una fracción en la que la trombomodulina soluble no es adsorbida sobre un intercambiador aniónico o hidroxapatita cuando un material que contiene trombomodulina soluble se hace pasar a través de dicho intercambiador aniónico o hidroxapatita. La clase de dicha fracción de paso no está limitada particularmente, siempre que no contenga sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina. Por ejemplo, se puede usar una fracción de 1 a 20 volúmenes de columna, 1 a 50 volúmenes de columna o 1 a 100 volúmenes de columna.

Las condiciones de la elución en gradiente se pueden determinar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de columna utilizado. Las condiciones específicas se describirán más adelante. Además, para condiciones en las que la trombomodulina soluble no se eluye de una fracción de paso, se puede determinar una solución tampón que ha de ser utilizada, según sea apropiado, dependiendo del tipo de columna utilizada. Las condiciones específicas se describirán más adelante. Además, las condiciones de la elución isocrática se pueden determinar, según sea apropiado, dependiendo del tipo de columna utilizado.

Como intercambiador aniónico se usa preferiblemente un intercambiador aniónico que tenga un grupo de amonio cuaternario, tal como *SourceQ* (*GE Healthcare Bio-Sciences*), que es un intercambiador aniónico fuerte. Antes de hacer pasar un material que contenga el producto desnaturalizado a través de dicho intercambiador, dicho intercambiador aniónico puede ser equilibrado con varios volúmenes de columna de una solución tampón de pH 4 a 9 (la clase de dicha solución tampón no está limitada, por ejemplo, un tampón de acetato 0,1 M (pH 4), un tampón de fosfato 0,02 M (pH 7,3) o un tampón Tris 0,02 M (pH 8)). Después de la terminación de dicho equilibrado, un material que contiene el producto desnaturalizado se hace pasar a través del intercambiador aniónico. Antes de la elución de la trombomodulina soluble, el intercambiador aniónico se puede lavar con una solución tampón de pH 4 a 9 (la clase de dicha solución tampón no está limitada, por ejemplo, un tampón de acetato 0,1 M (pH 4), un tampón de fosfato 0,02 M (pH 7,3) o un tampón Tris 0,02 M (pH 8)). Con respecto al material que contiene el producto desnaturalizado adsorbido, la trombomodulina soluble puede ser separada de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble y puede ser eluida por elución en gradiente con una concentración de sal de 0 a 1 M, utilizando una solución tampón de pH 5 a 9, y preferiblemente de pH 7 a 8 (la clase de dicha solución tampón no está limitada, por ejemplo, un tampón de fosfato 0,02 M (pH 7,3) o un tampón Tris 0,02 M (pH 8)). Las condiciones de separación no están limitadas particularmente, siempre que las condiciones sean capaces de separar la trombomodulina soluble de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble y permitan su elución. Ejemplos de dichas condiciones de elución en gradiente incluyen condiciones de elución en gradiente lineal, condiciones de elución en gradiente escalonado, y condiciones de elución en gradiente en las que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado. En dicha elución en gradiente, se ajusta una concentración de sal preferiblemente de 0 a 0,3 M, y más preferiblemente de 0,03 a 0,26 M. La cantidad de una solución tampón usada en la elución es 2 a 40 volúmenes de columna y preferiblemente 5 a 20 volúmenes de columna.

Cuando se utilizan condiciones de elución en gradiente, como una etapa para obtener una fracción de elución que contenga trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, se aplica, por ejemplo, (a) una etapa en la que se obtiene dicha fracción de elución después de que haya sido previamente confirmada la posición de una fracción de la que se eluye la trombomodulina soluble, o (b) una etapa en la que se obtiene dicha fracción de elución mientras se confirma la presencia de la trombomodulina soluble en la fracción de elución.

Describiendo específicamente la etapa (a), la posición de una fracción de elución, que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble, ha sido confirmada previamente por un método analítico para confirmar la presencia de trombomodulina soluble y la de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble (por ejemplo, por la cromatografía por exclusión de tamaños descrita en el Ejemplo 7 más adelante) y se recupera la fracción de elución de la posición. Por otro lado, describiendo específicamente la etapa (b), mientras se confirma por un método analítico de confirmación de la presencia de trombomodulina soluble y la de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble (por ejemplo, por la cromatografía por exclusión de tamaños descrita en el Ejemplo 7 más adelante) que una fracción de elución contiene trombomodulina soluble y no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, se obtiene dicha fracción de elución que contiene trombomodulina soluble y que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. La etapa (b) es preferible. Además, también puede haber casos en los que es preferible la etapa (a).

Por otra parte, la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente uno de sus productos desnaturalizados se puede obtener también como una fracción de paso sustituyendo un material que contiene el producto desnaturalizado por una solución tampón adecuada antes de hacer pasar dicho material que contiene el producto

desnaturalizado a través de un intercambiador aniónico. Dicha fracción de paso es una fracción en la que la trombomodulina soluble no es adsorbida en el intercambiador aniónico cuando un material que contiene trombomodulina soluble se hace pasar a través del intercambiador aniónico. Se utiliza una diferencia entre la trombomodulina soluble y uno de sus productos desnaturalizados en términos de capacidad de adsorción en una columna. En este caso, como intercambiador aniónico se usa preferiblemente un intercambiador aniónico que tiene un grupo amonio cuaternario, tal como *SourceQ*, *Q Sepharose FF* (*GE Healthcare Bio-Sciences*), *Sartobind* (*Sartorius KK*) o *Mustang (PALL)*, que es un intercambiador aniónico fuerte. Una solución tampón adecuada utilizada en la sustitución es preferiblemente una solución tampón de pH 5 a 8 que tiene una concentración de sal de 0,1 a 0,2 M. La clase de dicha solución de tampón no está limitada. Por ejemplo, se puede utilizar fosfato 0,02 M, cloruro de sodio 0,18 M, pH 7,3. Como método de obtención de una fracción de paso, mientras se confirma por un método analítico, tal como la cromatografía de exclusión por tamaños descrita en el Ejemplo 7 más adelante, contiene trombomodulina soluble y no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, se puede obtener apropiadamente dicha fracción,

Además, también se pueden usar condiciones de elución isocrática. También en este caso, dichas condiciones se pueden determinar, según sea apropiado, con referencia a las condiciones de elución en gradiente y a las condiciones en las que la trombomodulina soluble no se eluye de una fracción de paso.

Como hidroxapatita se usa, por ejemplo, *Macro-Prep (R) Ceramic Hydroxyapatite TYPE 1* (Bio-Rad). Antes de hacer pasar un material que contiene el producto desnaturalizado a través de dicha hidroxapatita, la misma puede ser equilibrada con varios volúmenes de columna de una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 8 mM o menos, preferiblemente 5 mM o menor, y más preferiblemente 2 mM o menor (la clase de dicha solución tampón no está limitada, pero se pueden usar las siguientes soluciones tampón, por ejemplo: fosfato 5 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7; fosfato 1 mM, Tris 25 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7,7; o fosfato 2 mM, HEPES 20 mM, cloruro de sodio 0,17 M, pH 7). Una solución tampón de un material que contiene producto desnaturalizado que se ha hacer pasar a través de hidroxapatita es una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 8 mM o menor, preferiblemente 5 mM o menor, y más preferiblemente 2 mM o menor. Después de la terminación de dicho equilibrado, un material que contiene producto desnaturalizado se hace pasar a través de hidroxapatita. Antes de la elución de la trombomodulina soluble, la hidroxapatita se puede lavar con una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 8 mM o menor, preferiblemente 5 mM o menor, y más preferiblemente 2 mM o menor (la clase de dicha solución tampón no está limitada, pero se pueden usar, las siguientes soluciones tampón, por ejemplo: fosfato 5 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7; fosfato 1 mM, Tris 25 mM, cloruro de sodio 0,2 M, pH 7,7; o fosfato 2 mM, HEPES 20 mM, cloruro de sodio 0,17 M, pH 7). Con respecto al material que contiene producto desnaturalizado adsorbido, la trombomodulina soluble se puede separar de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble y luego puede ser eluída por elución en gradiente con una concentración de fosfato de 0 a 0,5 M, utilizando una solución tampón de pH 6 a 9, y preferiblemente de pH 7 a 8. Las condiciones de separación no están limitadas particularmente, siempre que las condiciones sean capaces de separar la trombomodulina soluble de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. Ejemplos de tales condiciones de elución en gradiente incluyen condiciones de elución en gradiente lineal y condiciones de elución en gradiente de elución escalonado. Esta elución en gradiente se lleva a cabo preferiblemente con una concentración de fosfato de 1 a 40 mM. Más preferiblemente, la elución en gradiente escalonado se lleva a cabo con una concentración de fosfato de 8 a 10 mM, de modo que se obtenga una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble y que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. Aumentando aún más la concentración de fosfato se eluye un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble.

Cuando se utilizan condiciones de elución en gradiente, como un método de obtención de una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble y que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, se puede aplicar el mismo método que en el caso de la separación de la trombomodulina soluble de uno de sus productos desnaturalizados utilizando un intercambiador aniónico.

Además, se puede obtener también trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente uno de sus productos desnaturalizados como una fracción de paso sustituyendo un material que contiene producto desnaturalizado con una solución tampón adecuada antes de hacer pasar dicho material que contiene producto desnaturalizado a través de hidroxapatita. Dicha fracción de paso es una fracción en la que la trombomodulina soluble no es adsorbida sobre la hidroxapatita cuando un material que contiene trombomodulina soluble se hace pasar a través de la hidroxapatita. Se utiliza una diferencia entre la trombomodulina soluble y uno de sus productos desnaturalizados en términos de capacidad de adsorción en una columna. En este caso, se puede usar como hidroxapatita, por ejemplo, *Macro-Prep (R) Ceramic Hydroxyapatite TYPE 1* (Bio-Rad). Una solución tampón adecuada utilizada en la sustitución es una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 20 mM, y preferiblemente una solución tampón de pH 6 a 7 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 10 mM. La clase de dicha solución tampón no está limitada. Por ejemplo, se puede utilizar fosfato 10 mM, cloruro de sodio 10 mM, pH 7. Como método para obtener una fracción de paso, mientras es confirmado por un método analítico, tal como la cromatografía de exclusión por tamaños descrita en el Ejemplo 7 más adelante, que una fracción de elución contiene trombomodulina soluble y no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, se puede obtener apropiadamente dicha fracción.

Por otra parte, también se pueden usar condiciones de elución isocrática. También en este caso, dichas condiciones se pueden determinar, según sea apropiado, con referencia a las condiciones de elución en gradiente y las condiciones en las que la trombomodulina soluble no se eluye de una fracción de paso.

5 Preferiblemente, el método de producción de la presente invención no comprende una etapa en la que se ajusta el pH de una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble y que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, a pH 4 o menor, después que se ha hecho pasar un material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita para obtener la fracción de elución antes mencionada. Además, incluso en la etapa de concentración subsiguiente y/o la etapa de desalación para convertir la trombomodulina soluble en un material farmacéutico, es preferible no ajustar el pH de la fracción de elución a pH 4 o menor.

10 Un ejemplo preferido de un método de purificación de la trombomodulina soluble a partir de un líquido sobrenadante de cultivo preparado cultivando células capaces de producir trombomodulina soluble en un medio que contiene componentes séricos o un medio exento de suero es un método de purificación que usa, como indicador, la actividad de trombomodulina, tal como la actividad de trombomodulina para promover la activación de la proteína C por trombina. Un ejemplo específico es un método de purificación que comprende: purificar en bruto un líquido sobrenadante de cultivo con *Q-Sepharose FF* utilizado como una columna de intercambio iónico para recuperar una fracción que tiene actividad de trombomodulina; purificar la fracción recuperada con un anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina de ratón en una columna de afinidad para recuperar una fracción que tiene una alta actividad de trombomodulina; purificar la fracción recuperada con *SP-Sepharose FF* utilizada como columna de intercambio catiónico; concentrar una fracción de paso; y luego someter la fracción resultante a filtración por gel para obtener una fracción activa de trombomodulina. Después de la terminación de dicha purificación con *SP-Sepharose FF*, se utiliza en condiciones óptimas el intercambiador aniónico de la presente invención, preferiblemente un intercambiador aniónico que tiene un grupo de amonio cuaternario, tal como *SourceQ (GE Healthcare Bio-Sciences)*, que es un intercambiador aniónico fuerte, o la hidroxapatita de la presente invención, tal como *Macro-Prep (R) Ceramic Hydroxyapatite TYPE 1 (Bio-Rad)*, con el fin de obtener fácilmente la trombomodulina de alta pureza que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble.

15 Por otro lado, después de la purificación con un anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina de ratón, se utiliza en condiciones óptimas el intercambiador aniónico de la presente invención, preferentemente un intercambiador aniónico que tiene un grupo amonio cuaternario tal como *SourceQ (GE Healthcare Bio-Sciences)*, que es un intercambiador aniónico fuerte, de modo que se pueden eliminar simultáneamente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble, un producto derivado de anticuerpo de ratón, y en el caso de utilizar un medio que contiene suero, un producto derivado del suero, obteniéndose de este modo fácilmente trombomodulina de gran pureza que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble.

20 La trombomodulina de gran pureza obtenida por el método antes mencionado se somete luego a una etapa de concentración y/o una etapa de desalación en la que el pH no se ajusta a pH 4 o menor, de modo que se obtiene un producto altamente purificado con intercambio de tampón. La trombomodulina soluble obtenida por el método antes mencionado se puede utilizar como material farmacéutico.

25 También se describe en la presente memoria un método para purificar trombomodulina soluble de tal modo que la trombomodulina soluble no contenga sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble que puede ser generado a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas. El presente método de purificación no está limitado particularmente, siempre que comprenda: (1) una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble, que contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita, y (2) una etapa en la que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble y que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en condiciones de separación en las que la trombomodulina soluble puede ser separada de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble. Además, como dicho método de purificación, se puede aplicar un método de purificación que tiene los rasgos característicos del método anteriormente mencionado para la producción de la trombomodulina soluble de la presente invención.

Ejemplos

30 La presente invención se describirá más específicamente en los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se pretende que estos ejemplos limiten el alcance de la presente invención.

(Ejemplo 1) Purificación en bruto en una columna de intercambio aniónico fuerte

35 De acuerdo con la descripción de Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999), El DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 se preparó, modificó, y luego se incorporó en células de ovario de hámster chino mediante técnicas de ingeniería genética. Las células se cultivaron, y se obtuvo luego un líquido sobrenadante del cultivo. Después, se filtraron 41 litros del líquido sobrenadante del cultivo obtenido por un filtro de membrana de 0,2 µm (*Millipore; Millipak 20*). El líquido sobrenadante del cultivo filtrado se hizo pasar a través de una columna de *Q-Sepharose (GE Healthcare Bio-Sciences)* (diámetro: 44 cm; longitud: 26,3 cm) que

había sido equilibrada con una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contenía cloruro de sodio 150 mM. Posteriormente, la columna se lavó con 6 volúmenes de columna de una solución tampón de acetato 20 mM que contenía cloruro de sodio 180 mM, y se lavó adicionalmente con 8 volúmenes de columna de una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contenía cloruro de sodio 180 mM. A continuación se inició la elución con una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,4) que contenía cloruro de sodio 300 mM. Se obtuvieron 0,5 volúmenes de columna de un eluato como un producto purificado en bruto a partir de la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. Ha de advertirse que el caudal se ajustó a 760 mL/min.

(Ejemplo 2) Purificación con un anticuerpo monoclonal

De acuerdo con la descripción de la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999), se preparó un anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina usando como antígeno trombomodulina derivada de pulmón humano. A continuación, el anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina obtenido se dejó entrar en contacto, y reaccionar *Sepharose 4 Fast Flow* activada con CNBr (*GE Healthcare Bio-Sciences*) de modo que el anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina se acopló con dicho reactivo, produciendo de este modo *Sepharose 4 Fast Flow* unida al anticuerpo monoclonal anti-trombomodulina. Se hicieron pasar 16,5 litros de la fracción de elución obtenida en el Ejemplo 1 a través de una columna de anticuerpo monoclonal (diámetro: 44 cm; longitud: 10,5 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 0,3 M. La columna se lavó por suministro de 6 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 1,0 M y, a continuación, por suministro de 3 volúmenes de columna de una solución tampón de acetato 0,1 M (pH 5,0). Después, se inició la elución con una solución tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,0) que contenía cloruro de sodio 0,3 M. Se obtuvo un eluato desde la subida inicial hasta el declive del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. A continuación se añadió al eluato una solución tampón de fosfato 0,5 M (pH 7,3) en una cantidad de 1/10 con respecto al volumen del eluato, para obtener una solución purificada. Hay que advertir que el caudal se ajustó a 760 mL/min.

(Ejemplo 3) Purificación con una columna de cambio catiónico fuerte.

Se añadió una solución tampón de glicina-HCl 1,0 M (pH 2,0) a 193 mL de la solución purificada obtenida en el Ejemplo 2, para ajustar el pH de la solución a pH 3,5. Esta solución se hizo pasar a través de una columna de *SP-Sepharose FF* (*GE Healthcare Bio-Sciences*) (diámetro: 16 mm; longitud: 12 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de glicina 0,1 M (pH 3,5) que contenía NaCl 0,3 M. La columna comenzó a ser lavada con una solución tampón de glicina-HCl 100 mM (pH 3,5) que contenía NaCl 300 mM. Se obtuvo una fracción de paso desde la subida inicial hasta el declive del pico de absorbancia a 280 nm, y se neutralizó inmediatamente con una solución tampón de fosfato 0,5 M (pH 7,3) con el fin de ajustar el pH de la solución a pH 7, obteniéndose de este modo un producto altamente purificado. Hay que advertir que el caudal se ajustó a 3,3 mL/min. Como resultado de la medición por cromatografía usando Asahipak C4P-50 antes mencionado o el método ELISA descrito en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999), se encontró que el contenido de la trombomodulina soluble en el producto altamente purificado era 99% o más.

(Ejemplo 4) Separación de producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente lineal a través de intercambiador aniónico (1)

10 mL del producto altamente purificado obtenido en el Ejemplo 3 se diluyeron con 30 mL de agua purificada. Se hicieron pasar 40 mL de la solución así diluida a través de una columna *SourceQ 30* (*GE Healthcare Bio-Sciences*) (diámetro: 0,5 cm, longitud: 9,8 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 6) que contenía cloruro de sodio 0,1 M. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 6), y empezó a ser eluida por elución en gradiente lineal de cloruro de sodio de 0,1 M a 0,3 M con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 6) en un volumen de elución de 20 volúmenes de columna. Se fraccionó un eluato en una unidad de 1 volumen de columna desde la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. Hay que advertir que el caudal durante la carga de la muestra y el lavado se ajustó a 2,2 mL/min, y que el caudal durante la elución se ajustó a 0,3 mL/min. El cromatograma se muestra en la Figura 1.

(Ejemplo 5) Separación del producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente lineal a través de intercambiador aniónico (2)

Se diluyeron 10 mL de producto altamente purificado obtenido en el Ejemplo 3 con 30 mL de agua purificada. Se hicieron pasar 40 mL de la solución así diluida a través de una columna *SourceQ 30* (*GE Healthcare Bio-Sciences*) (diámetro: 0,5 cm, longitud: 9,8 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7) que contenía cloruro de sodio 0,1 M. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7), y empezó a ser eluida por elución en gradiente lineal de cloruro de sodio de 0,1 M a 0,3 M con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7) en un volumen de elución de 20 volúmenes de columna. Se fraccionó un eluato en una unidad de 1 volumen de columna desde la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. Hay que advertir que el caudal durante la carga de la muestra y el lavado se ajustó a 2,2 mL/min, y que el caudal durante la elución se ajustó a 0,3 mL/min. El cromatograma se muestra en la Figura 2.

(Ejemplo 6) Separación de producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente lineal a través de intercambiador aniónico (3)

Se diluyeron 10 mL del producto altamente purificado obtenido en el Ejemplo 3 con 30 mL de agua purificada. Se hicieron pasar 40 mL de la solución así diluida a través de una columna *SourceQ 30 (GE Healthcare Bio-Sciences)* (diámetro: 0,5 cm; longitud: 9,8 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón Tris 20 mM (pH 8) que contenía cloruro de sodio 0,1 M. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de una solución tampón Tris 20 mM (pH 8) y la elución luego se inició por elución en gradiente lineal de cloruro de sodio de 0,1 M a 0,3 M con una solución tampón Tris 20 mM (pH 8) a un volumen de elución de 20 volúmenes de columna. Se fraccionó un eluato en una unidad de 1 volumen de columna desde la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. Hay que advertir que el caudal durante la carga de la muestra y el lavado se ajustó a 2,2 mL/min, y que el caudal durante la elución se ajustó a 0,3 mL/min. El cromatograma se muestra en la Figura 3.

(Ejemplo 7) Evaluación del contenido de productos desnaturalizados de trombomodulinas solubles de los Ejemplos 4-6

Usando una cromatografía analítica de exclusión por tamaños, TSK-GEL G3000SWXL (D.I. 7,8 mm x 30 cm; TOSOH), se evaluó en cada fracción el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. La columna se equilibró con una fase móvil. Como tal fase móvil, se utilizó una solución tampón de fosfato 50 mM (pH 7,3) que contenía sulfato de sodio 0,1 M. Se sometieron 150 µL de cada fracción a la cromatografía antes mencionada a un caudal de 0,9 mL/min, de modo que se analizó. Además, la velocidad de recuperación de cada fracción se calculó midiendo la absorbancia a 280 nm. Los resultados de los Ejemplos 4 a 6 se muestran en la siguiente Tabla 1. Además, con respecto al producto altamente purificado obtenido en el Ejemplo 3, también se midió por el método antes mencionado el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Como resultado, se encontró que el contenido era 7,0% (Figura 4). En cualquiera de las condiciones de los Ejemplos 4 a 6, se pudo obtener una trombomodulina soluble de gran pureza que no contenía sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble con una tasa de recuperación de 76% a 81%.

25

Tabla 1

		Mezcla de las fracciones 1 a 4	Fracción 5	Fracción 6	Fracción 7
Ejemplo 4	Tasa de contenido de producto desnaturalizado de TM (%)	0,0	9,3	41,5	53,8
	Tasa de recuperación (%)	80	9	7	4
Ejemplo 5	Tasa de contenido de producto desnaturalizado de TM (%)	0,0	3,0	35,5	54,7
	Tasa de recuperación (%)	76	10	8	6
Ejemplo 6	Tasa de contenido de producto desnaturalizado de TM (%)	0,0	8,8	40,2	50,0
	Tasa de recuperación (%)	81	9	7	3

TM = trombomodulina.

(Ejemplo 8) Separación de producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente escalonado a través de un intercambiador aniónico.

Se diluyeron 70 mL del producto altamente purificado obtenido en el Ejemplo 3 con 210 mL de agua purificada. La solución diluida se hizo pasar a través de una columna *SourceQ 30 (GE Healthcare Bio-Sciences)* (diámetro: 0,5 cm; longitud: 20,5 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 30 mM. La columna se lavó con 3 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 30 mM, y se comenzó la elución con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 0,18 M. Se obtuvo un eluato desde la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato hasta 6 volúmenes de columna. Usando una cromatografía analítica de exclusión por tamaños, TSK-GEL G3000SWXL (TOSOH), se evaluó en el eluato el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble en las condiciones del Ejemplo 7. Como resultado, se encontró que el contenido del producto desnaturalizado de trombomodulina soluble era 0,0%. Por lo tanto, se pudo obtener una trombomodulina soluble de gran pureza que no contenía sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Se encontró que la tasa de recuperación del eluato era 89%. Hay que advertir que el caudal durante la carga de la muestra y el lavado se ajustó a 0,8 mL/min, y que el caudal durante la elución se ajustó a 0,4 mL/min. El cromatograma se muestra en la Figura 5.

(Ejemplo 9) Obtención de un líquido sobrenadante de cultivo que contiene trombomodulina soluble por cultivo exento de suero de células de ovario de hámster chino, en las que se incorporó, por técnicas de ingeniería genética, el gen de la trombomodulina humana que había sido preparado y modificado.

45

Como medios exentos de suero que no contenían ingredientes de origen animal utilizados en el cultivo para la obtención de un líquido sobrenadante de cultivo que contenía trombomodulina soluble, se prepararon dos tipos de medios, a saber, un medio para la siembra y un medio para el cultivo por perfusión.

5 Para preparar el medio para la siembra, se mezclaron asépticamente 5 mL de suplemento HT (líquido; número de catálogo: 11067-030; fabricante: Invitrogen) y 40 mL de L-glutamina 200 mM (líquido; número de catálogo: 25030-081; fabricante: Invitrogen) en 1 litro de IS CHO-CD (medio líquido; número de catálogo: 91119-1L; fabricante: Irvine Scientific). Para sus conservación, el medio así preparado para la siembra se refrigeró (2°C a 8°C), y cuando se utilizó, se calentó en un baño de temperatura constante a 36°C inmediatamente antes de su uso.

10 Para preparar el medio para el cultivo en perfusión, se añadieron 20,8 g de IS CHO-CD-A3 (medio en polvo; número de catálogo 98688; fabricante: Irvine Scientific), 2,6 g de sales comunes (calidad especial; fabricante: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y 4,4 g de bicarbonato de sodio (calidad especial; fabricante: Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) y se disolvieron en 1 L de agua ultrafiltrada desionizada, y a continuación la solución mixta se filtró asépticamente por un filtro de 0,2 µm (hecho de PVDF; fabricante: Millipore). El medio así preparado para el cultivo en perfusión se refrigeró (2°C a 8°C) cuando se conservó y usó.

15 Para la iniciación del cultivo de siembra, las células congeladas capaces de producir trombomodulina soluble (Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999)) se fundieron rápidamente en un baño a temperatura constante de 37°C, y a continuación las células se pusieron en suspensión en un medio para el cultivo de siembra. La suspensión se centrifugó (2000 rpm; 2 minutos; Kokusan Chemical Co., Ltd.) y después de la eliminación del líquido sobrenadante centrifugado, el sedimento celular se puso en suspensión en 100 mL del medio para el cultivo de siembra. La suspensión se distribuyó en un recipiente de cultivo consistente en un matraz en forma de T de 225 cm² (fabricante: BD Biosciences) para iniciar un cultivo de siembra para la primera etapa. El cultivo de siembra para la primera etapa se llevó a cabo en forma de un cultivo estático en una incubadora a 36°C con 5% de CO₂. Cuando la densidad de las células vivas que flotan en el cultivo de siembra para la primera etapa alcanzó aproximadamente 8 x 10⁵ células/mL, las células se subcultivaron hasta obtener un cultivo de siembra para la segunda etapa.

El cultivo de siembra para la segunda etapa y los cultivos subsiguientes se llevaron a cabo como cultivos giratorios. Las balanzas y los recipientes del cultivo giratorio utilizados en cultivos giratorios como cultivos de siembra son los siguientes: cultivo de siembra para la segunda etapa: 400 mL (un matraz giratorio de vidrio; fabricante: Shibata Scientific Technology Ltd.); cultivo de siembra para la tercera etapa: 1,6 L (un matraz giratorio de vidrio; fabricante: Shibata Scientific Technology Ltd.); y cultivo de siembra para la cuarta etapa: 6 L (un matraz giratorio de vidrio; fabricante: Shibata Scientific Technology Ltd.). Así, las células se subcultivaron sucesivamente, de modo que se aumentó la cantidad de una solución de cultivo. Cuando la densidad de células vivas que flotaban en un cultivo de siembra alcanzó aproximadamente 8 x 10⁵ células/mL, las células se subcultivaron hasta el cultivo de siembra siguiente. En dichos subcultivos, se añadió un medio para el cultivo de siembra al medio anterior en la misma cantidad que el valor obtenido restando el peso de la balanza de cultivo antes del subcultivo del peso de la balanza de cultivo después del subcultivo, con el fin de aumentar la cantidad de la solución de cultivo. El cultivo giratorio se llevó a cabo en una incubadora a 36°C, con 5% de CO₂, utilizando un agitador magnético (fabricante: Shibata Scientific Technology Ltd.) a una velocidad de agitación de 60 a 100 rpm.

40 Cuando la densidad de células vivas que flotan en el cultivo de siembra para la cuarta etapa alcanzó aproximadamente 8 x 10⁵ células/mL, se transfirieron 2 litros de la solución de cultivo de siembra a cada uno de 3 depósitos de cultivo en perfusión (fermentadores de cultivos en perfusión de 2 L; fabricante: B.E. Marubishi Co., Ltd.) y luego se inició el cultivo en perfusión.

45 En el cultivo en perfusión, el transporte cuantitativo de un medio de cultivo en perfusión suministrado a un depósito de cultivo en perfusión se llevó a cabo usando una bomba peristáltica (fabricante: Master Flex) a un caudal de 2 L/día.

50 La separación de células en el cultivo en perfusión se llevó a cabo utilizando un filtro giratorio acoplado a un depósito de cultivo en perfusión. Los filtros giratorios usados en los 3 depósitos de cultivo en perfusión fueron de tipos diferentes. Un primer filtro giratorio consistía en una malla de acero inoxidable (FP-10, diámetro de poros: 10 µm; fabricante: Fuji Filtro MFG Co., Ltd.). Un segundo filtro giratorio consistía en una malla de acero inoxidable (FP-30, diámetro de poros: 30 µm; fabricante: Fuji Filtro MFG Co., Ltd.). Un tercer filtro giratorio consistía en una malla de poliéster PETP (diámetro de poros: 10 µm; número de catálogo: BB-8808571; fabricante: Sartorius KK),

55 Se retiró intermitentemente del depósito un líquido sobrenadante de cultivo, separado con un filtro giratorio acoplado a un depósito de cultivo en perfusión, mediante la presión en el depósito de cultivo por la acción de un sensor de nivel que indicaba un nivel de líquido de 2 L en el depósito de cultivo en perfusión, cuando la cantidad de la solución de cultivo llegó a ser 2 L o más. El líquido sobrenadante del cultivo retirado intermitentemente se transfirió a un recipiente refrigerado, y luego se refrigeró de 2°C a 8°C.

Las condiciones para el cultivo en perfusión fueron controladas como sigue: la temperatura en el depósito: 35°C a 37°C; nivel de oxígeno disuelto: 10% a 90%; y pH 6,8 a 7,6.

El cultivo en perfusión se realizó durante 30 días. Las densidades medias de las células vivas durante el cultivo fueron los siguientes: en el primer depósito de cultivo en perfusión: 17×10^6 células/mL; en el segundo depósito de cultivo en perfusión: 10×10^6 células/mL; y en el tercer depósito de cultivo en perfusión: 18×10^6 células/mL.

5 Se reunieron los líquidos sobrenadantes de cultivo obtenidos de los 3 depósitos de cultivo en perfusión durante un período de tiempo entre el tercer día y el día 30 del cultivo en perfusión, y luego la mezcla se filtró por un filtro de 0,2 μm (de PVDF; fabricante: Millipore). El líquido sobrenadante de cultivo filtrado se refrigeró (2°C a 8°C).

(Ejemplo 10) Purificación con una columna de intercambio aniónico fuerte.

10 Se hicieron pasar 850 mL del líquido sobrenadante de cultivo obtenido en el Ejemplo 9 a través de una columna *Q-Sepharose FF (GE Healthcare Bio-Sciences)* (diámetro: 1,6 cm, longitud: 29 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de acetato de sodio 20 mM - acetato 120 mM que contenía cloruro de sodio 30 mM. Posteriormente, la columna se lavó con 12 volúmenes de columna de una solución tampón de acetato de sodio 20 mM - acetato 120 mM (pH 3,8) que contenía cloruro de sodio 30 mM y a continuación se inició la elución con una solución tampón de acetato de sodio 20 mM - acetato 40 mM (pH 4,2) que contenía cloruro de sodio 140 mM. Se añadió 1/5 de volumen de columna de una solución tampón HEPES 1 M (pH 8) que contenía fosfato de potasio 10 mM a un eluato desde la subida inicial del pico principal de absorbancia a 280 nm del eluato hasta 2 volúmenes de columna, con el fin de obtener un producto purificado. Hay que advertir que el caudal se ajustó a 2 mL/min.

(Ejemplo 11) Separación de producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente escalonado a través de hidroxapatita.

20 Se hicieron pasar 20 mL del producto purificado obtenido en el Ejemplo 10 a través de una a una columna *Macro-Prep (R) Ceramic Hydroxyapatite TYPE 1 (BIO-RAD)* (diámetro: 0,5 cm; longitud: 9,7 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón HEPES 20 mM (pH 7) que contenía cloruro de sodio 0,17 M y fosfato de sodio 2 mM. La columna se lavó con 6 volúmenes de columna de una solución tampón HEPES 20 mM (pH 7) que contenía cloruro de sodio 0,17 M y fosfato de sodio 2 mM, y a continuación se realizó la elución con 4 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 8 mM (pH 7) que contenía cloruro de sodio 10 mM. Se obtuvo un eluato desde la subida inicial hasta el declive del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. Hay que advertir que el caudal se ajustó a 0,4 mL/min. Usando una cromatografía analítica de exclusión por tamaños, TSK-GEL G3000SWXL (TOSOH), se evaluó en el eluato en las condiciones del Ejemplo 7, el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Como resultado, se encontró que el contenido del producto desnaturalizado de trombomodulina soluble era 0,8% o menos. La columna se reprodujo con una solución tampón de fosfato 0,5 M (pH 7). El cromatograma se muestra en la Figura 6.

(Ejemplo 12) Purificación en bruto con una columna de intercambio aniónico fuerte (2)

35 Se hicieron pasar 5,2 L de líquido sobrenadante del cultivo obtenido en el Ejemplo 9 a través de una columna *Capto Q (GE Healthcare Bio-Sciences)* (diámetro: 1,6 cm; longitud: 26 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,7) que contenía cloruro de sodio 150 mM. Posteriormente, la columna se lavó con 15 volúmenes de columna de una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,7) que contenía cloruro de sodio 0,18 M y a continuación se inició la elución con una solución tampón Tris-HCl 20 mM (pH 7,7) que contenía cloruro de sodio 0,3 M. Se obtuvo un eluato desde la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato hasta 2 volúmenes de columna como un producto purificado en bruto. Hay que advertir que el caudal se ajustó a 10 mL/min.

(Ejemplo 13) Purificación con un anticuerpo monoclonal (2)

40 Se produjo un anticuerpo monoclonal de acuerdo con el Documento de Patente 2. Se hicieron pasar 72 mL de la fracción de elución obtenida en el Ejemplo 12 a través de una columna cargada con un anticuerpo monoclonal (diámetro: 5 cm; longitud: 11 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 0,3 M. Se suministraron a la columna 6 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 1,0 M y después se suministraron a dicha columna 3 volúmenes de columna de una solución tampón de acetato 0,1 M (pH 5,0), de modo que se lavó dicha columna. Después, se inició la elución con una solución tampón de glicina-HCl 0,1 M (pH 3,0) que contenía cloruro de sodio 20 mM, para obtener un eluato desde la subida inicial hasta el declive del pico de absorbancia a 280 nm del eluato. Luego se añadió al eluato 15% en volumen de una solución tampón de fosfato 0,3 M (pH 7,3), para obtener una solución purificada. Hay que advertir que el caudal se ajustó a 9,8 mL/min. Como resultado de la medición por cromatografía usando el Asahipak C4P-50 antes mencionado o el método ELISA descrito en la Publicación de Patente japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999) se encontró que el contenido de trombomodulina soluble en la solución altamente purificada era 99% o más.

(Ejemplo 14) Altas purificación y eliminación de producto desnaturalizado de trombomodulina soluble con un intercambiador aniónico fuerte.

55 Se hicieron pasar 75 mL de la solución purificada obtenida en el Ejemplo 13 a través de una columna *SourceQ 30 (GE Healthcare Bio-Sciences)* (diámetro: 0,5 cm; longitud: 20,5 cm) que había sido equilibrada con una solución tampón de acetato 0,1 M (pH 4) que contenía cloruro de sodio 40 mM. Se suministraron a la columna 2 volúmenes

de columna de una solución tampón de acetato 0,1 M (pH 4) que contenía cloruro de sodio 40 mM, luego se suministraron a dicha columna 4 volúmenes de columna de una solución tampón de acetato 0,1 M (pH 4) que contenía cloruro de sodio 50 mM y después se suministraron a dicha columna 3 volúmenes de columna de una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 30 mM de modo que se lavó la columna. Después se inició la elución con una solución tampón de fosfato 20 mM (pH 7,3) que contenía cloruro de sodio 0,18 M, para obtener un eluato desde la subida inicial del pico de absorbancia a 280 nm del eluato hasta 6 volúmenes de columna. Hay que advertir que el caudal durante la carga de la muestra se ajustó a 1 mL/min, y que el caudal durante el lavado y la elución se ajustó a 0,3 mL/min. Usando una cromatografía analítica de exclusión por tamaños, TSK-GEL G3000SWXL (TOSOH), se evaluó en el eluato, en las condiciones del Ejemplo 7, el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Como resultado, se encontró que el contenido del producto desnaturalizado de trombomodulina soluble era 0,1%. Por tanto, se obtuvo una trombomodulina soluble de gran pureza que no contenía sustancialmente un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble. Se encontró que la tasa de recuperación del eluato era 71%. El cromatograma se muestra en la Figura 7.

(Ejemplo 15) Evaluación de la cantidad de proteínas en la que están mezclados diferentes tipos de productos (producto derivado de anticuerpo de ratón y producto derivado de células de ovario de hámster chino)

Por el método ELISA descrito en la Publicación de Patente Japonesa (Kokai) N° 11-341990 A (1999) se evaluaron las fracciones de elución de los Ejemplos 13 y 14. Se midió la absorbancia a 280 nm de cada fracción de elución. Los resultados obtenidos evaluando por absorbancia dicha fracción de elución basada en la cantidad mixta se muestran en la Tabla 2 siguiente. Las cantidades mixtas de ingredientes podían ser disminuidas simultáneamente.

Tabla 2:

	Producto derivado de anticuerpo de ratón (ng/DO)	Producto derivado de células de ovario de hámster chino (ng/DO)
Ejemplo 13	1	102
Ejemplo 14	N.D.	N.D.

Breve descripción de los dibujos

- La Figura 1 muestra un cromatograma de la separación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente lineal a través de un intercambiador aniónico en el Ejemplo 4.
- La Figura 2 muestra un cromatograma de la separación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente lineal a través de un intercambiador aniónico en el Ejemplo 5.
- La Figura 3 muestra un cromatograma de la separación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente lineal a través de un intercambiador aniónico en el Ejemplo 6.
- La Figura 4 muestra los resultados obtenidos midiendo el contenido de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble en el producto altamente purificado obtenido en el Ejemplo 3.
- La Figura 5 muestra un cromatograma de la eliminación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente escalonado a través de un intercambiador aniónico en el Ejemplo 8.
- La Figura 6 muestra un cromatograma de la eliminación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble por elución en gradiente escalonado a través de hidroxapatita en el Ejemplo 11.
- La Figura 7 muestra un cromatograma de las altas purificación y eliminación de un producto desnaturalizado de trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico fuerte en el Ejemplo 14.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Asahi Kasei Pharma Kabushiki Kaisha

5 <120> Método para producir trombomodulina soluble de gran pureza

<130> F107165

<160> 13

10

<210> 1

<211> 132

<212> PRT

<213> humana

15

<400> 1

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
1      5      10      15
Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro
      20      25      30
Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro
      35      40      45
Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala
      50      55      60
Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
65      70      75      80
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu
      85      90      95
Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly
      100     105     110
Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile
      115     120     125
Gly Thr Asp Cys
      130
    
```

20 <210> 2

<211> 396

<212> DNA

<213> humano

25 <400> 2

```

atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggccg gcctggggtt ccccgaccg 60
tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
gtctgcgccg agggttcgc gccattccc cagcagccgc acaggtgcca gatgttttgc 180
aaccagactg cctgtccagc cgactcgcac cccaacaccc aggctagctg tgagtgcct 240
gaaggctaca tcctggacga cgtttcctc tcacacggaca tcgacgagtg cgaaacggc 300
ggcttctgct cgggggtgtg ccacaacctc cccggtacct tcgagtgcct ctgcggggcc 360
gactcggccc ttgtccgccca cattggcacc gactgt 396
    
```

30 <210> 3

<211> 132

<212> PRT

<213> humana

35 <400> 3

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
1      5      10      15
Phe Pro Asp Pro Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro
    
```

```

                20                25                30
Leu Asn Gln Thr Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro
   35                40                45
Ile Pro His Glu Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala
   50                55                60
Cys Pro Ala Asp Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro
   65                70                75                80
Glu Gly Tyr Ile Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu
                85                90                95
Cys Glu Asn Gly Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly
                100                105                110
Thr Phe Glu Cys Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile
                115                120                125
Gly Thr Asp Cys
   130

```

5 <210> 4
 <211> 396
 <212> DNA
 <213> humano

10 <400> 4

```

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctggggtt ccccgaccg 60
tgcttcagag ccaactgcga gtaccagtgc cagcccctga accaaactag ctacctctgc 120
gtctgcgcog agggcttcgc gccattccc cagcagccgc acaggtgccg gatgttttgc 180
aaccagactg cctgtccagc cgactgcgac cccaacacc aggctagctg tgagtgcct 240
gaaggctaca tcctggacga cggttcacg tcacaggaca tcgacgagtg cgaaaacggc 300
ggcttctgct ccgggggtg ccacaacctc ccgggtacct tcgagtgcac ctgcggggcc 360
gactcggccc ttgcccgcca cattggcacc gactgt 396

```

15 <210> 5
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> humana

20 <400> 5

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
  1                5                10                15
Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
                20                25                30
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
   35                40                45
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
   50                55                60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
   65                70                75                80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
                85                90                95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
                100                105                110
Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
                115                120                125

```

Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480

<210> 6
 <211> 1440
 <212> DNA
 <213> humano

5

<400> 6

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctggggtt ccccgaccc 60
 gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctotacccg 120
 ggccccgcga ccttctcaaa tgccagtacg atctgcgacg gactgcgggg ccacctaatg 180
 acagtgcgct cctcgggtggc tgccgatgtc atttccctgc tactgaacgg cgaccggcggc 240
 gttggccccc gggcctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctgcgg cgaccccaag 300
 cgctcggggc ccctgcgcgg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtggggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgcg gccctgtgtg cgtcgtctgc 420
 tccgctgctg aggccactgt gccagcggag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
 aaggccgatg gcttctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagccccggc ccgcggctgc cgccgtctg atcacctacg gcacccccgt cgcgccccgc 600
 ggagcggact tccaggcgtc gccggtgggc agctccggcg cgggtgctcc cctcggotta 660
 cagctaagt gcaccgcgc gcccgaggcg gtccaggggc actgggccag ggaggcggcg 720
 ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgcgatccct 780
 ggggctcccc gctgccagt cccagccggc gccgccctgc aggcagacgg gcgctcctgc 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctcgt tcccaacccc 900
 gaccagccgc gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
 caccgggtgc aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcctgt 1020
 gtcaacacac aggggtggct cgagtccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccggtga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaa ctagctacct ctgctctgc gccgagggtc tcgcccacat tcccacagag 1200
 ccgcacaggt gcagatggt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
 gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctcccgggt 1380
 acctcagat gcatctgcgg gcccgactcg gccctgttcc gccacattgg caccgactgt 1440

<210> 7
 <211> 480
 <212> PRT
 <213> humana

5

<400> 7

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
 20 25 30
 His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
 35 40 45
 Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
 50 55 60
 Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
 85 90 95
 Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
 100 105 110
 Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140

10

Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480

<210> 8
 <211> 1440
 5 <212> DNA
 <213> humano

<400> 8

10 atgcttgggg tcctggtcct tggcgcgctg gccctggcgg gcctggggtt ccccgaccc 60

gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcag actgcttcgc gctctaccg 120
 ggccccgcga ccttctctca tgcagtcag atctgcgac gactgcgggg ccacctaag 180
 acagtgcgct cctcgggtgg tccgatgac atttcttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
 gttggccgcc ggccctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctcgg cgaccccaag 300
 cgctcggggc cctgcgagg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
 aggtggggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgag gcccgttggt cgtcgtctg 420
 tccgctgctg aggccaactg gccagcggag ccgatctggg agggagcagca gtgcgaagt 480
 aaggccgatg gtttctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
 gagccccggc ccggggctgc cgccgtctg atcacctac gcaccccgtt cgcggcccgc 600
 ggagcggact tccaggcgtt gccgggtggc agctccgccc cggtaggtcc cctcggctta 660
 cagctaattg gcaccgcgcc gccgggagcg gtccaggggc actggggcag ggaggcggcg 720
 ggccgttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgcgatccct 780
 ggggtcccc gctgccagt cccagccggc gccgccctg aggcagacgg gcgctcctg 840
 accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac cctgcgagc acttctcgt tcccaacccc 900
 gaccagccgg gctcctact gtgatgtgc gagaccggt accgctggc gccggaccaa 960
 caccgggtgc aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgt 1020
 gtcaacacac aggggtggct cgagtgccac tgcacccta actacgacct gttggacggc 1080
 gagtgtgtgg agcccgtgga cccgtgctt agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
 ctgaacaaa ctagctacct ctgctctgc gccgagggt tccgcccac tcccacgag 1200
 ccgcacaggt gccagatgt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
 acccaggcta gctgtgagt cctgaaggc tacatcctgg acgacggtt catctgcag 1320
 gacatgcagc agtgcaaaa ccggggctt tgcctcgggg tgtgccaaa cctccccggt 1380
 acctcgagt gcatctcgg gcccgactc gcccttccc gccacattg caccgactgt 1440

<210> 9
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> humana

5

<400> 9

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
 1 5 10 15
 Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
 20 25 30
 His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
 35 40 45
 Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
 50 55 60
 Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
 65 70 75 80
 Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
 85 90 95
 Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
 100 105 110
 Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160

10

Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Val Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 485 490 495
 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 500 505 510
 Val His Ser Gly
 515

<210> 10
 <211> 1548
 <212> DNA
 <213> humano

5

<400> 10

```

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgaccc 60
gcagagcccg agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctaccgg 120
ggccccgcga ccttctctca tccagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaag 180
acagtgcgct cctcgggtgg tccgatgac atttcttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttggccccc ggccctctg gatcggcctg cagctgccac ccggctcggg cgaccccaag 300
cgctcggggc ccctgcgagg cttccagtgg gttacggggg acaacaacac cagctatagc 360
agggtggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgag gcccggttgg cgtcgtctgc 420
tccgctgctg aggcactgt gccagcgag ccgatctggg aggagcagca gtgcgaagtg 480
aaggccgatg gcttctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagcccgggc ccgcgctgc cggctctcg atcacctac gcaccccggt cgggccccgc 600
ggagcggact tccaggcgct gccggtgggc agctccgccc cgggtgctcc cctcggctta 660
cagctaagtg gcaccgcgcc gccggagcg gtccaggggc actgggccag ggaggcggcg 720
ggcgtttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgcgtgcaa tgcgatccct 780
ggggctcccc gctgccagtg cccagccggc gccgccctgc aggcagcggg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgacgcagtc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgctg tcccacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccgggtgc aggacgtgga tgaactgata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgt 1020
gtcaacacac aggggtgctt cgagtgcac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccggtga cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaa ctagctacct ctgctctgc gccgagggct tcgcccctat tccccacgag 1200
ccgacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccacaac 1260
accagggcta gctgtgagt ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcagc 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccaaa cctccccggt 1380
accttcgagt gcatctcggg gcccgactcg gccctgttcc gccacattgg caccgactgt 1440
gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccagc 1500
ccggctcca ccttactcc tccggccgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

```

<210> 11
 <211> 516
 <212> PRT
 <213> humana

5

<400> 11

```

Met Leu Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Leu Ala Leu Ala Gly Leu Gly
1           5           10           15
Phe Pro Ala Pro Ala Glu Pro Gln Pro Gly Gly Ser Gln Cys Val Glu
20          25          30
His Asp Cys Phe Ala Leu Tyr Pro Gly Pro Ala Thr Phe Leu Asn Ala
35          40          45
Ser Gln Ile Cys Asp Gly Leu Arg Gly His Leu Met Thr Val Arg Ser
50          55          60
Ser Val Ala Ala Asp Val Ile Ser Leu Leu Leu Asn Gly Asp Gly Gly
65          70          75          80
Val Gly Arg Arg Arg Leu Trp Ile Gly Leu Gln Leu Pro Pro Gly Cys
85          90          95
Gly Asp Pro Lys Arg Leu Gly Pro Leu Arg Gly Phe Gln Trp Val Thr
100         105         110

```

10

Gly Asp Asn Asn Thr Ser Tyr Ser Arg Trp Ala Arg Leu Asp Leu Asn
 115 120 125
 Gly Ala Pro Leu Cys Gly Pro Leu Cys Val Ala Val Ser Ala Ala Glu
 130 135 140
 Ala Thr Val Pro Ser Glu Pro Ile Trp Glu Glu Gln Gln Cys Glu Val
 145 150 155 160
 Lys Ala Asp Gly Phe Leu Cys Glu Phe His Phe Pro Ala Thr Cys Arg
 165 170 175
 Pro Leu Ala Val Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Val Ser Ile Thr
 180 185 190
 Tyr Gly Thr Pro Phe Ala Ala Arg Gly Ala Asp Phe Gln Ala Leu Pro
 195 200 205
 Val Gly Ser Ser Ala Ala Val Ala Pro Leu Gly Leu Gln Leu Met Cys
 210 215 220
 Thr Ala Pro Pro Gly Ala Val Gln Gly His Trp Ala Arg Glu Ala Pro
 225 230 235 240
 Gly Ala Trp Asp Cys Ser Val Glu Asn Gly Gly Cys Glu His Ala Cys
 245 250 255
 Asn Ala Ile Pro Gly Ala Pro Arg Cys Gln Cys Pro Ala Gly Ala Ala
 260 265 270
 Leu Gln Ala Asp Gly Arg Ser Cys Thr Ala Ser Ala Thr Gln Ser Cys
 275 280 285
 Asn Asp Leu Cys Glu His Phe Cys Val Pro Asn Pro Asp Gln Pro Gly
 290 295 300
 Ser Tyr Ser Cys Met Cys Glu Thr Gly Tyr Arg Leu Ala Ala Asp Gln
 305 310 315 320
 His Arg Cys Glu Asp Val Asp Asp Cys Ile Leu Glu Pro Ser Pro Cys
 325 330 335
 Pro Gln Arg Cys Val Asn Thr Gln Gly Gly Phe Glu Cys His Cys Tyr
 340 345 350
 Pro Asn Tyr Asp Leu Val Asp Gly Glu Cys Val Glu Pro Val Asp Pro
 355 360 365
 Cys Phe Arg Ala Asn Cys Glu Tyr Gln Cys Gln Pro Leu Asn Gln Thr
 370 375 380
 Ser Tyr Leu Cys Val Cys Ala Glu Gly Phe Ala Pro Ile Pro His Glu
 385 390 395 400
 Pro His Arg Cys Gln Met Phe Cys Asn Gln Thr Ala Cys Pro Ala Asp
 405 410 415
 Cys Asp Pro Asn Thr Gln Ala Ser Cys Glu Cys Pro Glu Gly Tyr Ile
 420 425 430
 Leu Asp Asp Gly Phe Ile Cys Thr Asp Ile Asp Glu Cys Glu Asn Gly
 435 440 445
 Gly Phe Cys Ser Gly Val Cys His Asn Leu Pro Gly Thr Phe Glu Cys
 450 455 460
 Ile Cys Gly Pro Asp Ser Ala Leu Ala Arg His Ile Gly Thr Asp Cys
 465 470 475 480
 Asp Ser Gly Lys Val Asp Gly Gly Asp Ser Gly Ser Gly Glu Pro Pro
 485 490 495

 Pro Ser Pro Thr Pro Gly Ser Thr Leu Thr Pro Pro Ala Val Gly Leu
 500 505 510
 Val His Ser Gly
 515

5 <210> 12
 <211> 1548
 <212> DNA
 <213> humano

10 <400> 12

```

atgcttgggg tcctggctct tggcgcgctg gccctggccg gcctgggggt ccccgacccc 60
gcagagccgc agccgggtgg cagccagtgc gtcgagcacg actgcttcgc gctctacccg 120
ggccccgcga ccttcctcaa tgcagtcag atctgcgacg gactgcgggg ccacctaag 180
acagtgcgct cctcgggtgg tgcagatgac atttccttgc tactgaacgg cgacggcggc 240
gttggccccc ggccgctctg gatcggcctg cagctggcac ccggctgcgg cgaccccaag 300
cgctcggggc ccctgcgagg cttccagtgg gttacgggag acaacaacac cagctatagc 360
aggtagggcac ggctcgacct caatggggct cccctctgag gcccgttgtg cgtcgtctgc 420
tccgctgctg aggccactgt gccagcagc cagatctggg agggagcagca gtgcgaagtg 480
aaggccgatg gcttcctctg cgagttccac ttcccagcca cctgcaggcc actggctgtg 540
gagcccgccg ccgaggctgc cgcctctcgc atcacctacg gcaccccggt cgcggccccc 600
ggagcggact tccaggcgct gccggggggc agctccgccc cggtaggctcc cctcggccta 660
cagctaatgt gcaccgcgcc gcccgagcgc gtcagggggc actggggcag ggaggcggcc 720
ggcgcttggg actgcagcgt ggagaacggc ggctgcgagc acgctgcaa tgcgatccct 780
ggggctcccc gctgccagtg cccagccggc gccgcccctg aggcagacgg gcgctcctgc 840
accgcatccg cgagcagctc ctgcaacgac ctctgcgagc acttctgctg tcccaacccc 900
gaccagccgg gctcctactc gtgcatgtgc gagaccggct accggctggc ggccgaccaa 960
caccgggtgcg aggacgtgga tgactgcata ctggagccca gtccgtgtcc gcagcgtgt 1020
gtcaacacac agggtaggct cgagtgccac tgctacccta actacgacct ggtggacggc 1080
gagtgtgtgg agcccgtagc cccgtgcttc agagccaact gcgagtacca gtgccagccc 1140
ctgaacaaa ctagctacct ctgcgtctgc gccgagggct tcgcccctat tccccagag 1200
ccgcacaggt gccagatgtt ttgcaaccag actgcctgtc cagccgactg cgaccccaac 1260
acccaggcta gctgtgagtg ccctgaaggc tacatcctgg acgacggttt catctgcacg 1320
gacatcgacg agtgcgaaaa cggcggcttc tgctccgggg tgtgccacaa cctccccggt 1380
accttcgagt gcatctcggg gcccgactcg gcccttgccc gccacattgg caccgactgt 1440
gactccggca aggtggacgg tggcgacagc ggctctggcg agccccgcc cagcccgacg 1500
cccggctcca cctgactcc tccggcgtg gggctcgtgc attcgggc 1548

```

<210> 13

<211> 21

5 <212> DNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de la secuencia artificial: DNA sintético

<400> 13

aatgtggcgg gcaagggccg a 21

15

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, que puede ser generado a partir de la trombomodulina soluble en condiciones ácidas, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3 % o menos, que comprende: (0) una etapa en la que se deja la trombomodulina soluble en condiciones ácidas de pH 5 o menor; (1) una etapa en la que se hace pasar un material que contiene trombomodulina soluble que contiene o se sospecha que contiene un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, que se obtiene en la etapa (0) anterior, a través de un intercambiador aniónico o hidroxapatita; y (2) un etapa en la que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto de trombomodulina soluble es 3% o menos, en condiciones de separación en la cuales la trombomodulina soluble puede ser separada de un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble.
2. El método de producción de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la etapa en la que se deja la trombomodulina soluble en condiciones ácidas de pH 5 o menor es una etapa en la que se deja la trombomodulina soluble en condiciones ácidas de pH 4 o menor.
3. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través del intercambiador aniónico o hidroxapatita es la etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través del intercambiador aniónico.
4. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde la etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través del intercambiador aniónico o hidroxapatita es la etapa en la que se hacer pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de la hidroxapatita.
5. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el contenido de la trombomodulina soluble es 80% o más con respecto a las proteínas totales en el material que contiene trombomodulina soluble.
6. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado, o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado es 3% o menos.
7. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (2) es una etapa en la que se obtiene una fracción de paso, en la cual se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos.
8. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución isocrática para obtener una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos.
9. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico usando una solución tampón de pH 4 a 9; y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la cual se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, usando una solución tampón de pH 5 a 9 que tiene una concentración de sal de 0 a 1 M, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos, confirmando mientras la presencia de la trombomodulina soluble en la fracción de elución.
10. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de un intercambiador aniónico usando una solución tampón de pH 5 a 8 que tiene una concentración de sal de 0,1 a 0,2 M; y la etapa (2)

- 5 es una etapa en la que se obtiene una fracción de paso usando una solución tampón de pH 5 a 8 que tiene una concentración de sal de 0,1 a 0,2 M, de modo que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos.
- 10 11. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de hidroxiapatita usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 8 mM o menor; y la etapa (2) es una etapa en la que se realiza una elución en gradiente lineal, una elución en gradiente escalonado o una elución en gradiente en la que se combina la elución en gradiente lineal con la elución en gradiente escalonado, usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 0 a 0,5 M, de modo que se obtiene una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos, confirmando mientras la presencia de la trombomodulina soluble en la fracción de elución.
- 15 12. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la etapa (1) es una etapa en la que se hace pasar el material que contiene trombomodulina soluble a través de hidroxiapatita usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 20 mM o menor; y la etapa (2) es una etapa en la que se obtiene una fracción de paso usando una solución tampón de pH 6 a 9 que tiene una concentración de fosfato de 5 a 20 mM, de modo que se obtiene una fracción que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos.
- 20 13. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que no comprende una etapa en la que se ajusta el pH de una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble a pH 4 o menor, después de que se haya obtenido la fracción de elución, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos.
- 25 30 14. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que es un método de producción que comprende una etapa de concentración y/o una etapa de desalación, en donde el pH de una fracción de elución que contiene trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente un producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble no se ajusta a pH 4 o menor después de que se haya obtenido la fracción de elución, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 3% o menos, y en donde el método de producción se usa para convertir la trombomodulina soluble en un material farmacéutico.
- 35 15. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde el contenido del producto desnaturalizado de la trombomodulina soluble en la trombomodulina soluble que no contiene sustancialmente el producto desnaturalizado de trombomodulina soluble es 1% o menos.
- 40 16. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en donde la trombomodulina soluble es trombomodulina obtenida a partir de células transformantes preparadas transfecando células hospedantes con DNA que codifica la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11.
- 45 17. El método de producción de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la trombomodulina soluble es un péptido que consiste en una secuencia que consiste en los aminoácidos en las posiciones 19 a 516 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 9 u 11, o un péptido que comprende una sustitución, una delección, o una adición de uno o múltiples aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de dicho péptido y tiene actividad de trombomodulina.

Fig. 1

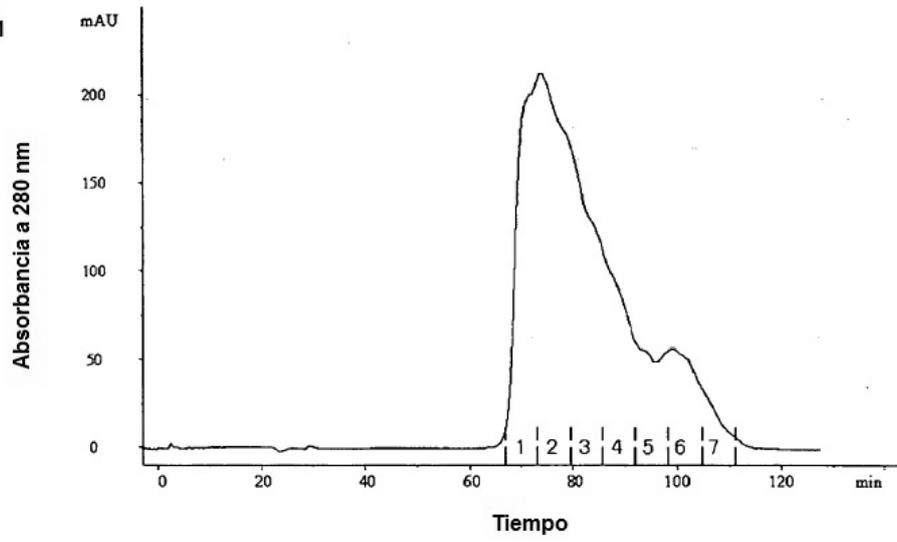


Fig. 2

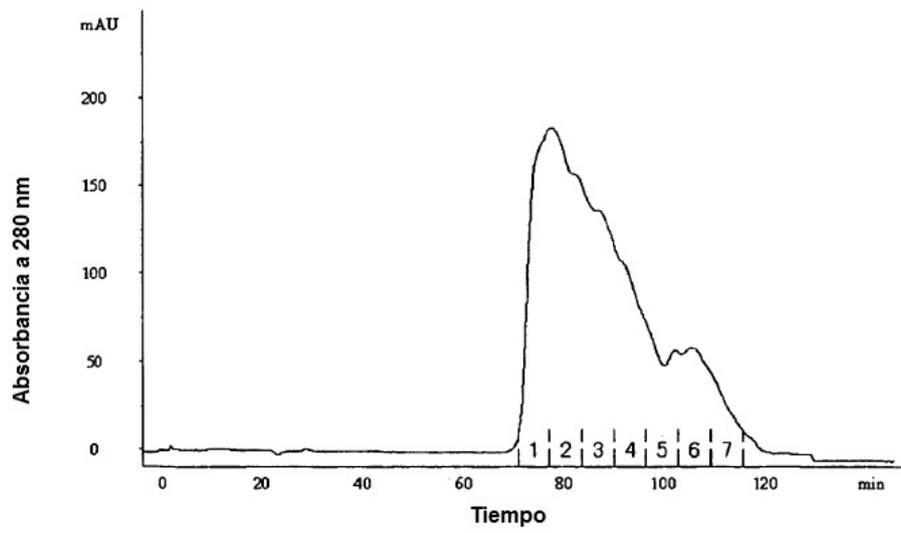


Fig. 3

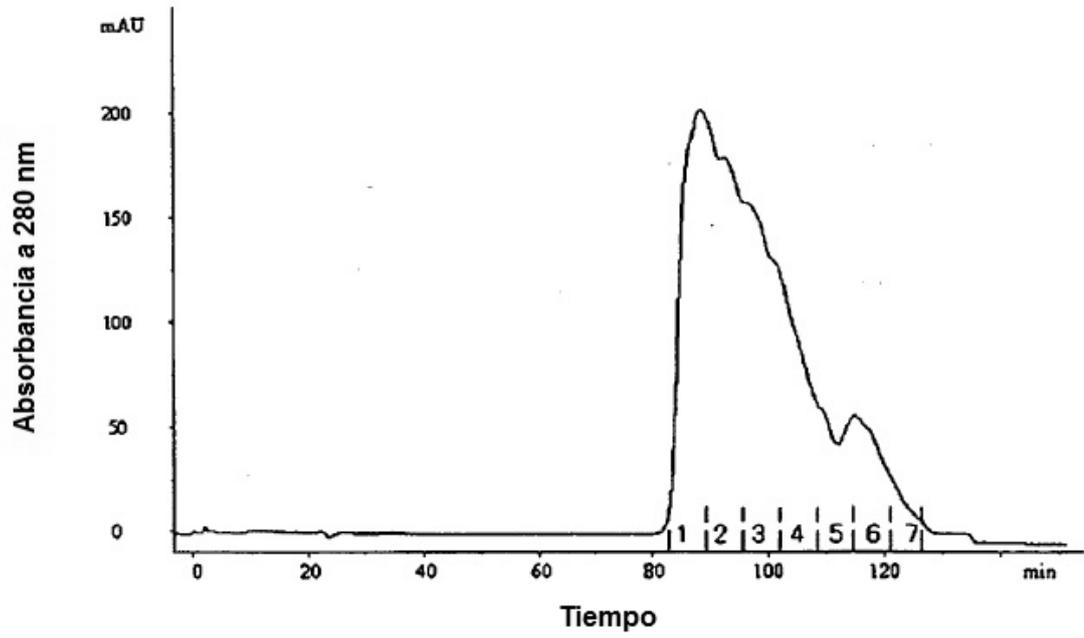
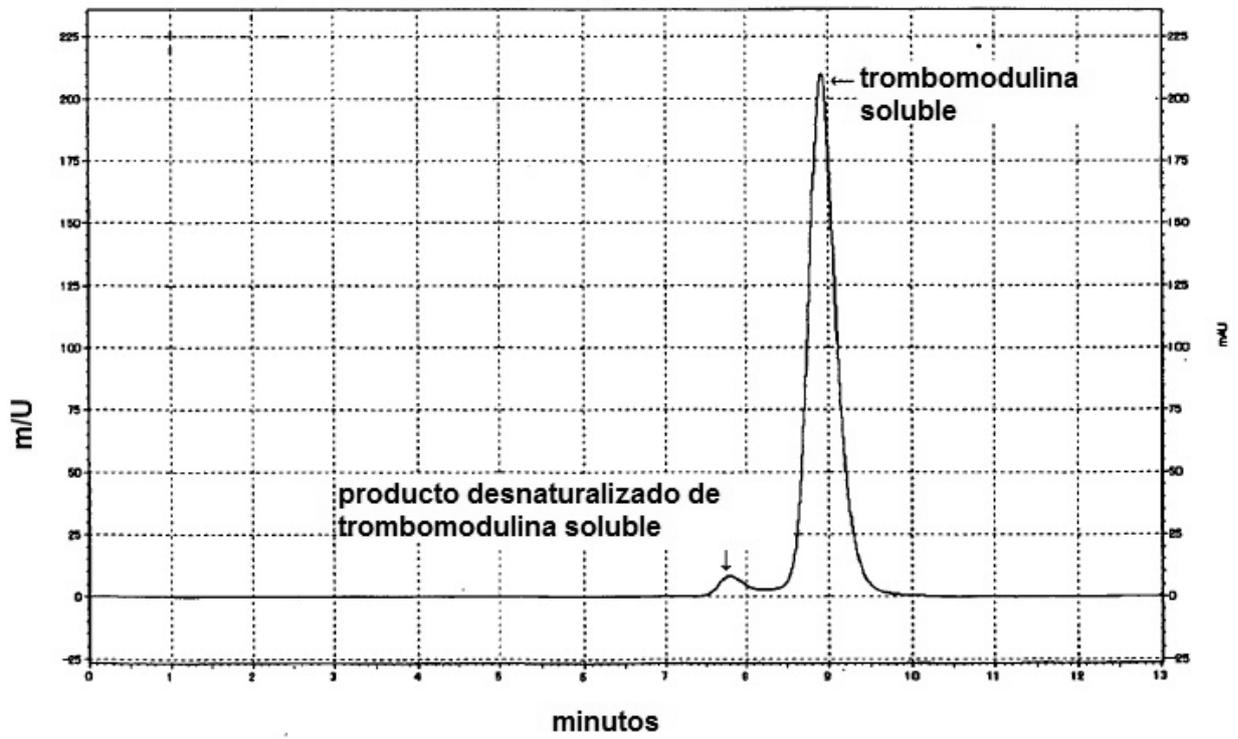


Fig. 4



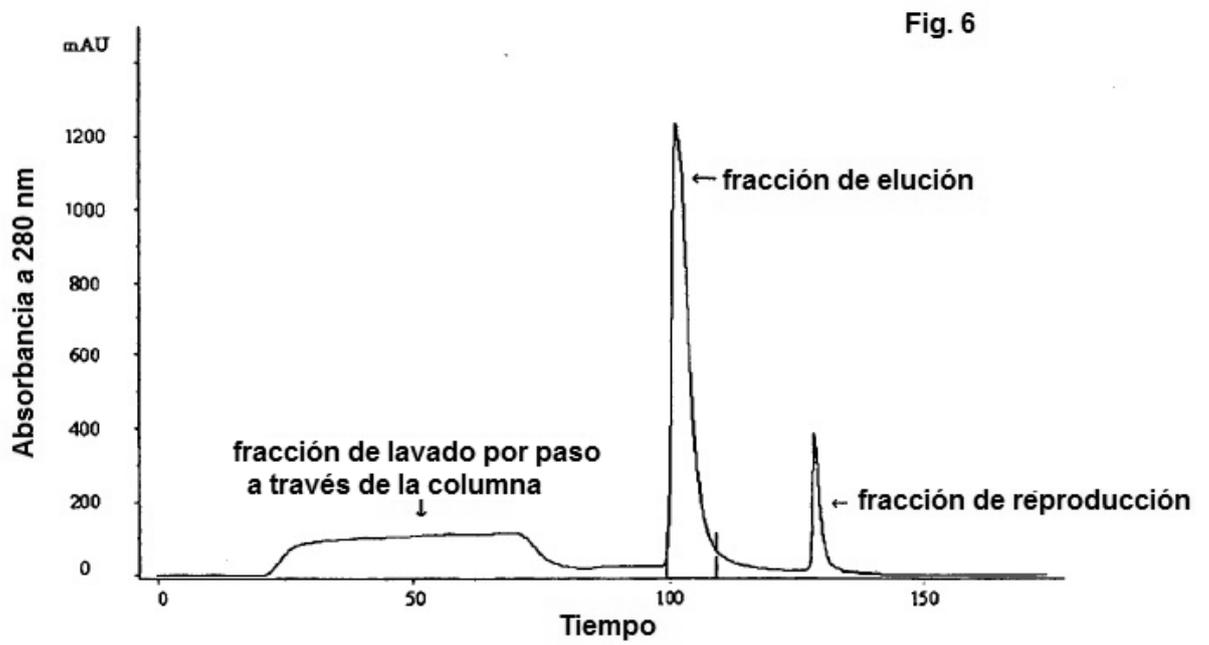
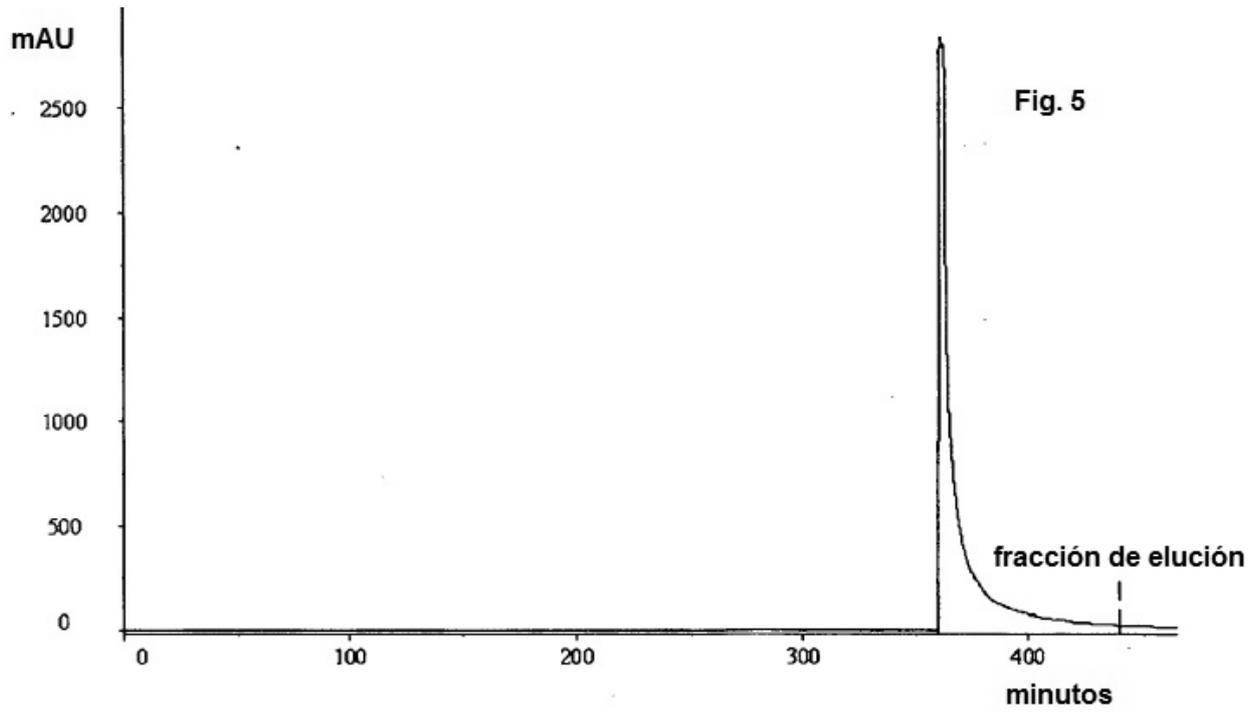


Fig. 7

