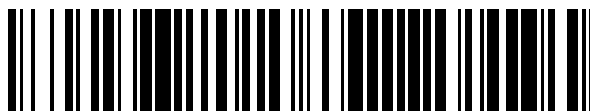


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 337**

51 Int. Cl.:

C07K 1/18 (2006.01)

C12N 9/50 (2006.01)

C12N 15/57 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.03.2010 E 10749193 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.08.2015 EP 2403865**

54 Título: **Procedimientos para la preparación de plasminógeno**

30 Prioridad:

03.03.2009 US 156990 P

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

27.11.2015

73 Titular/es:

**GRIFOLS THERAPEUTICS INC. (100.0%)
4101 Research Commons, 79 TW Alexander Drive
Research Triangle Park, NC 27709, US**

72 Inventor/es:

**KOEPF, EDWARD;
LINDSAY, MYLES;
SILVERSTEIN, REBECCA;
HUNT, JENNIFER, A.;
REBBEOR, JAMES;
ZIMMERMAN, THOMAS, P.;
MILLER, CHARLES;
CARONNA, ANTHONY y
STOKES, KENYA**

74 Agente/Representante:

DURÁN MOYA, Luis Alfonso

ES 2 552 337 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

Procedimientos para la preparación de plasminógeno

5 SECTOR DE LA INVENCION

La presente invención se refiere tanto a un procedimiento para la preparación de plasminógeno como a un procedimiento para la preparación de plasmina a partir de plasminógeno recombinante.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La producción de grandes cantidades de polipéptidos y proteínas relativamente puras es importante para la fabricación de muchas formulaciones farmacéuticas. Para la producción de muchas proteínas, se han empleado técnicas de ADN recombinante en parte debido a que se pueden expresar grandes cantidades de proteínas exógenas en células huésped.

La plasmina, la enzima fibrinolítica principal en los mamíferos, es una serina proteasa con especificidad de tipo tripsina que deriva del precursor zimógeno inactivo plasminógeno que circula en el plasma. El plasminógeno en sí mismo es un polipéptido de 790 aminoácidos que tiene un residuo de glutamato en el extremo N-terminal. Los activadores del plasminógeno, tales como la estreptoquinasa, el activador tisular del plasminógeno (tPA) o la uroquinasa, escindirán la molécula de plasminógeno de cadena sencilla para producir plasmina activa en el enlace peptídico Arg560-Val561. Las dos cadenas polipeptídicas resultantes de plasmina se mantienen juntas mediante dos puentes disulfuro intercatenarios. La cadena ligera de 25 kDa contiene el centro catalítico y es homóloga a la tripsina y otras serina proteasas. La cadena pesada (60 kDa) consiste en cinco estructuras kringle de triple bucle con secuencias de aminoácidos muy similares. Algunos de estos kringles contienen los denominados sitios de unión a lisina que son responsables de la interacción del plasminógeno y la plasmina con fibrina, α 2-antiplasmina u otras proteínas.

La plasmina, como potencial agente trombolítico, presenta numerosas dificultades técnicas. Entre estas dificultades se incluyen la dificultad de preparar plasmina pura que esté relativamente libre de trazas funcionales del activador del plasminógeno utilizado para generar la plasmina a partir de su precursor inactivo, el plasminógeno. Las preparaciones de plasmina están de forma habitual ampliamente contaminadas por el activador del plasminógeno, la estreptoquinasa o la uroquinasa, y la actividad trombolítica se ha atribuido, por lo tanto, a los activadores del plasminógeno contaminantes en lugar de a la propia plasmina. Los activadores del plasminógeno contaminantes también podrían desencadenar la hemorragia sistémica fuera del sitio específico de la trombosis. Otro factor técnico importante que limita la utilización clínica de la plasmina es que la plasmina, como serina proteasa con una amplia especificidad, es muy propensa a la autodegradación y la pérdida de actividad. Esta circunstancia implica dificultades importantes en la producción de plasmina de alta calidad, en la formulación estable de esta proteasa activa durante períodos prolongados de almacenamiento antes de su utilización, y en la administración segura y eficaz de la plasmina a pacientes humanos que padecen trombos oclusivos.

El aislamiento preparativo de plasminógeno recombinante o plasmina preparada a partir de plasminógeno recombinante que da lugar a una pureza farmacéutica y un rendimiento suficiente no se encuentra en el estado de la técnica. Por lo tanto, existe la necesidad de composiciones y procedimientos para la preparación de un plasminógeno recombinante y de plasmina preparada a partir del plasminógeno recombinante activado por un activador de plasminógeno.

El documento US 2004/171103 da a conocer procedimientos para la producción de plasmina mediante la activación del plasminógeno, y un procedimiento para la producción de plasminógeno purificado.

50 CARACTERÍSTICAS DE LA INVENCION

Se da a conocer en el presente documento un procedimiento para la preparación de un plasminógeno; y para la preparación de una plasmina a partir del mismo.

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de plasminógeno. El procedimiento comprende poner en contacto una composición que comprende un plasminógeno con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio catiónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno.

En otro aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de plasminógeno, comprendiendo el procedimiento:

- (a) expresar un plasminógeno recombinante utilizando un sistema de expresión recombinante en condiciones de expresión suficientes para producir un cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante;

(b) poner en contacto el cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante con un tampón de solubilización en condiciones de solubilización suficientes para obtener un cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante solubilizado;

(c) poner en contacto el cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante solubilizado con una solución de replegamiento en condiciones de replegamiento para obtener una composición que comprende el plasminógeno recombinante, en el que se añade PEG o sulfato de amonio a la solución de replegamiento en condiciones de precipitación, en el que la solución de replegamiento comprende el plasminógeno y polipéptidos agregados, en el que el plasminógeno es plasminógeno replegado, en el que las condiciones de precipitación son suficientes para precipitar todas o una parte sustancial de las proteínas agregadas;

(d) diafiltrar la composición después de la etapa (c);

(e) poner en contacto la composición con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio iónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno recombinante;

(f) eluir el plasminógeno recombinante capturado por el medio de intercambio catiónico para obtener un eluato del medio de intercambio catiónico que comprende el plasminógeno recombinante;

(g) poner en contacto el eluato del medio de intercambio catiónico con un primer medio de afinidad en una primera condición de afinidad que es suficiente para que el primer medio de afinidad se una al plasminógeno recombinante; y

(h) eluir el plasminógeno recombinante al que se unió el primer medio de afinidad para obtener una solución de plasminógeno que comprende el plasminógeno recombinante.

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de plasmina, comprendiendo el procedimiento:

(a) poner en contacto una composición que comprende un plasminógeno recombinante con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio catiónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno recombinante;

(b) poner en contacto el plasminógeno recombinante con un activador de plasminógeno en una solución de activación en condiciones de activación suficientes para convertir el plasminógeno recombinante en plasmina; y

(c) poner en contacto la plasmina con un medio de intercambio aniónico en condiciones de intercambio aniónico, de manera que el medio de intercambio aniónico se una, preferentemente, al activador de plasminógeno con respecto a la plasmina.

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para preparar una plasmina. El procedimiento comprende: poner en contacto una composición que comprende la plasmina con un intercambiador aniónico, mediante lo cual, si está presente en la composición, se separa de la plasmina un material proteico que tiene un punto isoeléctrico por debajo del de la plasmina.

DESCRIPCIÓN BREVE DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra una realización de la secuencia de aminoácidos de un plasminógeno recombinante (SEQ ID NO: 1).

La figura 2 muestra la secuencia de aminoácidos de un plasminógeno humano (SEQ ID NO: 2), que muestra la secuencia líder de 19 residuos numerada de -19 a -1, y la secuencia de plasminógeno mostrada como los residuos 1-791. Se muestran una serie de características, incluyendo las siguientes: una realización de la secuencia de aminoácidos de un plasminógeno recombinante (la región sombreada corresponde a la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 1); dominios kringle 1-5 (doble subrayado); sitios de glucosilación Asn289 y Thr346 (en negrita); el sitio de activación Arg-Val (R⁵⁶¹V⁵⁶² en negrita); y sitios de unión a lisina en kringle 1 (subrayados y con numeración de posición específica).

La figura 3 muestra comparaciones de secuencias de polipéptidos (es decir, una alineación de espacios) entre los cinco dominios kringle (1-5) de plasmina(plasminógeno) humano nativo. Los residuos de aminoácidos que son idénticos a los de la misma posición relativa en kringle 1 se muestran subrayados.

La figura 4 muestra un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida y dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) de intermedios de purificación. Las muestras se hicieron correr sobre un gel de poliacrilamida al 4-12%, en condiciones reductoras, y se tiñeron con colorante azul de Coomassie R-350. Los carriles 2-9 del gel 2-9 se cargaron cada uno con 3,5 µg de proteína total. Los carriles 1 y 10, marcadores del peso molecular; carril 2, cuerpos de inclusión solubilizados; carril 3, plasminógeno recombinante replegado; carril 4, eluato de SP-SEPHAROSE®; carril 5, eluato de ECH-lisina SEPHAROSE®; carril 6, plasmina; carril 7, carga de benzamidina SEPHAROSE®; carril 8, eluato de benzamidina SEPHAROSE®; carril 9, plasmina de la formulación final. Las flechas a la derecha del gel indican los productos de autólisis de la plasmina.

La figura 5 muestra un análisis de exclusión por tamaño de plasmina recombinante purificada. Los perfiles de elución (A₂₈₀) para las tres preparaciones de plasmina recombinante purificada se superponen en la figura. La plasmina monomérica constituía el 98,3 ± 0,1% de la absorbancia eluida de la columna durante cada serie. El resto (1,7 ± 0,1%) de la absorbancia eluida se eluyó antes del pico principal.

La figura 6 es un gráfico que muestra el porcentaje de proteína soluble total inicial (A₂₈₀) y la actividad de plasminógeno recombinante que permanece en solución después de la adición de polietilenglicol sólido (PEG) a las concentraciones indicadas y la eliminación del precipitado formado mediante centrifugación.

La figura 7 es un gráfico que muestra el porcentaje de proteína soluble total inicial (A_{280}) y la actividad de plasminógeno recombinante que permanece en solución después de la adición de sulfato de amonio sólido a las concentraciones indicadas y la eliminación del precipitado formado por centrifugación.

La figura 8 es una superposición de cromatogramas (trazas de absorbancia a A_{280}) de experimentos de cribado en resina de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) que demuestran la captura directa de plasminógeno recombinante (TAL6003Z) a partir de los replegados precipitados con sulfato de amonio. El inicio de la fase de elución de cada serie se indica mediante la flecha negra y coincide con el inicio de la recogida de fracciones.

La figura 9 es una SDS-PAGE.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

I. Plasminógeno

En un aspecto, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de plasminógeno, comprendiendo el procedimiento:

poner en contacto una composición que comprende un plasminógeno recombinante con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio catiónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno recombinante.

La secuencia de aminoácidos del plasminógeno puede corresponder o basarse en cualquier especie, incluyendo, pero sin limitarse a éstas, un ser humano, murino, bovino, ovino, porcino, equino y aviar, en la secuencia nativa o en una forma modificada genéticamente, y de cualquier fuente, ya sea natural, sintética, o producida de forma recombinante. En una realización, el plasminógeno corresponde o se basa en un plasminógeno humano.

25 A. Cromatografía de intercambio catiónico

El medio de intercambio catiónico puede ser una fase sólida que se une al plasminógeno recombinante presente en la composición. El medio de la cromatografía de intercambio catiónico se puede seleccionar entre cualquiera del grupo de medios descritos habitualmente como medios de intercambio catiónico, preferentemente, un medio de intercambio catiónico fuerte. El medio puede poseer una química o un ligando acoplado al mismo que puede permitir la captura selectiva o preferente del plasminógeno recombinante de la composición. Los medios de cromatografía útiles comprenden un soporte y uno o más ligandos unidos al mismo que proporcionan la capacidad de unión selectiva o preferente al plasminógeno recombinante. Entre los soportes útiles se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, polisacáridos, tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos, tales como poli(acrilamida), metacrilato de metilo y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno. Se debe entender que en el presente documento no se pretende dar a entender que sólo son adecuados sustratos orgánicos para la utilización como sustrato del medio, ya que también se pueden utilizar materiales de soporte inorgánicos, tales como sílice y vidrios de borosilicato.

En algunas realizaciones, el medio de intercambio catiónico está en forma de micropartículas, que, en general, pueden ser esféricas, o de forma alternativa, el medio de intercambio catiónico se puede disponer de manera útil en partículas o formas divididas que tienen otras formas regulares o irregulares. O, el medio puede estar en un formato de membrana. El medio de intercambio catiónico puede ser de carácter poroso o no poroso y el medio puede ser compresible o incompresible. Los medios de intercambio catiónico preferentes serán física y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación de plasminógeno, incluyendo bombeo y filtración de flujo transversal, y las temperaturas, pH, y otros aspectos de las distintas composiciones empleadas. En la técnica se conocen una amplia variedad de medios de intercambio catiónico, por ejemplo, aquellos en los que el ligando acoplado es sulfopropilo o sulfato de metilo.

En una realización, el medio de intercambio catiónico comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es sulfopropilo (SP), en el que el soporte es una agarosa. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio catiónico se puede realizar en un formato de columna SP-Sepharose[®]. SEPHAROSE[®] es una marca comercial registrada de gel de agarosa en forma de micropartículas.

Preferentemente, la condición de intercambio catiónico es suficiente para que el medio de intercambio catiónico se una de manera selectiva o preferente al plasminógeno recombinante presente en la composición en relación con una o más moléculas contaminantes que también pueden estar presentes en la composición. La molécula contaminante puede ser una sustancia presente en la composición que es diferente de la molécula de plasminógeno recombinante deseada y, de manera deseable, se excluye del producto de plasminógeno recombinante final. Entre los contaminantes se pueden incluir, pero sin limitarse a éstos, ácidos nucleicos, polipéptidos, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, plasminógenos no plegados y mal plegados, restos celulares, endotoxinas, etc.

Por ejemplo, la composición se puede pasar por una columna de SP equilibrada con un tampón adecuado. El pH del tampón adecuado puede ser, como mínimo, aproximadamente pH 3,0, de manera ilustrativa, como mínimo, aproximadamente: pH 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0 y 9,0. En algunas realizaciones, el tampón adecuado tiene un pH ácido, preferentemente, como mínimo, aproximadamente pH 4,0. En otra realización, el tampón adecuado tiene un pH alcalino, preferentemente, un tampón a base de Tris, como mínimo, de aproximadamente pH 8,0. Después de la

etapa de carga, la columna se puede lavar con el tampón de equilibrado o un tampón diferente siempre que una cantidad sustancial del plasminógeno recombinante permanezca unida al medio.

El procedimiento comprende además eluir el plasminógeno recombinante al que está unido el medio de intercambio catiónico para obtener un eluato del medio de intercambio catiónico que comprende el plasminógeno recombinante. Por ejemplo, el plasminógeno recombinante unido al medio se puede eluir del medio de intercambio catiónico con un tampón de elución que comprende una concentración adecuada de una sal. En una realización, se utiliza un tampón a base de Tris que comprende NaCl, como mínimo, aproximadamente 200 mM para eluir el plasminógeno recombinante de una columna de SP.

B. Cromatografía de afinidad

El eluato de intercambio catiónico que comprende el plasminógeno recombinante se puede cargar directamente en un medio de afinidad adecuado para cromatografía de afinidad. De manera alternativa, el eluato se puede someter a etapas de preparación adicionales previas a la cromatografía de afinidad. El procedimiento para la preparación de plasminógeno comprende, además, poner en contacto el eluato de medio de intercambio catiónico con un primer medio de afinidad en una primera condición de afinidad que es suficiente para que el medio de afinidad se una al plasminógeno.

En una realización, el primer medio de afinidad comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando presenta afinidad por el plasminógeno.

El primer medio de afinidad puede ser una fase sólida que se une al plasminógeno presente en la composición. El medio puede poseer una química o un ligando acoplado al mismo que puede permitir la captura selectiva o preferente del plasminógeno de la composición mediante interacciones de afinidad. Los medios de cromatografía de afinidad útiles comprenden un soporte y uno o más ligandos unidos al mismo que proporcionan la capacidad de unión selectiva o preferente al plasminógeno. Entre los soportes útiles se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, polisacáridos, tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos, tales como poli(acrilamida), metacrilato de metilo, y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno. Se debe entender que, en el presente documento, no se pretende dar a entender que sólo son adecuados sustratos orgánicos para la utilización como sustrato del medio, ya que también se pueden utilizar materiales de soporte inorgánicos, tales como sílice y vidrios de borosilicato.

En algunas realizaciones, el medio de afinidad está en forma de micropartículas, que, en general, pueden ser esféricas, o de forma alternativa, el medio de afinidad se puede disponer de manera útil en partículas o formas divididas que tienen otras formas regulares o irregulares. El medio de afinidad puede ser de carácter poroso o no poroso y el medio puede ser compresible o incompresible. Los medios de afinidad preferentes serán física y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación de plasminógeno. En la técnica se conocen una amplia variedad de medios de afinidad, por ejemplo, aquellos en los que el ligando acoplado es una lisina, un anticuerpo o un ion metálico.

En una realización, el medio de afinidad comprende un ligando acoplado a un soporte. En otra realización, el ligando es lisina, en la que el soporte es una agarosa. Por ejemplo, el primer medio de afinidad se puede utilizar en un formato de columna ECH Lisina SEPHAROSE®.

C. Plasminógeno recombinante

El plasminógeno es un plasminógeno recombinante. Por ejemplo, se puede preparar una molécula de ácido nucleico que codifica el plasminógeno de la presente invención a partir de varias fuentes, por ejemplo, a través de síntesis química utilizando la secuencia de ADN conocida o mediante la utilización de técnicas de clonación estándar conocidas por los expertos en la materia. Los clones de ADN que llevan la secuencia codificante del plasminógeno pueden identificarse mediante la utilización de sondas de hibridación de oligonucleótidos diseñadas de manera específica en base a la secuencia conocida del plasminógeno.

En una realización, el plasminógeno recombinante de la presente invención es un zimógeno recombinante que es capaz de activarse a una enzima plasmina funcional después de un proceso de activación que, como mínimo, implica la escisión proteolítica de un enlace peptídico Arg-Val situado entre el dominio kringle y el dominio de serina proteasa del zimógeno.

El plasminógeno recombinante puede presentar propiedades de unión a fibrina y antiplasmina, así como propiedades de activación del plasminógeno humano nativo de longitud completa. En diversas realizaciones, el plasminógeno recombinante y/o la plasmina derivada del mismo pueden caracterizarse, como mínimo, por uno de los siguientes:

- i) en realizaciones particulares, pesos moleculares más bajos con respecto a moléculas de plasmina (plasminógeno) nativas de longitud completa que dan lugar a una mayor actividad específica (por mg de proteína);

- ii) en realizaciones particulares, la falta, como mínimo, de dos sitios de glucosilación que se encuentran en la proteína nativa, combinada con pesos moleculares relativamente bajos, facilita la producción recombinante de esta proteína utilizando sistemas de expresión relativamente económicos;
- 5 iii) en realizaciones particulares, la capacidad del plasminógeno para ser activado por el activador de plasminógeno estreptoquinasa, uroquinasa, tPA y/o estafiloquinasa;
- iv) en realizaciones particulares, la presencia de un único dominio kringle N-terminal homólogo a un dominio kringle de plasminógeno humano nativo, en las que se conservan las propiedades de unión a fibrina de la plasmina, que son importantes para la eficacia trombolítica;
- 10 v) en realizaciones particulares, la presencia de sitios de unión a α 2-antiplasmina en el único dominio kringle N-terminal homólogo a un dominio kringle de plasminógeno humano nativo, lo cual puede permitir que las plasminas sean inhibidas rápidamente por este inhibidor fisiológico de plasmina (una característica que puede evitar la hemorragia);
- vi) en realizaciones particulares, la ausencia de kringle 5, que mantiene el sitio de unión principal a fibrina (fibrinógeno) intacto, sin digerir, puede permitir la utilización de la plasmina con el menor agotamiento de fibrinógeno circulante;
- 15 vii) en realizaciones particulares, la presencia de un único dominio kringle N-terminal homólogo a un dominio kringle de plasminógeno humano nativo, en las que los últimos cuatro residuos de aminoácidos dentro del dominio kringle son V, P, Q, y C, proporciona una unión de tipo nativo al dominio de serina proteasa (es decir, una unión similar a la unión del dominio natural entre el dominio kringle 5 y el dominio de serina proteasa de plasminógeno humano); y
- 20 viii) en realizaciones particulares, después de la expresión del plasminógeno recombinante, su extremo N-terminal se puede escindir de nuevo (por ejemplo, se escindió de nuevo durante la activación) para proporcionar un extremo N-terminal de tipo nativo.
- 25 En otras realizaciones, el plasminógeno recombinante tiene una única región kringle N-terminal al sitio de activación y el dominio de serina proteasa. En algunas realizaciones, la única región kringle que contiene moléculas puede comprender secuencias adicionales (secuencias N-terminal adicionales derivadas de las de las regiones kringle nativas de un plasminógeno nativo) N-terminal al sitio de activación. Los dominios kringle N-terminal pueden incluir secuencias kringle de kringles 1 y 4 de la plasmina (plasminógeno) nativa y equivalentes funcionales de los mismos.
- 30 Además, realizaciones particulares de los plasminógenos recombinantes y las plasminas preparadas a partir de los mismos pueden mostrar una inmunogenicidad reducida debido a las estructuras de tipo nativo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el plasminógeno recombinante tiene un extremo N-terminal idéntico al de una de las formas naturales de plasminógeno derivado de plasma humano, que, después de la activación por el activador del plasminógeno (por ejemplo, estreptoquinasa), produce polipéptidos de plasmina que comprenden extremos N-terminales de tipo nativo. De manera adicional, en otras realizaciones, el plasminógeno recombinante puede tener una secuencia entre los dominios de Kringle y de serina proteasa que es similar a la unión entre Kringle 5 y el dominio SP en plasmina humana natural.
- 35 En otra realización, la presente invención da a conocer un procedimiento para preparar un plasminógeno recombinante, en el que el plasminógeno recombinante comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1 (figura 1). En una realización, el polipéptido de plasminógeno recombinante es, como mínimo, el 90% o el 95%, o el 98% idéntico a la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 1. En otras realizaciones, el plasminógeno recombinante comprende un único dominio kringle que es, como mínimo, el 90% o el 95%, o el 98% idéntico al dominio kringle 1 o kringle 4 del plasminógeno dominio humana nativo; y el dominio C-terminal es, como mínimo, el 90% o el 95%, o el 98% idéntico al dominio del sitio de activación y la serina proteasa de plasminógeno humano. En algunas realizaciones, el polipéptido de plasminógeno recombinante tiene una secuencia de aminoácidos tal como se muestra en la SEQ ID NO: 1, y sustituciones conservativas de la misma. En otras realizaciones, el polipéptido tiene un residuo de arginina en una posición relativa análoga a la de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1.
- 40 En otras realizaciones, los plasminógenos recombinantes tienen una única región kringle N-terminal al sitio de activación y al dominio serina proteasa, en las que los residuos en ciertas posiciones del dominio único kringle N-terminal del plasminógeno están conservados con respecto a kringle 1 de plasminógeno humano nativo. Éstos pueden ser residuos en las posiciones asociadas a puentes disulfuro y de unión a lisina, e incluyen Cys84, Cys105, Cys133, Cys45, Cys157 y Cys162 y Pro136-Pro140, Pro143-Tyr146 y Arg153-Tyr156, respectivamente (posiciones enumeradas tal como se muestra en la SEQ ID NO: 2 (figura 2). Adicionalmente, se pueden caracterizar químicamente realizaciones particulares del plasminógeno recombinante por contraste con miniplasmina (plasminógeno) que tiene una composición de dominio análoga (es decir, kringle-serina proteasa (K-SP) (véase Sottrup-Jensen, L., y otros, Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis ("Progreso en fibrinólisis y trombólisis química"), volumen 3, (Editores: J.F. Davidson, y otros) Raven Press, Nueva York (1978)), pero, entre otras cosas, carece de una arginina (Arg) en una posición relativa análoga a la de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1 (figura 1). En algunas realizaciones, el plasminógeno recombinante de la presente invención comprende un único dominio kringle N-terminal que comprende un residuo de Arg en una posición relativa análoga a la de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 1. Entre los ejemplos no limitantes de una posición relativa análoga a la de la posición 85 de la secuencia de aminoácidos
- 50
- 55
- 60
- 65

mostrada en la SEQ ID NO: 1 se incluyen las posiciones Arg (153), Arg (234), Arg (324) y Arg (426) de la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 2 (figura 2).

En otras realizaciones, las posiciones específicas de los residuos nombrados pueden variar algo sin dejar de estar presentes en el polipéptido en posiciones estructural y funcionalmente análogas (es decir, relativas a la estructura kringle del dominio N-terminal; véase Chang, Y., y otros, tal como se describió anteriormente). En algunas realizaciones, el dominio único kringle N-terminal del polipéptido de plasmina (plasminógeno) tiene un porcentaje de identidad, como mínimo, de un residuo más con kringle 1 o kringle 4 de plasminógeno humano nativo que con kringle 5 de plasminógeno humano nativo.

Además, en realizaciones particulares, el plasminógeno recombinante puede caracterizarse funcionalmente por contraste con la miniplasmina (plasminógeno). En una realización, la plasmina preparada a partir del plasminógeno recombinante muestra una mayor velocidad de inhibición por la α_2 -antiplasmina, por ejemplo, de hasta aproximadamente uno o dos órdenes de magnitud más rápida que la velocidad de inhibición de la miniplasmina.

La caracterización del dominio único kringle N-terminal del plasminógeno como "N-terminal" sólo significa que el dominio está presente en N-terminal al sitio de activación y no significa que estén presentes residuos de aminoácidos adicionales N-terminal al dominio en sí. Además, el número y la identidad de los residuos interpuestos entre el residuo de cisteína más C-terminal del dominio único kringle N-terminal (es decir, el residuo Cys más C-terminal mostrado en la figura 3) y el sitio de activación del plasminógeno pueden variarse sin apartarse del alcance de la presente invención. Un experto en la materia será capaz de determinar estas variaciones (unión de tipo kringle 1 de ácidos coaminocarboxílicos, sin aumento sustancial del tamaño del mutante por delección o introducción de sitios de glucosilación potencialmente problemáticos) sin experimentación indebida en base a la divulgación en el presente documento y las referencias citadas en el mismo para orientación con respecto a la función y la estructura de kringle 1.

Se entenderá además que, dependiendo de los criterios usados, la "posición" o secuencia exacta de los dominios kringle, del sitio de activación y de serina proteasa del plasminógeno recombinante puede diferir ligeramente en variaciones particulares dentro del alcance de la presente invención. Por ejemplo, la localización exacta del dominio kringle en relación al sitio de activación puede variar ligeramente y/o la secuencia N-terminal al dominio kringle puede variar en la longitud. Entre dichas variantes se pueden incluir, pero sin limitarse a éstas, delecciones, inserciones, inversiones, repeticiones y sustituciones. La orientación relativa a qué cambios de aminoácidos son probablemente fenotípicamente silenciosos puede encontrarse en Bowie, J.U., y otros, "Deciphering the Message in Protein Sequences: Tolerance to Amino Acid Substitutions" ("Descifrando el mensaje en las secuencias de proteínas: tolerancia a las sustituciones de aminoácidos"), *Science* 247: 1306-1310 (1990).

De este modo, las variantes, fragmentos, derivados o análogos del polipéptido de la SEQ ID NO: 1 pueden ser (i) aquellos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos (por ejemplo, 3, 5, 8, 10, 15 ó 20 residuos) están sustituidos por un residuo de aminoácido conservado o no conservado (preferentemente, un residuo de aminoácido conservado). Dichos residuos de aminoácidos sustituidos pueden estar o no codificados por el código genético, o (ii) aquellos en los que uno o más de los residuos de aminoácidos incluyen un grupo sustituyente (por ejemplo, 3, 5, 8, 10, 15 ó 20), o (iii) aquellos en los que el polipéptido maduro está fusionado con otro compuesto, tal como un compuesto para incrementar la semivida del polipéptido (por ejemplo, polietilenglicol), o (iv) aquellos en los que los aminoácidos adicionales están fusionados con el polipéptido maduro, tal como un péptido de región de fusión Fc de IgG o secuencia líder o secretora o una secuencia que se emplea para la purificación del polipéptido maduro o una secuencia de proproteína. Dichos fragmentos, derivados y análogos se consideran dentro del alcance de los expertos en la materia a partir de las enseñanzas en el presente documento.

Tal como se ha indicado, los cambios son, preferentemente, de una naturaleza menor, tales como sustituciones conservativas de aminoácidos que no afectan de manera significativa al plegamiento o la actividad de la proteína. Naturalmente, el número de sustituciones de aminoácidos que haría un experto en la materia depende de muchos factores, incluyendo los descritos anteriormente. En términos generales, el número de sustituciones para cualquier polipéptido de plasminógeno determinado no será de más de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5 ó 3.

Los aminoácidos en el plasminógeno recombinante que son esenciales para la función se pueden identificar mediante procedimientos conocidos en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio o mutagénesis de rastreo de alanina (Cunningham y Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989)). El último procedimiento introduce mutaciones individuales de alanina en cada residuo en la molécula. A continuación, las moléculas mutantes resultantes se prueban por la actividad biológica, por ejemplo, tal como se muestra en los ejemplos proporcionados en el presente documento. Los sitios que son críticos para la unión a ligando también pueden determinarse mediante análisis estructural, tal como cristalización, resonancia magnética nuclear o marcado por fotoafinidad (Smith, y otros, *J. Mol. Biol.* 224: 399-904 (1992) y de Vos, y otros, *Science* 255: 306-312 (1992)). Incluso si la delección de uno o más aminoácidos del extremo N-terminal de una proteína da lugar a la modificación o pérdida de una o más funciones biológicas de la proteína, todavía pueden mantenerse otras actividades biológicas.

También se contempla que se pueden producir plasminógenos recombinantes mediante procedimientos de síntesis en fase sólida. Véase Houghten, R. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5131-5135 (1.985); y la patente de Estados Unidos No. 4.631.211 de Houghten y otros (1986).

5 Los polipéptidos que tienen una secuencia de aminoácidos de un porcentaje de identidad indicado con respecto a una secuencia de aminoácidos de referencia de la SEQ ID NO: 1 se pueden determinar utilizando los procedimientos, incluyendo los procedimientos asistidos por ordenador, indicados anteriormente con respecto a polinucleótidos. Las secuencias de aminoácidos del polipéptido se examinan y se comparan, al igual que las secuencias de nucleótidos en la descripción anterior. Un experto en la materia entenderá que conceptos, tales como los puntos finales moleculares descritos para los polinucleótidos tendrán análogos directos cuando se considera la utilización correspondiente de dichos procedimientos y programas para el análisis de polipéptidos. Por ejemplo, las correcciones manuales descritas con respecto a polinucleótidos se refieren a los puntos de los extremos 5' y 3' de los ácidos nucleicos, pero la misma descripción se entenderá como aplicable a los extremos N-terminal y C-terminal de los polipéptidos.

15 La presente invención también abarca polipéptidos de plasminógeno recombinante que se modifican diferencialmente durante o después de la traducción, por ejemplo, mediante glucosilación, acetilación, fosforilación, amidación, derivatización mediante grupos protectores/bloqueantes conocidos, escisión proteolítica, unión a una molécula de anticuerpo u otro ligando celular, etc. Se pueden llevar a cabo cualquiera de las numerosas modificaciones químicas mediante técnicas conocidas, incluyendo, pero sin limitarse a éstas, la escisión química específica por bromuro de cianógeno, tripsina, quimotripsina, papaína, proteasa V8 de *S. aureus*, NaBH₄; acetilación, desamidación, formilación, metilación, oxidación, reducción; síntesis metabólica en presencia de tunicamicina; etc.

20 Entre las modificaciones adicionales posteriores a la traducción comprendidas por la presente invención se incluyen, por ejemplo, cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, procesamiento de los extremos N-terminal o C-terminal, unión de grupos químicos a la estructura de aminoácidos, modificaciones químicas de cadenas de carbohidratos unidas a N o unidas a O, y la adición de un residuo de metionina N-terminal como resultado de vectores y construcciones adaptadas para la expresión de los polipéptidos de plasminógeno recombinante, por ejemplo para la expresión en células huésped cultivadas procariontas. En algunas realizaciones, el plasminógeno recombinante también se puede modificar, por ejemplo, con un marcador de afinidad (por ejemplo, marcas de His, marcas de GST) o un marcador detectable, tal como un marcador enzimático, fluorescente o isotópico.

35 D. Vectores y células huésped

El procedimiento para la preparación de plasminógeno o una plasmina preparada a partir del mismo comprende expresar el plasminógeno recombinante utilizando un sistema de expresión recombinante.

40 El origen de la célula huésped para la expresión de la proteína no debe limitarse, por ejemplo, la célula huésped puede ser, por ejemplo, microorganismos, tales como bacterias (por ejemplo, las que pertenecen al género *Escherichia* y las que pertenecen al género *Bacillus*) y levaduras (por ejemplo, el género *Saccharomyces* y el género *Pichia*). Por ejemplo, el género *Escherichia* incluye, pero sin limitarse a éstos, *Escherichia coli* (*E. coli*) K12DH1, M103, JA221, HBI101, X600, azul XL-1 y JM109. Por ejemplo, el género *Bacillus* incluye, pero sin limitarse a éstos, *Bacillus subtilis* MI114 y 207-21. Por ejemplo, la levadura incluye, pero sin limitarse a éstas, *Saccharomyces cerevisiae* AH22, AH22R.sup.-, NA87-11A y DKD-5D y *Pichia pastoris*. La patente de Estados Unidos No. 6.068.995 divulga la producción de una proteína mediante una célula huésped capaz de expresar la proteína deseada.

50 Por ejemplo, se puede insertar una molécula que tiene la secuencia codificante de plasminógeno (por ejemplo, SEQ ID NO: 1) en un vector de clonación apropiado para la expresión en una célula huésped. El vector de clonación se puede construir para proporcionar las funciones reguladoras apropiadas requeridas para la transcripción, la traducción y el procesamiento eficaz de la secuencia codificante. Entre las células huésped adecuadas para expresar el ADN que codifica el plasminógeno se incluyen células procariontas, levaduras, o células eucariotas superiores. Entre las procariontas adecuadas se incluyen, por ejemplo, bacterias, tales como arqueobacterias y eubacterias. Las bacterias preferentes son eubacterias, tales como organismos Gram-negativos o Gram-positivos, por ejemplo, *Enterobacteriaceae*, tales como *E. coli*. Además, el vector puede ser, por ejemplo, un plásmido, un fago, un vector viral o retroviral. Los vectores retrovirales pueden ser de replicación competente o de replicación defectuosa. En este último caso, la propagación viral se producirá, en general, sólo en células huésped cultivadas de complementación. En una realización, el sistema de expresión recombinante es un sistema de expresión basado en *E. coli*.

60 Además de las procariontas, los microbios eucariotas, tales como los hongos o levaduras filamentosas, también pueden ser huéspedes de expresión adecuados para los vectores que codifican el plasminógeno. Por ejemplo, se puede utilizar *Saccharomyces cerevisiae*. En otra realización, el sistema de expresión recombinante es un sistema de expresión basado en *Pichia*. Sin embargo, un conjunto de otros géneros, especies y cepas están habitualmente disponibles y son útiles en el presente documento.

Las células huésped adecuadas apropiadas para la expresión del ADN que codifica el plasminógeno también se pueden derivar de organismos multicelulares. Entre los ejemplos de células de invertebrados se incluyen células vegetales (por ejemplo, de la familia de la lenteja de agua, tal como *Lemna*) y de insecto. Las células de cultivos vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate y tabaco también se pueden utilizar como huéspedes. Están disponibles las secuencias reguladoras y secuencias señal compatibles con células vegetales. La patente de Estados Unidos No. 6.815.184 divulga expresar un polipéptido en la lenteja de agua.

Se puede introducir un vector de expresión de plasminógeno en las células huésped y las células huésped cultivadas en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias de plasminógeno deseadas. Son conocidos por el experto en la materia numerosos procedimientos de transfección, por ejemplo, fosfato de calcio y electroporación. Dependiendo de la célula huésped utilizada, la transformación se realiza utilizando técnicas estándar apropiadas para dichas células. Por ejemplo, si se utilizan células procariontas para producir plasminógeno, se pueden cultivar en medios adecuados en los que el promotor puede inducirse de manera constitutiva o artificial tal como se describe, en general, por ejemplo, en Sambrook y otros, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ("Clonación molecular: un manual de laboratorio") (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York 1989). De este modo, se pueden introducir construcciones recombinantes en células huésped cultivadas utilizando técnicas bien conocidas, tales como infección, transducción, transfección, transvección, electroporación y transformación.

En algunas realizaciones, los polinucleótidos que codifican el plasminógeno recombinante se pueden unir a un vector que contiene un marcador seleccionable para la propagación en un huésped cultivado. Son preferentes vectores que comprenden regiones de control que actúan en *cis* al polinucleótido que codifica el plasminógeno. Se pueden suministrar factores apropiados que actúan en *trans* mediante el huésped cultivado, mediante un vector de complementación o mediante el propio vector después de la introducción en el huésped cultivado. En algunas realizaciones, los vectores proporcionan la expresión específica, que puede ser inducible y/o específica del tipo de célula. En una realización, entre dichos vectores están aquellos inducibles por factores ambientales que son fáciles de manipular, tales como la temperatura y los aditivos nutrientes.

Entre los ejemplos no limitantes de vectores de expresión útiles en la presente invención se incluyen vectores derivados de cromosomas, episomas y virus, por ejemplo, vectores derivados de plásmidos bacterianos, bacteriófagos, episomas de levadura, elementos cromosómicos de levadura, virus, tales como baculovirus, papovavirus, virus vaccinia, adenovirus, virus de la viruela aviar, virus de la pseudorrabia y retrovirus, y vectores derivados de combinaciones de los mismos, tales como cósmidos y fagémidos.

Los insertos de ADN se pueden unir de modo operativo a un promotor apropiado, tal como el promotor PL fago lambda, los promotores de *E. coli lac*, *trp* y *tac*, los promotores temprano y tardío de SV40 y los promotores de LTR retrovirales, por nombrar algunos. Otros promotores adecuados serán conocidos por el experto en la materia. Las construcciones de expresión contendrán, además, sitios para el inicio de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, un sitio de unión a ribosoma para la traducción. La parte codificante de los transcritos maduros expresados por las construcciones puede incluir un inicio de la traducción al principio y un codón de terminación (UAA, UGA o UAG) situado de manera apropiada al final del polipéptido a traducir.

Tal como se ha indicado, los vectores de expresión pueden incluir, como mínimo, un marcador seleccionable. Entre dichos marcadores se incluyen dihidrofolato reductasa o resistencia a neomicina para cultivo de células eucariotas y genes de resistencia a ampicilina o tetraciclina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias. Entre los ejemplos no limitantes de huéspedes cultivados apropiados se incluyen, pero sin limitarse a éstos, células bacterianas, tales como células de *E. coli*, *Streptomyces* y *Salmonella typhimurium*; células fúngicas, tales como células de levadura; células de insecto, tales como células de *Drosophila S2* y *Spodoptera Sf9*; células de animales, tales como CHO, COS y células de melanoma de Bowes; y células vegetales. Los medios de cultivo y las condiciones apropiadas para las células huésped cultivadas descritas anteriormente son conocidos en la técnica.

Por ejemplo, en otras realizaciones, el sistema de expresión recombinante es un sistema de expresión basado en mamífero. Líneas celulares de mamífero disponibles como huéspedes para la expresión son conocidas en la técnica, incluyendo líneas celulares inmortalizadas disponibles de la American Type Culture Collection ("Colección americana de cultivos tipo") (ATCC). Entre las células huésped de mamífero de ejemplo se incluyen, pero sin limitarse a éstas, líneas celulares de primates y líneas celulares de roedores, incluyendo líneas celulares transformadas. Preferentemente, para la integración estable del ADN vector, y para la posterior amplificación del ADN vector integrado, ambas mediante procedimientos convencionales, se emplean células de ovario de hámster chino (CHO) como la célula huésped de mamífero de elección. Entre otras líneas celulares adecuadas se incluyen, pero sin limitarse a éstas, células HeLa, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de riñón de mono (COS-1), células de carcinoma hepatocelular humano (por ejemplo, Hep G2), células 293 humanas transformadas con adenovirus, células L-929 de ratón, líneas celulares de hámster HaK, células murinas 3T3 derivadas de ratones Swiss, Balb-c o NIH y un conjunto de otras líneas celulares. Otra de las líneas de células de mamífero adecuada es la línea celular CV-1. Las células diploides normales, cepas celulares derivadas del cultivo in vitro de tejido primario, así como explantes primarios, también son adecuadas. Las células candidatas pueden ser deficientes genotípicamente en el gen de selección, o pueden contener un gen de selección que actúa de forma dominante.

5 Por ejemplo, las células huésped pueden transformarse con dicho uno o más vectores que llevan el ADN de plasminógeno, por ejemplo, mediante procedimientos conocidos en la técnica, y a continuación, se pueden cultivar en condiciones adecuadas, si se desea, con la amplificación de uno o ambos genes introducidos. A continuación, el plasminógeno expresado se puede recuperar y purificar a partir del medio de cultivo (o de la célula, por ejemplo, si se expresa intracelularmente) mediante procedimientos conocidos por un experto en la materia.

10 Los vectores adecuados para la replicación en células de mamífero pueden incluir replicones virales, o secuencias que aseguran la integración de la secuencia codificante del plasminógeno en el genoma del huésped. Entre los vectores adecuados se pueden incluir, por ejemplo, los derivados del virus de simio SV40, retrovirus, virus del papiloma bovino, virus vaccinia y adenovirus. Los componentes de los vectores, por ejemplo, replicones, genes de selección, potenciadores, promotores, y similares, pueden obtenerse de fuentes naturales o se pueden sintetizar mediante procedimientos conocidos.

15 Un vector adecuado, por ejemplo, puede ser uno derivado del virus vaccinia. En este caso, se inserta el ADN heterólogo en el genoma de vaccinia. Las técnicas para la inserción de ADN exógeno en el genoma del virus vaccinia son conocidas en la técnica, y utilizan, por ejemplo, recombinación homóloga. La inserción del ADN heterólogo es, en general, en un gen que no es de naturaleza esencial, por ejemplo, el gen de la timidina quinasa (tk), que también proporciona un marcador seleccionable.

20 Los vectores de expresión de mamífero pueden comprender una o más unidades de transcripción eucariotas que son capaces de la expresión en células de mamífero. Por ejemplo, la unidad de transcripción puede comprender, como mínimo, un elemento promotor para mediar la transcripción de secuencias de ADN exógeno. Los promotores adecuados para células de mamífero son conocidos en la técnica e incluyen promotores virales, tales como los de virus de simio 40 (SV40), citomegalovirus (CMV), virus del sarcoma de Rous (RSV), adenovirus (ADV) y virus del papiloma bovino (BPV).

25 La unidad de transcripción también puede comprender una secuencia de terminación y secuencias de adición poli(A) unidas de modo operativo a la secuencia de plasminógeno. La unidad de transcripción también puede comprender una secuencia potenciadora para aumentar la expresión de plasminógeno.

30 De manera opcional, también pueden incluirse secuencias que permiten la amplificación del gen, al igual que secuencias que codifican marcadores seleccionables. Los marcadores seleccionables para células de mamífero son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, timidina quinasa, dihidrofolato reductasa (junto con metotrexato como amplificador de DHFR), aminoglucósido fosfotransferasa, higromicina B fosfotransferasa, asparagina sintetasa, adenosina desaminasa, metalotioneína, y genes resistentes a antibióticos, tales como neomicina. O, por ejemplo, el ADN vector puede comprender todo o parte del genoma del virus del papiloma bovino y puede transportarse en líneas celulares, tales como células de ratón C127, como un elemento episomal estable.

35 En una realización, el plasminógeno recombinante se puede preparar utilizando la tecnología PER.C6[®] (Crucell, Holanda, Países Bajos). La expresión de proteínas recombinantes se da a conocer, por ejemplo, por la patente de Estados Unidos No. 6.855.544, que divulga procedimientos y composiciones para la producción de proteínas recombinantes en una línea celular humana.

40 Entre los vectores preferentes para utilización en bacterias se incluyen, por ejemplo, pET24b o pET22b, disponibles en Novagen, Madison, WI (pET-24b(+) y pET-22b(+)) = pET Expression System 24b (No. de catálogo 69750) y 22b (No. de catálogo 70.765), respectivamente, EMD Biosciences, Inc., Novagen Brand, Madison, WI, véase <http://www.emdbiosciences.com>, sección de información sobre productos en relación con pET-24b y pET-22b para obtener detalles con respecto al vector), pQE70, pQE60 y pQE-9, disponibles en Qiagen Inc., Valencia, CA; vectores pBS, vectores PHAGESCRIPT, vectores BLUESCRIPT, pNH8A, pNH16a, pNH18A, pNH46A, disponibles en Stratagene, LaJolla, CA; y ptrc99a, pKK223-3, pKK233-3, pDR540, pRIT5 disponibles en Pharmacia (ahora Pfizer, Inc., Nueva York, NY). Entre los vectores eucariotas preferentes se encuentran pWLNEO, pSV2CAT, pOG44, pXT1 y pSG disponibles en Stratagene; y pSVK3, pBPV, pMSG y pSVL disponibles en Pharmacia. Otros vectores adecuados serán fácilmente evidentes para el experto en la materia.

45 Entre los promotores bacterianos adecuados para utilizar en la presente invención se incluyen los promotores lacI y lacZ de *E. coli*, los promotores T3 y T7, el promotor gpt, los promotores PR y PL lambda, y el promotor trp. Entre los promotores eucariotas adecuados se incluyen el promotor temprano inmediato de CMV, el promotor de timidina quinasa de HSV, los promotores temprano y tardío de SV40, los promotores de LTR retrovirales, tales como los del virus del sarcoma de Rous (RSV) y promotores de metalotioneína, tales como el promotor de metalotioneína I de ratón.

50 En algunas realizaciones, la introducción de una construcción de vector en la célula huésped cultivada puede efectuarse mediante transfección con fosfato de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, transfección mediada por lípidos catiónicos, electroporación, transducción, infección u otros procedimientos. Dichos

procedimientos se describen en muchos manuales de laboratorio estándar, tales como Davis y otros, Basic Methods in Molecular Biology ("Procedimientos básicos en biología molecular"), 2ª edición (1995).

La transcripción del ADN que codifica los plasminógenos de la presente invención por eucariotas superiores se puede aumentar mediante la inserción de una secuencia potenciadora en el vector. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en *cis*, habitualmente aproximadamente de 10 a 300 pb, que actúan para aumentar la actividad transcripcional de un promotor en un tipo de célula huésped cultivada determinada. Entre los ejemplos de potenciadores se incluyen el potenciador de SV40, que se encuentra en el lado tardío del origen de replicación en los pb 100 a 270, el potenciador del promotor temprano de citomegalovirus, el potenciador de polioma en el lado tardío del origen de replicación, y potenciadores de adenovirus.

Para la secreción de la proteína traducida en el lumen del retículo endoplasmático, en el espacio periplásmico o en el entorno extracelular, se pueden incorporar señales de secreción apropiadas en el polipéptido expresado. Las señales pueden ser endógenas al polipéptido o pueden ser señales heterólogas.

En diversas realizaciones, los plasminógenos se pueden expresar en una forma modificada, tal como una proteína de fusión, y pueden incluir no sólo señales de secreción, sino también regiones funcionales heterólogas adicionales. Por ejemplo, se puede añadir una región de aminoácidos adicionales, particularmente aminoácidos cargados, al extremo N-terminal, por ejemplo, el polipéptido para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped cultivada, durante la purificación, o durante la posterior manipulación y almacenamiento. Además, se pueden añadir grupos peptídicos al polipéptido para facilitar la purificación. Dichas regiones se pueden eliminar antes de la preparación final del polipéptido. La adición de grupos peptídicos a polipéptidos para generar la secreción o la excreción, para mejorar la estabilidad y para facilitar la purificación, entre otros, son técnicas familiares y rutinarias en el sector de la técnica. Una proteína de fusión preferente comprende una región heteróloga de inmunoglobulina que es útil para solubilizar proteínas. Por ejemplo, el documento EP 0 464 533 A1 (su homólogo canadiense, 2.045.869) da a conocer proteínas de fusión que comprenden diversas partes de la región constante de moléculas de inmunoglobulina junto con otra proteína humana o parte de la misma. En muchos casos, la parte Fc en una proteína de fusión es completamente ventajosa para utilizar en terapia y en diagnóstico y, de este modo, da lugar, por ejemplo, a propiedades farmacocinéticas mejoradas. Por otro lado, para algunas utilidades sería deseable poder eliminar la parte de Fc después de que la proteína de fusión se haya expresado, detectado y purificado de la manera ventajosa descrita. Este es el caso cuando la parte de Fc resulta ser un obstáculo para utilizar en terapia y diagnóstico, por ejemplo, cuando la proteína de fusión se va a utilizar como antígeno para inmunizaciones. En el descubrimiento de fármacos, por ejemplo, las proteínas humanas se han fusionado con partes de Fc con el objetivo de ensayos de cribado de alto rendimiento (tales como receptor de hIL5 para identificar antagonistas de hIL-5). Véase, Bennett, D., y otros, J. Molecular Recognition, 8: 52-58 (1995) y Johanson, K. y otros, J. Biol. Chem., 270 (16): 9459 - 9471 (1995).

En una realización, se aísla el plasminógeno insoluble de las células huésped procariotas en un tampón de aislamiento adecuado. Por ejemplo, las células huésped se pueden exponer a un tampón de fuerza iónica adecuada para solubilizar la mayoría de proteínas del huésped, pero en el que el plasminógeno agregado es sustancialmente insoluble, y rompiendo las células para liberar los cuerpos de inclusión y así tenerlos disponibles para su recuperación, por ejemplo, mediante centrifugación. Esta técnica es conocida por un experto en la materia, y se describe una variación, por ejemplo, en la patente de Estados Unidos No. 4.511.503, que divulga un procedimiento de solubilización de proteínas heterólogas producidas en una forma refráctil insoluble en un cultivo de células huésped recombinantes. La etapa de expresión del plasminógeno recombinante comprende realizar el sistema de expresión en condiciones de expresión suficientes para producir un cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante.

Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que la expresión de una proteína recombinante, por ejemplo, en *E. coli*, da lugar con frecuencia a la deposición intracelular de la proteína recombinante en agregados insolubles denominados cuerpos de inclusión. La deposición de proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión puede ser ventajosa, tanto porque los cuerpos de inclusión acumulan proteína recombinante altamente purificada, como porque la proteína secuestrada en cuerpos de inclusión está protegido de la acción de proteasas bacterianas.

En general, las células huésped (por ejemplo, células de *E. coli*) se recogen después de una cantidad apropiada de crecimiento y se suspenden en un tampón adecuado antes de la rotura por lisis utilizando técnicas, tales como, por ejemplo, procedimientos mecánicos (por ejemplo, oscilador sónico), o mediante procedimientos químicos o enzimáticos. Entre los ejemplos de procedimientos químicos o enzimáticos de rotura celular se incluyen la acción de esferoplastos, que comprende la utilización de lisozima para lisar la pared bacteriana, y el choque osmótico, que implica el tratamiento de células viables con una solución de tonicidad elevada y con un lavado en agua fría de tonicidad baja para liberar los polipéptidos.

Después de la rotura de la célula huésped, la suspensión se centrifuga habitualmente para sedimentar los cuerpos de inclusión. El sedimento resultante contiene sustancialmente la totalidad de la fracción de polipéptido insoluble, pero si el proceso de rotura celular no es completo, también puede contener células intactas o fragmentos de células rotas. La completación de la rotura celular se puede analizar mediante la resuspensión del sedimento en una

pequeña cantidad de la misma solución tampón y el examen de la suspensión con un microscopio de contraste de fase. La presencia de fragmentos de células rotas o células completas indica que es necesaria una rotura adicional para eliminar los fragmentos o células y los polipéptidos no refringente asociados. Después de dicha rotura adicional, si se requiere, la suspensión se puede centrifugar de nuevo y el sedimento se puede recuperar, resuspender y analizar. El proceso se puede repetir hasta que el examen visual revele la ausencia de fragmentos de células rotas en el material sedimentado o hasta que un tratamiento adicional no logre reducir el tamaño del sedimento resultante. Una vez obtenido a partir de los cuerpos de inclusión solubilizados o en una etapa posterior de purificación, el plasminógeno puede replegarse de manera adecuada según la presente invención. El grado de cualquier despliegue se puede determinar mediante cromatografía, incluyendo cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC).

Si el plasminógeno no está aún en forma soluble antes del repliegue, puede solubilizarse mediante incubación en un tampón de solubilización que comprende un agente caotrópico (por ejemplo, urea, guanidina) y un agente reductor (por ejemplo, glutatión, DTT, cisteína) en cantidades necesarias para solubilizar sustancialmente el plasminógeno. Esta incubación tiene lugar en condiciones de concentración de plasminógeno, tiempo de incubación y temperatura de incubación que permitirán que tenga lugar la solubilización del plasminógeno. La medición del grado de solubilización del plasminógeno recombinante en el tampón se puede llevar a cabo mediante la determinación de la turbidez, analizando el fraccionamiento del plasminógeno entre el sobrenadante y el sedimento después de centrifugación en geles de SDS reducidos, mediante el ensayo de proteínas (por ejemplo, el kit de ensayo de proteínas Bio-Rad), o mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). El procedimiento de preparación del plasminógeno recombinante comprende además poner en contacto el cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante con un tampón de solubilización en condiciones de solubilización suficientes para obtener un cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante solubilizado.

El pH del tampón de solubilización puede ser alcalino, preferentemente, como mínimo, aproximadamente pH 7,5, siendo el intervalo preferente, de aproximadamente pH 7,5 a aproximadamente pH 11. La concentración de plasminógeno en la solución tamponada para la solubilización debe ser tal que el plasminógeno se solubilice sustancialmente y se reduzca y desnaturalice parcial o totalmente. De manera alternativa, el plasminógeno puede ser inicialmente insoluble. La cantidad exacta a emplear dependerá, por ejemplo, de las concentraciones y tipos de otros ingredientes en la solución tamponada, particularmente, el tipo y la cantidad de agente reductor, el tipo y cantidad de agente caotrópico, y el pH del tampón. Por ejemplo, la concentración de plasminógeno se puede aumentar si se incrementa de manera simultánea la concentración de agente reductor, por ejemplo, glutatión.

El procedimiento de preparación del plasminógeno comprende, además, poner en contacto el cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante solubilizado con una disolución de replegamiento en condiciones de replegamiento para obtener una composición que comprende el plasminógeno recombinante. En algunas realizaciones, es deseable producir una solución de proteínas solubilizadas más concentrada antes del replegamiento en dilución. Por ejemplo, en una realización, el plasminógeno se diluye con un tampón de replegamiento, preferentemente, como mínimo, aproximadamente cinco veces, más preferentemente, como mínimo, de aproximadamente diez a aproximadamente veinte veces. En otras realizaciones, el plasminógeno se dializa contra el tampón de replegamiento.

La concentración de plasminógeno en el tampón de replegamiento puede ser tal que la proporción de confórmero plegado correctamente recuperado con respecto a confórmero mal plegado recuperado se maximizará, según se determina mediante HPLC, RIA o bioensayo. La incubación de replegamiento se lleva a cabo para maximizar el rendimiento del confórmero de plasminógeno plegado correctamente y la proporción de confórmero de plasminógeno plegado correctamente recuperado con respecto a confórmero de plasminógeno mal plegado recuperado, según se determina mediante RIA o HPLC, y para minimizar el rendimiento de plasminógeno asociado multimérico, tal como se determina mediante el balance de masas, por ejemplo.

La composición de replegamiento se somete a una etapa de diafiltración después de la etapa de replegamiento, pero antes del procesamiento aguas abajo adicional para eliminar o reducir de manera sustancial las formas agregadas de plasminógeno recombinante después de la etapa de replegamiento. Por ejemplo, las mezclas de replegamiento se pueden pasar a través de un filtro de profundidad, a continuación se diafiltran, seguido de una filtración posterior antes de cualquier cromatografía aguas abajo. En algunas realizaciones, la recuperación de la actividad del plasminógeno a través de uno o más etapas de filtración y/o diafiltración secuenciales es, como mínimo, de aproximadamente el 70%, preferentemente, como mínimo, de aproximadamente el 80%, el 90%, o más. El procedimiento para preparar el plasminógeno comprende, además, diafiltrar la composición después de la etapa de replegamiento y antes de la etapa de puesta en contacto con el medio de intercambio catiónico.

El plasminógeno recombinante agregado se precipita de manera selectiva mediante la adición de una concentración apropiada de polietilenglicol (PEG) o sulfato de amonio a la mezcla de replegamiento. En las condiciones apropiadas, la proteína agregada puede volverse insoluble por el PEG o sulfato de amonio añadidos, y la mayoría de la proteína recombinante replegada correctamente se puede mantener en solución. Después de la eliminación de los agregados de proteína precipitados mediante centrifugación o filtración, el sobrenadante/filtrado resultante se puede procesar posteriormente. Al completar la etapa de replegamiento, se añaden PEG o sulfato de amonio sólidos hasta

una concentración apropiada, y se agita la mezcla para disolver el PEG o sulfato de amonio y se permite que tenga lugar la precipitación resultante de la proteína agregada. Después de un tiempo de precipitación, se puede extraer el precipitado mediante uno o más procedimientos de aclarado (por ejemplo, filtración de profundidad, centrifugación, microfiltración, etc., y combinaciones de los mismos), preferentemente, mediante filtración de profundidad. El filtrado resultante se puede someter a continuación a un procesamiento adicional para preparar el plasminógeno recombinante.

Entre los ejemplos de PEG se incluyen, pero sin limitarse a éstos, PEG 200, PEG 300, PEG 400, PEG 600, PEG 1000, PEG 2000, PEG 3350, PEG 4000, PEG 4600, PEG 5000, PEG 6000 y PEG 8000. En una realización, se añade un PEG a una solución de replegamiento en condiciones de precipitación, en la que la solución de replegamiento comprende el plasminógeno y polipéptidos agregados, en la que el plasminógeno es plasminógeno replegado, en la que las condiciones de precipitación son suficientes para precipitar la totalidad o una parte sustancial de las proteínas agregadas. En otras realizaciones, se añade el PEG para alcanzar concentraciones finales de PEG, como mínimo, de aproximadamente el 1% (p/v), de manera ilustrativa, aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, y 20% (p/v). En algunas realizaciones, se realiza una primera precipitación con PEG y, como mínimo, una precipitación adicional con PEG.

En otras realizaciones, se añade sulfato de amonio (por ejemplo, sulfato de amonio sólido) a la solución de replegamiento para alcanzar concentraciones finales de sulfato de amonio correspondientes, como mínimo, a aproximadamente el 1% de saturación, de manera ilustrativa, como mínimo, aproximadamente el 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 y 70%,

En una realización, el filtrado resultante (después de la precipitación con PEG o sulfato de amonio) puede ponerse en contacto con un medio de cromatografía de interacción hidrófoba adecuado en condiciones de interacción hidrófoba adecuadas suficientes, de manera que el medio de cromatografía de interacción hidrófoba captura, preferentemente, el plasminógeno. El medio de interacción hidrófoba puede ser una fase sólida que se une al plasminógeno. El medio de cromatografía de interacción hidrófoba puede seleccionarse entre cualquiera del grupo de medios de cromatografía descritos habitualmente como medio de interacción hidrófoba. El medio puede poseer una química o un ligando acoplado al mismo que puede permitir la captura selectiva o preferente del plasminógeno. Los medios de cromatografía útiles comprenden un soporte y uno o más ligandos unidos al mismo que proporcionan la capacidad de unión selectiva o preferente al plasminógeno. Entre los soportes útiles se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, polisacáridos, tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos, tales como poliácridamida, metacrilato de metilo, y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno. Se debe entender que en el presente documento no se pretende dar a entender que sólo son adecuados sustratos orgánicos para la utilización como sustrato del medio, ya que también se pueden utilizar materiales de soporte inorgánicos, tales como sílice y vidrios de borosilicato.

En algunas realizaciones, el medio de interacción hidrófoba está en forma de micropartículas, que, en general, pueden ser esféricas, o de forma alternativa, el segundo medio de afinidad se puede disponer de manera útil en partículas o formas divididas que tienen otras formas regulares o irregulares. En una realización, el medio puede estar en forma de membrana. El medio de interacción hidrófoba puede ser de carácter poroso o no poroso y el medio puede ser compresible o incompresible. Los medios de interacción hidrófoba preferentes serán física y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación. En la técnica se conocen una amplia variedad de medios de interacción hidrófoba, por ejemplo, aquellos en los que el ligando acoplado es un grupo fenilo, octilo o butilo.

En una realización, el medio de interacción hidrófoba comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es un grupo fenilo, en el que el soporte es una agarosa. Por ejemplo, la cromatografía de interacción hidrófoba se puede realizar en un formato de columna fenil-Sepharose®.

En algunas realizaciones, después de la extracción de los agregados de plasminógeno precipitados mediante centrifugación o filtración, el sobrenadante/filtrado resultante que comprende el plasminógeno recombinante replegado correctamente, opcionalmente, se captura y se purifica directamente mediante cromatografía de interacción hidrófoba.

Si se desea, la utilización de precipitación selectiva y/o cromatografía de interacción hidrófoba puede, aunque no necesariamente, sustituir dichas una o más etapas de filtrado/diafiltración de la mezcla de replegamiento, proporcionando así una estrategia alternativa a la purificación de la proteína recombinante.

En algunas realizaciones, después de la etapa o etapas de someter la mezcla de replegamiento a una o más etapas de filtrado/diafiltración y/o una etapa de precipitación selectiva y/o cromatografía de interacción hidrófoba, la solución resultante que comprende el plasminógeno recombinante puede purificarse adicionalmente mediante contacto de la solución resultante con el medio de intercambio catiónico (por ejemplo, SP-Sepharose®) y/o el primer medio de afinidad (por ejemplo, columna de ECH-lisina).

Después de una o más etapas de preparación, según la presente invención, el plasminógeno preparado de este modo se puede activar para obtener plasmina o se puede almacenar a una temperatura adecuada (por ejemplo, -20°C, -80°C) antes de la activación del plasminógeno.

- 5 De este modo, en realizaciones particulares, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de plasminógeno, comprendiendo el procedimiento:
- (a) expresar un plasminógeno recombinante utilizando un sistema de expresión recombinante en condiciones de expresión suficientes para producir un cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante;
 - 10 (b) poner en contacto el plasminógeno recombinante con un tampón de solubilización en condiciones de solubilización suficientes para obtener un plasminógeno recombinante solubilizado;
 - (c) poner en contacto el plasminógeno recombinante solubilizado con una solución de replegamiento en condiciones de replegamiento para obtener una composición que comprende el plasminógeno recombinante, en el que se añaden PEG o sulfato de amonio a la solución de replegamiento en condiciones de precipitación, en el que la solución de replegamiento comprende el plasminógeno y polipéptidos agregados, en el que el plasminógeno es plasminógeno replegado, en el que las condiciones de precipitación son suficientes para precipitar la totalidad o una parte sustancial de las proteínas agregadas;
 - 15 (d) diafiltrar la composición después de la etapa (c);
 - (e) poner en contacto la composición con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio iónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno recombinante;
 - 20 (f) eluir el plasminógeno recombinante capturado por el medio de intercambio catiónico para obtener un eluato del medio de intercambio catiónico que comprende el plasminógeno recombinante;
 - (g) poner en contacto el eluato del medio de intercambio catiónico con un primer medio de afinidad en una primera condición de afinidad que es suficiente para que el primer medio de afinidad se una al plasminógeno recombinante; y
 - 25 (h) eluir el plasminógeno recombinante unido por el primer medio de afinidad para obtener una solución de plasminógeno que comprende el plasminógeno recombinante.

Las condiciones de expresión son suficientes para proporcionar un cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante. El cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante se pone en contacto con un tampón de solubilización en condiciones de solubilización suficientes para obtener un cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante solubilizado. El cuerpo de inclusión del plasminógeno recombinante solubilizado se pone en contacto con una solución de replegamiento en condiciones de replegamiento para obtener una composición que comprende el plasminógeno recombinante.

35 II. Plasmina

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de plasmina. En una realización, el procedimiento comprende poner en contacto una composición de plasmina con un medio de afinidad (por ejemplo, benzamidina-SEPHAROSE[®]), en el que la composición de plasmina comprende plasmina preparada mediante la activación de un plasminógeno con un activador de plasminógeno. En algunas realizaciones, el plasminógeno se prepara según la presente invención. El plasminógeno es un plasminógeno recombinante preparado según la presente invención.

45 A. Conversión de plasminógeno en plasmina

El procedimiento para la preparación de plasmina comprende poner en contacto el plasminógeno con un activador de plasminógeno en una solución de activación en condiciones de activación suficientes para convertir el plasminógeno en una plasmina.

50 En general, el plasminógeno puede activarse (es decir, escindirse para proporcionar plasmina) utilizando una concentración catalítica de un activador de plasminógeno (por ejemplo, estreptoquinasa, uroquinasa, tPA, tripsina), que puede ser soluble y/o inmovilizado. En algunas realizaciones, la activación del plasminógeno puede tener lugar a aproximadamente 4°C o más, por ejemplo, aproximadamente 4, 10, 20, 25, 37 o más grados Celsius y habitualmente puede tardar, como mínimo, varios minutos o más, preferentemente, como mínimo, aproximadamente 1, 2, 4, o más horas. El plasminógeno puede escindirse en presencia de uno o más reactivos, incluyendo estabilizantes y/o excipientes, tales como omega-aminoácidos, sales, sacarosa, alcoholes (por ejemplo, etanol, metanol, 1,2-propanodiol, 1,3-propanodiol, glicerol, etilenglicol), y combinaciones de los mismos. Entre los omega-aminoácidos se pueden incluir lisina, ácido épsilon aminocaproico (ϵ -ACA), ácido tranexámico, polilisina, arginina y combinaciones o análogos de los mismos. Los agentes estabilizantes se describen, por ejemplo, en la publicación de patente de Estados Unidos No. 20030012778.

En una realización, el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno soluble. En otra realización, el procedimiento para la preparación de plasmina comprende poner en contacto el plasminógeno con un activador de plasminógeno en una solución de activación en condiciones de activación suficientes para convertir el plasminógeno en una plasmina, en el que el activador de plasminógeno es un activador de plasminógeno inmovilizado.

Por ejemplo, el activador del plasminógeno puede ser adsorbido sobre una matriz adecuada. Por ejemplo, se ha descrito que la estreptoquinasa es todavía capaz de activar el plasminógeno a plasmina cuando la estreptoquinasa está unida fuertemente a nitrocelulosa (Kulisek y otros, Anal. Biochem. 177: 78-84 (1989)). Además, la adsorción de la estreptoquinasa a una resina de intercambio iónico adecuada puede hacer que se inmovilice y todavía sea capaz de activar el plasminógeno.

La estreptoquinasa inmovilizada también se describe en Rimon y otros, Biochem. Biophys. Acta 73: 301 (1963), que utiliza un copolímero diazotizado de p-aminofenilalanina y leucina. Estos autores utilizaron la estreptoquinasa inmovilizada para estudiar el mecanismo de activación del plasminógeno. Sugitachi y otros, Thromb. Haemost. (Stuttg.) 39: 426 (1978) describen la inmovilización del activador de plasminógeno, uroquinasa, en nylon. La patente de Estados Unidos No. 4.305.926 propone la inmovilización de la estreptoquinasa sobre un polímero biocompatible, tal como nylon, Dacron, colágeno, polivinilpirrolidona o p-aminofenilalanina copolimérica y leucina.

En una realización, la estreptoquinasa se inmoviliza sobre una superficie utilizando una marca de afinidad tal como se describe en la patente de Estados Unidos No. 6.406.921. La superficie puede ser orgánica o inorgánica, biológica o no biológica, o cualquier combinación de estos materiales. En una realización, la superficie es transparente o translúcida. Son adecuados numerosos materiales para utilizar como superficie. Por ejemplo, la superficie puede comprender un material seleccionado entre un grupo que comprende silicio, sílice, cuarzo, vidrio, vidrio de poro controlado, carbono, alúmina, dióxido de titanio, germanio, nitruro de silicio, zeolitas y arseniuro de galio. Muchos metales, tales como oro, platino, aluminio, cobre, titanio, y sus aleaciones, son también opciones para las superficies. Además, también se pueden utilizar muchos cerámicos y polímeros. Entre los polímeros que pueden utilizarse como superficies se incluyen, pero sin limitarse a éstos, los siguientes: poliestireno; poli(tetra)fluoroetileno; (poli)vinilidendifluoruro; policarbonato; polimetacrilato de metilo; polivinilileno; polietilenimina; poli(éter éter)cetona; polioximetileno (POM); polivinilfenol; poliláctidos; polimetacrilimida (PMI); polialquenosulfona (PAS); polihidroxietilmetacrilato; polidimetilsiloxano; poli(acrilamida); poliimida; copolímeros de bloque; y las resinas fotosensibles Eupergit[®], películas de Langmuir-Blodgett polimerizadas, y estructuras LIGA también pueden servir como superficies en la presente invención.

La condición de activación es suficiente para convertir la totalidad o una cantidad sustancial del plasminógeno en una plasmina, proporcionando así una composición que comprende la plasmina.

B. Cromatografía de intercambio aniónico

En otros aspectos, la presente invención da a conocer un procedimiento para la preparación de una plasmina. El procedimiento comprende poner en contacto una composición que comprende la plasmina con un intercambiador aniónico, mediante lo cual, si está presente en la composición, se separa de la plasmina un material proteico que tiene un punto isoeléctrico por debajo del de la plasmina.

Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que para cualquier material proteico habrá un pH en el que el número total de cargas negativas es igual al número de cargas positivas. Este es el punto isoeléctrico de la proteína (o pI), es decir, el pH en el cual la proteína no lleva carga neta. Por encima de su pI, la proteína tendrá una carga neta negativa y se unirá a un intercambiador aniónico.

En una realización preferente, la plasmina que está presente en la composición es un producto de un plasminógeno que ha sido activado por un activador de plasminógeno. Se pone en contacto un plasminógeno recombinante con un activador de plasminógeno (por ejemplo, una estreptoquinasa) para proporcionar la plasmina. En una realización, la composición que comprende la plasmina es una solución de activación a la que se ha ajustado el pH, si es necesario, antes de contactar con el intercambiador aniónico.

En otra realización, la composición que comprende la plasmina es un eluato o una solución de flujo pasante de una etapa de cromatografía (por ejemplo, cromatografía de afinidad utilizando benzamidina), en la que se ha ajustado el pH del eluato o de la solución de flujo pasante, si es necesario, antes del contacto con el intercambiador aniónico.

El material proteico a separar de la plasmina tiene un pI por debajo del pI de la plasmina. En algunas realizaciones, el material proteico es el activador de plasminógeno (por ejemplo, estreptoquinasa) o un fragmento del mismo, en el que la composición que comprende la plasmina se pone en contacto con un medio de intercambio aniónico en condiciones de intercambio aniónico suficientes para obtener un flujo pasante en el intercambiador aniónico que comprende la plasmina, en el que las condiciones de intercambio aniónico son tales que el medio de intercambio aniónico se une, preferentemente, al activador de plasminógeno con respecto a la plasmina.

Sin estar vinculado a ninguna teoría particular, se cree que la proteólisis de la estreptoquinasa como consecuencia de su activación del plasminógeno se produce después del contacto de la estreptoquinasa con el plasminógeno. Además de la formación de plasmina, se pueden formar fragmentos de estreptoquinasa de pesos moleculares variables después de la activación del plasminógeno por la estreptoquinasa.

En una realización, el material proteico es un fragmento de estreptoquinasa que tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 45 kD, tal como se determina mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes, por ejemplo. En otra realización, el fragmento tiene un peso molecular de aproximadamente 40, 25, 15, 10 kD o menos. En algunas realizaciones, el fragmento tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kD.

5 En una realización, antes del contacto de la composición que comprende la plasmina con el intercambiador aniónico, se ajusta el pH de la composición para que sea menor que el pI de la plasmina, pero mayor que el pI del material proteico a separar de la plasmina. En algunas realizaciones, se ajusta el pH de la composición para que sea de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 10,0, de manera ilustrativa, aproximadamente: 10, 9,9, 9,8, 9,7, 9,6, 9,5,
10 9,4, 9,3, 9,2, 9,1, 9, 8,9, 8,8, 8,7, 8,6, 8,5, 8,4, 8,3, 8,2, 8,1, 8, 7,9, 7,8, 7,7, 7,6, 7,5, 7,4, 7,3, 7,2, 7,1, 7, 6,9, 6,8, 6,7, 6,6, 6,5, 6,4, 6,3, 6,2, 6,1, 6, 5,9, 5,8, 5,7, 5,6, 5,5, 5,4, 5,3, 5,2, 5,1 y 5. En otra realización, se ajusta el pH de la composición para que sea de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7. En otras realizaciones, se ajusta el pH de la composición para que sea de aproximadamente 7 a aproximadamente 8. En todavía otras realizaciones, se ajusta el pH de la composición para que sea de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 8.

15 En diversas realizaciones, el material proteico es un activador de plasminógeno o un fragmento del mismo. En una realización, la composición que comprende la plasmina es una solución de activación en la que un plasminógeno es convertido por un activador de plasminógeno para formar la plasmina. En algunas realizaciones, la solución de activación (que comprende la plasmina formada en la misma) se pone en contacto directamente con el intercambiador aniónico, en el que antes del contacto, se ajusta el pH de la solución de activación, si es necesario. En otra realización, antes del contacto de la solución de activación con el intercambiador, la solución de activación se somete a una o más etapas de purificación de la plasmina, tales como, pero sin limitarse a éstas, filtración, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y/o cromatografía de interacción hidrófoba. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se puede poner en contacto un eluato o una composición de flujo pasante
20 obtenidos a partir de dicha una o más etapas de purificación de plasmina con el intercambiador aniónico después del ajuste apropiado del pH del eluato o la composición de flujo pasante, si es necesario.

30 Por ejemplo, en una realización, en la que la plasmina comprende un pI de aproximadamente 9 o superior, en la que el material a separar es un fragmento de estreptoquinasa (por ejemplo, un fragmento que tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kD o menos) que tiene un pI de aproximadamente 5, se puede ajustar el pH de la composición para que sea de aproximadamente 6 a aproximadamente 8, para realizar la unión del fragmento (es decir, el material), pero no la plasmina, al intercambiador.

35 A modo de otro ejemplo, en otras realizaciones, en las que la plasmina comprende un pI de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, en las que el material a separar es un fragmento de estreptoquinasa (por ejemplo, un fragmento que tiene un peso molecular de aproximadamente 15 kD o menos) que tiene un pI de aproximadamente 5, se puede ajustar el pH de la composición para que sea de aproximadamente 6 a aproximadamente 7, para realizar la unión del fragmento (es decir, el material), pero no la plasmina, al intercambiador.

40 En algunas realizaciones, los procedimientos pueden llevarse a cabo en lotes o como procesos continuos.

45 En otras realizaciones, la solución de flujo pasante obtenida a partir del intercambiador aniónico se puede someter a un procesamiento adicional que incluye la purificación adicional de la plasmina contenida en la misma y/o la reducción de cualquier patógeno que pueda estar contaminando la plasmina. En algunas realizaciones, la purificación adicional se realiza mediante etapas de filtración adicionales (por ejemplo, nanofiltración) y/o etapas de cromatografía, incluyendo, pero sin limitarse a éstas, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de interacción hidrófoba.

50 El procedimiento para la preparación de plasmina comprende poner en contacto la solución de activación con un medio de intercambio aniónico en condiciones de intercambio aniónico para obtener un flujo pasante en el intercambiador aniónico que comprende la plasmina, en el que las condiciones de intercambio aniónico son tales que el medio de intercambio aniónico se une, preferentemente, al activador de plasminógeno con respecto a la plasmina.

55 El medio de intercambio aniónico puede ser una fase sólida que se une al activador de plasminógeno presente en la solución de activación. El medio de cromatografía de intercambio aniónico se puede seleccionar entre cualquiera del grupo de medios de cromatografía descritos habitualmente como medios de intercambio aniónico, preferentemente, un intercambiador de aniones fuertes. El medio puede poseer una química o un ligando acoplado al mismo que puede permitir la captura selectiva o preferente del activador de plasminógeno de la solución de activación. Los
60 medios de cromatografía útiles comprenden un soporte y uno o más ligandos unidos al mismo que proporcionan la capacidad de unión selectiva o preferente al plasminógeno recombinante. Entre los soportes útiles se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, polisacáridos, tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos, tales como poli(acrilamida), metacrilato de metilo, y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno. Se debe entender que en el presente documento no se pretende dar a entender que sólo son adecuados sustratos orgánicos para la utilización
65 como sustrato del medio, ya que también se pueden utilizar materiales de soporte inorgánicos, tales como sílice y vidrios de borosilicato.

En algunas realizaciones, el medio de intercambio aniónico está en forma de micropartículas, que, en general, pueden ser esféricas, o de forma alternativa, el medio de intercambio aniónico se puede disponer de manera útil en partículas o formas divididas que tienen otras formas regulares o irregulares. En una realización, el medio está en forma de membrana. El medio de intercambio aniónico puede ser de carácter poroso o no poroso y el medio puede ser compresible o incompresible. Los medios de intercambio aniónico preferentes serán física y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación, incluyendo bombeo y filtración de flujo transversal, y las temperaturas, pH, y otros aspectos de las distintas composiciones empleadas. En la técnica se conocen una amplia variedad de medios de intercambio aniónico, por ejemplo, aquellos en los que el ligando acoplado es amonio cuaternario (Q) o aminoetil cuaternario (QAE).

En una realización, el medio de intercambio aniónico comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es amonio cuaternario, en el que el soporte es una membrana. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar en un formato de columna membrana Q o Q-Sepharose®. En una realización, el intercambiador aniónico es una membrana Q.

En otras realizaciones, el medio de intercambio aniónico comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es amina o amonio cuaternario, en el que el soporte es una membrana. Por ejemplo, la cromatografía de intercambio aniónico se puede realizar en un formato de columna membrana Q o Q-Sepharose®. En una realización, el intercambiador aniónico es una membrana Q. Entre los adsorbentes de membrana de intercambio aniónico disponibles en el mercado se incluyen Sartorius Sartobind® Q (Sartorius, Bohemia, NY), Mustang® Q Port (Pall Corporation, Washington, NY), y ChromaSorb® (Millipore, Billerica, MA). En otra realización, el intercambiador aniónico es una membrana Q Sartobind® MA 5.

En otras realizaciones, la solución de flujo pasante obtenida a partir del intercambiador aniónico comprende una cantidad del activador del plasminógeno o fragmento del mismo que es menor que la cantidad del mismo que estaba presente en la composición antes del contacto con el intercambiador aniónico. En una realización, la composición de plasma resultante está sustancialmente libre del material proteico que tiene un pI inferior al pI de la plasma.

En algunas realizaciones, la plasma que está presente en la solución de flujo pasante del intercambiador aniónico tendrá habitualmente una pureza, como mínimo, de aproximadamente el 50% (en peso), de manera ilustrativa, como mínimo, aproximadamente: el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más.

En otras realizaciones, la solución de flujo pasante del intercambiador aniónico está sustancialmente libre del material proteico, en la que sustancialmente libre del material proteico se caracteriza por niveles del material proteico que están por debajo de los límites de detección mediante transferencia de Western.

En otra realización, se elimina como mínimo, aproximadamente el 50%, de manera ilustrativa, como mínimo, aproximadamente: el 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o más, de un fragmento de la estreptoquinasa de la composición que contiene plasma que se carga en el intercambiador aniónico, proporcionando de este modo una composición de plasma resultante sustancialmente libre del fragmento. En algunas realizaciones, el fragmento de estreptoquinasa tiene un peso molecular (por ejemplo, tal como se determina mediante SDS-PAGE) de aproximadamente 15 kD o menos).

En una realización, se puede ajustar el pH del flujo pasante del intercambiador aniónico, por ejemplo, hasta un pH ácido (por ejemplo, aproximadamente 3,4). En algunas realizaciones, este flujo pasante con pH ajustado que comprende la plasma puede posteriormente concentrarse y/o diafiltrarse mediante ultrafiltración/diafiltración.

A modo de otro ejemplo, el flujo pasante del intercambio aniónico se puede dializar con agua y acidificar con ácido acético glacial. En algunas realizaciones, se puede utilizar cualquier ácido que proporcione un portador acidificado farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, que tiene un tampón de baja capacidad de tamponamiento y que tiene un pH entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4,0). Por ejemplo, también se contempla dentro del alcance de la presente invención la utilización de otros ácidos y aminoácidos, tales como, pero sin limitarse a éstos, ácidos inorgánicos, ácidos carboxílicos, ácidos alifáticos y aminoácidos, incluyendo, pero sin limitarse a éstos, ácido fórmico, ácido acético, ácido cítrico, ácido láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido benzoico, serina, treonina, valina, glicina, glutamina, isoleucina, β-alanina y derivados de los mismos, ya sea individualmente o cualquier combinación de los mismos, que mantendrá el pH en el portador farmacéuticamente aceptable de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4,0.

60 C. Cromatografía de afinidad

Una composición de plasma que comprende plasma se puede purificar mediante cromatografía de afinidad utilizando un medio de afinidad que se une a la plasma contenida en la composición. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el flujo pasante del medio de intercambio aniónico se pone en contacto con un segundo medio de afinidad en una segunda condición de afinidad suficiente para que se una a la plasma contenida en el flujo

pasante. En realizaciones particulares, la segunda condición de afinidad es tal que el medio de afinidad se une de manera selectiva o preferente a la plasmina con respecto al activador del plasminógeno que pueda estar presente.

El segundo medio de afinidad puede ser una fase sólida que se une a la plasmina. El segundo medio de cromatografía de afinidad se puede seleccionar entre cualquiera del grupo de medios de cromatografía descritos habitualmente como segundo medio de afinidad. El medio puede poseer una química o un ligando acoplado al mismo que puede permitir la captura selectiva o preferente del activador de plasminógeno de la solución de activación. Los medios de cromatografía útiles comprenden un soporte y uno o más ligandos unidos al mismo que proporcionan la capacidad de unión selectiva o preferente al activador de plasminógeno. Entre los soportes útiles se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, polisacáridos, tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos, tales como poliacrilamida, metacrilato de metilo, y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno. Se debe entender que en el presente documento no se pretende dar a entender que sólo son adecuados sustratos orgánicos para la utilización como sustrato del medio, ya que también se pueden utilizar materiales de soporte inorgánicos, tales como sílice y vidrios de borosilicato.

En algunas realizaciones, el segundo medio de afinidad está en forma de micropartículas, que, en general, pueden ser esféricas, o de forma alternativa, el segundo medio de afinidad se puede disponer de manera útil en partículas o formas divididas que tienen otras formas regulares o irregulares. En una realización, el medio está en forma de membrana. El segundo medio de afinidad puede ser de carácter poroso o no poroso y el medio puede ser compresible o incompresible. Los segundos medios de afinidad preferentes serán física y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación, incluyendo bombeo y filtración de flujo transversal, y las temperaturas, pH, y otros aspectos de las distintas composiciones empleadas. En la técnica se conocen una amplia variedad de segundos medios de afinidad, por ejemplo, aquellos en los que el ligando acoplado es benzamidina.

En una realización, el segundo medio de afinidad comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es benzamidina, en el que el soporte es agarosa. Por ejemplo, la segunda cromatografía de afinidad, según la presente invención, se puede llevar a cabo en un formato de columna benzamidina-Sepharose®. Dado que la plasmina que se forma es una serina proteasa, en otras realizaciones, también se pueden utilizar otros medios de tipo afinidad que tienen propiedades similares a las de la benzamidina (por ejemplo, un material adsorbente de serina proteasa).

Por ejemplo, en otras realizaciones, la plasmina obtenida a partir del plasminógeno escindido puede estar contenida en una solución que comprende uno o más reactivos (por ejemplo, aminoácidos, cloruro sódico, glicerol) que permiten la estabilidad de la solución durante varios días a pH neutro antes de aplicar la solución a una columna de benzamidina-SEPHAROSE®. La acumulación de flujo pasante puede contener tanto plasminógeno no activado como productos de autodegradación inactivos de la plasmina.

La plasmina unida por un medio de afinidad puede eluirse con un tampón ácido o con una solución excipiente de pH sustancialmente neutro. Por ejemplo, la plasmina unida a benzamidina-SEPHAROSE® se puede eluir con un tampón ácido, tal como tampón de glicina. Cuando se utiliza una solución excipiente de pH sustancialmente neutro para eluir la plasmina unida, la solución final de plasmina eluida puede estar sustancialmente libre de plasmina degradada. Habitualmente, la solución excipiente de pH sustancialmente neutro tiene un pH de valor entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 8,5. Sin embargo, el pH de la solución puede variar de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 9,0. En realizaciones particulares, el pH puede ser de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,5. En otras realizaciones, el pH puede ser de aproximadamente 6,0. Entre los ejemplos de excipientes se incluyen omega-aminoácidos, incluyendo lisina, ácido épsilon amino caproico, ácido tranexámico, polilisina, arginina, y análogos y combinaciones de los mismos, sales, tales como cloruro sódico, e inhibidores del sitio activo, tales como benzamidina.

Una concentración apropiada de sal puede estar representada por una conductividad de aproximadamente 5 mS/cm a aproximadamente 100 mS/cm. En general, la concentración de sal se puede variar un poco de manera inversa en relación a la acidez, es decir, soluciones de pH más bajo pueden funcionar bien con concentraciones de sales más bajas y soluciones que tienen un pH más alto (dentro de los intervalos descritos anteriormente) pueden funcionar bien con concentraciones de sales más altas. Cuando la sal es cloruro sódico, la concentración puede ser de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 1.000 mM, o de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM. Cuando la solución está a un pH de aproximadamente 6,0, la concentración de cloruro sódico puede ser de aproximadamente 150 mM. De este modo, en algunas realizaciones, después de completar la activación del plasminógeno recombinante, la composición de plasmina puede filtrarse y estabilizarse adicionalmente durante varios días a pH neutro mediante la adición de excipientes, tales como los omega-aminoácidos y cloruro sódico antes de la cromatografía con benzamidina-SEPHAROSE®.

En algunas realizaciones, la plasmina eluida se puede tamponar con un agente de baja capacidad tamponante a pH bajo. El agente de baja capacidad tamponante a pH bajo comprende habitualmente un tampón de un aminoácido, un derivado, como mínimo, de un aminoácido, un oligopéptido que incluye, como mínimo, un aminoácido, o una combinación de los anteriores. De manera adicional, el agente de baja capacidad tamponante a pH bajo puede comprender un tampón seleccionado entre ácido acético, ácido cítrico, ácido clorhídrico, ácido carboxílico, ácido

láctico, ácido málico, ácido tartárico, ácido benzoico, serina, treonina, metionina, glutamina, alanina, glicina, isoleucina, valina, alanina, ácido aspártico, derivados o combinaciones de los mismos. El tampón puede estar presente a una concentración tal que el pH de la plasmina acidificada se puede elevar hasta pH neutro mediante la adición de suero a la composición en una cantidad no superior a aproximadamente 4 a 5 veces el volumen de la plasmina acidificada.

En otras realizaciones, la concentración de plasmina en la solución tamponada puede variar de aproximadamente 0,01 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml de la solución total. La concentración del tampón puede variar de aproximadamente 1 nM a aproximadamente 50 mM. Naturalmente, estos intervalos pueden ampliarse o estrecharse dependiendo del tampón elegido, o después de la adición de otros reactivos, tales como aditivos o agentes estabilizantes. La cantidad de tampón añadida es habitualmente la que llevará la solución de plasmina acidificada a tener un pH entre aproximadamente 2,5 y aproximadamente 4.

La solución de plasmina acidificada se puede estabilizar adicionalmente mediante la adición de un agente estabilizante, tal como un alcohol polihídrico, carbohidratos farmacéuticamente aceptables, sales, glucosamina, tiamina, niacinamida, o combinaciones de los mismos. Las sales estabilizantes se pueden seleccionar entre el grupo que comprende cloruro sódico, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio y combinaciones de los mismos. También se pueden añadir azúcares o alcoholes de azúcar, tales como glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, sacarosa, lactosa, trehalosa, y combinaciones de los mismos.

Entre las concentraciones de carbohidrato añadidas para estabilizar la solución de plasmina acidificada se incluyen un intervalo de aproximadamente 0,2% p/v a aproximadamente 20% p/v. Los intervalos para una sal, glucosamina, tiamina, niacinamida y sus combinaciones pueden variar de aproximadamente 0,01 M a aproximadamente 1 M.

Se ha descubierto que la plasmina formulada, según la presente invención, en agua acidificada es extremadamente estable. Se puede conservar en esta forma durante meses sin pérdida sustancial de actividad o la aparición de productos de degradación de naturaleza proteolítica o ácida. A 4°C, la plasmina es estable, como mínimo, durante nueve meses. Incluso a temperatura ambiente, la plasmina es estable, como mínimo, durante dos meses. La estabilidad a largo plazo a temperatura ambiente puede permitir que esta formulación sea compatible con largos regímenes de administración de trombolíticos. Por ejemplo, la administración durante 36 horas de trombolíticos, tales como el activador tisular del plasminógeno o la uroquinasa, es habitual en el tratamiento de oclusiones arteriales periféricas.

En una realización preferente, la plasmina contenida en la solución de plasmina acidificada es una plasmina inactiva de manera reversible. La capacidad de una plasmina acidificada tamponada de volverse completamente activa después de la transferencia hasta pH fisiológico se pone en evidencia mediante su actividad en el ensayo caseinolítico y también en los ensayos de lisis de coágulos marcados con I¹²⁵-fibrina. Ambos ensayos se pueden realizar a pH 7,4, y puede haber una recuperación completa de actividad de la plasmina recombinante durante el cambio de pH y pasando a través de los puntos isoeléctricos (pH 9,3 y 9,5). Esto se debe a que la plasmina recombinante se formula en un disolvente de baja capacidad de tamponamiento y, cuando se añade a una solución tamponada (por ejemplo, PBS, plasma), puede adoptar el pH neutro de manera instantánea y no tiene lugar la precipitación que normalmente acompaña al paso lento a través del punto isoeléctrico.

D. Cromatografía de interacción hidrófoba

En algunas realizaciones, el procedimiento para la preparación de plasmina puede comprender, además, cromatografía de interacción hidrófoba. En una realización, la cromatografía hidrófoba es opcional. En otras realizaciones, el procedimiento para la preparación de plasmina comprende poner en contacto el eluato del segundo medio de afinidad que comprende la plasmina con un medio de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones de interacción hidrófoba suficientes, de tal manera que el medio de cromatografía de interacción hidrófoba se une, preferentemente, al activador de plasminógeno con respecto a la plasmina. En realizaciones particulares, las condiciones de interacción hidrófoba son tales que el medio de interacción hidrófoba se une de manera selectiva o preferente al activador de plasminógeno, si está presente, con respecto a la plasmina.

El medio de interacción hidrófoba puede ser una fase sólida que se une a la plasmina. El medio de cromatografía de interacción hidrófoba puede seleccionarse entre cualquiera del grupo de medios de cromatografía descritos habitualmente como medios de interacción hidrófoba. El medio puede poseer una química o un ligando acoplado al mismo que puede permitir la captura selectiva o preferente del activador de plasminógeno. Los medios de cromatografía útiles comprenden un soporte y uno o más ligandos unidos al mismo que proporcionan la capacidad de unión selectiva o preferente al activador de plasminógeno. Entre los soportes útiles se incluyen, a modo de ejemplo ilustrativo, polisacáridos, tales como agarosa y celulosa, polímeros orgánicos, tales como poliácridamida, metacrilato de metilo, y copolímeros de poliestireno-divinilbenceno. Se debe entender que en el presente documento no se pretende dar a entender que sólo son adecuados sustratos orgánicos para la utilización como sustrato del medio, ya que también se pueden utilizar materiales de soporte inorgánicos, tales como sílice y vidrios de borosilicato.

En algunas realizaciones, el medio de interacción hidrófoba está en forma de micropartículas, que, en general, pueden ser esféricas, o de forma alternativa, el segundo medio de afinidad se puede disponer de manera útil en partículas o formas divididas que tienen otras formas regulares o irregulares. En una realización, el medio está en forma de membrana. El medio de interacción hidrófoba puede ser de carácter poroso o no poroso y el medio puede ser compresible o incompresible. Los medios de interacción hidrófoba preferentes serán física y químicamente resistentes a las condiciones empleadas en el proceso de purificación. En la técnica se conocen una amplia variedad de medios de interacción hidrófoba, por ejemplo, aquellos en los que el ligando acoplado es un grupo fenilo, octilo o butilo.

En una realización, el medio de interacción hidrófoba comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es un grupo octilo, en el que el soporte es una agarosa. Por ejemplo, la cromatografía de interacción hidrófoba se puede realizar en un formato de columna octil-SEPHAROSE[®]. En realizaciones particulares, la composición que comprende la plasmina se prepara hasta aproximadamente 0,1 M en sulfato de amonio y se somete a cromatografía de interacción hidrófoba, por ejemplo, en un formato de columna que utiliza una resina, tal como octil-SEPHAROSE[®].

En una realización, el flujo pasante de la octil-SEPHAROSE[®] que comprende plasmina puede someterse a nanofiltración. Por ejemplo, el flujo pasante se puede someter a una filtración previa con una cápsula de filtro de 0,1 micras, y a continuación, se puede someter a nanofiltración, por ejemplo, utilizando una membrana ASAHI NF (flujo normal) de 1,0 m² 15N (filtros PLANOVA, Asahi Kasei America, Inc., Buffalo Grove, IL). La implementación de una nanofiltración adicional aguas abajo en el proceso, después de la cromatografía de interacción hidrófoba de octilo, puede mejorar el rendimiento y las propiedades de flujo de membrana debido a una corriente de alimentación más pura. En alguna realización, la etapa de nanofiltración posterior a la cromatografía de interacción hidrófoba es opcional.

III. Agentes terapéuticos y kits

Los plasminógenos y/o las plasminas preparadas a partir de los mismos se pueden formular para utilización terapéutica, por ejemplo, según los procedimientos descritos en la patente de Estados Unidos No. 6.964.764; y Novokhatny, V., y otros, J. Thromb. Haemost. 1 (5): 1034-41 (2003). Por ejemplo, se puede utilizar un tampón de capacidad tamponante baja de pH bajo (de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 4) para la formulación de plasmina preparada según la presente invención. En algunas realizaciones, el plasminógeno y/o la plasmina preparada a partir del mismo se pueden utilizar para tratar una variedad de enfermedades o afecciones trombóticas, por ejemplo, según los procedimientos descritos en las patentes de Estados Unidos No. 6.355.243 y 6.969.515. De manera adicional, se pueden utilizar otros procedimientos y formulaciones conocidos por los expertos en la materia, tales como en la práctica con plasmina, miniplasmina y/o microplasmina, para formular el plasminógeno y/o la plasmina preparada a partir del mismo de la presente invención para administración terapéutica.

Los siguientes ejemplos se proporcionan sólo para ilustrar el presente procedimiento y no se proporcionan para limitar la presente invención. Un experto en la materia entenderá que los ejemplos proporcionados sólo ilustran lo que se reivindica y que la presente invención sólo está limitada en su alcance por las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

Ejemplo 1

Preparación de plasminógeno recombinante

Se transformó un vector de expresión que comprende el ADN que codifica el polipéptido del plasminógeno recombinante mostrado en la SEQ ID NO: 1 (véase también la secuencia de aminoácidos sombreada mostrada en la figura 2) en una variedad de células, incluyendo BL21(DE3) RIL (Stratagene, La Jolla, CA), BL21(DE3) (genotipo: F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3)) (EMB Biosciences, Inc., San Diego, CA), y BLR(DE3) (genotipo: F⁻ompT hsdS_B (r_B⁻m_B⁻) gal dcm (DE3) Δ(srl-recA)306::Tn10 (Tet^R)), y se analizó la sobreexpresión de la proteína después de la inducción por IPTG (isopropil-beta-D-tiogalactopiranosido) 1 mM mediante SDS-PAGE. Las estimaciones de la expresión fueron, como mínimo, aproximadamente 250 mg/l de cultivo celular en matraces de agitación.

Se diseñó el tipo de célula BL21(DE3) para expresar ARNt de *E. coli* raros que codifican Arg, Ile y Leu. Además, tanto BL21(DE3) como BLR(DE3) son *E. coli* de la cepa B que se clasifica como no patógena para los seres humanos y los animales en base a la ausencia de factores de virulencia y colonización. Las células de BLR(DE3) carecen del gen recA para la recombinación de ADN, y la inducción del fago lambda no se ha descrito con estas células. Se produjo un banco de células de investigación de la construcción del plasminógeno recombinante en células BLR(DE3) y se analizó la pureza, identidad y la inducción de bacteriófagos en Charles River Laboratories (Malvern, PA). La prueba confirmó la identidad y pureza del banco de células de investigación y las células pasaron la prueba de inducción por fagos sin observar ningún fago (datos no mostrados).

La producción de plasminógeno recombinante (es decir, basado en la SEQ ID NO: 1) se confirmó en la expresión a mayor escala en la que las células se lisaron y tanto la proteína soluble como los cuerpos de inclusión purificados se examinaron mediante SDS-PAGE.

5 Se ha utilizado el siguiente protocolo habitual para la expresión de plasminógeno recombinante:

Se utilizó una sola colonia de células de *E. coli* (por ejemplo, BL21(DE3) RIL, BL21 (DE3) o BLR (DE3) que contenía el vector de plasminógeno recombinante para inocular 5 ml de LB/kanamicina (30 µg/ml) y se incubó durante 8 horas a 37°C en un agitador. Después de eso, se tomó una alícuota de 50 µl de la suspensión bacteriana cultivada para el crecimiento adicional en medio fresco. El procedimiento se repitió después de 16 horas con 6 ml de cultivo bacteriano y 250 ml de los medios. Los cultivos se desarrollaron a 37°C con agitación hasta una DO600 nm de ~ 1,0, y se añadió IPTG hasta una concentración final de 1 mM. Los cultivos se desarrollaron durante 5 horas adicionales. Se recogieron las células mediante centrifugación a 5.000 xg y los sedimentos celulares se disolvieron en Tris 20 mM pH 8,0 que contenía EDTA 20 mM y se congelaron a -80°C.

15 Para purificar el plasminógeno recombinante, se descongelaron los sedimentos celulares y se añadió tampón hasta que el volumen de la solución fue de aproximadamente 1/20 éximo el volumen de cultivo celular original. Después de esto, se añadió lisozima hasta una concentración final de 0,5 mg/ml y las células se agitaron rápidamente a 4°C durante 10 - 15 minutos. A continuación, se añadió Triton X-100 hasta una concentración final del 1% y se continuó agitando durante otros 10 minutos. Se añadieron ADNasa I (0,05 mg/ml) y MgCl₂ (2,5 mM) y se continuó la agitación a 4°C durante 30 minutos o hasta que la solución ya no era viscosa. La solución final se centrifugó a 4°C durante 30 min a 15.000 xg y se descartó el sobrenadante. El sedimento celular se lavó tres veces con solución de lavado (Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, que contenía EDTA 10 mM, Triton X-100 al 1% y urea 0,5 M).

25 El plasminógeno recombinante comprende la secuencia de aminoácidos mostrada en la figura 1. La estructura primaria del plasminógeno recombinante comienza en la Met₆₉ y tiene la secuencia de enlace VPQ en lugar de ILE en las posiciones 160-162 (sistema de numeración de plasminógeno humano); este último cambio se incorporó para hacer que la región de enlace que une el dominio kringle al dominio de serina proteasa fuera idéntica a la de la secuencia de la serina proteasa-kringle 5 nativa. La secuencia N-terminal del plasminógeno recombinante produce extremos N-terminales de Lys₇₈ y Val₇₉ después de la activación por SK y la escisión del péptido de preactivación. La producción promedio de los cuerpos de inclusión aislados de 100 l de cultivo fue de 2,17 ± 0,63 kg (n = 3), que contenía aproximadamente el 20% en peso de la proteína de plasminógeno recombinante.

Ejemplo 2

35

Solubilización y replegamiento de plasminógeno

Se añadieron cuerpos de inclusión congelados y triturados (26 g) a 480 ml de tampón de solubilización frío (urea 7 M, glutatión reducido 10 mM, Tris 10 mM, arginina 0,25 M, EDTA 2 mM, pH 7,5), y esta suspensión se agitó vigorosamente a 6°C durante 4 horas. Esta solución de cuerpos de inclusión solubilizados se diluyó a continuación 1:20 en tampón de replegamiento frío [urea 0,5 M, 1,0 mM de cada uno de glutatión reducido y oxidado, arginina 0,5 M, EDTA 1,0 mM, ε-ACA 5,0 mM, Tris 50 mM, pH 8,0] y se agitó durante 17 horas en frío. La concentración de plasminógeno recombinante en este medio de replegamiento fue de aproximadamente 0,5 mg/ml.

45 Los cuerpos de inclusión solubilizados se analizaron mediante SDS-PAGE reductora; en base a un análisis densitométrico de geles teñidos con azul de Coomassie, se estimó que aproximadamente el 70% de la proteína total era plasminógeno recombinante (figura 4, carril 2). De este modo, el depósito de plasminógeno recombinante expresado en cuerpos de inclusión proporcionó una proteína diana relativamente pura al inicio de este proceso.

50 El procedimiento de replegamiento se llevó a cabo a una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 g/l. El plasminógeno recombinante solubilizado/reducido de los cuerpos de inclusión se replegó de modo oxidativo, mediante replegamiento por dilución, a la proteína catalíticamente activa (determinada en presencia de SK estequiométrica) con una actividad específica de 0,34; esto corresponde a un rendimiento estimado del 34% para la etapa de replegamiento (en relación a la proteína total). Si el rendimiento de replegamiento se normaliza en base a únicamente al contenido de proteína de plasminógeno recombinante presente en los cuerpos de inclusión, aumenta hasta aproximadamente el 48%.

Ejemplo 3

Filtración/diafiltración

60 La mezcla de replegamiento en el ejemplo 2 se aclaró pasándola a través de un filtro de profundidad Millipore Millistak Pod + A1HC de 0,054 m². Este filtrado se filtró adicionalmente a través de un filtro Millipore Express SHC Opticap XL 150 de 0,01 m² (0,5/0,2 µm). La diafiltración de este último filtrado se realizó con dos cartuchos GE Healthcare Kwick de 30 kDa de 0,11 m². El tampón de diafiltración fue Tris 10 mM, EDTA 1,0 mM, ε-ACA 5,0 mM,

urea 50 mM, pH 9,0. Entre 37 y 40 l de tampón de intercambio fueron necesarios para alcanzar la conductividad objetivo de 1-2 mS/cm.

5 Las mezclas de replegamiento se pasaron en primer lugar a través de un filtro de profundidad para eliminar los agregados de partículas de proteína, y a continuación, se sometieron a diafiltración. Se realizó una filtración posterior antes de la cromatografía para proteger contra las incrustaciones de la cromatografía de intercambio catiónico aguas abajo. La recuperación de la actividad del plasminógeno recombinante a través de estas tres etapas secuenciales de filtración/diafiltración/filtración fue de aproximadamente el 81%.

10 Ejemplo 4

Precipitación con polietileno (PEG)

15 Se añadió polietilenglicol sólido (PEG) a una composición de replegamiento (una composición de replegamiento no dializada que comprende arginina 0,5 M y urea 0,85 M) de plasminógeno recombinante para precipitar la proteína agregada que puede estar presente después del replegamiento oxidativo.

20 Se añadieron cantidades de PEG sólido a partes de 50 ml frías (5°C) de mezcla de replegamiento, con agitación vigorosa, para lograr concentraciones finales de PEG de 5, 10, 15 o 20% (p/v). Se continuó la agitación durante 60 minutos para asegurar la solubilización completa del PEG. Estas muestras, así como una muestra de la mezcla de replegamiento original a la que no se había añadido PEG, se centrifugaron a 16.000 rpm durante 30 minutos para sedimentar cualquier precipitado que se hubiera formado. Se recogieron los sobrenadantes claros y se evaluó el contenido de proteína total (mediante la medición de A₂₈₀) y el contenido de plasminógeno recombinante activo (mediante el ensayo de activación por SK, DiaPharma, West Chester, OH) y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC). Los resultados se resumen en la tabla 1 y la figura 6 y muestran que la adición de PEG daba lugar a: (i.) la precipitación relativamente selectiva de proteína que no era plasminógeno recombinante activo; (ii.) un aumento resultante de la actividad específica del plasminógeno recombinante que permaneció soluble; y (iii.) la eliminación de proteínas agregadas. Estos resultados demuestran que la adición de PEG a la mezcla de replegamiento no dializada causaba la precipitación de algunas proteínas (que no eran plasminógeno recombinante activo) y conservaba la mayor parte del plasminógeno recombinante activo por SK activo en solución. Además, la SEC-HPLC demostró que la adición de PEG a la mezcla de replegamiento no dializada daba lugar a una reducción progresiva de la proteína agregada y a un aumento correspondiente de plasminógeno recombinante monomérico en los sobrenadantes de PEG. Los resultados indican que PEG precipitaba de manera algo selectiva plasminógeno recombinante incorrectamente replegado o agregado y, de este modo, enriquecía el plasminógeno replegado correctamente en el sobrenadante de PEG. La actividad específica de plasminógeno recombinante activo por SK en esta mezcla de replegamiento no dializada aumentó de 0,33 a 0,53 en el sobrenadante de PEG al 20%. Los resultados indicaron que la precipitación con PEG es un procedimiento viable para eliminar selectivamente, como mínimo, una parte del plasminógeno recombinante inactivo por SK presente en mezclas de replegamiento previo a una cromatografía o una etapa de activación por SK.

40

Tabla 1: Análisis de precipitación con PEG

Muestra	Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6	Columna 7	Columna 8
Sobrenadante de PEG al 0%	1,349	0,812	0,266, 0,259	0,328, 0,319	'100'	'100'	41,5	52,5
Sobrenadante de PEG al 5%	1,305	0,786	0,255, 0,257	0,324, 0,327	96,7	97,5	60,6	39,5
Sobrenadante de PEG al 10%	0,987	0,595	0,241, 0,242	0,405, 0,407	73,2	92,0	86,9	13,1
Sobrenadante de PEG al 15%	0,789	0,475	0,227, 0,229	0,478, 0,482	58,5	86,9	98,6	1,4
Sobrenadante de PEG al 20%	0,691	0,416	0,219, 0,216	0,526, 0,519	51,2	82,9	99,8	0,2

En la tabla 1: columna 1, A_{280} de sobrenadante de PEG; columna 2, la concentración de plasminógeno recombinante total presente en sobrenadante de PEG, calculada dividiendo el valor de A_{280} por el coeficiente de extinción de 1,66 para una solución 1,0 ml/mg de plasminógeno recombinante; columna 3, concentración de plasminógeno recombinante activo por SK presente en sobrenadante de PEG (valores de ensayo duplicados); columna 4, actividad específica de plasminógeno recombinante activo por SK, calculada dividiendo los valores en la columna 3 por los valores correspondientes en la columna 2 (valores duplicados basados en ensayos duplicados); columna 5, porcentaje del valor de A_{280} original restante en el sobrenadante de PEG; columna 6, porcentaje de plasminógeno activo por SK original restante en el sobrenadante de PEG; columna 7, porcentaje de plasminógeno recombinante total presente en el sobrenadante de PEG como plasminógeno recombinante monomérico (en base a SEC-HPLC); columna 8, porcentaje de plasminógeno recombinante total presente en el sobrenadante de PEG como proteína agregada (en base a SEC-HPLC).

Ejemplo 5

5

Precipitación con sulfato de amonio

Se añadió sulfato de amonio sólido a una composición de replegamiento (una composición de replegamiento no dializada que comprende arginina 0,5 M y urea 0,85 M) de plasminógeno recombinante para precipitar la proteína agregada que puede estar presente después de un replegamiento oxidativo

10

Se añadió sulfato de amonio sólido a partes de 50 ml frías (5°C) de mezcla de replegamiento, con agitación vigorosa, para lograr concentraciones finales de sulfato de amonio correspondientes al 10, 20 30 o 40% de saturación, respectivamente. Se continuó la agitación durante 60 minutos para asegurar la solubilización completa del sulfato de amonio. Estas muestras, así como una muestra de la mezcla de replegamiento original a la que no se había añadido sulfato de amonio, se centrifugaron a 16.000 rpm durante 30 minutos para sedimentar cualquier precipitado que se hubiera formado. Se recogieron los sobrenadantes claros y se evaluó el contenido de proteína total (mediante la medición de A_{280}) y el contenido de plasminógeno recombinante activo (mediante el ensayo de activación por SK, DiaPharma, West Chester, OH) y se analizaron mediante cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC). Los resultados se resumen en la tabla 2 y la figura 7 y muestran que la adición de sulfato de amonio daba lugar a: (i.) la precipitación relativamente selectiva de proteína que no era plasminógeno recombinante activo; (ii.) un aumento resultante de la actividad específica del plasminógeno recombinante que permaneció soluble; y (iii.) la eliminación de proteínas agregadas. Estos resultados demuestran que la adición de amonio a la mezcla de replegamiento no dializada causaba la precipitación de algunas proteínas (que no eran plasminógeno recombinante activo) y conservaba la mayor parte del plasminógeno recombinante activo por SK activo en solución. Además, la cromatografía de exclusión por tamaño y la cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC) demostraron que la adición de amonio a la mezcla de replegamiento no dializada daba lugar a una reducción progresiva de la proteína agregada y a un aumento correspondiente de plasminógeno recombinante monomérico en los sobrenadantes de sulfato de amonio. Los resultados indican que sulfato de amonio precipitaba de manera algo selectiva plasminógeno recombinante incorrectamente replegado o agregado y, de este modo, enriquecía el plasminógeno replegado correctamente en el sobrenadante de sulfato de amonio. La actividad específica de plasminógeno recombinante activo por SK en esta mezcla de replegamiento no dializada aumentó de 0,33 a 0,48 en el sobrenadante de sulfato de amonio saturado al 30%; la adición de una mayor cantidad de sulfato de amonio tenía el efecto aparente de causar una precipitación significativa de plasminógeno recombinante activo por SK. Los resultados indicaron que la precipitación con sulfato de amonio es un procedimiento viable para eliminar selectivamente, como mínimo, una parte del plasminógeno recombinante inactivo por SK presente en mezclas de replegamiento previo a una cromatografía o una etapa de activación por SK.

15

20

25

30

35

Tabla 2: Análisis de precipitación con sulfato de amonio (AmSO_4)

Muestra	Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6	Columna 7	Columna 8
Sobrenadante de AmSO_4 al 0%	1,349	0,812	0,270, 0,272	0,333, 0,335	'100'	'100'	46,1	44,5
Sobrenadante de AmSO_4 al 5%	1,316	0,793	0,274, 0,270	0,346, 0,340	97,6	100,4	49,1	48,2
Sobrenadante de AmSO_4 al 10%	1,109	0,668	0,256, 0,256	0,383, 0,383	82,2	94,5	94,6	5,4
Sobrenadante de AmSO_4 al 15%	0,824	0,496	0,236, 0,241	0,476, 0,486	61,1	88	99,1	0,9
Sobrenadante de AmSO_4 al 20%	0,669	0,403	0,170, 0,170	0,422, 0,422	49,6	62,7	100	0

En la tabla 1: columna 1, A_{280} de sobrenadante de sulfato de amonio; columna 2, la concentración de plasminógeno recombinante total presente en sobrenadante de sulfato de amonio, calculada dividiendo el valor de A_{280} por el coeficiente de extinción de 1,66 para una solución 1,0 ml/mg de plasminógeno recombinante; columna 3, concentración de plasminógeno recombinante activo por SK presente en sobrenadante de sulfato de amonio (valores de ensayo duplicados); columna 4, actividad específica de plasminógeno recombinante activo por SK, calculada dividiendo los valores en la columna 3 por los valores correspondientes en la columna 2 (valores duplicados basados en ensayos duplicados); columna 5, porcentaje del valor de A_{280} original restante en el sobrenadante de sulfato de amonio; columna 6, porcentaje de plasminógeno activo por SK original restante en el sobrenadante de sulfato de amonio; columna 7, porcentaje de plasminógeno recombinante total presente en el sobrenadante de sulfato de amonio como plasminógeno recombinante monomérico (en base a SEC-HPLC); columna 8, porcentaje de plasminógeno recombinante total presente en el sobrenadante de sulfato de amonio como proteína agregada (en base a SEC-HPLC).

Ejemplo 6

5

Cromatografía de interacción hidrófoba después de la precipitación con sulfato de amonio

Se añadió $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido a una composición de replegamiento que contenía plasminógeno recombinante (pH 8,0) hasta 1 M. El precipitado formado se extrajo por filtración (0,45 μm) y la solución resultante de la filtración se puso en contacto con los siguientes medios de cromatografía de interacción hidrófoba:

10

Serie 1. HiTrap[®] Fenil Sepharose FF: Carga: 25 ml (A_{280} : 0,839); flujo pasante (FT)/lavado: 49,4 g (A_{280} : 0,266); eluato: placa de 96 pocillos con fracciones.

Serie 2. HiTrap[®] Octil Sepharose FF: Carga: 25 ml (A_{280} : 0,839); flujo pasante (FT)/lavado: 49,6 g (A_{280} : 0,407); eluato: placa de 96 pocillos con fracciones. Esta serie no mostró ningún pico de eluato real.

15

Serie 3. HiTrap[®] Butil Sepharose FF: Carga: 25 ml (A_{280} : 0,839); flujo pasante (FT)/lavado: 49,05 g (A_{280} : 0,215); eluato: placa de 96 pocillos con fracciones.

Serie 4. HiTrap[®] Fenil Sepharose HP: Carga: 25 ml (A_{280} : 0,839); flujo pasante (FT)/lavado: 49,01 g (A_{280} : 0,183); eluato: placa de 96 pocillos con fracciones.

20

Cromatografía: tampón A: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM, y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 M; y el tampón B: Tris-HCl 25 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM y (gradiente inverso 100 - 0% en 40 CV a 1 ml/min). Las fracciones se recogieron en la escala de 1 ml.

25

Las siguientes fracciones de las series se sometieron a diálisis, como mínimo, durante dos días contra Tris-HCl 10 mM, pH 9,0, y EDTA 1 mM a 4°C: fracción # 1 - Fenil Sepharose FF (B1-B11); fracción # 2 - Fenil Sepharose FF (B12-D5); fracción # 3 - Fenil Sepharose FF (D6-D11); fracción # 4 - flujo pasante en Fenil Sepharose FF; fracción # 5 - flujo pasante en octil Sepharose; fracción # 6 - carga de columna; fracción # 7 - butil Sepharose (A6-B12); fracción # 8 - butil Sepharose (C1-C7); fracción # 9 - butil Sepharose (C8-D12); fracción # 10 - flujo pasante en butil Sepharose; fracción # 11 - fenil Sepharose HP (A12-B12); fracción # 12 - fenil Sepharose HP (C1-D1); fracción # 13 - flujo pasante en fenil Sepharose HP; y fracción # 14 - carga de columna.

30

Las trazas de absorbancia A_{280} de las cuatro series de cromatografía de interacción hidrófoba se muestran en la figura 8. El análisis de potencia de las fracciones seleccionadas demostró que la fracción # 2 agrupada de la Fenil Sepharose FF (B12-D5) presentaba una actividad específica de 0,91, mientras que la fracción # 4 agrupada del flujo pasante presentaba una actividad específica de 0,003. De manera similar, la actividad específica de la fracción # 11 agrupada de la Fenil Sepharose HP (A12-B12) fue de 1,01, mientras que la actividad específica de la fracción # 13

35

del flujo pasante para esta serie era insignificante. La fracción # 7, butil Sepharose (A6-B12), presentó una actividad específica de 0,61, la fracción # 8, butil Sepharose (C1-C7), una actividad específica de 0,21, y la fracción # 10, flujo pasante en butil Sepharose, una actividad específica de 0,05. No se consiguió el máximo de captura con la resina de octil Sepharose, y la fracción # 5 del flujo continuo de esta serie presentó una actividad específica de 0,42.

El resultado muestra que el sobrenadante/filtrado de la etapa de precipitación con sulfato de amonio es susceptible de aplicación directa a cromatografía de interacción hidrófoba. La fenil Sepharose FF, fenil Sepharose HP y butil Sepharose FF son capaces de capturar de manera selectiva la mayor parte de la proteína recPlasminógeno activo de la mezcla de replegamiento, puesto en evidencia por una alta actividad específica en las fracciones de eluato y una baja actividad específica en las agrupaciones de flujo pasante. De este modo, por ejemplo, después de la precipitación con sulfato de amonio, el precipitado se puede aclarar mediante uno o más procedimientos (por ejemplo, filtración en profundidad, centrifugación, microfiltración, etc., y/o combinaciones de los mismos) que eliminan todo o una cantidad sustancial de cualquier precipitado, y el filtrado aclarado que comprende plasminógeno se puede someter a cromatografía de interacción hidrófoba para capturar el plasminógeno recombinante contenido en el mismo.

Ejemplo 7

Cromatografía de intercambio catiónico

El plasminógeno recombinante diafiltrado replegado se capturó en una columna de 206 ml de SP-Sepharose FF (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) a temperatura ambiente. El tampón de equilibrado de la columna fue Tris 25 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0. Después de lavar la columna con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, el plasminógeno recombinante se eluyó con Tris 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0.

El eluato de la columna SP Sepharose proporcionó un plasminógeno recombinante casi homogéneo con una actividad específica de 0,98, con una recuperación de aproximadamente el 89% de la actividad del plasminógeno recombinante. Esta etapa de cromatografía fue muy eficaz en la reducción de la contaminación del plasminógeno recombinante por la proteína de la célula huésped, tal como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Purificación de plasminógeno recombinante a partir de cuerpos de inclusión *E. coli*

Etapa de purificación	Concentración de proteína (mg/ml) ^a	Proteína total (mg) ^{a,b}	Actividad total (mg) ^{a,b}	Actividad recuperada (%) ^{a,b}	Actividad específica ^c	Proteína en la célula huésped (ng/mg proteína)
Cuerpos de inclusión solubilizados	8,88 ± 0,72	4.424 ± 356	DND ^d	-	-	DND
Plasminógeno replegado	0,51 ± 0,05	5.133 ± 454	1.720 ± 46	33,6 ± 2,2	0,34 ± 0,02	DND
(Plasminógeno filtrado después del replegamiento)	0,38 ± 0,02	4.039 ± 274	1.604 ± 185	93,2 ± 2,2	0,40 ± 0,02	DND
(Plasminógeno retenido en la diafiltración)	0,34 ± 0,03	3.386 ± 282	1.604 ± 252	99,8 ± 9,2	0,47 ± 0,04	DND
(Plasminógeno filtrado antes de SP Sepharose)	0,32 ± 0,02	3.313 ± 132	1.379 ± 5	87,6 ± 15,0	0,42 ± 0,02	2.464 ± 897
Plasminógeno en eluato de SP Sepharose	2,29 ± 0,13	1.255 ± 25	1.225 ± 26	88,8 ± 1,9	0,98 ± 0,02	31,9 ± 20,5
Plasminógeno en eluato de ECH-lisina	5,96 ± 0,56	1.137 ± 104	1.194 ± 34	97,4 ± 0,7	1,05 ± 0,08	1,60 ± 1,4

^a Los valores representan la media ± la desviación estándar de la media de tres series de purificación diferentes, cada una partiendo con un lote diferente de cuerpos de inclusión.

^b Valores no corregidos para el volumen de la muestra extraída para ensayos bioanalíticos.

^c Actividad específica, mg de plasminógeno recombinante activo por mg de proteína total.

^d El análisis no se llevó a cabo en estas muestras.

Ejemplo 8

Cromatografía de afinidad

5 El plasminógeno recombinante eluido de la columna de SP Sepharose se unió posteriormente a una columna de ECH-lisina Sepharose y se eluyó de la misma. Esta última etapa de cromatografía de afinidad también sirvió para confirmar que toda o sustancialmente toda la proteína procesada posteriormente aguas abajo contiene un sitio de unión a lisina replegada correctamente en el dominio kringle.

10 El eluido de la columna de SP Sepharose se cargó en una columna de 295 ml de ECH-lisina Sepharose 4 FF (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) a temperatura ambiente equilibrada con Tris 50 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0. Después de lavar la columna con 4 volúmenes de columna de tampón de equilibrado y, a continuación, con 3 volúmenes de columna de tampón de lavado 2 (Tris 50 mM, pH 8,0, y EDTA 1 mM), el plasminógeno se eluyó con Tris 50 mM, ϵ -ACA 20 mM, EDTA 1,0 mM, pH 8,0. Este eluato de la columna se almacenó congelado a -80°C hasta que se inició la siguiente etapa del proceso de purificación.

15 Se consiguió una recuperación casi cuantitativa del plasminógeno recombinante a partir de la etapa de cromatografía ECH-lisina Sepharose, con una actividad específica de unidad. Esta columna de afinidad también fue eficaz para reducir adicionalmente el contenido de proteínas de la célula huésped.

Ejemplo 9

Activación de plasminógeno a plasmina utilizando estreptoquinasa soluble

25 El plasminógeno recombinante descongelado se activó con estreptoquinasa (SK) durante 4 horas a temperatura ambiente en las siguientes condiciones de solución: 2,5 mg de plasminógeno/ml; 1,2-propanodiol al 12,5% (p/v); ϵ -ACA 20 mM; tampón de elución ECH-lisina Sepharose al 87,5% (v/v); 25 μ g de SK/ml; pH 7,0.

30 La SK se utilizó para activar el plasminógeno recombinante a plasmina en solución libre. Las condiciones para la activación se seleccionaron cuidadosamente para maximizar la activación del plasminógeno recombinante y para minimizar la autólisis. La actividad específica de plasmina al final del período de activación de 4 horas fue de 0,77, lo que indica un rendimiento de aproximadamente el 80% en esta etapa.

Ejemplo 10

35 **Activación de plasminógeno a plasmina utilizando estreptoquinasa marcada con polihistidina recombinante inmovilizada**

40 Se añade estreptoquinasa marcada con polihistidina recombinante (100 μ g) en Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y NaCl 100 mM a 100 μ l de una matriz de cromatografía de afinidad por iones metálicos inmovilizados (IMAC). Después de incubar a 22°C durante 5 min, la suspensión se aplicó a una columna de centrifuga con microcentrifuga Spin-X (Costar, Cambridge, MA) equipada con un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μ m. La matriz se sedimenta mediante centrifugación a 2.000 xg durante 3 min y posteriormente se lava varias veces con Tris-HCl 20 mM, pH 7,4. La matriz se extrae de la unidad de Spin-X, se coloca en un tubo de microcentrifuga, y se resuspende en 200 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4.

45 Se añade una cantidad equimolar del plasminógeno recombinante a la estreptoquinasa inmovilizada en una solución de activación: tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7,4. Las muestras se incuban a 22°C y se colocan en una plataforma giratoria para mantener la matriz en suspensión. Después de completar la activación, la solución de activación se filtra de la estreptoquinasa-Sepharose® en un filtro de vidrio y se aplica inmediatamente sobre la membrana Q o la columna de benzamidina-SEPHAROSE®. Para controlar el progreso de la activación del plasminógeno, se selecciona una muestra a diferentes intervalos y se termina la reacción mediante la adición de 0,1 volúmenes de tampón de parada 10X (NaHCO₃ 1,0 M ácido ϵ -aminocaproico 1,0 M [pH 9,4]). La muestra se transfiere a un tubo de microcentrifuga Spin-X y se sedimenta mediante centrifugación a 2.000 xg durante 3 min. Los reactivos inmovilizados se eluyen mediante la adición de 25 μ l de EDTA 100 mM, seguido por centrifugación a 5.000 xg durante 10 min. Se llevó a cabo una SDS-PAGE reducida mediante metodología convencional.

Ejemplo 11

60 **Cromatografía de intercambio aniónico**

La mezcla de activación de SK del ejemplo 9 se diluyó 1:1 con ϵ -ACA 200 mM/1,2-propanodiol al 12,5% y el pH se ajustó hasta 9,0. Esta solución se pasó a través de una membrana Sartobind SingleSep Q Nano de 1 ml (Sartorius) a temperatura ambiente.

65

La solución de activación se pasó a través de una membrana Q para eliminar la SK, con el 91% de recuperación de la plasmina; esta separación es posible por los valores dispares de pI para la plasmina recombinante (9,3 y 9,5) y SK (5,2). En base a un análisis de transferencia Western del material de carga y el flujo pasante de esta membrana Q, se redujo la SK hasta por debajo del nivel de cuantificación mediante esta etapa.

5

Ejemplo 12

Cromatografía de afinidad

10 El flujo pasante de la membrana Q del ejemplo 11 se complementó con NaCl (hasta 0,5 M) y se ajustó el pH hasta 7,0 antes de cargarse en una columna de 200 ml de benzamidina-Sepharose 4 FF (high sub) (GE Healthcare, Pittsburgh, PA) equilibrada con Tris 25 mM, NaCl 500 mM, ε-ACA 250 mM, pH 7,0 a temperatura ambiente. Después de lavar la columna con 5 volúmenes de columna de tampón de equilibrado, la plasmina se eluyó con citrato sódico 200 mM, ε-ACA 250 mM, NaCl 300 mM, pH 3,0. Este eluato de la columna se recogió en un recipiente que contenía un volumen de columna de tampón de elución con el fin de reducir rápidamente el pH (hasta 3,0) de la plasmina presente en el frente del pico.

15

Se cargó el flujo pasante de la membrana Q en una columna de benzamidina-Sepharose para unirse a la plasmina activa y eliminar el plasminógeno recombinante sin reaccionar y la plasmina autolisada. La actividad de la plasmina se recuperó con un rendimiento de aproximadamente el 95% durante esta etapa.

20

Ejemplo 13

Ultrafiltración/diafiltración

25

La plasmina presente en el eluato de la columna de benzamidina-Sepharose se concentró aproximadamente 5 veces (hasta 5 mg/ml) y se diafiltró frente a citrato sódico 5,0 mM (pH 3,3) utilizando una membrana Millipore Pellicon 5 kDa XL de 5 kDa (0,005 m²). Después de la diafiltración, esta solución ácida de plasmina se almacenó a -80°C.

30

Ejemplo 14

Concentración, actividad y pureza de la plasmina

35 Se cuantificó la proteína total en los intermedios de purificación de aguas arriba mediante el procedimiento con rojo de pirogalol que utiliza un patrón de plasminógeno que había sido calibrado en base a su absorbancia a 280 nm. Se calculó que el coeficiente de extinción para la plasmina recombinante pura era de 1,66 mg⁻¹/ml en base a la composición de aminoácidos; la absorbancia a 280 nm se utilizó para cuantificar la proteína de plasmina en los intermedios de purificación de aguas abajo. La actividad del plasminógeno se analizó utilizando el kit de plasminógeno COAMATIC[®] (DiaPharma Group, Inc.). Este último kit también se utilizó para analizar la actividad de plasmina pero sin adición de SK a las mezclas de ensayo; estos ensayos se calibraron y validaron para medir la concentración de zimógeno catalíticamente activo. Se realizó una SDS-PAGE convencional en condiciones reductoras. Se realizó una HPLC de exclusión por tamaño con una columna TSK-GEL G2000SW_{XL} de 7,8 mm x 30 cm (Tosoh Bioscience) con ácido acético 10 mM, NaCl 100 mM, pH 3,4, como fase móvil. Las proteínas de las células huésped de *E. coli* BL21 se analizaron con el kit ELISA de Cygnus Technologies. Se estimó la SK con una transferencia Western semicuantitativa utilizando el antisuero de SK de conejo purificado por afinidad preparado de forma habitual.

40

45

50 El criterio principal para la pureza del plasminógeno y la plasmina es la actividad específica de los preparados, representando una actividad específica de 1,0 la proteína pura al 100%. Tal como se muestra en las tablas 3 y 4, las actividades específicas del intermedio de plasminógeno y el producto final de plasmina estaban ambas próximas a 1,0.

Tabla 4: Purificación de plasmina a partir de plasminógeno purificado

Etapa de purificación	Columna 1	Columna 2	Columna 3	Columna 4	Columna 5	Columna 6	Columna 7
	(mg/ml)	(mg) ^{a,b}	(mg) ^{a,b}	(%) ^{a,b}	Actividad específica ^c	(ng/mg de proteína)	(µg/mg de proteína)
Plasmina activada por estreptoquinasa	2,47 ± 0,01	636 ± 49	489 ± 47	82,9 ± 3,6	0,77 ± 0,03	DND ^d	4,2 ± 1,5
Flujo pasante de membrana Q	1,00 ± 0,08	574 ± 46	425 ± 30	91,1 ± 0,3	0,74 ± 0,01	DND	< QL ^e
Plasmina de eluato de benzamidina Sepharose	1,09 ± 0,08	472 ± 43	409 ± 37	96,1 ± 4,1	0,87 ± 0,03	< 12	< QL
Plasmina ultrafiltrada/diafiltrada	6,19 ± 0,28	459 ± 29	414 ± 11	101,7 ± 6,5	0,90 ± 0,05	< 0,9	< QL

En la tabla 4: columna 1: concentración de proteínas; columna 2: proteína total; columna 3: actividad total; columna 4: actividad recuperada en la etapa del proceso; columna 5: actividad específica; columna 6: proteína de la célula huésped; columna 7: concentración de SK.

^a Valores no corregidos para el volumen de la muestra extraída para ensayos bioanalíticos.

^b Los valores representan la media ± la desviación estándar de la media de tres series de purificación diferentes. ^c Actividad específica, mg de plasmina recombinante activa por mg de proteína total.

^d No se realizó análisis en estas muestras.

^e Por debajo del nivel de cuantificación (0,15 µg/ml).

Estas estimaciones de pureza se corroboran mediante los resultados de SDS-PAGE presentados en la figura 4, que ilustran la purificación progresiva del plasminógeno, la conversión de plasminógeno de una sola cadena en plasmina de dos cadenas por SK, y la purificación de la plasmina. Se observó un pequeño porcentaje de productos de autólisis en el plasmina ultrafiltrado/diafiltrado al final del proceso de purificación (figura 4, carril 9). Los análisis de HPLC y por exclusión de tamaño de las tres muestras del producto final se superponen en la figura 5; este análisis demostró que el 98% de la proteína se eluyó en el pico correspondiente a plasmina monomérica. La proteína de la célula huésped se redujo a menos de 0,8 ng/mg de plasmina purificada. La SK se redujo por debajo del nivel de cuantificación (menos de 0,02 µg/mg de plasmina).

La proteína de plasminógeno recombinante presente en los cuerpos de inclusión solubilizados se replegó en la proteína activa con un rendimiento de aproximadamente el 48%. La recuperación global de la actividad después de la cromatografía de ECH-lisina Sepharose, en base al zimógeno replegado activo, fue del 70%. El rendimiento de la actividad de la plasmina, en base a la actividad del zimógeno de partida, fue del 65%. De este modo, el rendimiento global calculado de la plasmina, en base al zimógeno replegado activo, fue del 46% para las tres series de purificación presentadas en las tablas 3 y 4.

Ejemplo 15

Cromatografía de intercambio aniónico de plasmina preparada a partir de plasminógeno recombinante

Se implementó una cromatografía con membrana Q inmediatamente después de la activación del plasminógeno recombinante a plasmina utilizando SK. Se ajustó el pH de la mezcla de activación de SK de aproximadamente 7 a aproximadamente 8, se cargó en la membrana Q equilibrada en tampón Tris de pH 8, y se recogió el flujo pasante que contenía plasmina. Se realizaron estudios a escala de laboratorio y se identificaron las condiciones de carga de la membrana que conducían a la unión a SK y la recuperación de plasmina. Las muestras de los experimentos a escala de laboratorio se analizaron para el contenido de SK y se confirmó la pureza de la muestra.

Ejemplo 16

Cromatografía de intercambio aniónico de plasmina preparada a partir de plasminógeno derivado del plasma

Los plasminógenos derivados de la sangre y/o las plasminas preparadas a partir de los mismos se dan a conocer, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos No. 6.355.243, 6.964.764, 6.969.515 y 7.544.500 y las publicaciones de patentes de Estados Unidos No. 2002/0192794 y 2003/0012778; y Deutsch y otros, Science, 170: 1095-6 (1970). Por consiguiente, el plasminógeno se prepara a partir de sangre (por ejemplo, plasma, suero) a efectos de proporcionar una composición que comprende la plasmina.

Por ejemplo, el plasminógeno se prepara a partir de la pasta de la Fracción II + III de Cohn mediante cromatografía de afinidad en Lys-SEPHAROSE, tal como se ha descrito por Deutsch y otros, *supra*. Por ejemplo, se resuspenden 200 g de pasta de la Fracción II + III de Cohn en 2 litros de tampón de citrato sódico 0,15 M, pH 7,8. La suspensión

5 se incubaba durante una noche a 37°C, se centrifuga a 14.000 rpm, se filtra a través de fibra de vidrio y se mezcla con 500 ml de Lys-SEPHAROSE 4B (Pharmacia). La unión del plasminógeno se realiza a temperatura ambiente durante 2 horas. A continuación, la Lys-SEPHAROSE se transfiere sobre un filtro de vidrio de 2 litros, y se lava varias veces con citrato sódico 0,15 M que contiene NaCl 0,3 M hasta que la absorbancia a 280 nm desciende por debajo de 0,05. El plasminógeno unido se eluye con tres partes de 200 ml de ácido ϵ -aminocaproico 0,2 M. El plasminógeno eluido se precipita con 0,4 g de sulfato de amonio sólido/ml de solución de plasminógeno. El precipitado de plasminógeno crudo (80-85% puro) se puede almacenar a 4°C.

10 El precipitado de sulfato de amonio del plasminógeno impuro se centrifuga a 14.000 rpm y se resuspende en un volumen mínimo utilizando Tris 40 mM, que contiene lisina 10 mM, NaCl 80 mM a pH 9,0, para conseguir una concentración final de proteína de 10-15 mg/ml. La solución de plasminógeno se dializa durante una noche frente al mismo tampón para eliminar el sulfato de amonio. La solución de plasminógeno dializada (10-20 ml) se diluye con un volumen igual de glicerol al 100% y se combina con una cantidad apropiada de un activador de plasminógeno, preferentemente, estreptoquinasa. La utilización de glicerol al 50% puede reducir la autodegradación de la plasmina formada durante la activación por el activador.

15 La activación del plasminógeno por el activador (por ejemplo, estreptoquinasa) es a temperatura ambiente durante aproximadamente 2 horas a aproximadamente 24 horas o más. La SDS-PAGE se realiza en condiciones reductoras para controlar el progreso de la activación del plasminógeno. Después de completar la activación, la solución de activación que comprende plasmina se filtra con un filtro de vidrio, si se desea, y se aplica a un adsorbente de afinidad, tal como benzamidina-SEPHAROSE. Dado que la plasmina es una serina proteasa con especificidad del tipo tripsina, la benzamidina-Sepharose es un adsorbente de afinidad que puede permitir la captura de la plasmina activa. Por ejemplo, se aplica una solución al 50% de glicerol a la columna de benzamidina-Sepharose de 50 ml equilibrada con Tris 0,05 M, pH 8,0, que contiene NaCl 0,5 M con un caudal de 3 ml/min. La columna se desarrolla a 20 25 3 ml/min a 3-7°C. La parte delantera del pico no unido contiene impurezas de alto peso molecular. El resto del pico no unido está representado por plasminógeno no activado residual y por productos de autodegradación inactivos de la plasmina.

30 Para proteger la plasmina de la inactivación en condiciones de pH neutro, se seleccionan condiciones de elución ácidas. La plasmina unida a benzamidina-Sepharose se eluye, por ejemplo, con tampón de glicina 0,2 M, pH 3,0, que contiene NaCl 0,5 M.

35 Se ajustó el pH del eluato recogido de una columna de benzamidina-Sepharose hasta pH de aproximadamente 6,5 a 7,0 y se diluyó 4 veces con agua para inyección (WFI). Se equilibró la membrana Q (membrana Sartorius Sartobind MA 5 Q) con tampón de equilibrado (ECAC 62,5 mM, NaCl 37,5 mM, pH 6,5 a 7,0) y el eluato de benzamidina diluido se cargó en la membrana Q. Se recogieron el flujo pasante y aclarado, y el pH se ajustó inmediatamente hasta pH 3,4 con HCl 1 N. Este flujo pasante con pH ajustado se concentró posteriormente y se diafiltró mediante UF/DF.

40 El análisis de SDS-PAGE confirmó que muy poca (~10% o menos) de la plasmina se unió a la membrana Q, siendo el resto capturado en las fracciones del flujo pasante y el aclarado (figura 9). Y, el análisis de transferencia Western confirmó que los fragmentos de SK presentes en la carga Q no estaban presentes en el flujo pasante y el aclarado, pero estaban presentes en la fracción de la tira cuando la membrana Q se trató con EACA 62,5 mM, NaCl 500 mM, pH 6,5. La transferencia Western se analizó densitométricamente y los resultados se muestran en la tabla 5.

45

Tabla 5: Análisis densitométrico de carriles de transferencia Western.

Carril	Identificación de muestra (muestras analizadas en limpio)	Concentración 15 kD $\mu\text{g/ml}$
1	Patrón 15 kD 1,0 $\mu\text{g/ml}$	1,000
2	Patrón 15 kD 0,5 $\mu\text{g/ml}$	0,500
3	Patrón 15 kD 0,15 $\mu\text{g/ml}$	0,150
4	Carga de benzamidina PBC 050 221	> 1,0
5	Flujo pasante de benzamidina PBC 060 221	> 1,0
6	Eluato de benzamidina PBC 070 221	< 0,15
7	Carga de benzamidina AJC 007	0,25
8	Carga de membrana Q AJC 008, pH 6,5	< 0,15
9	Flujo pasante de membrana Q AJC 009, pH 6,5	< 0,15
10	Lavado de membrana Q AJC 010, pH 6,5	< 0,15
11	Eluato de membrana Q AJC 011, pH 6,5	0,46

50

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Talecris Biotherapeutics, Inc.
 5 Koepf, Edward
 Lindsay, Myles
 Silverstein, Rebecca
 Hunt, Jennifer
 Rebbeor, James
 10 Zimmerman, Thomas
 Miller, Charles
 Caronna, Anthony
 Stokes, Kenya

<120> COMPOSICIONES, MÉTODOS Y KITS PARA LA PREPARACIÓN DE PLASMINÓGENO; Y PLASMINA
 15 PREPARADA DE LOS MISMOS

<130> T126 2070PCT

<150> 61/156,990
 20 <151> 2009-03-03

<160> 7

<170> PatentIn versión 3.5

25 <210> 1
 <211> 344
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

30 <400> 1

Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys
 1 5 10 15

35 Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys
 20 25 30

40 Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg Pro
 35 40 45

45 Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr
 50 55 60

50 Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr
 65 70 75 80

55 Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys Ala Ala
 85 90 95

60 Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys Cys Pro
 100 105 110

Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp Pro Trp
 115 120 125

65 Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly Gly Thr
 130 135 140

ES 2 552 337 T3

Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu Glu Lys
 145 150 155 160

5

Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His Gln Glu
 165 170 175

10

Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg Leu Phe
 180 185 190

15

Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser Ser Pro
 195 200 205

20

Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser Pro Asn
 210 215 220

25

Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp Gly Glu
 225 230 235 240

30

Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln Leu Pro
 245 250 255

35

Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn Gly Arg
 260 265 270

40

Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly Thr Asp
 275 280 285

45

Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu Lys Asp
 290 295 300

50

Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys Ala Arg
 305 310 315 320

55

Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val Thr Trp
 325 330 335

60

Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 340

65

<210> 2
 <211> 810
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

70

<400> 2

75

Met Glu His Lys Glu Val Val Leu Leu Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser
 1 5 10 15

80

Gly Gln Gly Glu Pro Leu Asp Asp Tyr Val Asn Thr Gln Gly Ala Ser
 20 25 30

ES 2 552 337 T3

Leu Phe Ser Val Thr Lys Lys Gln Leu Gly Ala Gly Ser Ile Glu Glu
 35 40 45
 5
 Cys Ala Ala Lys Cys Glu Glu Asp Glu Glu Phe Thr Cys Arg Ala Phe
 50 55 60
 10
 Gln Tyr His Ser Lys Glu Gln Gln Cys Val Ile Met Ala Glu Asn Arg
 65 70 75 80
 15
 Lys Ser Ser Ile Ile Ile Arg Met Arg Asp Val Val Leu Phe Glu Lys
 85 90 95
 20
 Lys Val Tyr Leu Ser Glu Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110
 Gly Thr Met Ser Lys Thr Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser
 115 120 125
 25
 Ser Thr Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser
 130 135 140
 30
 Glu Gly Leu Glu Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln
 145 150 155 160
 35
 Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys
 165 170 175
 40
 Asp Ile Leu Glu Cys Glu Glu Glu Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn
 180 185 190
 Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala
 195 200 205
 45
 Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe
 210 215 220
 50
 Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu
 225 230 235 240
 55
 Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu
 245 250 255
 60
 Cys Asp Ile Pro Arg Cys Thr Thr Pro Pro Pro Ser Ser Gly Pro Thr
 260 265 270
 Tyr Gln Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala
 275 280 285
 65
 Val Thr Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro

ES 2 552 337 T3

290 295 300

5 His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp
 305 310 315 320

10 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His
 325 330 335

15 Thr Thr Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 340 345 350

20 Asp Ser Ser Pro Val Ser Thr Glu Gln Leu Ala Pro Thr Ala Pro Pro
 355 360 365

25 Glu Leu Thr Pro Val Val Gln Asp Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser
 370 375 380

30 Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser
 385 390 395 400

35 Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr
 405 410 415

40 Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp
 420 425 430

45 Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr
 435 440 445

50 Cys Asn Leu Lys Lys Cys Ser Gly Thr Glu Ala Ser Val Val Ala Pro
 450 455 460

55 Pro Pro Val Val Leu Leu Pro Asp Val Glu Thr Pro Ser Glu Glu Asp
 465 470 475 480

60 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 485 490 495

65 Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 500 505 510

70 His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 515 520 525

75 Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 530 535 540

80 Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 545 550 555 560

ES 2 552 337 T3

Ala Ala Pro Ser Phe Asp Cys Gly Lys Pro Gln Val Glu Pro Lys Lys
 565 570 575

5
 Cys Pro Gly Arg Val Val Gly Gly Cys Val Ala His Pro His Ser Trp
 580 585 590

10
 Pro Trp Gln Val Ser Leu Arg Thr Arg Phe Gly Met His Phe Cys Gly
 595 600 605

15
 Gly Thr Leu Ile Ser Pro Glu Trp Val Leu Thr Ala Ala His Cys Leu
 610 615 620

20
 Glu Lys Ser Pro Arg Pro Ser Ser Tyr Lys Val Ile Leu Gly Ala His
 625 630 635 640

25
 Gln Glu Val Asn Leu Glu Pro His Val Gln Glu Ile Glu Val Ser Arg
 645 650 655

30
 Leu Phe Leu Glu Pro Thr Arg Lys Asp Ile Ala Leu Leu Lys Leu Ser
 660 665 670

35
 Ser Pro Ala Val Ile Thr Asp Lys Val Ile Pro Ala Cys Leu Pro Ser
 675 680 685

40
 Pro Asn Tyr Val Val Ala Asp Arg Thr Glu Cys Phe Ile Thr Gly Trp
 690 695 700

45
 Gly Glu Thr Gln Gly Thr Phe Gly Ala Gly Leu Leu Lys Glu Ala Gln
 705 710 715 720

50
 Leu Pro Val Ile Glu Asn Lys Val Cys Asn Arg Tyr Glu Phe Leu Asn
 725 730 735

55
 Gly Arg Val Gln Ser Thr Glu Leu Cys Ala Gly His Leu Ala Gly Gly
 740 745 750

60
 Thr Asp Ser Cys Gln Gly Asp Ser Gly Gly Pro Leu Val Cys Phe Glu
 755 760 765

65
 Lys Asp Lys Tyr Ile Leu Gln Gly Val Thr Ser Trp Gly Leu Gly Cys
 770 775 780

70
 Ala Arg Pro Asn Lys Pro Gly Val Tyr Val Arg Val Ser Arg Phe Val
 785 790 795 800

75
 Thr Trp Ile Glu Gly Val Met Arg Asn Asn
 805 810

<210> 3

ES 2 552 337 T3

<211> 79
<212> PRT
<213> Homo sapiens

5 <400> 3

Cys Lys Thr Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Arg Gly Thr Met Ser Lys Thr
1 5 10 15

10

Lys Asn Gly Ile Thr Cys Gln Lys Trp Ser Ser Thr Ser Pro His Arg
20 25 30

15

Pro Arg Phe Ser Pro Ala Thr His Pro Ser Glu Gly Leu Glu Glu Asn
35 40 45

20

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asn Asp Pro Gln Gly Pro Trp Cys Tyr Thr
50 55 60

25

Thr Asp Pro Glu Lys Arg Tyr Asp Tyr Cys Asp Ile Leu Glu Cys
65 70 75

30

<210> 4
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

35

<400> 4

Cys Met His Cys Ser Gly Glu Asn Tyr Asp Gly Lys Ile Ser Lys Thr
1 5 10 15

40

Met Ser Gly Leu Glu Cys Gln Ala Trp Asp Ser Gln Ser Pro His Ala
20 25 30

45

His Gly Tyr Ile Pro Ser Lys Phe Pro Asn Lys Asn Leu Lys Lys Asn
35 40 45

50

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Arg Glu Leu Arg Pro Trp Cys Phe Thr Thr
50 55 60

55

Asp Pro Asn Lys Arg Trp Glu Leu Cys Asp Ile Pro Arg Cys
65 70 75

60

<210> 5
<211> 78
<212> PRT
<213> Homo sapiens

65

<400> 5

Cys Leu Lys Gly Thr Gly Glu Asn Tyr Arg Gly Asn Val Ala Val Thr
1 5 10 15

70

Val Ser Gly His Thr Cys Gln His Trp Ser Ala Gln Thr Pro His Thr
20 25 30

ES 2 552 337 T3

His Asn Arg Thr Pro Glu Asn Phe Pro Cys Lys Asn Leu Asp Glu Asn
 35 40 45

5

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Lys Arg Ala Pro Trp Cys His Thr Thr
 50 55 60

10

Asn Ser Gln Val Arg Trp Glu Tyr Cys Lys Ile Pro Ser Cys
 65 70 75

15

<210> 6
 <211> 78
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

20

<400> 6
 Cys Tyr His Gly Asp Gly Gln Ser Tyr Arg Gly Thr Ser Ser Thr Thr
 1 5 10 15

25

Thr Thr Gly Lys Lys Cys Gln Ser Trp Ser Ser Met Thr Pro His Arg
 20 25 30

30

His Gln Lys Thr Pro Glu Asn Tyr Pro Asn Ala Gly Leu Thr Met Asn
 35 40 45

35

Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Ala Asp Lys Gly Pro Trp Cys Phe Thr Thr
 50 55 60

40

Asp Pro Ser Val Arg Trp Glu Tyr Cys Asn Leu Lys Lys Cys
 65 70 75

45

<210> 7
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

50

<400> 7
 Cys Met Phe Gly Asn Gly Lys Gly Tyr Arg Gly Lys Arg Ala Thr Thr
 1 5 10 15

55

Val Thr Gly Thr Pro Cys Gln Asp Trp Ala Ala Gln Glu Pro His Arg
 20 25 30

60

His Ser Ile Phe Thr Pro Glu Thr Asn Pro Arg Ala Gly Leu Glu Lys
 35 40 45

65

Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Asp Val Gly Gly Pro Trp Cys Tyr
 50 55 60

70

Thr Thr Asn Pro Arg Lys Leu Tyr Asp Tyr Cys Asp Val Pro Gln Cys
 65 70 75 80

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de plasminógeno, comprendiendo el procedimiento:
- 5 (a) expresar un plasminógeno recombinante utilizando un sistema de expresión recombinante en condiciones de expresión suficientes para producir un cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante;
- (b) poner en contacto el cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante con un tampón de solubilización en condiciones de solubilización suficientes para obtener un cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante solubilizado;
- 10 (c) poner en contacto el cuerpo de inclusión de plasminógeno recombinante solubilizado con una solución de replegamiento en condiciones de replegamiento para obtener una composición que comprende el plasminógeno recombinante, en el que se añade PEG o sulfato de amonio a la solución de replegamiento en condiciones de precipitación, en el que la solución de replegamiento comprende el plasminógeno y polipéptidos agregados, en el que el plasminógeno es plasminógeno replegado, en el que las condiciones de precipitación son suficientes para precipitar todas o una parte sustancial de las proteínas agregadas;
- 15 (d) diafiltrar la composición después de la etapa (c);
- (e) poner en contacto la composición con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio iónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno recombinante;
- (f) eluir el plasminógeno recombinante capturado por el medio de intercambio catiónico para obtener un eluato del medio de intercambio catiónico que comprende el plasminógeno recombinante;
- 20 (g) poner en contacto el eluato del medio de intercambio catiónico con un primer medio de afinidad en una primera condición de afinidad que es suficiente para que el primer medio de afinidad se una al plasminógeno recombinante; y
- (h) eluir el plasminógeno recombinante al que se unió por el primer medio de afinidad para obtener una solución de plasminógeno que comprende el plasminógeno recombinante.
- 25 2. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el medio de intercambio catiónico comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando es sulfopropilo, en el que el soporte es agarosa.
3. Procedimiento, según la reivindicación 1, en el que el primer medio de afinidad comprende un ligando acoplado a un soporte, en el que el ligando presenta afinidad por el plasminógeno.
- 30 4. Procedimiento, según la reivindicación 3, en el que el ligando es lisina, en el que el soporte es una agarosa.
5. Procedimiento para la preparación de plasmina, comprendiendo el procedimiento:
- 35 (a) poner en contacto una composición que comprende un plasminógeno recombinante con un medio de intercambio catiónico en condiciones de intercambio catiónico que son suficientes para que el medio de intercambio catiónico se una al plasminógeno recombinante;
- (b) poner en contacto el plasminógeno recombinante con un activador de plasminógeno en una solución de activación en condiciones de activación suficientes para convertir el plasminógeno recombinante en plasmina; y
- 40 (c) poner en contacto la plasmina con un medio de intercambio aniónico en condiciones de intercambio aniónico, de manera que el medio de intercambio aniónico se una, preferentemente, al activador de plasminógeno con respecto a la plasmina.
6. Procedimiento, según la reivindicación 5, que comprende además: poner en contacto el flujo pasante del medio de intercambio aniónico con un segundo medio de afinidad en una segunda condición de afinidad suficiente para unirse a la plasmina; o
- 45 poner en contacto un eluato del segundo medio de afinidad que comprende la plasmina con un medio de cromatografía de interacción hidrófoba en condiciones de interacción hidrófoba suficientes, de manera que el medio de cromatografía de interacción hidrófoba se una, preferentemente, al activador de plasminógeno con respecto a la plasmina.
- 50 7. Utilización de polietilenglicol (PEG) o sulfato de amonio para precipitar de manera selectiva el plasminógeno recombinante agregado a partir de una mezcla de replegamiento que comprende plasminógeno recombinante.

FIGURA 1

1 MetArgAspValValLeuPheGluLysLysValTyrLeuSerGluCysLysThrGlyAsn
 21 GlyLysAsnTyrArgGlyThrMetSerLysThrLysAsnGlyIleThrCysGlnLysTrp
 41 SerSerThrSerProHisArgProArgPheSerProAlaThrHisProSerGluGlyLeu
 61 GluGluAsnTyrCysArgAsnProAspAsnAspProGlnGlyProTrpCysTyrThrThr
 81 AspProGluLysArgTyrAspTyrCysAspValProGlnCysAlaAlaProSerPheAsp
 101 CysGlyLysProGlnValGluProLysLysCysProGlyArgValValGlyGlyCysVal
 121 AlaHisProHisSerTrpProTrpGlnValSerLeuArgThrArgPheGlyMetHisPhe
 141 CysGlyGlyThrLeuIleSerProGluTrpValLeuThrAlaAlaHisCysLeuGluLys
 161 SerProArgProSerSerTyrLysValIleLeuGlyAlaHisGlnGluValAsnLeuGlu
 181 ProHisValGlnGluIleGluValSerArgLeuPheLeuGluProThrArgLysAspIle
 201 AlaLeuLeuLysLeuSerSerProAlaValIleThrAspLysValIleProAlaCysLeu
 221 ProSerProAsnTyrValValAlaAspArgThrGluCysPheIleThrGlyTrpGlyGlu
 241 ThrGlnGlyThrPheGlyAlaGlyLeuLeuLysGluAlaGlnLeuProValIleGluAsn
 261 LysValCysAsnArgTyrGluPheLeuAsnGlyArgValGlnSerThrGluLeuCysAla
 281 GlyHisLeuAlaGlyGlyThrAspSerCysGlnGlyAspSerGlyGlyProLeuValCys
 301 PheGluLysAspLysTyrIleLeuGlnGlyValThrSerTrpGlyLeuGlyCysAlaArg
 321 ProAsnLysProGlyValTyrValArgValSerArgPheValThrTrpIleGluGlyVal
 341 MetArgAsnAsn (SEQ ID NO:1)

FIGURA 3

HK1	<u>CKTGN</u> <u>GKNYR</u>	<u>GTMSK</u> <u>TKNGI</u>	<u>TCQKW</u> <u>SS TSP</u>	<u>HR -</u> <u>PRF</u> <u>SPAT</u>	<u>HPSEGL</u> <u>EENY</u>
HK2	<u>CMHCS</u> <u>GENYD</u>	<u>GKISK</u> <u>TMSGI</u>	<u>ECQAW</u> <u>DSQSP</u>	<u>HA -</u> <u>HGY</u> <u>I PSK</u>	<u>FPNKN</u> <u>LKKNY</u>
HK3	<u>CLKGT</u> <u>GENYR</u>	<u>GNVA</u> <u>VTVSGH</u>	<u>TCQHW</u> <u>SAQTP</u>	<u>HT -</u> <u>HNRT</u> <u>PEN</u>	<u>FPCKN</u> <u>L DENY</u>
HK4	<u>CYHGD</u> <u>GQSYR</u>	<u>GTSS</u> <u>TTTGK</u>	<u>KCQSW</u> <u>SSMTP</u>	<u>HR -</u> <u>HQK</u> <u>TPEN</u>	<u>YPNAG</u> <u>L TMNY</u>
HK5	<u>CMFGN</u> <u>GKGYR</u>	<u>GKRAT</u> <u>TVTGT</u>	<u>PCQDW</u> <u>AAQEP</u>	<u>HRHS</u> <u>IFT</u> <u>PET</u>	<u>NPRAG</u> <u>L EKNY</u>

(continuación)

HK1	<u>CRNPD</u> <u>NDPQG</u>	<u>PWCYT</u> <u>TDPEK</u>	<u>RYDYC</u> <u>DILEC</u>	(SEQ ID NO: 3)
HK2	<u>CRNPD</u> <u>RE -LR</u>	<u>PWCFT</u> <u>TDPNK</u>	<u>RWELC</u> <u>DI PRC</u>	(SEQ ID NO: 4)
HK3	<u>CRNPD</u> <u>GK -RA</u>	<u>PWCHT</u> <u>TNSQV</u>	<u>RWEYC</u> <u>KI PSC</u>	(SEQ ID NO: 5)
HK4	<u>CRNPD</u> <u>DAD -KG</u>	<u>PWCFT</u> <u>TDPSV</u>	<u>RWEYC</u> <u>NLKKC</u>	(SEQ ID NO: 6)
HK5	<u>CRNPD</u> <u>GDVGG</u>	<u>PWCYT</u> <u>TNPRK</u>	<u>LYDYC</u> <u>DVPQC</u>	(SEQ ID NO: 7)

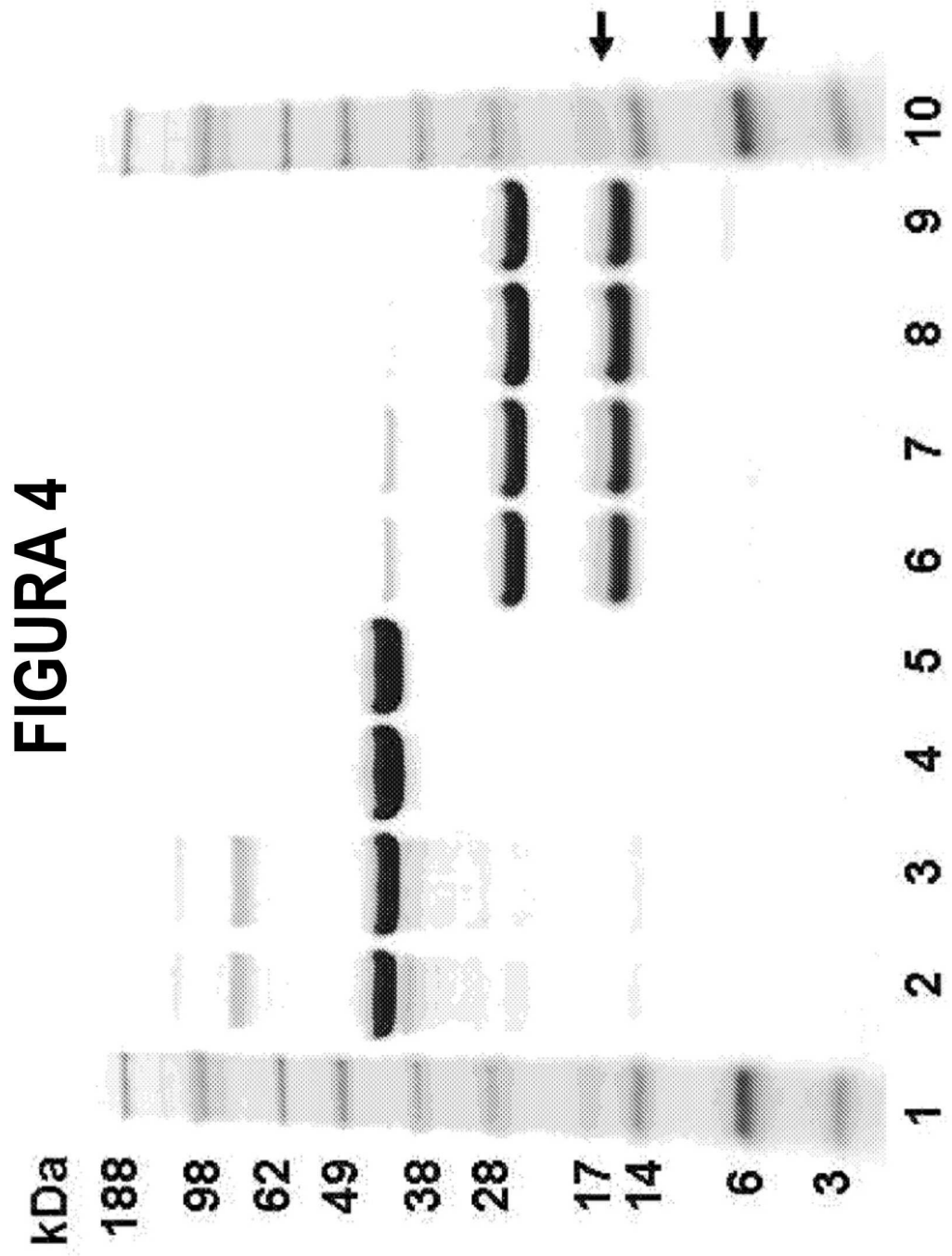


FIGURA 5

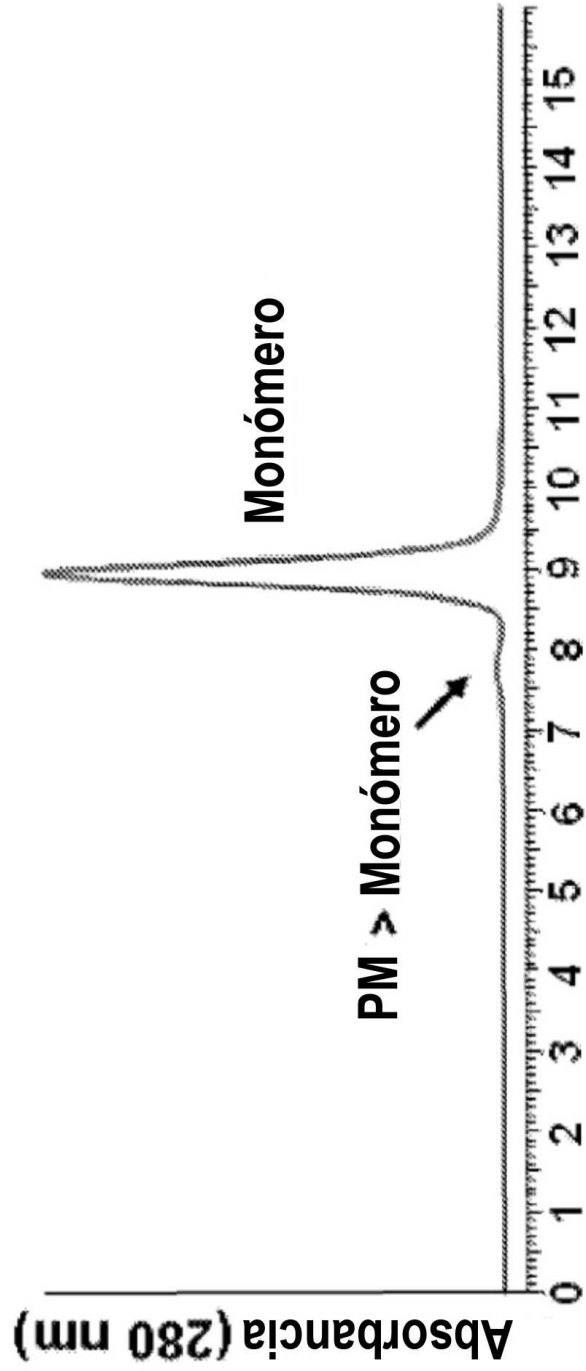


FIGURA 6

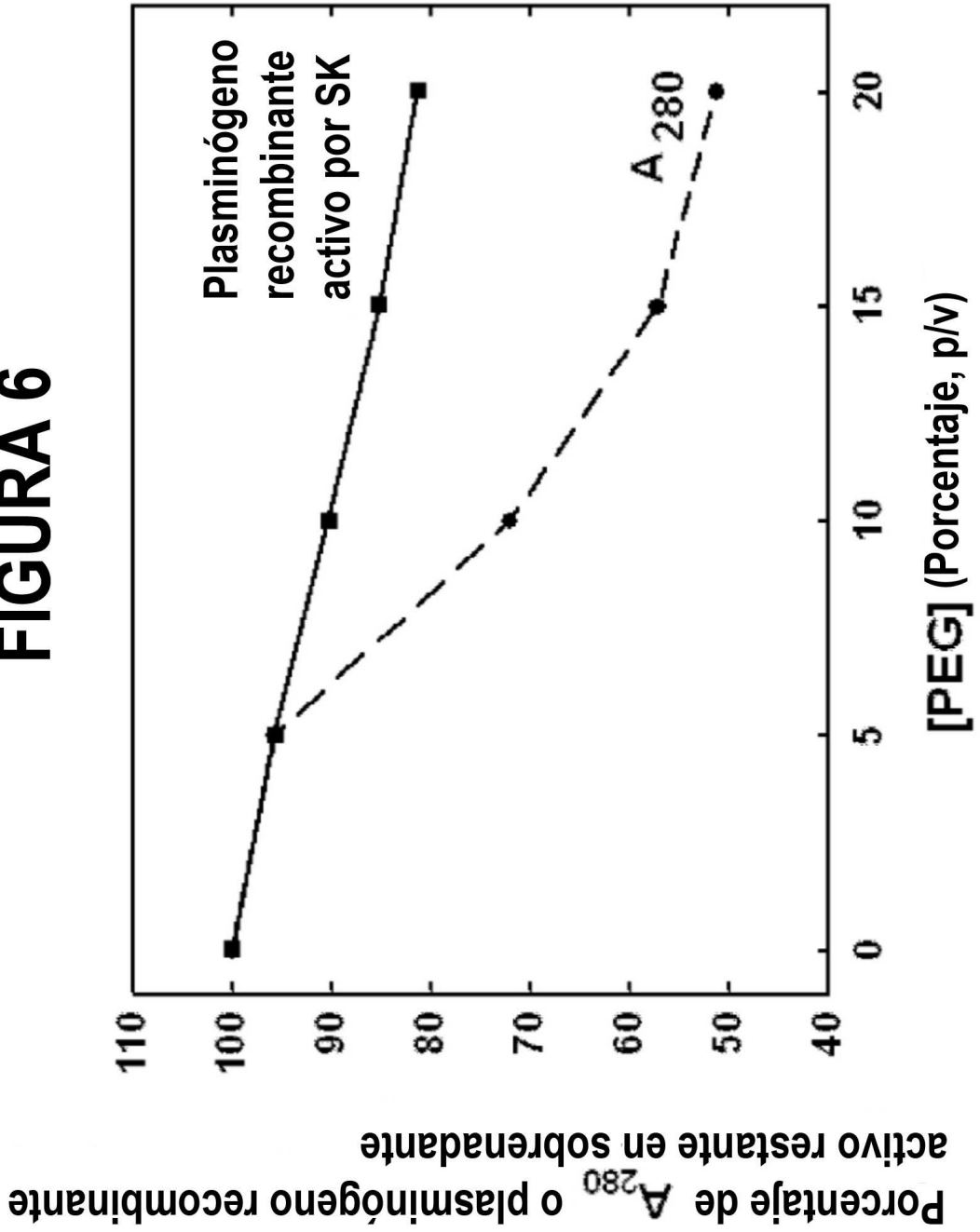


FIGURA 7

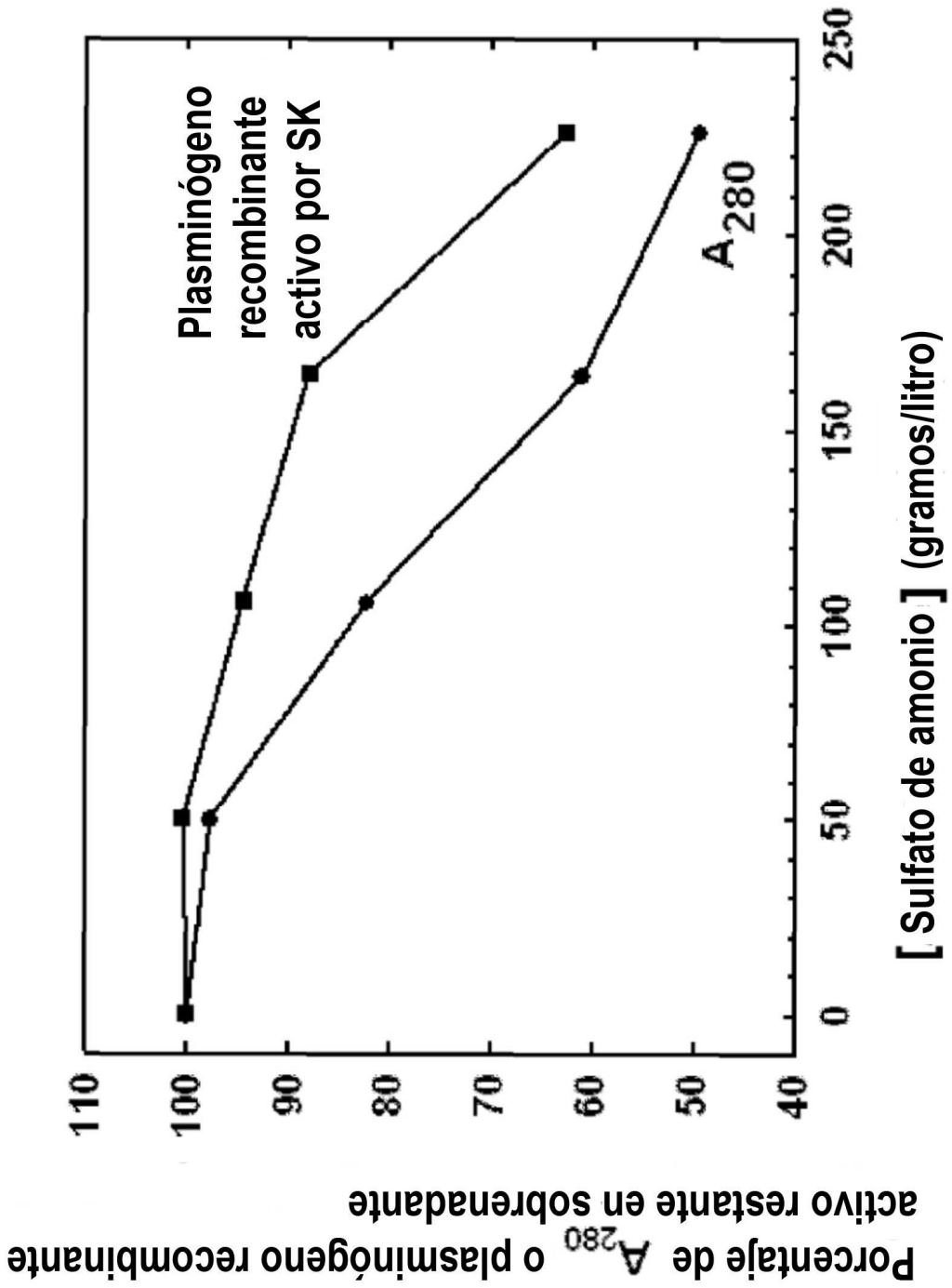


FIGURA 8

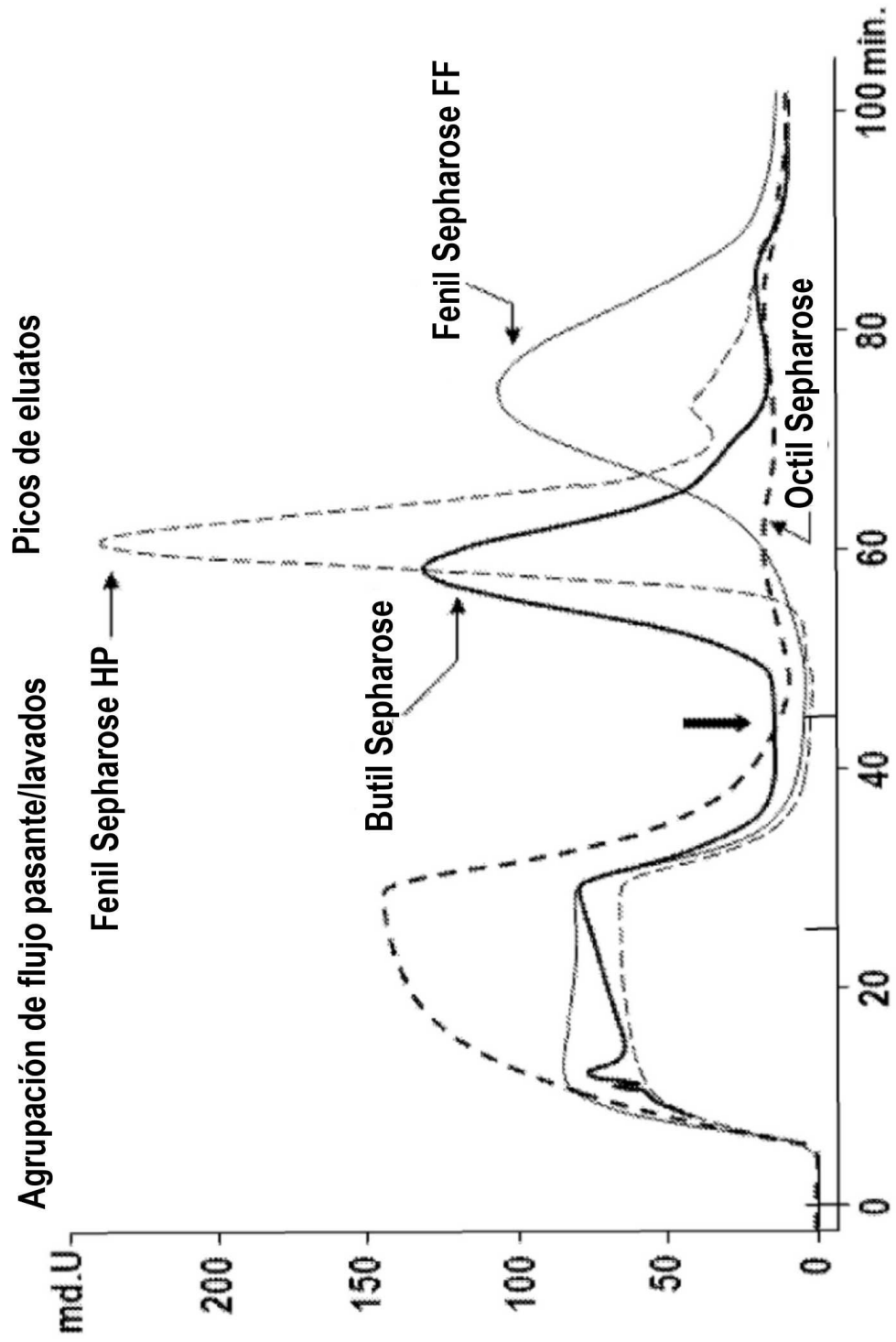


FIGURA 9

