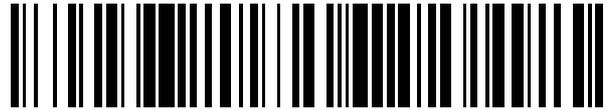


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 635 595**

51 Int. Cl.:

**C12N 9/48** (2006.01)

**C12N 9/72** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.11.2011 PCT/IN2011/000790**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.05.2012 WO12066569**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.11.2011 E 11817539 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.06.2017 EP 2640834**

54 Título: **Un nuevo procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno**

30 Prioridad:

**16.11.2010 IN 3127MU2010**

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

**04.10.2017**

73 Titular/es:

**CADILA HEALTHCARE LIMITED (100.0%)  
Zydus Tower Satellite Cross Roads  
Ahmedabad 380 015, Gujarat, IN**

72 Inventor/es:

**BANDYOPADHYAY, SANJAY;  
MENDIRATTA, SANJEEV KUMAR y  
BANDYOPADHYAY, SUSHOBHAN**

74 Agente/Representante:

**SALVA FERRER, Joan**

ES 2 635 595 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

Un nuevo procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno

5 **[0001]** La presente invención se refiere a un procedimiento de purificación de la proteína activadora tisular del plasminógeno (tPA) a partir de una mezcla que comprende dicha proteína y otras impurezas. Específicamente, la presente invención describe la purificación del tPA en la forma deseada, que principalmente comprende la forma monocatenaria de dicha proteína, usando una cromatografía de interacción hidrófoba en presencia de un disolvente adecuado.

10

**Antecedentes de la invención:**

**[0002]** Los activadores del plasminógeno son proteasas de serina que convierten el plasminógeno zimógeno catalíticamente inactivo en su forma activa, plasmina, que es la requerida para la disolución de la fibrina. Debido a esta propiedad, actualmente se usan varios activadores del plasminógeno como agentes fibrinolíticos *in vivo* en el tratamiento del infarto de miocardio agudo. Uno de tales activadores del plasminógeno es el activador tisular del plasminógeno que ha sido el foco de una atención considerable a causa de su actividad fibrinolítica intensificada en el tratamiento del infarto de miocardio agudo y la embolia pulmonar.

15

20 **[0003]** El activador tisular del plasminógeno humano, una proteasa de serina que contiene 527 aminoácidos con 17 pares de puentes S-S, es una glucoproteína de cadena polipeptídica sencilla con una masa molecular de aproximadamente 70 kDa. Se ha encontrado que el tPA glucosilado aparece con dos formas diferentes: el tipo I y el tipo II. La fracción de carbohidrato comprende principalmente glucosilaciones unidas a N o unidas a O en las posiciones Asn<sup>448</sup>, Asn<sup>117</sup> y Asn<sup>184</sup> (unidas a N) y Thr<sup>61</sup> (unidas a O) y contribuye aproximadamente al 7 % del peso molecular total de la proteína. Se sabe que el tPA del tipo I contiene la fracción glucosilada en todos los restos especificados anteriormente, mientras que la población del tipo II del tPA no presenta glucosilación en la posición Asn<sup>184</sup> (Kayuza Mori, J. Biol. Chem., 17 de febrero de 1995; 270(7): 3261-7). El tPA humano aislado presenta un pH isoelectrónico de aproximadamente 7,5. Aunque el tPA se sintetiza dentro de la célula como un polipéptido monocatenario, se ha descrito que tras su liberación al medio extracelular, el tPA sufre una escisión proteolítica por parte de la plasmina en el extremo C de la Arg<sup>275</sup> (Kayuza Mori, J. Biol. Chem., 17 de febrero de 1995; 270(7): 3261-7). La escisión proteolítica convierte el tPA monocatenario en una forma de dos cadenas que se mantienen unidas por un único enlace S-S. Sin embargo, es sabido en la técnica que las formas monocatenaria y bicatenaria del tPA no muestran ninguna diferencia significativa en actividad fibrinolítica.

25

30

35 **[0004]** La TNKasa (TNK-tPA), una forma recombinante del tPA humano, se produce en células CHO como proteína de secreción y se sabe que desempeña el mismo papel que el tPA humano. El tPA recombinante se usa como agente terapéutico para el tratamiento del infarto de miocardio agudo. El TNK-tPA tiene tres conjuntos de mutaciones en su esqueleto polipeptídico en las posiciones T<sup>103</sup>N, N<sup>117</sup>Q, KHRR<sup>(296-299)</sup>AAAA, según se muestra en (Proc. Natl. Acad. Sci. vol 91, págs. 3670-3674, abril de 1994) y también en la patente de los EE. UU. 5.612.029. De manera similar al tPA, el TNK-tPA recombinante también consta de glucoformas del tipo I y el tipo II y se ha observado que aparece como una mezcla de formas monocatenaria y bicatenaria.

40

**[0005]** Se ha descrito que la especie monocatenaria del tPA recombinante (producido por CHO) con más del 70 % de pureza de la forma monocatenaria se mantiene estable durante más de 2,5 años si se almacena en forma liofilizada, en condiciones de temperatura ambiente (Journal of Interventional Cardiology, vol. 2, n.º 2, 1989). También se ha demostrado que la especie bicatenaria del tPA recombinante (forma escindida) obtenida de células CHO permanece bastante estable durante al menos un año cuando se almacena a 0-4 °C. Estas observaciones indican que ambas formas, monocatenaria y bicatenaria, del tPA se mantienen razonablemente estables en diversas condiciones de almacenamiento.

50

**[0006]** Con fines comerciales, el activador tisular del plasminógeno recombinante o el TNK-tPA se han sobreexpresado en células CHO y purificado con ayuda de diversas etapas de cromatografía en columna. Estas etapas cromatográficas comprenden fundamentalmente ciertas matrices para cromatografía en columna de afinidad para aislar el tPA con sus especies variantes, como el tipo I y el tipo II, de manera selectiva. Una de tales cromatografías de afinidad de uso extendido es la cromatografía en columna de lisina-sefarosa. La matriz de lisina-sefarosa se une al tPA por el sitio de unión a la lisina de su dominio kring 2. Por lo tanto, la etapa de esta columna ha resultado ser útil para capturar la molécula del tPA de manera selectiva a partir de una mezcla cruda durante la purificación en columna (Byeon I. J., Kelley R. F., Linás M., Eur. J. Biochem., 10 de abril de 1991; 197(1): 155-65). Además, el documento US 4.898.825 describe el uso del inhibidor de tripsina de *Erythrina* como un agente de

55

afinidad para la purificación del tPA. El documento US 5.411.864 describe el uso de anticuerpos para la purificación del tPA. De manera similar, el documento 5.015.583 describe el uso de una columna de afinidad de heparina y sefarosa para la purificación del tPA. El documento US 5.141.863 describe el uso de una columna de hidroxapatito para la purificación del tPA.

5

**[0007]** Por consiguiente, se ha aplicado una gran diversidad de procedimientos cromatográficos, por ejemplo, afinidad e hidroxapatito, para la purificación del tPA. Sin embargo, el coste de las matrices de afinidad y de hidroxapatito es muy elevado y, por lo tanto, no muy rentable para uso industrial. Además, todavía no se ha descrito que ninguno de los procedimientos produzca la mezcla deseada de las formas monocatenaria y bicatenaria del tPA a la vez que se elimina la cantidad excesiva de la forma bicatenaria de dicha proteína durante la purificación. En ausencia de un procedimiento adecuado, el proceso de purificación del tPA sigue siendo problemático. Por consiguiente, se necesita desarrollar un procedimiento de purificación de la preparación de tPA deseada que sea industrialmente viable y rentable.

10

15 **[0008]** Por tanto, la presente invención resuelve el problema asociado con el procedimiento descrito en la técnica anterior y también aporta progreso científico que hace que el procedimiento presente sea ventajoso en relación con los procedimientos conocidos en la técnica anterior para la purificación del tPA en la forma deseada. En el presente procedimiento de purificación, el tPA se captura primeramente de una mezcla cruda sin ninguna pérdida significativa de la proteína deseada y se eluye de manera diferencial de una columna hidrófoba en presencia de un disolvente orgánico, a la vez que se eliminan las proteínas contaminantes y la especies variantes no deseadas.

20

#### **Objetivos de la invención**

**[0009]** La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno que comprende:

25

- a) cargar la mezcla cruda de activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna adecuada;
- b) eluir las impurezas de dicha matriz de columna con un disolvente orgánico adecuado en la concentración apropiada, en que la concentración apropiada es de menos del 15 % del disolvente orgánico adecuado;
- 30 c) eluir la forma deseada de dicha proteína de dicha matriz de columna con un disolvente orgánico adecuado en la concentración apropiada, en que la concentración apropiada es del 15 al 30 % del disolvente orgánico adecuado;
- d) obtener dicha proteína en la forma deseada; y
- e) opcionalmente, se usa una etapa con una columna de intercambio iónico después de usar dicha matriz de columna adecuada,

35

en que la matriz de columna adecuada corresponde a una cromatografía de interacción hidrófoba; y en que el disolvente orgánico adecuado se selecciona entre etanol, metanol y alcohol isopropílico.

**[0010]** En una realización, el procedimiento de la invención proporciona un activador tisular del plasminógeno purificado que comprende una mezcla adecuada de la forma monocatenaria y la forma bicatenaria.

40

**[0011]** En una realización, el procedimiento de la invención proporciona una mezcla de la forma deseada de tPA, que comprende predominantemente la forma monocatenaria del activador tisular del plasminógeno. En otra realización, el procedimiento de la invención proporciona la forma deseada de preparación del activador tisular del plasminógeno que contiene al menos el 55 % de la forma monocatenaria del tPA. En otra realización, el procedimiento de la invención proporciona una preparación de tPA que comprende predominantemente la forma bicatenaria del activador tisular del plasminógeno.

45

**[0012]** En una realización, la invención proporciona el uso de un disolvente orgánico, alcohol isopropílico en una concentración de aproximadamente el 5 % al 30 %, para la purificación del activador tisular del plasminógeno en la forma deseada.

50

**[0013]** En una realización, la invención proporciona un procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno que comprende:

55

- a) cargar la mezcla cruda del activador tisular del plasminógeno con otras impurezas en una matriz de columna de interacción hidrófoba;
- b) lavar la matriz de columna de interacción hidrófoba con menos del 15 % de alcohol isopropílico (API) para eluir las impurezas que comprenden principalmente la forma bicatenaria del tPA;

- c) eluir el activador tisular del plasminógeno en la forma deseada que comprende predominantemente la forma monocatenaria del tPA en presencia del 15 % al 30 % de alcohol isopropílico a través de la matriz de columna hidrófoba; y
- d) opcionalmente, el activador tisular del plasminógeno eluido en la forma deseada se somete posteriormente a una
- 5 cromatografía en columna de intercambio iónico.

**[0014]** En otra realización, la presente invención proporciona un procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno que comprende:

- 10 i. cargar la mezcla cruda del activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna de interacción hidrófoba;
- ii. eluir el activador tisular del plasminógeno mediante alcohol isopropílico en concentraciones de más del 18 % de la matriz de columna de interacción hidrófoba; y
- iii. el activador tisular del plasminógeno eluido se somete posteriormente a al menos una matriz adecuada para eluir
- 15 el activador tisular del plasminógeno en la forma deseada.

### Resumen de la invención

**[0015]** La presente invención proporciona un procedimiento de purificación del activador tisular del plasminógeno (tPA) en la forma deseada, a partir de una mezcla cruda de proteínas que contiene la proteína tPA con otras impurezas, mediante el uso de una cromatografía en columna de interacción hidrófoba, opcionalmente en combinación con una cromatografía en columna de intercambio iónico. En el procedimiento de purificación, la proteína tPA se purifica en la forma deseada a partir de una mezcla cruda, principalmente mediante el uso de una columna hidrófoba, a la vez que se eliminan las impurezas de la forma deseada del activador tisular del

25 plasminógeno. En una realización, la molécula de tPA purificada en la forma deseada obtenida de dicha columna después de la elución comprende predominantemente la variante monocatenaria (intacta) de dicha proteína: en la realización, la forma deseada del tPA comprende del 55 % al 80 % de la forma monocatenaria del tPA. En una realización preferida, la forma deseada del tPA comprende el 60 % de la forma monocatenaria del tPA. Además, la presente invención proporciona también un procedimiento mediante el cual la variante monocatenaria o la variante

30 bicatenaria de la molécula de tPA pueden aislarse en dos fracciones diferentes a partir de una mezcla cruda por elución diferencial de la proteína en presencia de concentraciones variables de un disolvente orgánico adecuado a través de una columna de interacción hidrófoba. Opcionalmente, en el procedimiento de purificación de dicha molécula de proteína se usa una cromatografía en columna de intercambio iónico para eliminar los contaminantes indeseados.

35

### Breve descripción de las figuras

**[0016]**

40 La **figura 1** ilustra un cromatograma de la purificación de TNK-tPA a partir de una obtención cruda por cromatografía en columna de interacción hidrófoba. Pico 1 - con el 12,5 % de alcohol isopropílico; pico 2 - con el 20 % de alcohol isopropílico.

La **figura 2** ilustra el perfil de polipéptidos del TNK-tPA eluido de la columna por SDS-PAGE reductora después de la purificación en la etapa de cromatografía en columna de interacción hidrófoba. Carril 1 - obtención cruda; carril 2 -

45 fracciones de flujo a través de la columna y lavado; carril 3 - predominantemente la forma bicatenaria eluida con el 12,5 % de alcohol isopropílico; carril 4 - forma deseada del tPA eluida con el 20 % de alcohol isopropílico.

La **figura 3** ilustra un cromatograma de la purificación de TNK-tPA a partir de una obtención cruda por cromatografía en columna de interacción hidrófoba. Pico 1 - lavado con tampón (sin NaCl); pico 2 - con el 5 % de alcohol isopropílico; pico 3 - con el 10 % de alcohol isopropílico; pico 3 - con el 20 % de alcohol isopropílico; pico 4 - con el

50 30 % de alcohol isopropílico.

La **figura 4** ilustra un cromatograma de la purificación de TNK-tPA a partir de una obtención cruda por cromatografía en columna de interacción hidrófoba. Pico 1 - con el 20 % de alcohol isopropílico; pico 2 - lavado con NaOH.

La **figura 5** ilustra un cromatograma de la purificación de TNK-tPA a partir de una obtención cruda por cromatografía en columna de interacción hidrófoba. Pico 1 - con el 10 % de alcohol isopropílico; pico 2 - con el 20 % de alcohol isopropílico y pico 3 - con el 30 % de alcohol isopropílico.

55

### Descripción detallada de la invención:

**[0017]** Según se usa en este documento, el término "activador tisular del plasminógeno" se refiere al

activador del plasminógeno extrínseco (de tipo tisular) humano con actividad fibrinolítica que tiene típicamente una estructura con cinco dominios (dominios de dedo, factor de crecimiento, kringle-1, kringle-2 y proteasa), pero que sin embargo puede tener menos dominios o puede tener algunos de los dominios repetidos y actuar como un agente trombolítico y que retiene los sitios de glucosilación unida a N en las posiciones 117, 184 y 448. Como mínimo, el activador tisular del plasminógeno consta de un dominio de proteasa que es capaz de convertir el plasminógeno en plasmina y una región N-terminal que se cree que es al menos parcialmente responsable de las posiciones de unión a fibrina correspondientes a las posiciones aminoacídicas 117, 184 y 448 del activador tisular del plasminógeno humano natural. La retención de estos sitios de glucosilación se debe al hecho de que la ocupación variable de los sitios del activador tisular del plasminógeno recombinante y de tipo natural derivado de melanoma conduce a la producción de dos variantes designadas como activador tisular del plasminógeno del tipo I y activador tisular de plasminógeno del tipo II, respectivamente. El activador tisular del plasminógeno del tipo I contiene oligosacáridos unidos a N en las posiciones 117, 184 y 448. El activador tisular del plasminógeno del tipo II contiene oligosacáridos unidos a N en las posiciones 117 y 448. También se entiende que existen variaciones alélicas naturales y que pueden presentarse entre individuos, como demuestran las una o más diferencias de aminoácidos en la secuencia aminoacídica del activador tisular del plasminógeno de cada individuo.

**[0018]** El término “tPA” usado en este documento se refiere al “activador tisular del plasminógeno”, el cual incluye el activador tisular del plasminógeno humano o sus mutantes o variantes basadas en el patrón de glucosilación (tipo I y tipo II), producido endógenamente por células o por tecnología de ADN recombinante.

**[0019]** La “forma bicatenaria (cadena A y cadena B) o forma escindida del tPA” se refiere al activador tisular del plasminógeno humano, o sus mutantes o variantes, que está formado por escisión autocatalítica o proteolítica de dicha proteína entre Arg<sup>275</sup> e Ile<sup>276</sup>, lo que resulta en la formación de dos cadenas separadas en función de su peso molecular aparente en SDS-PAGE reductora y denominadas cadena A (forma de movimiento lento) y cadena B (forma de movimiento rápido). Las cadenas A y B se mantienen unidas por un puente S-S en condiciones nativas.

**[0020]** Por otro lado, la “forma monocatenaria o intacta del tPA” se refiere a una forma monocatenaria del activador tisular del plasminógeno humano, o sus mutantes o variantes, que no muestra ninguna escisión en el esqueleto de la cadena polipeptídica.

**[0021]** El término “TNK-tPA”, según se usa en este documento, se refiere al “activador tisular del plasminógeno”, el cual incluye el activador tisular del plasminógeno humano o sus mutantes o variantes, basado en las mutaciones T<sup>103</sup>N, N<sup>117</sup>Q y KHRR<sup>(296-299)</sup>AAAA y producido endógenamente por células o producido usando la tecnología de ADN recombinante. Además, el TNK-tPA adecuado comprende la relación apropiada entre las especies monocatenaria y bicatenaria. Un ejemplo de tPA incluye la TNKasa o TNK-tPA, que son bien conocidos en la técnica. En lo sucesivo, la TNKasa o TNK-tPA, una forma genomanipulada del tPA natural se considera una especie del tPA.

**[0022]** El término “forma deseada del tPA” usada en lo sucesivo en este documento describe una preparación del tPA que comprende principalmente la forma monocatenaria con alguna cantidad de la forma bicatenaria de la proteína tPA.

**[0023]** El término “células de ovario de hámster chino” (células CHO) son células obtenidas originalmente de ovarios de hámster chino. Estas se transfectan con el gen de interés para poder expresar la proteína de interés en condiciones experimentales adecuadas.

**[0024]** El término “impurezas” usado en este documento se refiere a la contaminación y/o proteínas relacionadas con el producto que se obtienen junto con la proteína de interés de la célula hospedadora.

**[0025]** El término “mezcla cruda” se refiere al sobrenadante que se obtiene del cultivo de células CHO por un procedimiento convencional de fermentación adherente, en suspensión o perfusión, en que la proteína se secreta al medio extracelular y puede obtenerse del sobrenadante.

**[0026]** El término “mezcla parcialmente purificada” de la proteína tPA se refiere a una mezcla que contiene la proteína tPA con impurezas relacionadas con el producto y relacionadas con el procedimiento que se obtiene en cualquier procedimiento de purificación conocido en la técnica.

**[0027]** La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación del activador del plasminógeno o sus especies usando una matriz de purificación adecuada en presencia de una concentración

adecuada de disolventes orgánicos.

**[0028]** La presente invención proporciona un procedimiento para la purificación del activador del plasminógeno (tPA) que comprende:

- 5
- a) cargar la mezcla cruda de activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna adecuada;
  - b) eluir las impurezas de dicha matriz de columna con un disolvente orgánico adecuado en la concentración apropiada, en que la concentración apropiada es de menos del 15 % del disolvente orgánico adecuado;
  - 10 c) eluir la forma deseada de dicha proteína de dicha matriz de columna con un disolvente orgánico adecuado en la concentración apropiada, en que la concentración apropiada es del 15 al 30 % del disolvente orgánico adecuado;
  - d) obtener dicha proteína en la forma deseada; y
  - e) opcionalmente, se usa una etapa con una columna de intercambio iónico después de usar dicha matriz de columna adecuada,
- 15 en que la matriz de columna adecuada corresponde a una cromatografía de interacción hidrófoba; y en que el disolvente orgánico adecuado se selecciona entre etanol, metanol y alcohol isopropílico.

- [0029]** La matriz de columna de interacción hidrófoba usada en la presente invención incluye, pero no se limita a butilsefarosa 6FF, fenilsefarosa 6 de flujo rápido y octilsefarosa 4 de flujo rápido. El activador del plasminógeno es el activador del plasminógeno (tPA) o TNK-tPA, r-tPA, r-PA o n-PA, preferentemente TNK-tPA. Según se menciona anteriormente, el disolvente adecuado se selecciona entre etanol, metanol y alcohol isopropílico (AIP), preferentemente alcohol isopropílico. La concentración apropiada de alcohol isopropílico es importante para aislar la forma deseada del tPA de la columna de interacción hidrófoba, a la vez que se eliminan las impurezas. En una realización, se usa de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 30 % de alcohol isopropílico para purificar la proteína tPA de manera diferencial a través de la columna hidrófoba. En una realización preferida, se usa del 5 % a menos del 15 % de alcohol isopropílico para eliminar las impurezas que comprenden la forma bicatenaria del tPA de dicha matriz de columna y se usa del 15 % al 30 % de alcohol isopropílico para eluir la forma deseada del tPA de la columna. En una realización más preferida, se lleva a cabo una eliminación sustancial de las impurezas que comprenden la forma bicatenaria con del 10 % al 12,5 % de alcohol isopropílico y la elución de la forma deseada del tPA se realiza con del 18 % al 20 % de alcohol isopropílico. En la realización más preferida, la eliminación de las impurezas de lleva a cabo con el 12,5 % de alcohol isopropílico y la elución de la forma deseada de la proteína tPA se realiza con el 20 % de alcohol isopropílico. La forma deseada del tPA eluido comprende principalmente la forma monocatenaria del tPA. En una realización, la forma deseada del tPA comprende del 55 % al 80 % de la forma monocatenaria del tPA. En una realización preferida, la forma deseada del tPA comprende el 60 % de la forma monocatenaria del tPA. El dicho procedimiento no implica ninguna etapa de cromatografía de afinidad para la purificación de la forma deseada del tPA.

**[0030]** En una de las realizaciones preferidas, la invención proporciona un procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno que comprende:

- 40
- a) cargar la mezcla cruda del activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna de interacción hidrófoba;
  - b) lavar la matriz de columna de interacción hidrófoba con menos del 15 % de alcohol isopropílico para eluir las impurezas que comprenden principalmente la forma bicatenaria del tPA;
  - 45 c) eluir el activador tisular del plasminógeno en la forma deseada que comprende predominantemente la forma monocatenaria en presencia del 15 % al 30 % de alcohol isopropílico a través de la matriz de columna hidrófoba; y
  - d) opcionalmente, el activador tisular del plasminógeno eluido en la forma deseada se somete posteriormente a una cromatografía en columna de intercambio iónico.

- 50 **[0031]** En tal realización, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa (b) es de aproximadamente el 5 % y en una realización preferida, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa (b) es de aproximadamente el 10 %. En la realización más preferida, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa (b) es de aproximadamente el 12,5 %. Las impurezas que se eliminan en la etapa (b) comprenden la forma bicatenaria del tPA e impurezas relacionadas con el procedimiento. En la etapa (b), las impurezas se eliminan total o sustancialmente en presencia de alcohol isopropílico.

**[0032]** En tal realización, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa (c) es de aproximadamente el 18 % y, en una realización preferida, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa (c) es de aproximadamente el 20 %. La presente invención también proporciona opcionalmente el uso de una

cromatografía en columna de intercambio catiónico para la eliminación posterior de impurezas de la forma deseada del tPA.

**[0033]** En una realización, la forma deseada del tPA mencionada en la etapa (c) comprende del 55 % al 80 % de la forma monocatenaria del tPA. En una realización preferida, la forma deseada del tPA comprende el 60 % de la forma monocatenaria del tPA.

**[0034]** En otra realización, el procedimiento de la invención para la purificación de la forma deseada del activador tisular del plasminógeno comprende:

10

i. cargar la mezcla del activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna de interacción hidrófoba;

ii. eluir el activador tisular del plasminógeno mediante alcohol isopropílico en concentraciones de más del 18 % de la matriz de columna de interacción hidrófoba; y

15 iii. el activador tisular del plasminógeno eluido se somete posteriormente a al menos una matriz adecuada para eluir el activador tisular del plasminógeno en la forma deseada.

**[0035]** En tal realización, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa (b) es de aproximadamente el 18 % al 40 % y, en una realización preferida, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa ii. es de aproximadamente el 18 %. En la realización más preferida, la concentración de alcohol isopropílico usada en la etapa ii. es de aproximadamente el 20 %. La matriz adecuada se selecciona entre las correspondientes a cromatografía de intercambio iónico, en hidroxipatito o de afinidad y cromatografía de interacción hidrófoba.

**[0036]** En la presente invención, se obtiene una preparación cruda de tPA a partir de células CHO genomanipuladas que contienen el gen que codifica dicha proteína como proteína secretada en el sobrenadante del cultivo. Esta preparación cruda se somete primeramente a cromatografía en columna de interacción hidrófoba para su purificación en un modo de captura y elución. Opcionalmente, puede usarse una columna de intercambio iónico después de la etapa de la columna de interacción hidrófoba para eliminar otras impurezas presentes en la mezcla cruda. En una realización preferida, la columna de interacción hidrófoba se usa en primer lugar como la primera etapa de purificación en modo de captura y elución.

**[0037]** Alternativamente, el tPA se obtiene de células CHO genomanipuladas como una proteína secretada al sobrenadante del cultivo que se purifica parcialmente por un procedimiento de purificación conocido en la técnica y después se purifica adicionalmente usando una etapa de cromatografía en columna de interacción hidrófoba, en que dicha proteína se purifica en la forma deseada usando dicha columna en un modo de captura y elución. Opcionalmente, después de la etapa de la columna de interacción hidrófoba puede usarse una cromatografía de intercambio iónico para una purificación adicional. En una realización preferida, la columna de interacción hidrófoba se usa en primer lugar como la etapa de captura para la purificación del tPA de una preparación semipurificada, después de la cual, opcionalmente, puede usarse una cromatografía de intercambio iónico para eliminar otras impurezas. Dicha columna de intercambio iónico se usa en un modo de unión y elución, en que la elución de la columna se lleva a cabo en presencia de alta concentración de sal, por ejemplo, se usan NaCl, KCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> con un tampón adecuado. La columna de intercambio iónico usada según la presente invención es una columna de intercambio catiónico. Se usa preferentemente una columna de fuerte intercambio catiónico, lo que incluye pero no se limita a SP sefarosa, SP-5PW, etc.

45

**[0038]** La presente invención es ventajosa con respecto a los procedimientos conocidos de purificación del tPA, ya que proporciona una captura directa de la proteína tPA mediante la matriz de columna hidrófoba a partir de una mezcla cruda de tPA sin pérdidas significativas de la proteína deseada y sin el uso de ninguna cromatografía en columna de afinidad. Además, el presente procedimiento también hace posible aislar la forma deseada del tPA a la vez que se eliminan las otras impurezas de manera selectiva. La forma deseada de la preparación del tPA aislado comprende principalmente la forma monocatenaria del tPA. Por lo tanto, la presente invención proporciona un procedimiento de purificación de la proteína tPA de alto rendimiento, robusto y rentable.

50

**[0039]** La presente invención proporciona además una composición farmacéutica del activador tisular del plasminógeno en la que el tPA está purificado en la forma deseada, que comprende principalmente la forma monocatenaria de dicha proteína, usando una matriz de columna de interacción hidrófoba en presencia de un disolvente orgánico.

**[0040]** La composición farmacéutica comprende el activador tisular del plasminógeno, que se obtiene

mediante el procedimiento de purificación descrito en la presente invención, y un diluyente o vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición de la presente invención puede formularse en forma liofilizada.

**[0041]** La invención se explica más detalladamente mediante los ejemplos mostrados a continuación, que se proporcionan solo a modo de ilustración y por lo tanto no deberán interpretarse como limitantes del alcance de la invención.

#### Ejemplo 1

10 **[0042]** El gen de la tPA se modificó para incorporar las mutaciones deseadas T<sup>103</sup>N, N<sup>117</sup>Q y KHRR<sup>(296-299)</sup>AAAA para producir TNK-tPA, según se describe en PNAS, 1994, vol. 91, 3670-3674). Este gen modificado se clonó en un vector derivado de pZRC (documento WO 2007/017903) y el vector de expresión final con el gen de TNK-tPA se usó para producir transfectantes estables de células CHO K1. La producción de TNK-tPA a partir de las células CHO K1 transfectadas de manera estable fue como sigue. El crecimiento y la producción se llevaron a cabo  
15 en modo por lotes o lotes alimentados usando un medio químicamente definido sin suero disponible en el comercio. Además, en el proceso por lotes alimentados, la alimentación de los lotes alimentados se realizó usando un suministro concentrado del mismo medio a partir del 3.<sup>er</sup> día de crecimiento y a intervalos regulares hasta el 10.<sup>o</sup> día del proceso. Las células se cultivaron a 37 °C en un ambiente humidificado con el 5 % de CO<sub>2</sub> en condiciones de agitación, oscilando las velocidades de agitación entre 50 rpm y 200 rpm, con el uso de botellas giratorias. Las células se cultivaron hasta densidades celulares de 3,0 a 4,0 millones de células/ml y la viabilidad de las células se mantuvo superior al 75 % para obtener una expresión óptima de la proteína deseada. El proceso se continuó en las condiciones mencionadas anteriormente durante un periodo de 8 a 11 días. El sobrenadante cultivado que contenía la proteína TNK-tPA se cargó en una columna de butilsefarosa 6 de flujo rápido. La columna se equilibró con un tampón de Tris-Cl 20 mM, pH 7, que contenía NaCl 750 mM. Después de la carga, la columna se lavó con el 12,5 %  
20 de alcohol isopropílico en el tampón de equilibrado. La forma deseada de tPA se eluyó con el 20 % de alcohol isopropílico en el mismo tampón, según se muestra en la figura 1 y la figura 2. En la fracción de la columna del 12,5 % de alcohol isopropílico se observó la salida de la columna principalmente de la forma bicatenaria de TNK-tPA e impurezas contaminantes, mientras que la forma deseada de TNK-tPA, que comprende fundamentalmente la forma monocatenaria de TNK-tPA, resultó eluir en la fracción del 20 % de alcohol isopropílico.

30

#### Ejemplo 2

**[0043]** El sobrenadante del cultivo que contenía la proteína TNK-tPA, según se describe en el ejemplo 1, se cargó en una columna de butilsefarosa 6 de flujo rápido. La columna se equilibró con un tampón de Tris-Cl 20 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 750 mM. Después de la carga, la columna se lavó con el tampón de equilibrado sin NaCl  
35 seguido de un segundo lavado con el tampón con el 5 % de alcohol isopropílico. La proteína deseada se eluyó con tampón que contenía el 20 % de alcohol isopropílico. La columna se lavó después con tampón con el 30 % de alcohol isopropílico para recuperar la proteína tPA firmemente unida. La fracción eluida con el 20 % de alcohol isopropílico resultó contener la forma deseada de la proteína tPA que comprende principalmente la forma monocatenaria de TNK-tPA, según se muestra en la figura 3.

40

#### Ejemplo 3

**[0044]** El sobrenadante del cultivo que contenía la proteína TNK-tPA, según se describe en el ejemplo 1, se cargó en una columna de butilsefarosa 6 FF. La columna se equilibró con un tampón de Tris-Cl 20 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 750 mM. Después de la carga, la proteína unida a la matriz de la columna se eluyó con el mismo tampón de equilibrado con el 20 % de alcohol isopropílico. La mayoría de la proteína tPA resultó eluida de la columna con el 20 % de alcohol isopropílico, según se muestra en la figura 4.

50 Ejemplo 4

**[0045]** El sobrenadante del cultivo que contenía la proteína TNK-tPA, según se describe en el ejemplo 1, se cargó en una columna de butilsefarosa 6 FF. La columna se equilibró con un tampón de Tris-Cl 20 mM, pH 7,0, que contenía NaCl 750 mM. Después de la carga, la columna se lavó con el 10 % de alcohol isopropílico en el tampón de equilibrado. La mayoría de las impurezas presentes en la mezcla cruda resultaron lavadas de la columna con el 10 % de alcohol isopropílico. La proteína tPA deseada se eluyó de la columna con tampón que contenía el 20 % de alcohol isopropílico. La columna se lavó después con tampón con el 30 % de alcohol isopropílico para eliminar la proteína tPA firmemente unida junto con otras impurezas. El cromatograma se muestra en la figura 5.

55

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno que comprende:
- 5 a) cargar la mezcla cruda de activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna adecuada;  
b) eluir las impurezas de dicha matriz de columna con un disolvente orgánico adecuado en la concentración apropiada, en que la concentración apropiada es de menos del 15 % del disolvente orgánico adecuado;  
c) eluir la forma deseada de dicha proteína de dicha matriz de columna con un disolvente orgánico adecuado en la concentración apropiada, en que la concentración apropiada es del 15 al 30 % del disolvente orgánico adecuado;
- 10 d) obtener dicha proteína en la forma deseada; y  
e) opcionalmente, se usa una etapa con una columna de intercambio iónico después de usar dicha matriz de columna adecuada,  
en que la matriz de columna adecuada corresponde a una cromatografía de interacción hidrófoba; y en que el disolvente orgánico adecuado se selecciona entre etanol, metanol y alcohol isopropílico.
- 15 2. El procedimiento según la reivindicación 1, en que el activador tisular del plasminógeno se selecciona entre TNK-tPA, r-tPA, r-PA y n-PA, preferentemente TNK-tPA.
3. El procedimiento según la reivindicación 2, en que la forma deseada del activador tisular del  
20 plasminógeno comprende predominantemente la forma monocatenaria del tPA.
4. El procedimiento según la reivindicación 3, en que la forma deseada del activador tisular del plasminógeno comprende predominantemente al menos el 55 %, preferentemente del 60 % al 80 % de la forma monocatenaria del tPA.
- 25 5. El procedimiento según la reivindicación 1, en que las impurezas comprenden predominantemente la forma bicatenaria.
6. El procedimiento según la reivindicación 1, en que la concentración apropiada usada en la etapa (b) es  
30 del 12,5 % del disolvente orgánico adecuado.
7. El procedimiento según la reivindicación 1, en que la concentración apropiada usada en la etapa (c) es del 20 % del disolvente orgánico adecuado.
- 35 8. El procedimiento según la reivindicación 1, en que el disolvente orgánico apropiado es alcohol isopropílico.
9. El procedimiento según la reivindicación 8, en que el alcohol isopropílico se usa en una concentración del 5 % al 30 %.
- 40 10. El procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno según la reivindicación 1 que comprende:
- a) cargar la mezcla cruda del activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna de  
45 interacción hidrófoba;  
b) lavar la matriz de columna de interacción hidrófoba con menos del 15 % de alcohol isopropílico para eluir las impurezas que comprenden principalmente la forma bicatenaria del tPA;  
c) eluir el activador tisular del plasminógeno en la forma deseada que comprende predominantemente la forma monocatenaria en presencia del 15 % al 30 % de alcohol isopropílico a través de la matriz de columna hidrófoba; y  
50 d) opcionalmente, el activador tisular del plasminógeno eluido en la forma deseada se somete posteriormente a una cromatografía en columna de intercambio iónico.
11. El procedimiento según la reivindicación 10, en que la concentración del alcohol isopropílico en la etapa (b) es del 5 % a menos del 15 %, preferentemente del 10 %, más preferentemente del 12,5 %.
- 55 12. El procedimiento según la reivindicación 10, en que la concentración de alcohol isopropílico en la etapa (c) es del 20 %.
13. El procedimiento para la purificación del activador tisular del plasminógeno según la reivindicación 1

que comprende:

- i. cargar la mezcla cruda del activador tisular del plasminógeno con impurezas en una matriz de columna de interacción hidrófoba;
  - 5 ii. eluir el activador tisular del plasminógeno mediante alcohol isopropílico en concentraciones de más del 18 % de la matriz de columna de interacción hidrófoba; y
  - iii. el activador tisular del plasminógeno eluido se somete posteriormente a al menos una matriz adecuada para eluir el activador tisular del plasminógeno en la forma deseada; en que la matriz adecuada se selecciona entre las correspondientes a cromatografía de intercambio iónico, en hidroxapatito o de afinidad y cromatografía de
  - 10 interacción hidrófoba.
14. El procedimiento según la reivindicación 13, en que la concentración de alcohol isopropílico en la etapa ii. es de hasta el 40 %, preferentemente del 20 %.

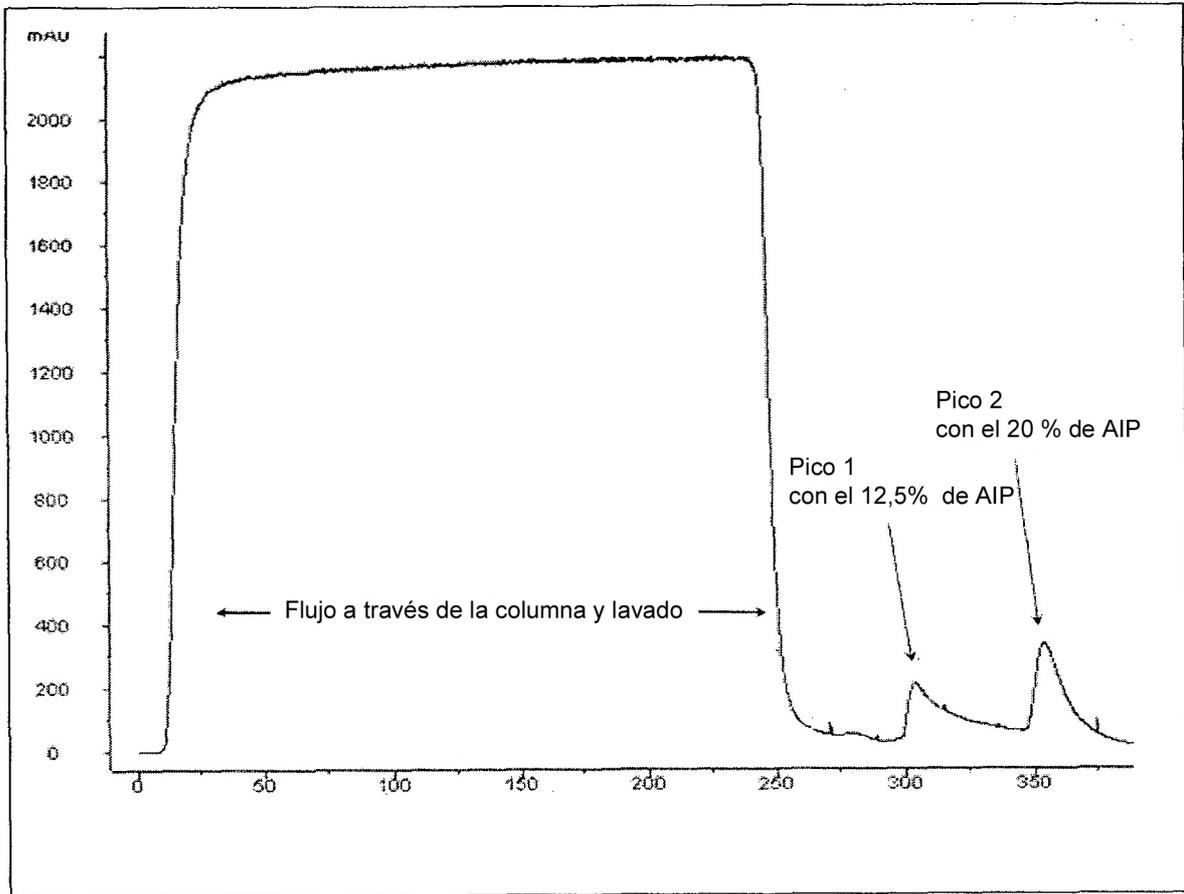


Figura 1

AIP - alcohol isopropílico

Figura 2

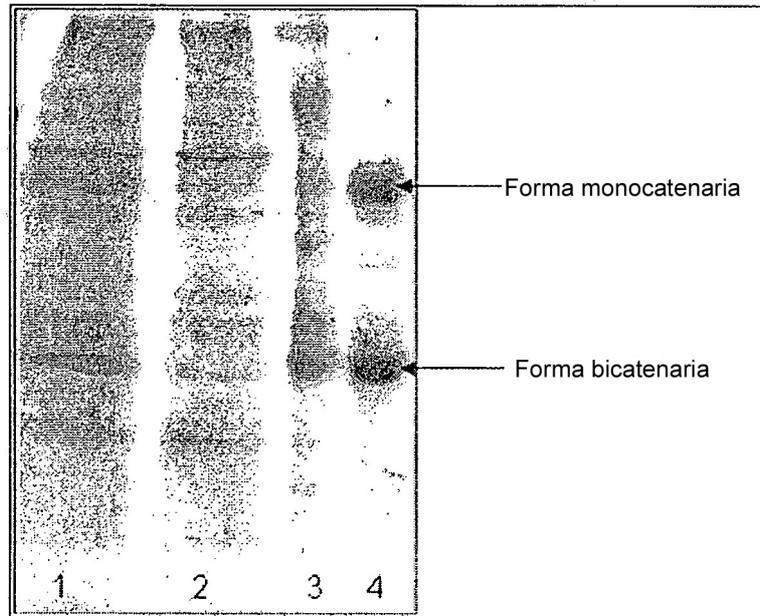


Figura 2

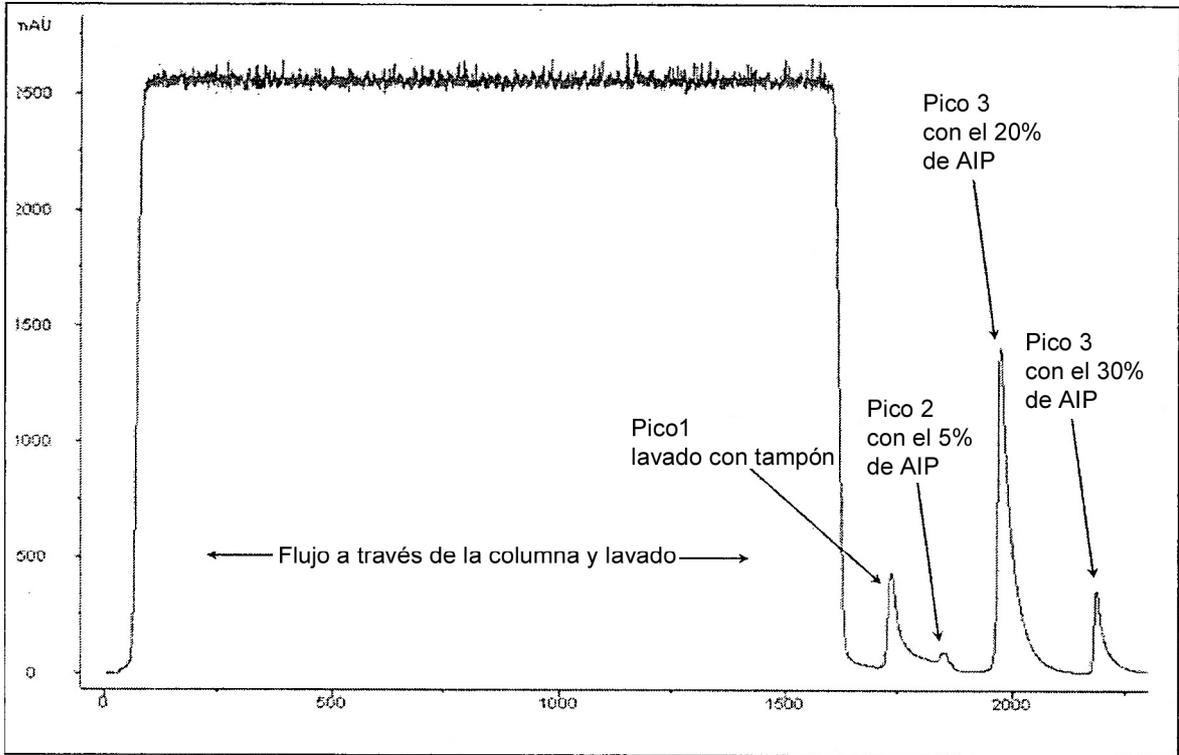


Figura 3

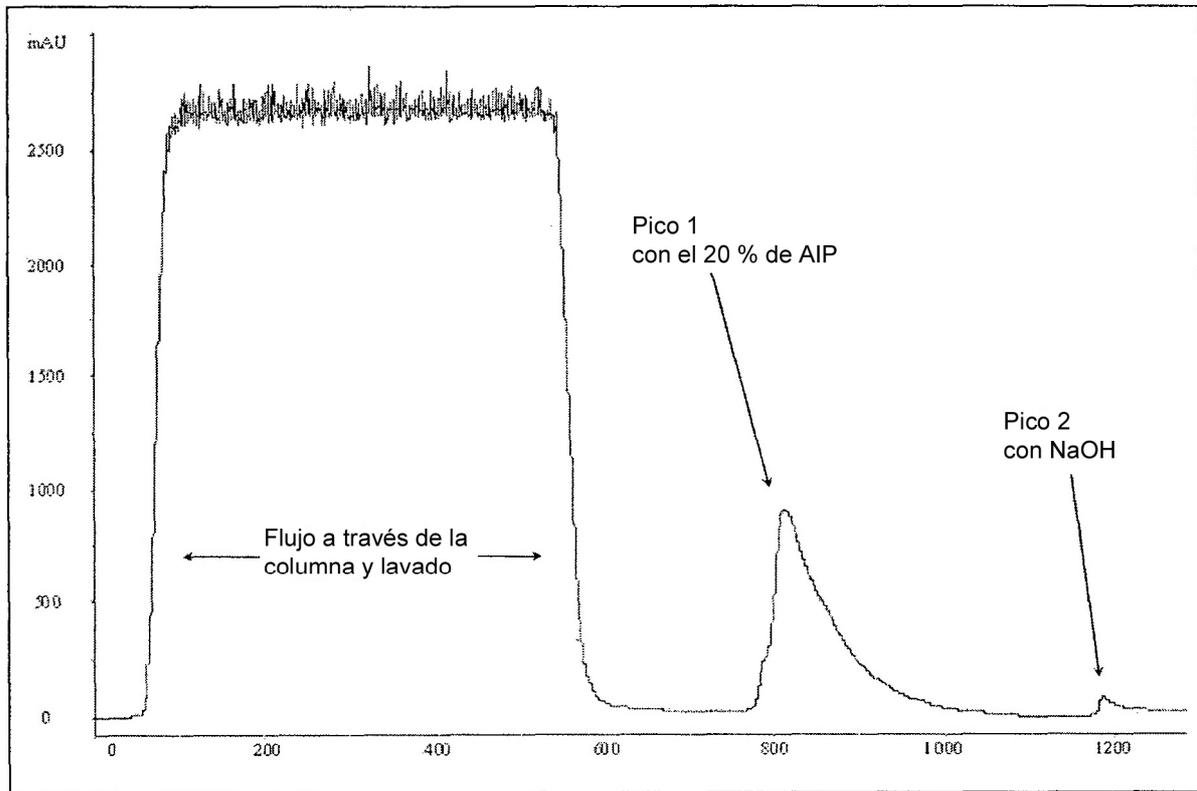


Figura 4

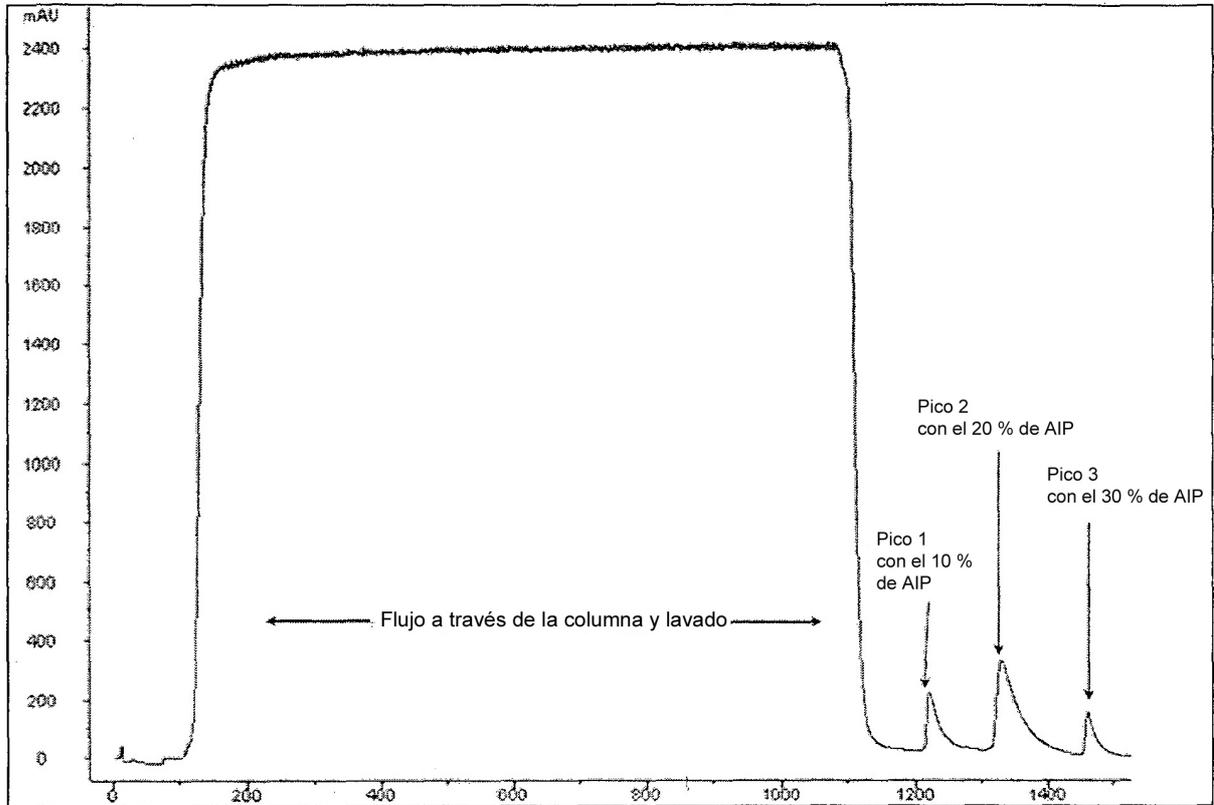


Figura 5