



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 306 462**

51 Int. Cl.:
C07K 14/49 (2006.01)
C07K 1/18 (2006.01)
A61K 38/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **97948629 .7**
86 Fecha de presentación : **12.12.1997**
87 Número de publicación de la solicitud: **0948538**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.1999**

54 Título: **Análisis y separación de proteínas del factor de crecimiento derivadas de plaquetas.**

30 Prioridad: **13.12.1996 US 32720**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2008

73 Titular/es: **Novartis Vaccines and Diagnostics, Inc.**
4560 Horton Street
Emeryville, California 94608, US

72 Inventor/es: **Kunitani, Michael;**
Tran, An y
Parker, Hug

74 Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

ES 2 306 462 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

Análisis y separación de proteínas del factor de crecimiento derivadas de plaquetas.

5 **Campo de la invención**

La presente invención se relaciona con el campo del análisis y separación de proteínas, particularmente con preparaciones de isoformas purificadas de proteínas heterólogas que tienen heterogeneidad estructural.

10 **Antecedentes de la invención**

El factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), el mitógeno primario en el suero para las células derivadas mesenquimales, se almacena en gránulos alfa de plaquetas. El daño a los vasos sanguíneos activa la liberación de PDGF de estos gránulos en la vecindad de los vasos dañados. Este mitógeno actúa como un potente quimioatrayente para fibroblastos y células de músculo liso, así como también monocitos y neutrófilos. La actividad mitogénica del PDGF localizado da como resultado la proliferación de estas células en el sitio de daño, contribuyendo al proceso de preparación de heridas.

El factor de crecimiento derivado de plaqueta nativo purificado (PDGF), una glicoproteína de aproximadamente 20 30.000 daltons, está compuesta de dos cadenas de polipéptido ligadas a disulfuro. Se han identificado dos formas de estas cadenas, designadas A y B. La proteína nativa ocurre como el homodímero AA o BB o el heterodímero AB o una mezcla de éstos. Se ha identificado una secuencia parcial de aminoácido para la cadena PDGF-A (Johnsson *et al.* (1984) EMBO J. 3:921-928) y los cADN que codifican dos formas de los precursores de cadena PDGF-A y se han descrito los cADN que codifican dos formas de los precursores de cadena PDGF-A (Patente U.S No 5, 219,759). La 25 cadena A madura consiste de un polipéptido de 104 aminoácidos que es derivada mediante procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de 211 aminoácidos. El cADN que codifica la cadena PDGF-B también se ha descrito (Nature (1985) 316:748-750). La cadena B madura consiste de un polipéptido de 109 aminoácidos que se deriva mediante el procesamiento proteolítico de un polipéptido precursor de 241 aminoácidos. Las cadenas A y B maduras del PDGF muestran identidad de secuencia del 51%, con los ocho residuos de cisteína que se conservan en cada una 30 de las cadenas (Johnsson *et al.* (1984) EMBO J. 3:921-928).

Además del procesamiento proteolítico de los polipéptidos precursores en las cadenas PDGF-A y PDGF-B maduras, el PDGF recombinante (rPDGF) producido en un huésped de levadura sufre el procesamiento post-transduccional adicional que resulta en una proteína madura secretada que tiene considerable heterogeneidad estructural. Esto es 35 cierto para el rPDGF-AB heterodímero, y más particularmente para el rP-DGF-BB homodímero.

Cuando se expresa en un huésped de levadura para la producción de una sustancia de fármaco en masa, el PDGF sufre clivaje endoproteolítico, o el así llamado "enganchado" de la cadena B entre los residuos Arg-32 y Thr-33, dan como resultado una sustancia de fármaco en masa que tiene una mezcla del "desenganchada" o el así llamado rPDGF 40 y el rPDGF de enganche que se ha clivado en la cadena B entre los residuos Arg-32 y Thr-33. En el caso del rPDGF-BB, una o ambas de estas cadenas B pueden estar desenganchadas, dando como resultado un rPDGF-BB enganchado único o enganchado doble, respectivamente. Otras modificaciones post-transduccionales de interés de la presente invención incluyen la remoción exoproteolítica de los aminoácidos C-terminales, o el así llamado truncamiento, que 45 puede remover el Arg-32 de las cadenas de enganchada y/o Thr-109 de las cadenas B intactas y enganchadas. Estas modificaciones post-transduccionales conducen a numerosas formas estructurales, o las así llamadas isoformas, del rPDGF-BB presente en el producto secretado. Los métodos de la presente invención están dirigidos a la separación y purificación de las isoformas enganchadas únicas, y enganchadas dobles intactas del rPDGF más particularmente el rPDGF-BB.

Las tres formas dimericas del PDGF exhiben diferentes afinidades de unión para los dos productos del gen receptor PDGF conocido, α y β . El receptor beta reconoce la cadena PDGF B y se dimeriza en la presencia de PDGF-BB. El receptor alfa reconoce el PDGF B y las cadenas PDGF B y A y se puede dimerizar mediante PDGF-BB, PDGF-AA y PDGF-AB (ver, por ejemplo, Abboud *et al.* (1994) J. Cell. Phys. 158:140-150). La región de residuo del aminoácido del PDGF-BB involucrada en la unión o activación del receptor se ha estrechado a los residuos Ile25-Phe37 (Giese *et al.* (1990) Mol. Cell. Biol. 10:5496-5501). Estos residuos incluyen el sitio Arg-32/Thr-33 clivado por procesamiento 55 endoproteolítico durante la producción del PDGF-BB por un huésped de levadura.

Los mutantes resistente a proteinasa de el PDGF-BB recombinante que exhibe la actividad biológica mejorada se han identificado (Cook *et al.* (1992) Biochem. J. 281:57-65; ver también European Patent Application No 0 547064 60 B1). Estos mutantes evitan el clivaje endoproteolítico de las cadenas B en Arg-32: Así la eliminación del clivaje endoproteolítico en ésta región aparentemente conduce a la actividad biológica creciente del PDGF-BB producido en el huésped de levadura durante el proceso de fermentación. Este incrementa una actividad biológica presumiblemente se asocia con un incremento en la cantidad relativa del no enganchado, o así llamado PDGF-BB intacto y con un incremento en la cantidad relativa del PDGF-BB desenganchado, o así llamado intacto, y una disminución en la cantidad relativa del PDGF-BB enganchado en el producto PDGF-BB recombinante. De manera similar, en el clivaje 65 endoproteolítico en ésta región de una o ambas de las cadenas B dentro de la proteína rPDGF-BB se esperaría que produjera una sustancia de fármaco en masa que tiene una actividad biológica diferente que la que se encuentra para la sustancia de fármaco en masa que consiste solamente del rPDGF-BB intacto.

Antes de la presente invención, los métodos usados comúnmente en la técnica para purificar el PDGF recombinantemente producido no se habían distinguido entre las varias isoformas de PDGF que resultan del procesamiento post-transduccional, que incluye el clivaje endoproteolítico de la cadena PDGF-B entre el Arg-32 y Thr-33. La técnica anterior enseña que las isoformas estructurales que resultan del clivaje endoproteolítico post-transduccional podrían tener 5 grados variados de actividad biológica, y de ésta manera pueden efectuar la actividad biológica total de la sustancia del fármaco de masa producida por fermentación.

Los métodos son necesarios para separar y cuantificar las isoformas estructurales del PDGF recombinantemente producido de tal forma que sus actividades biológicas se pueden comparar. Estos métodos serían útiles para preparar 10 las sustancias de fármaco en masa que consisten de isoformas puras.

Resumen de la invención

Se suministran métodos para mejorar la purificación y la cuantificación de las proteínas del factor de crecimiento 15 derivado de plaqueta (PDGF) que tienen heterogeneidad estructural. La preparación de las isoformas sustancialmente puras de estas proteínas se logra utilizando la cromatografía de intercambio de catión sulfopropilo TSK y la cromatografía líquida de alto desempeño de fase inversa. Estos métodos son particularmente útiles para separar las isoformas que resultan del procesamiento endoproteolítico post-transduccional del PDGF recombinante secretado (rPSGF), más particularmente el rPDGF-BB. Un método de electroforesis de zona capilar de carga inversa de la invención es útil 20 para cuantificar las modificaciones post-transduccionales endoproteolíticas.

Las composiciones de la invención son isoformas sustancialmente purificadas de las proteínas PDGF secretadas que tienen heterogeneidad estructural, más particularmente las isoformas enganchadas únicas purificadas del PDGF-BB. Las composiciones farmacéuticas que comprenden por lo menos una de estas isoformas PDGF sustancialmente 25 purificadas y los métodos para su uso en promover la curación de heridas también se suministran.

La invención suministra una composición que comprende los dímeros PDGF-BB (rPDGF-BB) recombinante biológicamente activos purificados, en donde por lo menos el 95% de los dímeros rPDGF-BB son isoformas enganchadas 30 únicas, y en donde los polipéptidos rPDGF-B en los dímeros son la secuencia nativa o los polipéptidos rPDGF-B variante que exhiben por lo menos aproximadamente 80% de la identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B de la secuencia nativa.

La invención también suministra un método para preparar una composición enriquecida en por lo menos una isoforma deseada de la proteína dimérica PDGF-BB recombinante biológicamente activa (rPDGF-BB) o la variante 35 de ésta de una mezcla de isoformas de dicha proteína dimérica rPDGF-BB o variante de ésta, en donde los polipéptidos rPDGF-B en la proteína dimérica son los polipéptidos de la secuencia nativa o el rPDGF-B variante que exhiben por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B de la secuencia nativa, dicho método comprende tomar dicha mezcla y utilizar cromatografía de intercambio de ión, cromatografía líquida de alta presión de fase inversa o la electroforesis de zona capilar de carga inversa para reducir la cantidad de las isoformas 40 indeseadas en dicha mezcla y obtener así dicha composición enriquecida.

La invención también suministra un método para preparar una mezcla de las isoformas intacta o enganchadas únicas de la proteína dimérica PDGF-BB recombinante biológicamente activa (rPDGF-BB) de una mezcla de isoformas 45 de dicha proteína obtenida de un cultivo de células, en donde los polipéptidos rPDGF-B en dicha proteína dimérica rPDGF-BB son los polipéptidos de secuencia nativa o rPDGF-B variante que exhiben por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B, de la secuencia nativa, dicho método comprende cargar dicha mezcla de isoformas sobre una columna de cromatografía de intercambio de catión de sulfopropilo TSK, lavando dicha mezcla de isoformas desde dicha columna con un amortiguador de gradiente lineal, descartando una fracción 50 eluida que comprende una isoforma de doble enganche, y recolectando una fracción eluida que comprende isoformas intactas y de enganche único.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una representación esquemática de una isoforma intacta del rhPDGF-BB (grupo A) con y sin trun- 55 camiento del Thr-109. Las líneas únicas representan cadenas B; las líneas pareadas representan rhPDGF-BB.

La figura 2 es una representación esquemática de las isoformas de enganche único del rhPDGF-BB con y sin 60 truncamiento del Arg-32 y el Thr-109. Las líneas pareadas representan rhPDGF-BB de enganche único. El gancho en una de las cadenas B está representado por la ruptura en la línea. Las isoformas de las especies de enganche único están separadas en los grupos B y C con base en la diferencia de la carga total de la proteína. El truncamiento del Arg-32 en el sitio del gancho (grupos C) produce una isoforma más ácida, aunque el truncamiento solamente del Thr-109 (grupo B) no altera la carga molecular.

La figura 3 es una representación esquemática de las isoformas de doble enganche del rhPDGF-BB con y sin el 65 truncamiento del Arg-32 y el Thr-109. Las líneas intermitentes pareadas representan rhPDGF-BB de doble enganche. El gancho en cada una de las cadenas B está representado por una ruptura en cada línea. La isoforma de doble enganche se separa en los grupos D, E y F con base en la diferencia de la carga total de la proteína. El truncamiento del Arg-32 en uno de los sitios del gancho (grupo E) hace la isoforma más ácida, aunque el truncamiento del Arg-32 en ambos

ES 2 306 462 T3

sitios del gancho (grupo F) remueve dos residuos de aminoácidos básicos. El truncamiento solamente del Thr-109 (grupo D) no altera la carga molecular, similar a las especies de enganche simple (grupo B).

5 La figura 4 es un perfil de (RP)HPLC de fase inversa a alta temperatura del rhPDGF-BB que utiliza una elusión de gradiente lineal. Las isoformas de doble enganche y de doble enganche truncado (A), las isoformas de enganche único y de enganche único truncado (B), y las isoformas intactas e intactas truncadas (C) del rhPDGF-BB se resuelven como tres grupos de varios picos.

10 La figura 5 es un perfil de RP HPLC de alta temperatura del rhPDGF-BB que utiliza una etapa de elusión de gradiente. Las isoformas de enganche doble y enganche doble truncado (A), las isoformas de enganche único y enganche único truncado (B), las isoformas intactas e intactas truncadas (C), y un dímero/dímero (D) del rhPDGF-BB se resuelven como picos individuales.

15 La figura 6 es un electroferograma de la electroforesis de zona capilar de carga inversa (RC CZE) del PDGF-BB tratado con carboxipeptidasa de (inferior) en comparación con el rhPDGF-BB no tratado (parte superior). Las letras corresponden a los grupos identificados en las figuras 1-3.

Descripción detalla de las modalidades preferidas

20 La presente invención está dirigida a composiciones que tienen actividad PDGF que son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de heridas. Más específicamente, estas composiciones comprenden por lo menos una isoforma sustancialmente purificada biológicamente activa de una proteína PDGF (rPDGF) recombinante. Por “recombinante” se entiende la proteína que es producida como una proteína heteróloga o extraña en las células de un organismo huésped establemente transformado con una secuencia de nucleótido que codifica la proteína PDGF de interés extraña.

30 Los métodos de la invención suministran la separación de las isoformas biológicamente activas del rPDGF de una sustancia de fármaco en masa que comprende una mezcla de estas isoformas. Los métodos son particularmente útiles para separar las isoformas que dan como resultado el procesamiento endoproteolítico post-transduccional del rPDGF secretado, más particularmente el rPDGF-BB. Una vez separada, las isoformas se pueden purificar sustancialmente e incorporar en una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de heridas.

35 Una isoforma de una proteína de rPDGF es “biológicamente activa” cuando ésta tiene la capacidad de desempeñar una o más funciones biológicas de un grupo de actividades normalmente atribuidas al PDGF en el contexto biológico. Estas actividades biológicas incluyen inducir quimiotaxis y/o mitogénesis de los tipos de célula de respuesta que siguen a la unión del PDGF a un receptor de superficie de célula específica. Otras actividades biológicas del PDGF pueden incluir, pero no están limitadas a la activación de fosfolipasa, al cambio de fosfatidilinositol incrementado y el metabolismo de prostaglandina, a la estimulación tanto de la síntesis de colágeno como de colaginasa por las células de respuesta, a la respuesta proliferativa indirecta de las células a las que le falta los receptores PDGF, y a la actividad vaso constructora potente. La actividad biológica se puede determinar utilizando cualquier número de ensayos disponibles en la técnica para el PDGF, que incluye pero no está limitado al ensayo mitogénico descrito aquí.

45 Por “isoformas sustancialmente purificadas” se entiende por lo menos aproximadamente el 80%, preferiblemente por lo menos aproximadamente 90%, más preferiblemente por lo menos aproximadamente a 95% de la composición que comprende rPDGF en la isoforma de interés. Las isoformas sustancialmente purificadas de una proteína se obtienen utilizando métodos de la presente invención que suministran la separación de la isoforma de interés de un cultivo de células que comprende una mezcla de isoformas rPDGF. Por “separación de la isoforma de interés” se entiende la remoción de cualquiera de las isoformas indeseables de otros componentes en el cultivo de células de tal forma que la isoforma restante es sustancialmente purificada.

50 La proteína rPDGF cuyas isoformas son separadas utilizando los métodos de la presente invención serán una forma dimerica biológicamente activa, más particularmente el homodímero rPDGF-AA y el PDGF-BB o el heterodímero rPDGF-AB así como también cualquiera de las variantes sustancialmente homólogas y funcionalmente equivalentes de ésta. Por “variante” se entiende una proteína derivada de la proteína nativa por la supresión o adición de uno o más de los aminoácidos al extremo terminal N o terminal C de la proteína nativa; la supresión o adición de uno o más aminoácidos en uno o más sitios en la proteína nativa; o la sustitución de uno o más aminoácidos en uno o más sitios de la proteína nativa. Las sustituciones conservadoras que preservan la carga general, la hidrofobicidad/hidrofiliidad, y/o la masa estérica del aminoácido sustituido se pueden preferir. Tales sustituciones pueden ser hechas por ejemplo, entre los miembros de los siguientes grupos: Glys ⇌ Ala, Val ⇌ Ile ⇌ Leu, Asp ⇌ Glu, Lys ⇌ Arg, Asn ⇌ Gln, y Phe ⇌ Trp ⇌ Tyr. Otras sustituciones se pueden hacer para eliminar los residuos de aminoácido no esencial, tal como alterar el sitio de glicosilación, un sitio de fosforilación, un sitio de acetilación, o para alterar el patrón de doblamiento al alterar la posición del residuo de cisteína que no es necesario para la función. Los métodos para tales manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica.

65 Por ejemplo, las variantes de la secuencia de aminoácido de la proteína PDGF de interés se pueden preparar mediante mutaciones en la secuencia de ADN que codifica la proteína PDGF nativa. Los métodos para la mutagénesis y las alteraciones de la secuencia de nucleótido son bien conocidos en la técnica. Ver, por ejemplo, Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492; Kunkel *et al.* (1987) Methods Enzymol. 154:367-382; U.S Patent No. 4,873,192;

Walker and Gaas-tra, eds. (1983) Techniques in Molecular Biology (Mac-Millan Publishing Company, New York) y las referencias citadas aquí.

5 Tales variantes continuarán poseyendo la actividad biológica deseada. Obviamente, las mutaciones que se harán en el ADN que codifica la proteína PDGF variante no deben colocar la secuencia por fuera de la estructura de lectura y preferiblemente no crearan las regiones complementarias que podrían producir la estructura de mRNA secundaria. Ver Publicación de la Solicitud de Patente EP No 75,444.

10 Las proteínas rPDGF cuyas isoformas se separan utilizando los métodos de la presente invención incluyen las proteínas de PDGF a la ocurrencia natural así como también las variantes de ésta. Estas variantes serán sustancialmente homologas y funcionalmente equivalentes a su proteína PDGF nativa. Una variante de la proteína PDGF nativa es "sustancialmente homologa" a la proteína nativa cuando por lo menos aproximadamente el 80%, más preferiblemente aproximadamente el 90% y más preferiblemente a por lo menos aproximadamente 95% de su secuencia de aminoácido es idéntica a la secuencia de aminoácido de la proteína PDGF nativa. Las variantes pueden diferir por aproximada-
15 mente 1, 2, 3 o 4 aminoácidos. Por "funcionalmente equivalente" se entiende que la secuencia de la variante define una cadena que produce una proteína que tiene sustancialmente la misma actividad biológica que la proteína nativa de interés. Tales variantes funcionalmente equivalentes que comprenden las variaciones sustanciales de secuencia también están comprendidas por la invención. Así una variante funcionalmente equivalente de la proteína nativa tendrá una actividad biológica suficiente para ser terapéuticamente útil por "terapéuticamente útil" se entiende efectivo para
20 lograr una meta terapéutica como, por ejemplo, curar una herida.

Los métodos están disponibles en la técnica para determinar la equivalencia funcional. La actividad biológica se puede medir utilizando ensayos específicamente diseñados para medir la actividad de la proteína nativa. Adicionalmente, los anticuerpos generados contra la proteína nativa biológicamente activa pueden ser probados por su capacidad
25 para unir el análogo funcionalmente equivalente, donde la unión efectiva es indicativa de una proteína que tiene una conformación similar a aquella de la proteína nativa.

Los métodos de la presente invención suministran la separación mejorada y la purificación de las isoformas de las proteínas rPDGF, más particularmente aquellas isoformas que resultan del procesamiento endoproteolítico post-transduccional del rPDGF. El rPDGF cuyas isoformas se separan pueden ser el PDGF-BB homodímero o el PDGF-AB heterodímero. En una modalidad preferida, las isoformas de la proteína PDGF humano recombinante (rhPDGF) se separan y purifican utilizando los métodos de la invención.

35 La secuencia de nucleótido que codifica la proteína rPDGF cuyas isoformas se separan utilizando los métodos de la presente invención pueden ser un cADN genómico o una secuencia de ADN sintética. Los genes que codifican las formas nativas de PDGF han sido secuenciados, y varios análogos son bien conocidos en la técnica. La expresión de los homodímeros y heterodímeros PDGF se describen en, por ejemplo, las Patentes U.S Nos. 4,766,073; 4,769,328; 4,801,542; 4,845,075; 4,849,407; 5,045,633; 5,128,321; y 5,187,263. Con base en las secuencias de aminoácidos conocidas para los polipéptidos de cadena A y B, las secuencias de nucleótidos sintéticas que codifican los polipéptidos de cadena A y cadena B de PDGF pueden ser hechos *in vitro* utilizando métodos disponibles en la técnica. Ver particularmente Sambrook *et al.* (1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor, New York). Donde la proteína PDGF recombinante de interés es el rhPDGF-AB heterodímero, la secuencia de nucleótido que codifican los polipéptidos precursores híbridos que comprenden los polipéptidos de la cadena A y B se pueden ensamblar como partes de un cartucho de expresión o ensambladas en cartuchos de expresión separados para la contra-transformación
45 de una célula huésped.

La secuencia de nucleótido que codifica una proteína PDGF recombinante de interés se puede expresar en un sistema de expresión adecuado para la posterior separación y purificación de las isoformas de interés de acuerdo con los métodos de la presente invención. Los métodos están disponibles en la técnica para expresar las proteínas heterólogas, más particularmente para expresar los homodímeros y los heterodímeros PDGF en bacterias (ver, por ejemplo, Hoppe *et al.* (1990) Eur. J. Biochem 187:207-214; Fretto *et al.* (1993) J. Biol. Chem. 268:3625-3631), yeast (Kelly *et al.* (1984) EMBO J. 4:33993405; Ostman *et al.* (1989) Growth Factors 1: 271-281); y mammalian cells (ver, por ejemplo, Ostman *et al.* (1988) J. Biol. Chem. 263: 16202-16208). Ver también EP 177,957; Patente U.S No 5,219,759. Los métodos de la presente invención se pueden practicar con el rPDGF producido en cualquier sistema
55 huésped donde el procesamiento endoproteolítico post-transduccional conduce a un producto rPDGF secretado que comprende una mezcla de isoformas.

Los problemas con el procesamiento endoproteolítico post-transduccional y la generación de isoformas son frecuentemente encontradas en el rPDGF producida en una célula huésped. Por "levadura" se entienden levaduras ascosporogenas (Endomycetales), levaduras basidiosporogenas, y levaduras que pertenecen a los hongos imperfectos (Blastomycetes). Las levaduras de ascosporogenas se dividen en dos familias, Spermophthoraceae y Saccharomycetaceae. La última está comprendida de cuatro subfamilias, Schizosaccharomycoideae, (por ejemplo el género Schizosaccharomyces), Nadsonioideae, Lipomycoideae, y Saccharomycoideae (por ejemplo, los géneros Pichia, Kluyveromyces, y Saccharomyces). Las levaduras de basidiosporogenas incluyen en los géneros Leucosporidium, Rhodosporidium, Sporidiobolus, Filobasidium, y Filobasidiella. La levadura que pertenece a los surcos imperfectos se divide en dos familias, Sporobolomycetaceae (por ejemplo, los géneros Sporobolomyces, Bullera) y Cryptococcaceae (por ejemplo el género Candida). De particular interés para la presente invención son las especies dentro del género Pichia, Kluyveromyces, Saccharomyces, Schizosaccharomyces, y Candida. De particular interés son las especies de

Saccharomyces S. cerevisiae, S. carlsbergensis, S. diastolicus, S. douglasii, S. kluyveri, S. norbensis, y S. oviformis. Las especies de particular interés en el genero *Kluyveromyces* incluyen *K.lactis*. En razón a que la clasificación de la levadura puede cambiar en el futuro, para los propósitos de ésta invención, la levadura se debe definir como se describieron en Skinner *et al.*, eds. (1980) *Biology and Activities of Yeast* (Soc. App. Bacteriol. Symp. Series No 9). Además de lo anterior, aquellos expertos en la técnica están presumiblemente familiarizados con la biología de las levaduras y la manipulación de la genética de las levaduras. Ver, por ejemplo, Bacila *et al.*, eds (1978) *Biochemistry and Genetics of Yeast*; Rose and Harrison, eds. (1987) *The Yeasts* (2nd ed.); Strathern *et al.*, eds. (1981) *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces*.

La selección de la levadura adecuada y otros huéspedes microorganismos para la expresión de las proteínas heterólogas son del conocimiento del experto. Cuando se seleccionan las levaduras huéspedes para expresión, los huéspedes adecuados pueden incluir aquellas mostradas por tener, entre otros, buena capacidad de secreción, baja productividad proteolítica, y una robustez total. La levadura y otros microorganismos están generalmente disponibles de una variedad de fuentes, que incluyen el Centro de Almacenamiento Genético de Levaduras, Departamento de Biofísica y de Física Medica. Universidad de California, Berkeley, California; y el American Type Cultura Collection, Rockville, Maryland.

Los métodos para la expresión del rPDGF en un huésped de levadura están disponibles en la técnica. Uno de tales métodos comprende transformar una célula huésped de levadura con un vector de expresión de plásmido que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el PDGF-BB humano. Este método se describe en resumen en el Ejemplo 1 de aquí.

Cuando se expresa en un huésped de levadura, el rPDGF se secreta como una mezcla de complejo de las isoformas estructurales que resultan del procesamiento post-transduccional de la proteína durante el proceso de producción de fermentación. El procesamiento post-transduccional es particularmente prevalente en la expresión del rPDGF-BB. Estas isoformas estructurales tienen grados variantes de actividad biológica, como se demuestra utilizando los ensayos estándar de la actividad PDGF. Los métodos de la invención están dirigidos a la separación de estas isoformas estructurales de tal forma que una composición farmacéutica final que comprende las isoformas sustancialmente purificadas de la actividad biológica más grande se puede preparar. Estos métodos son útiles para separar las isoformas del rPDGF-AB, y más particularmente las isoformas del rPDGF-BB.

El PDGF-BB recombinante producido en una célula huésped de levadura se secreta como una proteína homodimérica biológicamente activa completamente doblada que consiste de dos pares anti-paralelos altamente entorchados de las cadenas B (Oefner *et al.* (1992) *EMBO J.* 11"3921-3926). Cada cadena B comprende residuos de 109 aminoácidos. Durante la fermentación para producir la sustancia de fármaco en masa, varias modificaciones post-transduccionales ocurren o le ocurren al rPDGF-BB secretado. Esto da como resultado una sustancia de fármaco en masa que comprende la proteína rPDGF que tiene una heterogeneidad estructural considerable. Tales modificaciones incluyen, pero no están limitadas a la digestión endoproteolítica entre los residuos Arg-32 y Thr-23 (denominada como "enganche") y en la remoción exoproteolítica de los aminoácidos C-terminales (denominada como "truncamiento") en el Arg-32 y el Thr-109, la glicosilación de los residuos Ser y/o Thr, y la oxidación de la metionina. Estas modificaciones post-transduccionales conducen a un número de formas estructurales, o las así llamadas isoformas del rPDGF-BB presente en el producto secretado. La heterogeneidad estructural del producto de levadura rPDGF-BB es además complicada por la presencia de un enlace rígido Pro-Pro en los residuos 41 y 42. La rotación de este enlace rígido se impide además por su proximidad a un enlace disulfuro y a una cadena lateral en masa de Trp-40. El impedimento rotacional conduce a la formación de isómeros cis-trans estables de rPDGF-BB a temperatura ambiente. Aunque existen numerosas isoformas potenciales cuando se consideran las combinaciones múltiples de las modificaciones post-transduccionales y de la isomerización Pro-Pro, las isoformas que resultan del enganche y el truncamiento post-transduccional son de interés principal para la presente invención.

El procesamiento endoproteolítico post-transduccional y el enganche entre el Arg-32 y el Thr-33 conduce a tres isoformas básicas diferentes y distintas del rPDGF-BB: intacta, enganche único, y doble enganche. Por "intacto" se entiende tanto las cadenas B que permanecen intactas y no están proteolíticamente clivadas. Por "enganche único" se entiende una cadena B que está intacta y una cadena B que es endoproteolíticamente clivada entre el Arg-32 y el Thr-33. Por "doblemente enganchada" se entiende que ambas cadenas B son o están proteolíticamente clivadas entre Arg-32 y Thr-33. Cada isoforma respectiva puede adicionalmente ser modificada por el truncamiento C-terminal del Arg-32 o el Thr-109, que produce un número conocido de especies estructurales derivadas de cualquier isoforma básica. Así, para la isoforma intacta, el truncamiento C-terminal puede ocurrir solamente en el residuo 109, conduciendo a tres especies estructurales diferentes de esa isoforma. Para la isoforma de enganche único, el truncamiento C-terminal de ambos residuos 32 y 109 puede producir ocho especies estructurales diferentes de esa isoforma. Para la isoforma de enganche doble, diez especies estructurales de esa isoforma son posibles. Todo junto, en los procesos post-transduccionales del enganche seguido por el truncamiento C-terminal de los residuos Arg-32 o Thr-109 conducen a una mezcla de complejo de veintiuna isoformas estructurales posibles del rPDGF-BB en la sustancia de fármaco en masa, como se ilustra esquemáticamente en las figuras 1-3.

Los métodos de la invención están dirigidos a la separación de las isoformas básicas designadas como los isómeros intactos, de enganche único, o de enganche doble del rPDGF-BB cada uno de los cuales comprende un número conocidos de especies estructurales derivadas que resultan del truncamiento de los residuos Arg-32 y Thr-109. Se ha determinado que la isoforma intacta tiene una actividad 100% mitogénica, la isoforma de enganche único tiene

ES 2 306 462 T3

120% de actividad mitogénica y la isoforma de enganche doble tiene 20% de actividad mitogénica. La muestra de referencia exhibe el 50% de actividad. De acuerdo con esto, utilizando los métodos de la invención se pueden obtener composiciones que tienen por lo menos aproximadamente 20% o más, preferiblemente por lo menos aproximadamente 50% o más, más preferiblemente por lo menos aproximadamente 100% más de actividad PDGF que la del cultivo de células no purificado. Así, para los propósitos de preparar las composiciones rPDGF-BB farmacéuticas que tienen uso como agente terapéutico para el tratamiento de heridas, es claramente deseable separar estas isoformas de tal forma que las composiciones farmacéuticas comprenden isoformas intactas y/o de enganche único de los métodos rPDGF-BB. Los métodos de la invención posibilitan la preparación de tales composiciones farmacéuticas al suministrar la separación de las isoformas intactas y de enganche único de la isoforma de doble enganche del rPDGF-BB de la sustancial de fármaco en masa producida por fermentación.

Los métodos de la invención utilizan enriquecimiento de intercambio de ión, cromatografía líquida de alta presión de fase inversa, y electroforesis de zona capilar de carga inversa. El primero de estos métodos está dirigido a la separación de los isómeros intactos, de enganche único y de enganche doble del rPDGF, particularmente el rPDGF-BB, donde la separación es ha un grado de purificación apropiado para el uso terapéutico del rPDGF. De ésta manera, este método es apropiado para la separación de estos isómeros para el uso en la producción de una composición farmacéutica que comprende rPDGF intacto sustancialmente purificado, de enganche único, o intacto de enganche único, particularmente rPDGF-BB. El segundo y tercer método, aunque suministra medios para la separación de los isómeros intacto, de enganche único, y de enganche doble, son principalmente útiles para medios analíticos, como se describe adelante.

Las isoformas intactas y de enganche único del rPDGF-BB se pueden separar mediante enriquecimiento de intercambio de ión de la isoforma de enganche doble a un grado de purificación apropiado para el uso terapéutico del rPDGF-BB. Un fármaco en masa que comprende el rPDGF-BB biológicamente activo se puede enriquecer en las isoformas rPDGF-BB intactas sustancialmente purificadas y de enganche único al separar estas isoformas de la isoforma de enganche doble utilizando cromatografía de intercambio de catión y una columna de sulfopropilo TSK (TSK SP). La sustancia de fármaco en masa producida por fragmentación, que comprende todas las tres isoformas, es corrida sobre la columna, y las isoformas deseadas son eluidas con solución de NaCl. La isoforma de doble enganche se eluye en fracciones más tempranas, seguida por las isoformas de enganche único e intacta. La remoción de la fracción eluida que comprende la isoforma de doble enganche permite la recolección subsecuente o la recolección posterior de las fracciones que eluyen las isoformas de enganche único e intacta. Estas fracciones se pueden utilizar separadamente, o juntas para producir una composición que comprende la isoforma intacta aislada, la isoforma de enganche único, o una mezcla de las isoformas intacta y de enganche único del rPDGF-BB.

La cromatografía líquida de alta presión de fase inversa (RP HPLC) es un método útil para separar ciertas isoformas de una preparación de proteína dimérica que tiene múltiples isoformas, donde por lo menos una isoforma tiene dos diferentes caras. Por "caras" se entiende el término utilizado en el contexto de RP HPLC donde cada cadena de polipéptido de una proteína dimérica es una "cara" de la molécula. Para los homodímeros, como el PDGF-BB, donde dos cadenas son idénticas y no tiene modificaciones que hacen una cara diferente de la otra, la molécula tiene solo una cara. Sin embargo, donde la molécula tiene, como en el caso del rPDGF-BB, una cadena que es endoproteolíticamente clivada sobre una de las cadenas, hace así una isoforma de enganche único, el dímero resultante tiene dos caras: la cara de la cadena no enganchada y la cara de la cadena enganchada. El heterodímero tiene naturalmente dos caras. Por ejemplo, en el caso del heterodímero rPDGF-AB la cadena A es una cara y la cadena B es otra.

Para los propósitos de la presente invención, el RP HPLC conducido a alta temperatura se utiliza para separar las isoformas intacta, de enganche único, y de enganche doble del rPDGF-BB. De acuerdo con la presente invención, el métodos RP HPLC se conduce a una temperatura entre aproximadamente 75°C como mínimo y aproximadamente a 90°C como máximo, y más preferiblemente la temperatura es de aproximadamente 85°C, para la separación de las isoformas rPDGF-BB. El método RP HPLC de la invención puede además incluir utilizando una combinación isocrática/gradiente de etapa de acetonitrilo.

Antes de la presente solicitud del RP HPLC de alta temperatura para analizar y separar las isoformas del rPDGF-BB, se había notado por los investigadores la producción de PDGF-BB en *E. Coli* y analizarlo mediante RP HPLC que por lo menos cuatro picos fueron rutinariamente observados en los cromatogramas resultantes (ver Watson y Kenney (1992) *J. Chromatography* 606:165-170). Se estableció que estos picos eran debidos a diferencias en la hidrofobicidad expuesta originada por las secuencias pro-pro en el residuo 41 y 42 (Watson y Kenney (1992) *J. Chromatogr.* 606:165-170) y medir así los conformadores pro-pro. Adicionalmente, el rPDGF-BB expresado en *Saccharomyces cerevisiae* de levadura exhibe múltiples conformadores que producen amplios perfiles heterogéneos cromatográficos cuando se analizan con RP HPLC a varias temperaturas ambientales y sub-ambientales como se describe en el Ejemplo 3 de adelante. El análisis y la separación del rPDGF-BB mediante RP HPLC a estas temperaturas es complicado por las isomerizaciones pro-pro dentro de la molécula. Adicionalmente, la cromatografía de absorción no puede resolver simultáneamente el enganche y truncamiento a las caras opuestas de la proteína homodimérica bajo estas condiciones.

Cuando se conduce a alta temperatura de acuerdo con la presente invención, el análisis RP HPLC acelera el equilibrio de la isomerización Pro-Pro, así como también se acelera la tasa de desorción. Como resultado, no se observa el fenómeno de los múltiples conformadores Pro-Pro. Así, el número de isoformas potencialmente resuelta se puede reducir a veintiuno estructuras descritas anteriormente como las isoformas intacta, de enganche único, y

ES 2 306 462 T3

de enganche doble y sus especies exoproteolizadas. Adicionalmente, cuando el análisis RP HPLC se lleva a cabo a aproximadamente 85°C, la heterogeneidad que resulta de las modificaciones post-transduccionales debido al enganche y truncamiento que ocurre en ambas caras de la molécula dimérica se puede resolver.

5 Una combinación isocrática/gradiente de etapa también se pueden emplear además de la alta temperatura para mejorar la separación de las isoformas, simplificando así grandemente el perfil cromatográfico. Utilizar el método RP HPLC de alta temperatura y un isocrático/gradiente de etapa suministra la separación de las isoformas del rPDGF-BB predominantemente sobre la base del enganche, facilitando el análisis y la separación de las isoformas intactas, de enganche único, y de doble enganche del rPDGF-BB. Los métodos para conducir un isocrático/gradiente de etapa
10 están disponibles en la técnica.

Las cantidades de las isoformas intactas, de enganche único, y de enganche doble del rPDGF-BB se pueden separar de una sustancia de fármaco en masa que comprende una mezcla de las isoformas rPDGF utilizando el método RP HPLC a alta temperatura y un isocrático/gradiente de etapa de acetonitrilo de acuerdo con la presente invención. Estas
15 isoformas se pueden purificar del acetonitrilo y el disolvente TFA y los componentes amortiguadores. La purificación se logra utilizando medios estándar para la remoción de proteínas de tales disolventes. Por ejemplo, la diálisis se utiliza tubos pequeños, o para grandes cantidades que utilizan fibras de diálisis de flujo continuo, se pueden conducir para producir un producto adecuado para el uso como un agente terapéutico.

20 Las isoformas rPDGF-BB purificadas obtenidas de acuerdo con este método de la invención son útiles para conducir los ensayos de actividad biológica para determinar la actividad biológica relativa de las isoformas purificadas. En el caso del rPDGF-BB, un ensayo mitogénico para determinar la actividad biológica de una sustancia de fármaco en masa comprende por lo menos una isoforma del rPDGF-BB se puede conducir como se describió en el Ejemplo 5 descrito aquí.

25 Aunque el método RP HPLC a alta temperatura de la presente invención es útil para separar las cantidades de isoformas del rPDGF-BB suficiente para analizar la actividad biológica de las isoformas individuales, el métodos no es adecuado para análisis de rutina y cuantificación de las isoformas intacta y enganchada de una sustancia de fármaco en masa. El tercer método de la invención, la electroforesis de zona capilar de carga inversa (RC CZE) se desarrollo
30 para suministrar tal cuantificación y análisis de rutina.

El CZE de carga inversa de la presente invención se desarrollo originalmente para monitorear la heterogeneidad de carga en razón a que el punto isoeléctrico extremadamente alto (pI=10.5) de la molécula rPDGF-BB precluyo el uso del análisis de enfoque isoeléctrico convencional (IEF). Sin embargo, el uso de geles IEF pI para molde manual muy
35 alto puede ser posible.

La separación mediante RC CZE está basada en una proporción carga/tamaño. Así, con respecto al rPDGF-BB de la presente invención, el truncamiento del residuo base Arg-32 tiene un mayor efecto sobre la selectividad del ensayo RC CZE que el truncamiento del residuo del aminoácido neutro Thr-109. En razón a que el truncamiento del residuo
40 Thr-109 no altera apreciablemente la carga o el tamaño de la proteína, no existe separación entre las tres posibles categorías de isoformas dentro de la isoforma intacta. La separación de la línea base observada entre la isoforma intacta y la isoforma de enganche único se puede deber a un incremento en el tamaño hidrodinámico de la isoforma de enganche único, el cual puede ocurrir a través de la desnaturalización parcial de la estructura secundaria. Dentro de la isoforma de enganche único, la separación de dos especies (una sin el truncamiento C-terminal del Arg-32 y la otra con
45 aquel truncamiento) se debe a la disminución en la carga de las especies de la isoforma resultante del truncamiento del terminal C del Arg-32. Dentro de las isoformas de doble enganche se pueden distinguir tres isoformas; la separación de ellas se puede deber a la diferencia de carga resultante del truncamiento del terminal C único o doble del Arg-32.

El método RC CZE descrito así de lejos es incapaz de distinguir entre, y así separar, las isoformas de enganche
50 único que tienen el truncamiento Arg-32 y las isoformas de doble enganche que no tiene el truncamiento Arg-32. Con el fin de separar estas dos categorías de isoforma, y con el fin de cuantificar las isoformas intactas, de gancho único, y de gancho doble, el método RC CZE de la presente invención comprende así tratar la sustancia de fármaco de masa que comprende las varias isoformas rPDGF-BB con la carboxipeptidasa B antes del análisis. Esta enzima es específica para los aminoácidos básicos arginina y lisina localizados en el terminal carboxi. El tratamiento de enzima convierte
55 las isoformas de enganche único que no tienen el truncamiento Arg-32 a isoformas de enganche único que tienen el truncamiento Arg-32 y convierte las isoformas de doble enganche que no lo tienen, a solamente una, el truncamiento Arg-32 a isoformas que tiene dos truncamientos Arg-32. Así, el tratamiento de la sustancia de fármaco en masa PDGF-BB con la carboxipeptidasa B simplifica el electroferograma RC CZE y permite la cuantificación de las tres isoformas del rPDGF-BB como se definió por el enganche entre el Arg-32 y el Thr-33 (las isoformas denominadas como intactas,
60 de enganche único, y de enganche doble).

El método RC CZE análisis del PDGF-BB tal como se modificó en la presente invención para aislar el intacto, enganche único y de enganche doble mediante el uso de carboxipeptidasa B, es útil para cuantificar en un contexto de control de calidad, para el análisis de una sustancia de fármaco en masa que comprende las isoformas rPDGF-BB
65 descritas aquí. La ventaja del uso del RC CZE para analizar el PDGF-BB en un contexto de control de calidad es la facilidad y la precisión lograda mediante este método, lo cual hace un método apropiado para tales actividades de rutina del análisis como se requiere en el control de calidad de las sustancias de fármaco en masa.

Así los métodos de la invención son útiles para analizar y separar las isoformas intacta, de enganche único, y de doble enganche del rPDGF-BB. Luego de la separación del intacto deseado, enganche único, o mezcla de las isoformas intacta y de enganche único del rPDGF-BB, se puede remover el amortiguador contaminante u otras impurezas donde sea necesario para producir las composiciones que comprenden las isoformas sustancialmente purificadas de interés.

5 Estas composiciones se pueden preparar para utilizarse como un agente terapéutico como se describe adelante. Por "agente terapéutico" se entiende un agente que logra una meta terapéutica, como por ejemplo, la curación de una herida.

10 Las composiciones que comprenden el intacto sustancialmente purificado, el intacto único, o una mezcla de las isoformas intacta y de enganche único del rPDGF-BB son útiles como agentes terapéuticos en el tratamiento de heridas, particularmente aquellas heridas que son normalmente reparadas en respuesta a la liberación del PDGF nativo.

15 La liberación del PDGF *in vivo* actúa como un agente quimiotáctico para atraer monocitos, fibroblastos, y células de músculo liso al sitio del daño, para iniciar la replicación celular para los propósitos de reparación de herida. Este factor de crecimiento ha mostrado que promueve la curación de las heridas de incisión en ratas y la curación en regiones del cuerpo tal como las cámaras o el espacio subcutáneo. Así el PDGF tiene aplicación en la curación de tales heridas como úlceras, quemaduras e injertos de piel. Además, el PDGF se puede utilizar para curar heridas que resultan de tejido conectivo dañado, cuya reparación requiere la proliferación de fibroblastos y la deposición de colágeno. Además, cuando la curación de herida se retarda por cualquier número de factores que incluyen, pero no están limitado a edad avanzada, diabetes, cáncer, y tratamiento de fármaco anti-inflamatorios o anti-coagulantes, el PDGF se puede utilizar para promover la curación normal de heridas en mamíferos en situaciones que de otra manera retrasarían en la curación de heridas.

20 La utilidad del factor de crecimiento derivado de plaqueta como un agente terapéutico para la reparación de la quemadura en grosor parcial y total también se ha descrito por Danilenko *et al.* (1995) *Am. J. Pathol.* 147:1261-1277. De ésta manera, el PDGF-BB recombinante induce matriz extra celular marcada y producción de tejido de granulación de tal forma que los defectos de quemadura se reparan.

30 En el contexto de la diabetes, una condición con la complicación de la curación de herida retrasada, se ha postulado que las heridas diabéticas refractarias son el resultado de las deficiencias en los factores de crecimiento y/o las citoquinas que son importantes para el proceso de curación. Algunos estudios preliminares han mostrado que la aplicación de ciertos factores de crecimiento o citoquinas pueden facilitar la curación de heridas, como se describió en Doxey *et al.* (1995) *Life Sciences* 57(11):111-23. En este estudio, el PDGF de ratas diabéticas heridas se produjo a niveles bajos comparado con los animales de control. Estas ratas tenían una producción retrasada de PDGF en las células que circundan las heridas que ocurrían muchos días después de que había ocurrido la herida, posiblemente explicando el retraso en la curación en la herida en mamíferos diabéticos. Así, existe una aplicación potencial de la administración del PDGF-BB en diabéticos para inducir y normalizar la curación de heridas.

40 Los mecanismos de acción del PDGF-BB y los otros dímeros PDGF incluyen el PDGF-AA y el PDGF-AB. Se discuten en general en Lepistö *et al.* (1995) *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 209(2):393-9. Los dímeros PDGF-AA y PDGF-BB sub-regulan tanto los niveles de estado constante del pro-alfa 1 (I) y el pro-alfa 1 (III) de las cadenas de colágeno mRNA y en la producción del colágeno tanto de manera dependiente de dosis.

45 Adicionalmente, las composiciones que comprenden el PDGF pueden facilitar la curación de los huesos dañados o desgastados al promover el crecimiento del tejido conectivo, el crecimiento del hueso y el cemento, y mediante la estimulación de proteína y síntesis de colágeno en la región del hueso dañado, especialmente como en el caso, por ejemplo, de la enfermedad periodontal (ver WO 88/03409).

50 Las composiciones que comprende el PDGF pueden suministrar la curación rápida, efectiva de tales heridas como, por ejemplo, úlceras por cama, laceraciones, y quemaduras, como se describió en la WO 91/15231 y la US 5,019,559, donde el PDGF en una composición con el factor de crecimiento similar a insulina (IGF) promueve un incremento en el tejido conectivo y un incremento en el crecimiento del tejido epitelial.

55 Las composiciones que comprenden el PDGF se pueden administrar en una formulación de gel, y tal formulación es adecuada para la administración tópica para promover la curación de heridas y las condiciones tales como úlceras, heridas superficiales, y laceraciones, abrasiones, heridas quirúrgicas, quemaduras, y efectos óseos, como se describió en la WO 93/08825.

60 Para uso como un agente terapéutico para el tratamiento de heridas, las composiciones que comprenden las isoformas intactas, el enganche único, o la mezcla de las isoformas intacta y de enganche único del PDGF-BB descritas aquí se pueden administrar tópicamente con un portador farmacéuticamente aceptable apropiado o en una preparación sustancialmente purificada de proteína de tal forma que ésta este libre de las impurezas y elementos que interferirían con el uso terapéutico. Tales preparaciones que son libres de tóxicos, antigénicas, inflamatorias, u otras sustancias deletéreas y que son por lo menos 80% puras son consideradas apropiadas. La concentración de la proteína puede ser desde aproximadamente 1 a aproximadamente 25 pg/ml del volumen total, o pueden estar en un rango tan amplio como aproximadamente 1 ng/ml a aproximadamente 50 ug/ml dependiendo del uso terapéutico para el rPDGF-BB. La cantidad terapéuticamente efectiva suficiente para acelerar la tasa de aparición y el incremento del número de nuevos fibroblastos en el espacio de la herida y estimular la síntesis de ADN en una deposición de colágeno por aquellos

ES 2 306 462 T3

fibroblastos estará en el rango de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 mililitros de la preparación, dependiendo de las características de la herida.

Una composición farmacéutica comprende las isoformas intacta sustancialmente purificada o de enganche único del rPDGF-BB o una mezcla de tales isoformas y un portador farmacéuticamente aceptable apropiado se pueden formular para la administración como un agente terapéutico para el tratamiento de heridas. Los portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser macromoléculas grandes como lentamente metabolizadas tales como proteínas, polisacáridos, ácidos polilácticos, ácidos poliglicólicos, aminoácidos poliméricos, o polímeros de aminoácido, y virus inactivos en partículas. Tales portadores son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica. Las sales farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar aquí, por ejemplo, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromohidratos, fosfatos, sulfatos, y similares; y las sales de los ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos, y similares. Los portadores farmacéuticamente aceptables en las composiciones terapéuticas pueden contener líquidos tales como agua, solución salina, glicerol y etanol. Adicionalmente, las sustancias auxiliares, tales como los agentes humectantes o emulsificantes, las sustancias amortiguadoras de pH, y similares, pueden estar presentes en tales vehículos.

El método para formular la composición farmacéutica es conocido generalmente en la técnica. Una discusión completa de la formulación y la selección de los portadores, estabilizadores, e isomolitos farmacéuticamente aceptables, se puede encontrar en Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th edition (Mack pub. Co., Eaton, Pennsylvania, 1990).

Típicamente, las composiciones farmacéuticas terapéuticas se preparan como inyectables, bien sea como soluciones o suspensiones líquidas. Las formas sólidas adecuadas para la solución en, o la suspensión en, vehículos líquidos antes de la inyección también se pueden preparar. Los liposomas están incluidos dentro de la definición de un portador farmacéuticamente aceptable. Algunas composiciones de liposoma se describe en la Patente U.S No 5,422,120; la WO 95/13796; la WO 94/23697; la WO 91-14445; y la EP 524,968 B1.

La administración de la composición farmacéutica terapéutica PDGF-BB puede ser mediante cualquier medio y cualquier localización en el cuerpo del animal que es tratado como es apropiado para una herida que está siendo tratada. Así, el PDGF-BB se puede administrar, por ejemplo, parenteral o tópicamente. La administración parenteral puede incluir inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial, intramuscular, o inyección directa a una región u órgano del cuerpo.

Los siguientes ejemplos se ofrecen por vía de ilustración y no por vía de limitación.

Ejemplo

Ejemplo 1

Preparación de una sustancia de fármaco en masa PDGF-BB

El PDGF-BB humano recombinante (rhPDGF) se produjo por una cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* genéticamente modificada con un plásmido de expresión de levadura multicopia que incluye un gen que codifica la cadena de polipéptido PDGF-B humana madura.

La cepa de *S. cerevisiae* MB2-1 se desarrollo para contener el genotipo: *Mata*, *ura3* Δ , *leu2-3*, *leu2-112*, *his3-11*, *his3-15*, *pep4* Δ , [*cir*^o]. Esta es auxotrófica para uracilo, leucina e histidina, requiriendo estos suplementos nutricionales cuando crecen en medio mínimo. El MB2-1 no contiene un plásmido endógeno 2- μ , que tienden a interferir con la estabilidad de los plásmidos introducidos y anima la precombinación entre los plásmidos endógenos e introducidos. La cepa no expresa la protease A funcional, el producto del gen PEP4, que interfiere con la producción de las proteínas heterólogas. El MB2-1 se designó para impartir estas características favorables, que incluyen la selección para la alta expresión de proteínas heterólogas.

El vector seleccionado para expresar rhPDGF-BB, pAB24, es un vector lanzadera de levadura-bacteria. El plásmido es una quimera de la secuencia de pBR322, derivada de varios plásmidos bacterianos de ocurrencia natural, y las secuencias de plásmido *S. cerevisiae* 2- μ endógeno (Broach (1981) in *Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces* (Cold Spring Harbor Press, New York), 1: 445-470).

El casete de expresión que comprende una secuencia de nucleótido que codifica el rhPDGF-BB estaba ligado en el vector pAB24 para generar el plásmido de expresión de levadura pYL7PPB.

En resumen, el plásmido pYL7PPB incluye un casete de expresión con las siguientes características. La iniciación de la transcripción en la terminación se median mediante el promotor de levadura híbrido inducible ADH/GAP y el terminador transcripcional *Mataa*. El casete incluye además una estructura de lectura abierta que codifica el líder del factor alfa de levadura para mediar la secreción de pro-PDGF-B humano. La secuencia incluida en la construcción de expresión es solamente la secuencia que codifica el propéptido N-terminal nativo; la secuencia del propéptido C-terminal nativo no está incluida en la construcción. La inclusión del polipéptido N-terminal dio como resultado la expresión mejorada del rhPDGF-BB.

ES 2 306 462 T3

Los sitios de procesamiento en el líder del factor alfa truncado/propéptido N-terminal y las uniones del propéptido N-terminal/PDGF-B estaban incluidas para facilitar la producción del polipéptidos rhPDGF-B correctamente procesado por la levadura.

5 El aislamiento del cADN que codifica el hPDGF-B se desarrollo utilizando una librería de cADN preparada de ARN aislado de una línea celular del glioma clonal humano. Los isoformas y las características de este cADN se han descrito en el Westermark *et al*, J. Neurosci Res 8:491 (1982) y el Ponten y Westermark, Med Biol 56:184 (1978). Esta línea celular se utilizó como una fuente de ARN para el aislamiento del gen PDGF en razón a que este había mostrado producir mayores niveles de la actividad de competencia del receptor PDGF que otras líneas celulares probadas.

10 Ejemplo 2

Enriquecimiento de la Sustancia del Fármaco en Masa rhPDGF-BB de las Isoformas de rhPDGF-BB Intactas y de Enganche Único Utilizando la Cromatografía de Intercambio de Catión de Sulfopropilo TSK

15 La elaboración de la sustancia del fármaco en masa rhPDGF-BB se describe en el Ejemplo 1. La meta total de este procedimiento era generar cantidades en miligramos de las isoformas intacta, de enganche único, y de enganche doble del rhPDGF-BB que utiliza cromatografía TSK SP 5PW repetitivo (Tosoh-Haas) del rhPDGF-BB producido en células huésped de levadura, entonces para determinar la actividad biológica relativa de las tres isoformas utilizando el ensayo de mitógeno. En el proceso, se mostró que cuando en lugar de 0 a 1 M de NaCl enunciado en el protocolo de manufactura, el SP TSK 5PW se eluyó con 0 M a 0.6 M de gradiente de NaCl, una porción significativa de la isoforma de doble enganche del rhPDGF-BB apareció fluirse al frente del gradiente, separándose del resto del material. Como la isoforma de doble enganche es por lo menos biológicamente activa (ver ejemplo adelante), podría ser útil incorporar este cambio único (al gradiente de 0-0.6 M en un futuro, proceso de generación secundaria a gran escala.

25 La columna se preparó al empacar 50 ml de TSK SP 5PW ("preswollen" suministrado) en una columna vacía farmacia K 26 (2.5 x 10 cm). La columna empacada se lavó con no menos de 5 volúmenes de columna (c.v.) del amortiguador de carga (0.05M de acetato de Na, pH 4.5). El rhPDGF-BB producido mediante el método del Ejemplo 1, se aplico, y la columna se lavó con no menos de 2 c.v. de amortiguador de carga, y luego 2 c.v. de 0.05M de fosfato de Na pH 7 (con NaOH). El producto se eluyó con un gradiente lineal de 10 c.v. (desde 0 a 0.6M) NaCl (amortiguador B) en 50 mM de fosfato de sodio pH 7.0. El pisco de elusión se fraccionó.

30 En las corridas mostradas aquí, el material de partida fue un grupo final del rhPDGF-BB como se describió en el Ejemplo 1. El material estaba en fosfato de Na a un pH de 6 a 9.9 mg/ml; el pH se ajustó a 4.5 con 1M de NaH₂PO₄. La concentración del rh-PDGF-BB fue el 9 mg/ml después del ajuste del pH, y la conductividad de la carga fue de 1.62 mS/cm a 25°C. Todo el trabajo fue hecho a temperatura ambiente. 477 mg (53 ml) se cargaron sobre la columna a 2 ml/min. La columna se lavó con 2 c.v. de amortiguador de carga (100 ml), y luego el gradiente NaCl de 0-0.6M se aplicó en aproximadamente 10 c.v. (492 ml). 15 fracciones fueron recolectadas, y las fracciones fueron analizadas mediante PAGE(10-20% de Geles de Norex Tricina), y se midieron las absorbencias. La proteína eluyó iniciando en la fracción 28 hasta aproximadamente la fracción 50. Con base en los geles, las fracciones 28-30 fueron agrupadas, eluidas 1:1 con agua destilada (para conseguir la conductividad por debajo suficientemente baja para permitir la unión), reaplicada a la columna SP, y eluida bajo las mismas condiciones. Cuando se analizó mediante el ensayo mitogénico, la carga se mostró por tener 14% de actividad del estándar de referencia, indicando que estas fracciones representaban una gran cantidad de la isoforma de doble gancho. Sin embargo, mediante los geles SDS PAGE podrían no hacerse un análisis suficiente para cuantificar la isoforma dimérica PDGF-BB. Los análisis de estas fracciones mediante el método RC CZE descrito en el Ejemplo 4 indica la extensión de la pureza de las fracciones y ayuda en la elaboración de la evaluación de aquellas fracciones las cuales contienen la isoforma en cantidades relativas. Mediante el A280 los tubos agrupados (28-30) mostraron que eran de aproximadamente 69 mg, o 15% de los 477 mg cargados para la corrida. Los resultados del ensayo mitogénico conducido con este material indica baja actividad y una isoforma de doble gancho. Los análisis de estas fracciones utilizando RC CZE serian entonces apropiados para la determinación inicial de las varias isoformas aisladas, y la cuantificación de las cantidades.

Ejemplo 3

Análisis de RP HPLC de Gradiente Lineal a Alta Temperatura de rhPDGF-BB no Reducido

55 La sustancia de fármaco en masa rhPDGF-BB producida en levaduras como se describió en el Ejemplo 1 se analizó sobre una columna Delta-Pak de 5 micrómetros, 300 Angstrom, (3.9 mmID x 15 cm L) utilizando una bomba de suministro de disolvente Spectra Physics 8800 equipada con un auto inyector WISP 712 y un detector de arreglo de yodo PE 135. La temperatura de columna se controló mediante el uso de un baño de enfriamiento de glicol Nesslab de un bloque de calentamiento de Jones Chromatography. La separación se logró a una tasa de flujo de 1.2 ml/min utilizando 5 a 60% de acetónitrilo/0.1% de gradiente lineal TFA durante 40 minutos.

65 Cuando se analizó el rhPDGF-BB a 5°C, seis picos distintos con varios hombros más pequeños fueron resueltos. En la medida en que la temperatura se incrementaba (5°C, 20°C, 33°C, 60°C), el perfil se volvía menos definido. Sin embargo, a 60°C el pico se volvió más resuelto aunque los hombros aun estaban presentes. El doble pico tempranamente eluido (24 minutos) observado en el perfil de 5°C desapareció en la medida en que la temperatura se incrementaba. Para caracterizar adicionalmente los diferentes picos generados a 5°C, el rhPDGF-BB fue fraccionado semi-preparativamente. Estas fracciones se analizaron mediante RP HPLC y cada fracción recromatografiada, resultando en un perfil

ES 2 306 462 T3

que despegaba cantidades significativas de la proteína presente en otras fracciones. Así, es evidente que un equilibrio lento pero reversible existe entre las isoformas separadas a 5°C que resultan de la interconversión de los conformadores rhPDGF-BB. La isomerización del enlace Pro-Pro es probablemente responsable por el equilibrio lento observado entre los conformadores rhPDGF-BB.

5 El análisis RP HPLC del rhPDGF-BB no reducido fue entonces desarrollado utilizando una columna de fase inversa Zorbax 300SB-C18 (4.6 mm ID x 25 cm L) mantenida a 85°C utilizando un gradiente de TFA/acetonitrilo lineal. Este método resolvió las veintiún isoformas enganchadas y truncadas predichas del rhPDGF-BB, las cuales son agrupadas en tres grupos principales (intacto, enganche único, y enganche doble). Las fracciones recolectadas a través de cada grupo fueron analizadas utilizando RP HPLC del rhPDGF-BB reducido. Los resultados indicaron que los picos múltiples en cada grupo son debido a diferentes niveles de truncamiento C-terminal del Arg-32 y el Thr-109. Intentos adicionales por mejorar la separación de la isoforma enganchada e intacta de estos tres grupos no fueron exitosos utilizando un gradiente lineal. Así, la alta temperatura a un gradiente lineal de RP HPLC fue capaz de resolver la heterogeneidad que resulta de las modificaciones post-transduccionales debido al enganche y truncamiento que ocurre en ambas caras de la molécula, y el fenómeno de los conformadores Pro-Pro múltiples no se observó a alta temperatura.

Una combinación isocrática/gradiente de etapa fue entonces empleada además de la alta temperatura para mejorar la separación de las isoformas. El gradiente de etapa a alta temperatura resolvió la isoforma de doble enganche a 29% de acetonitrilo, la isoforma de enganche único a 30% de acetonitrilo, y la isoforma intacta a 33% de acetonitrilo. A diferencia del gradiente lineal anterior, las isoformas debido al truncamiento no son resueltas, y así simplificar el perfil grandemente. De acuerdo con esto, la separación de las isoformas del rhPDGF-BB predominantemente sobre la base del enganche se lograron mediante la combinación a alta temperatura del isocrático/gradiente de etapa ya descrito, por lo tanto simplificando el perfil cromatográfico grandemente, y facilitando el análisis y la separación de las isoformas funcionales claves del rhPDGF-BB.

25 Ejemplo 4

Ensayo de Electroforesis de Zona Capilar de Carga Inversa para el rhPDGF-BB que Incluye Pretratamiento con Carboxipeptidasa B

30 Una muestra del rhPDGF-BB recombinantemente producido en la levadura como se describió en el Ejemplo 1 y el material de referencia que tiene una composición conocida de PDGF-BB se ensayo utilizando electroforesis de zona capilar de carga inversa (RC CZE). Las muestras de interés fueron diluidas al correr amortiguador que tiene amortiguador tris a un pH 8.0 a una concentración de 1.0 mg/ml como se determino mediante espectrofotometría. 100 ul de 25 U/ml de carboxipeptidasa B se agregaron a 50 ul de la muestra de prueba. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se agregaron 25 ul de HCl 0.1N. Una tabla de secuencias se preparó sobre una Pantalla de Secuencia Turbochrom. Reactivos desgasificados necesarios para llevar a cabo el ensayo se preparó al colocar 1500 ul de cada una de los siguientes en un tubo de microfuga de polipropileno de 1700 ul separados: IN NaOH, solución regeneradora eCAP™, y 50 mM de amortiguador Tris (pH 8.0). Los tubos fueron micro-centrifugados durante 5 minutos a la configuración más alta disponible de rpm.

El ensayo fue corrido sobre un sistema de electroforesis capilar (BioFocus™ 3000) configurado con la siguiente información: prep 1: NaOH preinyectado, 180 sec; prep 2: AMREGEN preinyectado, 180 sec; prep 3: AMRINSE 180 sec preinyectado; presión: 2 psi*sec; polaridad: neg a pos; voltaje: 15.00 kV; límite de corriente: 50.00 uA; amortiguador de entrada: AMRUN; amortiguador de salida AMRUN; temperatura de cartucho: 25 grados Celsius; tiempo de corrida: 10 min; modo detector programable de longitud de onda único; lamda (nm): 214.

Las muestras fueron cargadas en un BioFocus™ 3000. La detección posibilitada por el pico fue ajustada antes del enjuague en el electroferograma antes del pico de doble gancho y detección de pico deshabilitada se ajustó después de la línea horizontal que sigue al pico rhPDGF-BB intacto. Pero el electroferograma era aceptable si la diferencia en las mediciones de muestra duplicada era menos del 10%.

Los resultados del análisis de los lotes clínicos de rhPDGF-BB mediante RC CZE indicaron las siguientes composiciones de las isoformas intactas, de enganche único, y de enganche doble para los materiales pretendidos para uso comercial:

55

Tanda	Doble enganche	Enganche único	Intacto
1	47%	31%	22%
2	44%	33%	23%
3	45%	33%	22%
4	46%	33%	21%
5	45%	33%	22%
6	45%	32%	23%

60

65

ES 2 306 462 T3

Ejemplo 5

Actividad Mitogénica de las Isoformas de Enganche Único, Enganche Doble e Intacta del rhPDGF-BB

5 La capacidad del PDGF para estimular las síntesis de ADN y el crecimiento celular en el cultivo pueden ser probadas mediante la incorporación de ³H-Timidina en ADN de las células cultivadas que responden al PDGF, y los resultados en la demostración de la actividad biológica del PDGF o las moléculas similares al PDGF. Tal ensayo se describen en la Patente U.S No 4,849,407, y en Cook *et al.* (1992) Biochem. J. 281: 57-65, incorporada aquí como referencia. Este es un ensayo estándar para determinar el beneficio terapéutico potencial del PDGF.

10 El ensayo mitogénico del PDGF, un mitógeno, se cree que representa en la técnica la utilidad potencial como composición farmacéutica. Se ha determinado previamente que los truncamientos C-terminales no tienen ningún efecto sobre la actividad biológica. Se ha determinado que sobre el rango estrecho de la elusión pico, en los componentes de acetonitrilo y ácido trifluoroacético (ACN-TFA) de la cromatografía tuvieron un efecto consistente sobre el ensayo mitogénico.

15 Las formas de enganche único con enganche doble e intactas purificadas del rhPDGF-BB se recolectaron a través de ciclos repetidos de RP HPLC no reducido a alta temperatura. Las formas de enganche único, de enganche doble e intactas se probaron utilizando ensayos de RP HPLC no reducidas y reducidas de alta temperatura, y las purezas se encontraron que eran 95%, 97%, y 95%, respectivamente. Las muestras de cada forma fueron entonces probadas por el ensayo de actividad mitogénica. Todas las muestras fueron ensayadas en triplicado en el mismo ensayo. Las fracciones de cada isoforma fueron recolectadas y se determinó que la isoforma de enganche único tenía 120% de actividad, la isoforma intacta tenía 100% de actividad, y el enganche doble tenía 20% de actividad. La muestra de referencia (el cultivo de célula no purificada que comprende una mezcla de la isoforma intacta, de enganche doble, de enganche doble del rhPDGF-BB) exhibió 50% de actividad. Esto indicó que puede ser deseable remover la isoforma de enganche doble en una sustancia en masa de rgPDGF-BB que se pretende para uso terapéutico.

Ejemplo 6

PDGF-BB para Tratar una Herida

30 Una mezcla de PDGF-BB de las isoformas intacta y de enganche único se prepara en una crema tópica. La aplicación de aproximadamente 50 a aproximadamente 100 mM de la mezcla de PDGF-BB se hace para una herida de tercer grado de una a tres veces al día durante un mes, y hasta que se cura la herida. Los procedimientos de aplicación estándar para vendar las heridas de quemadura se practican para la administración de la quema PDGF-BB a la herida de quemadura.

40 Todas las publicaciones y las solicitudes de patente mencionadas en la especificación son indicativas del nivel de aquellos expertos en la técnica al cual corresponde ésta invención.

45 Aunque la invención anterior se ha descrito algún detalle por vía de ilustración y ejemplo para los propósitos de claridad y entendimiento, será obvio que ciertos cambios y modificaciones se practicaran dentro del alcance de las reivindicaciones finales.

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende dímeros PDGF-BB (rPDGk'-BB) recombinantes biológicamente activos purificados, en donde por lo menos 95% de los dímeros rPDGF-BB son isoformas de enganche único, y en donde los polipéptidos rPDGF-B en los dímeros son los polipéptidos de secuencia nativa o rPDGF-B variantes que exhiben por lo menos aproximadamente 80% de la identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B de secuencia nativa.
- 10 2. Una composición de acuerdo a la reivindicación 1, en donde los polipéptidos rPDGF-B exhiben por lo menos aproximadamente 80% de la identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B humanos de secuencia nativa.
3. Una composición de acuerdo a la reivindicación 1, en donde los polipéptidos rPDGF-B exhiben por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B de secuencia nativa.
- 15 4. Una composición de acuerdo a la reivindicación 3 en donde los polipéptidos rPDGF-B son polipéptidos rPDGF-B de secuencia nativa.
5. Una composición de acuerdo a la reivindicación 4, en donde los polipéptidos rPDGF-B tiene la secuencias de aminoácido de los polipéptidos rPDGF-B humanos.
- 20 6. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde los polipéptidos rPDGF-BB son los productos del sistema de expresión de célula de levadura.
7. Una composición de acuerdo a la reivindicación 6, en donde la célula de levadura es una célula de *Saccharomyces*.
- 25 8. Una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que son una composición farmacéutica adicional que comprende un portador farmacéuticamente aceptable.
- 30 9. Uso de una composición de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la elaboración de un medicamento para uso en el tratamiento de una herida.
10. Uso de acuerdo a la reivindicación 9, en donde dicha herida es una laceración, una quemadura, una úlcera, una herida quirúrgica, un daño óseo, una herida epitelial, o una herida endotelial.
- 35 11. Un método para preparar una composición de acuerdo con una cualquier de las reivindicaciones 1 a 8 de una mezcla de isoformas, dicho método comprende tomar dicha mezcla y utilizar cromatografía de intercambio de ión, cromatografía líquida de alta presión de fase inversa o electroforesis de zona capilar de carga inversa para reducir la cantidad de las isoformas no deseadas en dicha mezcla y obtener así dicha composición enriquecida.
- 40 12. Un método de acuerdo a la reivindicación 11, en donde dicha composición se enriquece en las isoformas de enganche único de la proteína dimérica PDGF-BB (rPDGF-BB) recombinante biológicamente activa.
13. Un método de acuerdo a la reivindicación 11, en donde dicha composición está enriquecida en las isoformas de enganche único de la proteína dimérica rPDGF-BB biológicamente activa.
- 45 14. Un método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde dicha composición comprende por lo menos 95% de los dímeros rPDGF-BB como isoformas de enganche único.
- 50 15. Un método para preparar una mezcla de las isoformas intacta y de enganche único del PDGF-BB de la proteína dimérica (rPDGF-BB) recombinante biológicamente activa de una mezcla de isoformas de dicha proteína obtenida de un cultivo de células, en donde los polipéptidos rPDGF-B en dicha proteína polimérica rPDHGF-B son polipéptidos rPDGF-B de secuencias nativa o variantes que exhiben por lo menos aproximadamente 80% de la identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B de secuencia nativa, dicho método comprende cargar dicha mezcla de isoformas sobre una columna de cromatografía de intercambio de catión de sulfopropilo TSK, lavar dicha mezcla de isoformas de dicha columna con un amortiguador de gradiente lineal, descartar una fracción eluida que comprende una isoforma del gancho doble, y recolectar una fracción eluida que comprende las isoformas intactas y de enganche único.
- 55 16. Un método de acuerdo a una cualquier de las reivindicaciones 11 a 15, en donde los polipéptidos rPDGF-B exhiben por lo menos aproximadamente 80% de identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B humanos de secuencia nativa.
- 60 17. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15, en donde el polipéptido rPDGF-B exhiben por lo menos aproximadamente 95% de identidad de secuencia con los polipéptidos rPDGF-B de secuencia nativa.
- 65 18. Un método de acuerdo a la reivindicación 17 en donde los polipéptidos rPDGF-B son polipéptidos de secuencia nativa.

ES 2 306 462 T3

19. Un método de acuerdo a la reivindicación 18, en donde los polipéptidos rPDGF-B tienen la secuencia de aminoácido de los polipéptidos rPDGF-B humano.

20. Un método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 11 a 19, en donde dicho rPDGF-BB se produce en una célula huésped de levadura.

21. Un método de acuerdo a la reivindicación 20, en donde dicho huésped de levadura es una célula huésped de levadura de *Saccharomyces*.

10

15

20

25

30

35

40

45

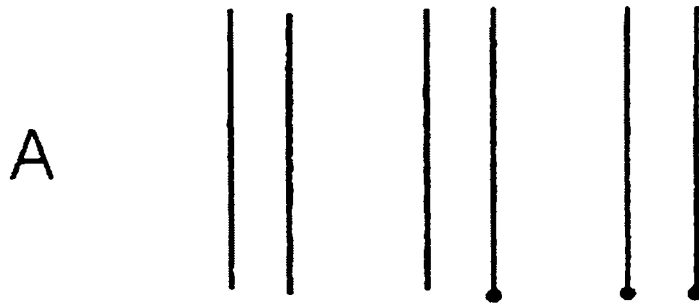
50

55

60

65

Figura 1. Representación esquemática de isoformas de resultado rhPDGF-BB
intacto de truncación de Thr-109



• Truncación Thr-109

Figura 2. Representación esquemática de isoformas de rh-PDGF-BB simples sujetadas que resultan de truncación de Arg-32 y Thr-109

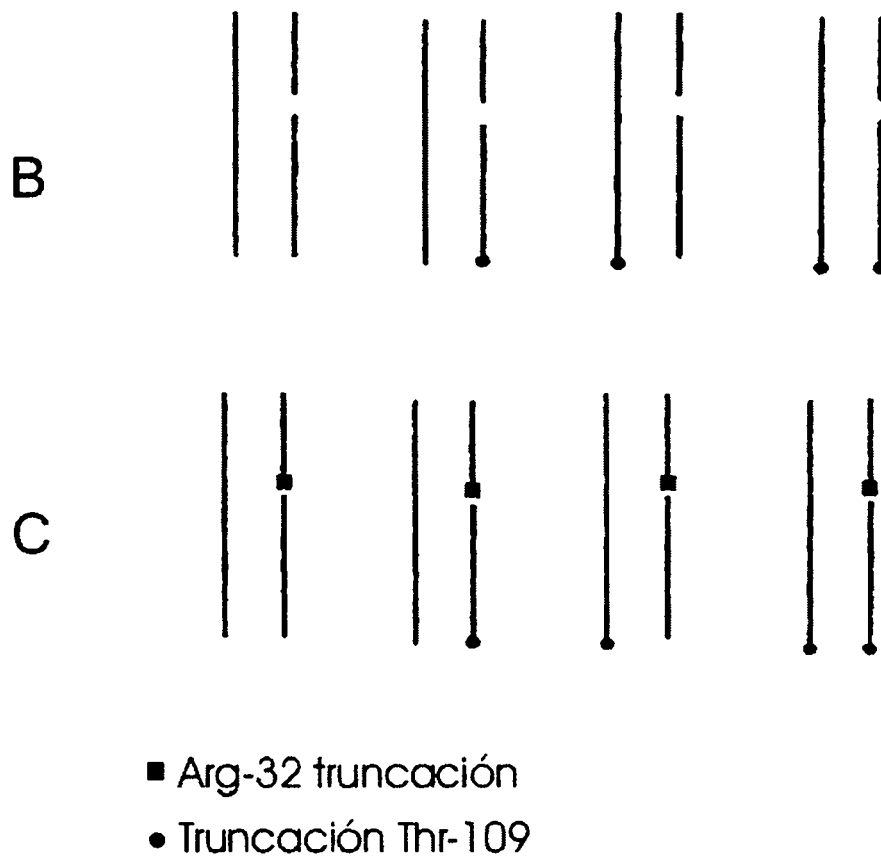
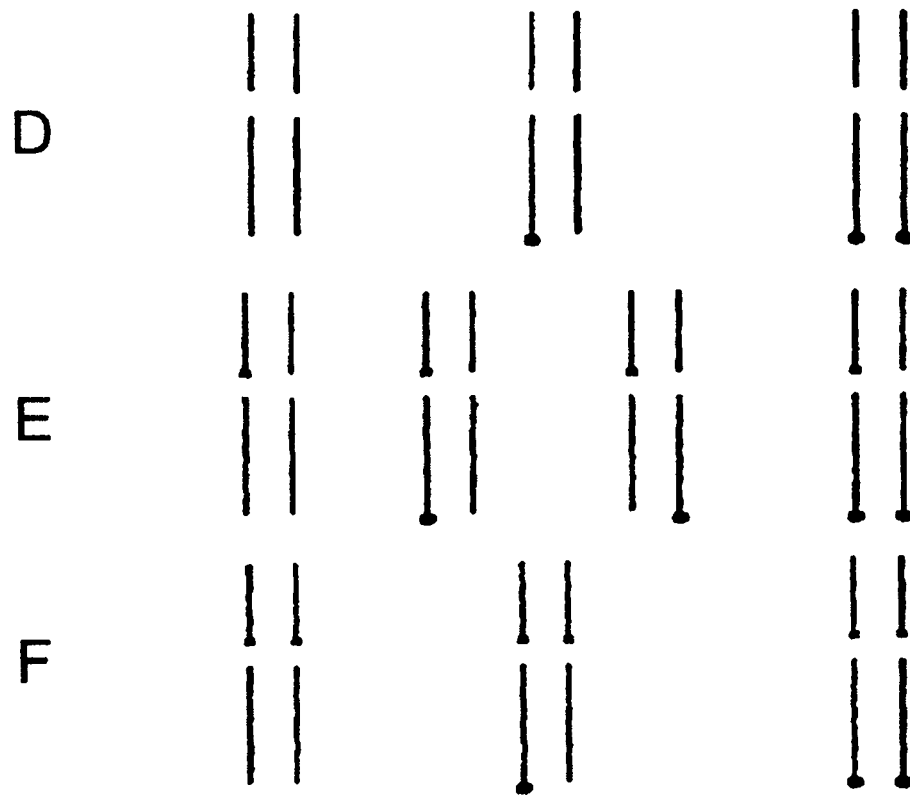


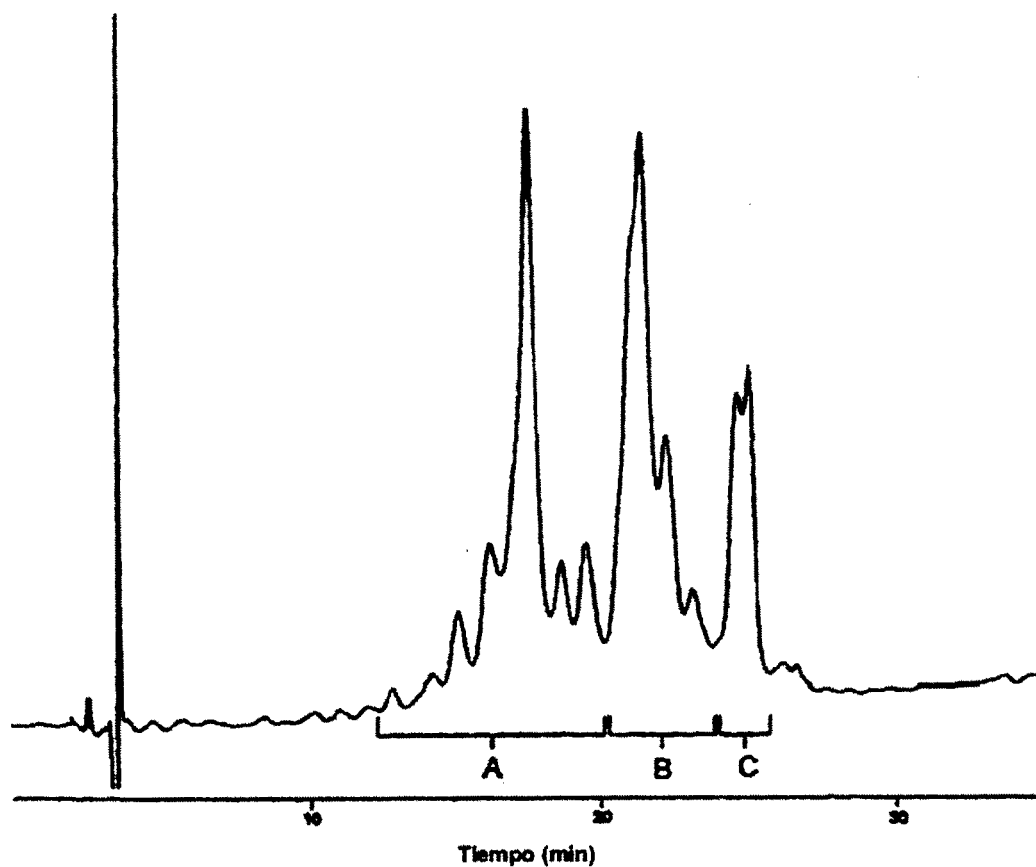
Figura 3. Isoformas de rhPDGF-BB doble sujetadas que resultan de truncamiento de Arg-32 y Tgr-109



- Arg-32 truncación
- Thr-109 truncación

FIGURA 4

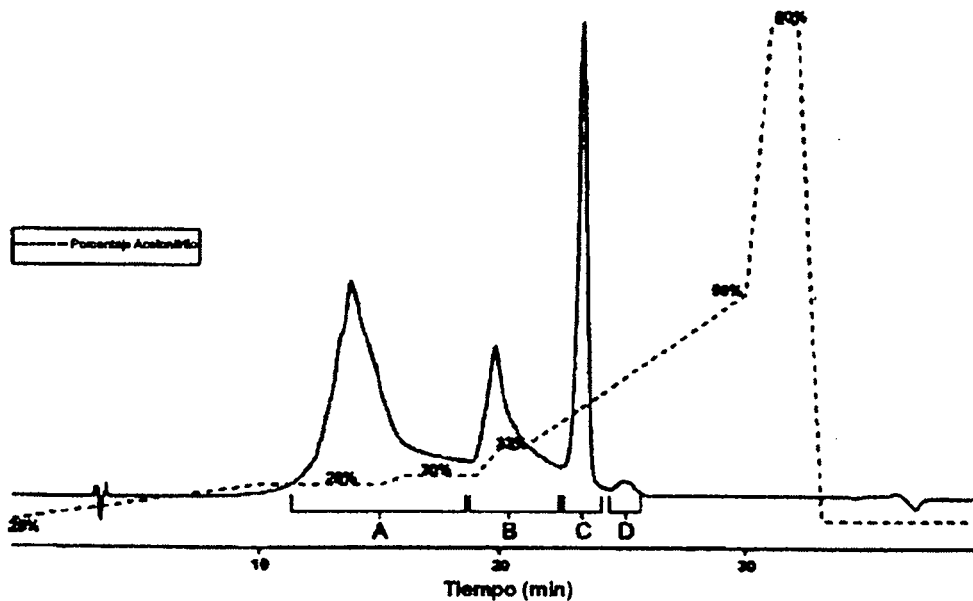
RP-HPLC a alta temperatura de rhPDGF-BB (Lote MPAPK005 Referencia Estándar) usando una Elución de Gradiente Lineal



- A DC e isoformas DC truncadas de rhPDGF-BB
- B SC e isoformas SC truncadas de rhPDGF-BB
- C IN e isoformas IN truncadas de rhPDGF-BB

FIGURA 5

RP-HPLC a alta temperatura de rhPDGF-BB (Lote MPAPK005 Referencia Estándar) usando una Elución de Gradiente Lineal



- A DC e isoformas DC truncadas de rhPDGF-BB
- B SC e isoformas SC truncadas de rhPDGF-BB
- C IN e isoformas IN truncadas de rhPDGF-BB
- D rhPDGF-BB dimero/dimero

FIGURA 6 RC CZE de carboxipeptidasa B tratada rhPDGF-BB

