



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI0621124-0 A2**

(22) Data de Depósito: 19/12/2006
(43) Data da Publicação: 29/11/2011
(RPI 2134)



(51) *Int.Cl.:*
C07K 14/52

(54) **Título:** MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À HEPARINA

(30) **Prioridade Unionista:** 22/12/2005 US 60/753,615, 14/07/2006 US 60/807,432, 14/07/2006 US 60/807,432, 22/12/2005 US 60/753,615

(73) **Titular(es):** Genentech, INC

(72) **Inventor(es):** Charles H. Schmelzer, David W.Kahn, Jeffrey L. Cleland, Marjorie E. Winkler, Michelle D. Butler, Shelly Pizarro

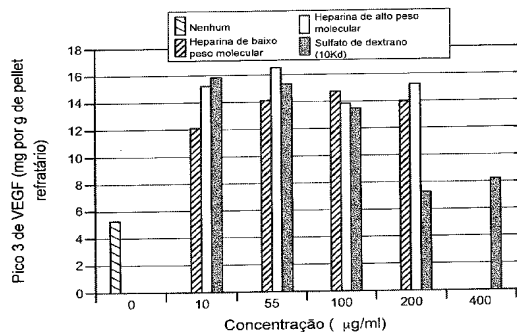
(74) **Procurador(es):** Carolina Nakata

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006062320 de 19/12/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/130154de 15/11/2007

(57) **Resumo:** MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À HEPARINA. A presente invenção refere-se a um processo para recuperação de proteínas de ligação à heparina redobradas produzidas em células hospedeiras heterólogas que inclui a etapa de incubação da proteína solubilizada com um tipo polianiónico, tal como sulfato de dextrano.

Gráfico da tabela 1: Efeito da Heparina e Sulfato de dextrano no redobramento de VEGF



“MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À HEPARINA”

Este pedido reivindica prioridade para e em benefício do Pedido Provisório US 60/753.615, depositado em 22 de dezembro de 2005, e Pedido Provisório US 60/807.432, depositado em 14 de julho de 2006, cujas especificações são integralmente incorporadas ao presente pedido.

CAMPO DA INVENÇÃO

Esta invenção refere-se aos métodos para obtenção de proteínas de ligação à heparina produzidas em cultura celular. A invenção inclui métodos para recuperação e purificação de proteínas de ligação à heparina redobradas que foram produzidas em células hospedeiras procariontes e estão presentes nestas células, tipicamente no espaço periplasmático ou intracelular. As proteínas de ligação à heparina produzidas nas células hospedeiras procariontes podem ser também encontradas como proteínas solúveis ou como uma mistura de proteínas solúveis ou insolúveis.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Sabe-se que uma grande variedade de polipeptídeos ativos biologicamente, que ocorrem naturalmente, se liga à heparina. Tais polipeptídeos que se ligam à heparina incluem citocinas, como fator plaquetário 4 e IL-8 (Barber *et al.*, (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, 286:312-329; Handin *et al.*, (1976) *J. Biol. Chem.*, 251:4273-422; Loscalzo *et al.*, (1985) *Arch. Biochem. Biophys.*, 240:446-455; Zucker *et al.*, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:7571-7574; Talpas *et al.*, (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, 1078:208-218; Webb *et al.*, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:7158-7162) fatores de crescimento de ligação à heparina (Burgess e Maciag, (1989) *Annu. Rev. Biochem.*, 58:576-606; Klagsbrun, (1989) *Prog. Growth Factor Res.*, 1:207-235), como fator de crescimento epidermal (EGF); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento básico de fibroblastos

(bFGF); fator de crescimento ácido de fibroblastos (aFGF); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); e fator de crescimento de hepatócito (HGF) (Liu *et al.*, (1992) *Gastrointest. Liver Physiol.* 26:G642-G649); e selectinas, como L-selectina, E-selectina e P-selectina (Norgard-Sumnicht *et al.*, (1993) *Science*, 5 261:480-483). Ver também, Munoz e Linhardt., (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24:1549-1557.

O documento WO 95/07097 descreve formulações de proteínas de ligação à heparina incluindo fator de crescimento de ligação à heparina como VEGF, com heparina nativa purificada ou outros compostos polianiónicos para uso terapêutico. A heparina derivada de oligossacarídeos e vários outros 10 compostos polianiónicos mostraram estabilizar a conformação ativa para fatores de crescimento de ligação à heparina (Barzu *et al.*, (1989) *J. Cell. Physiol.* 140:538-548; Dabora *et al.*, (1991) *J. Biol. Chem.* 266:23627-23640) e a cromatografia de afinidade em heparina foi empregada em vários esquemas de purificação (ver em geral, o WO 96/02562). 15

Muitas proteínas de ligação à heparina originárias de mamífero foram produzidas por tecnologia recombinante e são clinicamente relevantes (Munoz e Linhardt, (2004) *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 24:1549-1557; Favard *et al.* (1996) *Diabetes and Metabolism* 22(4):268-73; Matsuda *et al.*, 20 (1995) *J. Biochem.* 118(3):643-9; Roberts *et al.*, (1995) *Brain Research* 699(1):51-61). Por exemplo, VEGF é um importante mitógeno para células endoteliais vasculares. É também conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF). Ver, Dvorak *et al.*, (1995) *Am. J. Pathol.* 146:1029-39. VEGF atua na vasculogênese, no desenvolvimento da vasculatura embriônica e angiogênese e no processo de formação de novos vasos sanguíneos a partir 25 dos pré-existentes. Ver, por exemplo, Ferrara, (2004) *Endocrine Reviews* 25(4):581-611; Risau *et al.*, (1988) *Dev. Biol.*, 125:441-450; Zachary, (1998) *Intl. J. Biochem Cell Bio* 30:1169-1174; Neufeld *et al.*, (1999) *FASEB J.* 13:9-22;

Ferrara (1999) *J. Mol. Med.* 77:527-543; e, Ferrara e Davis-Smyth, (1997) *Endocri. Rev.* 18:4-25. Aplicações clínicas para o VEGF incluem aquelas onde o crescimento de novos leitos capilares é indicado, como por exemplo, na promoção da cicatrização (ver, por exemplo, WO 91/02058; e resumo do agente 5 nº. P2358R1, chamado "*Wound Healing*", depositado em 16 de junho de 2006), na promoção do crescimento e reparo do tecido, por exemplo, fígado (ver, por exemplo, WO 2003/0103581), osso (ver, por exemplo, WO 2003/094617), etc. Vide também Ferrara (2004) em *Endocrine Reviews* 25(4):581-611.

Tipicamente, proteínas recombinantes relevantes 10 terapêuticamente são produzidas em uma variedade de organismos hospedeiros. A maioria das proteínas pode ser expressa em suas formas nativas nos hospedeiros eucariontes como células CHO. A cultura celular animal exige períodos prolongados de crescimento para atingir o máximo de densidade celular e basicamente atinge densidade celular mais baixa do 15 que culturas celulares procariontes (Cleland, J. (1993) ACS Symposium Series 526, *Protein Folding: In Vivo and In Vitro*, American Chemical Society). Além disso, culturas celulares animais freqüentemente exigem meios caros, contendo componentes de crescimento que podem interferir na recuperação da proteína desejada. Sistemas de expressão de 20 hospedeiros bacterianos fornecem uma alternativa eficaz em termos de custo para a produção em escala de proteínas recombinantes. Existem diversas patentes US sobre expressão bacteriana de proteínas recombinantes em geral, incluindo patentes US 4.565.785; US 4.673.641; US 4.795.706 e US 4.710.473. A maior vantagem do método de produção é 25 a capacidade para isolar facilmente o produto a partir dos componentes celulares por centrifugação ou microfiltração. Ver, por exemplo, Kipriyanov e Little, (1999) *Molecular Biotechnology*, 12: 173-201; e, Skerra e Pluckthun, (1988) *Science*, 240: 1038-1040.

Fatores de crescimento de ligação à heparina recombinantes como fator de crescimento ácido de fibroblastos, fator de crescimento básico de fibroblastos e fator de crescimento endotelial vascular foram recuperados e purificados a partir de inúmeras fontes incluindo bactéria (Salter D.H. *et al.*, (1996) *Labor. Invest.* 74(2):546-556 (VEGF); Siemeister *et al.*, (1996) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 222(2):249-55 (VEGF); Cao *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.* 261(6):3154-62 (VEGF); Yang *et al.*, (1994) *Gaojishu Tongxun*, 4:28-31 (VEGF); Anspach *et al.*, (1995) *J. Chromatogr. A* 711(1):129-139 (aFGF e bFGF); Gaulandris (1994) *J Cell. Physiol.* 161(1):149-59 (bFGF); Estape e Rinas (1996) *Biotech. Tech.* 10(7):481-484 (bFGF); McDonald *et al.*, (1995) *FASEB J.* 9(3):A410 (bFGF)). No entanto, sistemas de expressão bacterianos como *E. coli* são desprovidos de maquinaria celular para facilitar o redobramento correto das proteínas e geralmente não resulta na secreção de proteínas grandes no meio de cultura. Proteínas recombinantes expressas em células hospedeiras bacterianas são freqüentemente encontradas como corpos de inclusão que consistem de massas densas parcialmente dobradas e proteínas reduzidas dobradas de forma incorreta. Nesta forma, a proteína recombinante é geralmente inativa. Por exemplo, a forma ativa predominante do VEGF é um homodímero de dois polipeptídeos com 165 aminoácidos (VEGF-165). Nesta estrutura, cada subunidade contém 7 pares de pontes bissulfeto entre as cadeias e dois pares que efetuam a ligação covalente das duas subunidades (Ferrara *et al.*, (1991) *J. Cell. Biochem.* 47:211-218). A conformação nativa inclui um domínio básico forte que mostrou se ligar facilmente à heparina (Ferrara *et al.* (1991) acima). A dimerização covalente do VEGF é necessária para ligação e atividade biológica efetivas do receptor (Pötgens *et al.*, (1994) *J. Biol. Chem.* 269:32879-32885; Claffey *et al.*, (1995) *Biochim. et Biophys. Acta* 1246:1-9). O produto bacteriano potencialmente contém diversos intermediários de bissulfeto misturados e dobrados de forma incorreta.

Além disso, o redobramento frequentemente produz dímeros, trímeros e multímeros ligados ao bissulfeto e dobrados de forma incorreta. (Morris *et al.*, (1990) *Biochem. J.*, 268:803-806; Toren *et al.*, (1988) *Anal. Biochem.*, 169:287-299). Este fenômeno de associação é muito comum durante
5 o redobramento, particularmente em altas concentrações de proteína, e parece frequentemente envolver a associação através da interação hidrofóbica de intermediários dobrados parcialmente (Cleland e Wang, (1990) *Biochemistry*, 29:11072-11078).

O dobramento incorreto ocorre tanto na célula durante a
10 fermentação como durante o procedimento de isolamento. As proteínas recuperadas do espaço periplasmático ou intracelular devem ser solubilizadas e a proteína solúvel redobrada para o estado nativo. Métodos *in vitro* para redobramento de proteínas para a conformação correta, biologicamente ativa são essenciais para a obtenção de proteínas funcionais. Processos a jusante típicos
15 de proteínas recuperadas para corpos de inclusão inclui a dissolução dos corpos de inclusão em alta concentração de um desnaturante como uréia, seguido pela diluição do desnaturante para permitir que o redobramento ocorra (ver, patente US 4.512.922; US 4.511.502; e US 4.511.503). Ver também, por exemplo, Rudolph e Lilie, (1996) *FASEB J.* 10:49-56; e, Fischer *et al.*, (1993),
20 *Biotechnology and Bioengineering*, 41:3-13. Tais métodos de recuperação são considerados como sendo universalmente aplicáveis, com pequenas modificações na recuperação de proteínas recombinantes biologicamente ativas a partir de corpos de inclusão. Estes métodos foram aplicados à proteína de ligação à heparina como VEGF (Siemeister *et al.* (1996) acima). Estes métodos
25 procuram eliminar ligações de bissulfeto aleatórias antes da atração da proteína recombinante para sua conformação biologicamente ativa através de sua força de estabilização e não podem eliminar intermediários dobrados de forma imprópria ou fornecer populações homogêneas do produto dobrado corretamente.

Micelas revertidas ou cromatografia de troca iônica foram usadas para auxiliar no redobramento das proteínas desnaturadas pelo confinamento de uma única proteína dentro de micelas ou isolando-as em uma resina e então removendo o desnaturante (Hagen *et al.*, (1990) *Biotechnol. Bioeng.* 35:966-975; 5 Creighton (1985) em *Protein Structure Folding and Design* (Oxender, D.L. Ed.) páginas 249-251, Nova York: Alan R. Liss, Inc.). Estes métodos foram úteis na prevenção da aglutinação das proteínas e facilitadores do redobramento correto. Para alterar a taxa ou extensão do redobramento, o redobramento específico para conformação foi realizado com ligantes e anticorpos para a estrutura nativa 10 da proteína (Cleland e Wang, (1993), em *Biotechnology*, (Rehm H.-J., e Reed G. Eds.) páginas 528-555, Nova York, VCH). Por exemplo, creatina quinase foi redobrada na presença de anticorpos para a estrutura nativa (Morris *et al.*, (1987) *Biochem. J.* 248:53-57). Além dos anticorpos, ligantes e cofatores foram usados para aumentar o redobramento. Estas moléculas iriam interagir mais 15 provavelmente com a proteína dobrada após a formação da proteína nativa. Dessa forma, o equilíbrio de dobramento poderia ser “dirigido” ao estado nativo. Por exemplo, a taxa de dobramento do ferricitocromo c foi aumentada pelo ligante extrínseco para a posição axial do ferro heme (Brems e Stellwagon, (1983) *J. Biol. Chem.* 258:3655-3661). Proteínas chaperonas foram também 20 usadas para auxiliar no dobramento da proteína. Ver, por exemplo, Baneyx, (1999) *Current Opinion in Biotechnology*, 10:411-421.

Existe uma necessidade para métodos novos e mais efetivos de dobramento e/ou recuperação de proteínas de ligação à heparina a partir de uma cultura celular hospedeira, por exemplo, para a produção eficiente e 25 econômica de proteínas de ligação à heparina na cultura celular bacteriana que forneçam eliminação ou redução de intermediários biologicamente inativos e melhorem a recuperação de uma proteína corretamente redobrada, biologicamente ativa e que sejam geralmente aplicáveis na fabricação de

proteínas em grande escala. A invenção remete a estas e outras necessidades, como serão aparentes sob revisão das descrições a seguir.

DESCRIÇÃO RESUMIDA DA INVENÇÃO

A invenção fornece um método para recuperação e purificação de proteínas de ligação à heparina redobradas a partir da cultura celular. Em específico, a invenção fornece um método de recuperação de uma proteína de ligação à heparina a partir de células hospedeiras procariontes, por exemplo, células bacterianas. Por exemplo, um método compreende as etapas de:

(a) isolamento da proteína de ligação à heparina insolúvel a partir do espaço periplasmático ou intracelular das ditas células bacterianas;

(b) solubilização de dita proteína de ligação à heparina insolúvel isolada em uma primeira solução tamponada que compreende um agente caotrópico e um agente redutor;

(c) incubação da dita proteína de ligação à heparina solubilizada em uma segunda solução tamponada que compreende um agente caotrópico e um agente polianiônico sulfatado por um período e sob condições tais que o redobramento da proteína de ligação à heparina ocorra; e

(d) recuperação da dita proteína de ligação à heparina redobrada, em que há um aumento de 2 a 10 vezes na concentração da proteína recuperada por incubação com um agente polianiônico sulfatado comparado ao controle. Em uma realização, a segunda solução tamponada ainda compreende arginina. Em uma realização, a segunda solução tamponada ainda compreende cisteína e um agente redutor moderado.

Em uma realização da invenção existe, por exemplo, um aumento de 2 a 8 vezes na concentração de proteína recuperada da proteína redobrada biologicamente ativa, ou um aumento de 2 a 5 vezes na concentração de proteína recuperada da proteína redobrada biologicamente ativa, ou um aumento de 3 a 5 vezes na concentração de proteína recuperada da proteína

redobrada biologicamente ativa, ou um aumento de 2 a 3 vezes na concentração de proteína recuperada da proteína redobrada biologicamente ativa. Em outra realização da invenção existe, por exemplo, um aumento de mais de 2 a 2,5 vezes, 2,8 vezes, 3 vezes, 5 vezes, 6 vezes, 7 vezes, 8 vezes, 9
5 vezes etc. na concentração de proteína recuperada da proteína redobrada biologicamente ativa. Em uma realização da invenção, existe um aumento de 3 a 5 vezes na concentração de proteína do VEGF redobrado biologicamente ativo.

Os processos da presente invenção são amplamente aplicáveis para proteínas de ligação à heparina e especialmente para fatores de crescimento de ligação à heparina e em específico o fator de crescimento
10 endotelial (VEGF). Em certas realizações da invenção, o agente polianiônico sulfatado tem cerca de 3.000 a 10.000 daltons. Em uma realização, o agente polianiônico sulfatado utilizado no processo de produção é um sulfato de dextrano, sulfato de sódio ou sulfato de heparina. Em um aspecto, o sulfato de
15 dextrano tem entre 3.000 e 10.000 daltons.

A invenção adicionalmente fornece processos e métodos para purificação de proteínas de ligação à heparina tanto sozinhas como em conexão com a recuperação da proteína de ligação à heparina como descrito no presente pedido. Em uma realização específica, métodos de purificação
20 incluem colocar em contato dita proteína de ligação à heparina redobrada com um suporte cromatográfico de hidroxiapatita, um primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, um suporte cromatográfico catiônico e um segundo suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, e eluir seletivamente a proteína de ligação à heparina de cada suporte. Em outra
25 realização, um método de purificação compreende colocar em contato dita proteína de ligação à heparina redobrada com um suporte de troca catiônica; um primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica; e um suporte cromatográfico de meio de troca iônica ou misto, e eluir seletivamente a

proteína de ligação à heparina de cada suporte. É contemplado que as etapas para recuperação podem ser realizadas em qualquer ordem, por exemplo, seqüencialmente ou alterando a ordem dos suportes cromatográficos. Em certas realizações da invenção, são fornecidos métodos para recuperação e purificação de proteínas de ligação à heparina redobradas a partir de cultura celular de fabricação ou escala industrial.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1 ilustra uma cromatografia a partir do VEGF produzido por linhagem bacteriana W3110 carregada em uma coluna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA). Por exemplo, a coluna POROS HE2/M é equilibrada em 10 mM de fosfato de sódio, pH 7 contendo 0,15 M de cloreto de sódio. A coluna é eluída usando-se um gradiente linear de 0,15 M a 2 M de cloreto de sódio em 10 mM de fosfato de sódio, pH 7 por 10 minutos. O eluente é monitorado em 280 nm. A proteína recuperada em cada pico corresponde ao VEGF, embora apenas o pico 3 corresponda a um VEGF redobrado de forma correta, biologicamente ativo.

A Figura 2 ilustra um gráfico que descreve a estabilização do VEGF nativo dobrado corretamente pela heparina. O VEGF é suspenso em 50 mM de HEPES, pH 8, contendo 5 mM de EDTA, 0,2 M de NaCl e 10 mM de cisteína.

As Figuras 3A - 3D ilustram cromatografias de VEGF produzidos por linhagens bacterianas W3110 e incubadas com 12 µg/ml de sulfato de dextrano 5.000 daltons (Figura 3A); 12 µg/ml de sulfato de dextrano 8.000 daltons (Figura 3B); 12 µg/ml de sulfato de dextrano 10.000 daltons (Figura 3C) ou 25 µg/ml de heparina (Figura 3D), 3.000 daltons e carregado em uma coluna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA). Por exemplo, a coluna é equilibrada em 10 mM de fosfato de sódio, pH 7 contendo 0,15 M de cloreto de sódio. A coluna é eluída usando-se um gradiente linear de 0,15 M a 2 M de cloreto de sódio em 10 mM de fosfato de

sódio, pH 7 por 10 minutos. O eluente é monitorado em 280 nm. A proteína recuperada em cada pico corresponde ao VEGF, embora apenas o pico 3 corresponda a um VEGF redobrado de forma correta, biologicamente ativo.

A Figura 4 ilustra o efeito de escala no redobramento do VEGF.

5 A Figura 5 ilustra o efeito da heparina de baixo peso molecular (MW) e alto MW, e sulfato de dextrano, de 10.000 daltons, no VEGF redobrado. O pico 3 corresponde a um VEGF redobrado corretamente, biologicamente ativo.

10 A Figura 6 ilustra o efeito do sulfato de sódio no redobramento do VEGF. O pico 3 corresponde a um VEGF redobrado corretamente, biologicamente ativo.

A Figura 7 ilustra o efeito da heparina de baixo peso molecular (MW) e alto MW, e sulfato de dextrano, de 5.000 daltons, de 8.000 daltons e de 10.000 daltons no VEGF redobrado. O pico 3 corresponde a um VEGF redobrado corretamente, biologicamente ativo.

15 A Figura 8 ilustra o efeito da heparina e sulfato de dextrano no redobramento do VEGF. O pico 3 corresponde a um VEGF redobrado corretamente, biologicamente ativo.

A Figura 9 ilustra o efeito da uréia e DTT na extração do VEGF a partir de corpos de inclusão bacterianos.

20 A Figura 10 ilustra o efeito da concentração de uréia e DTT no redobramento do VEGF.

A Figura 11 ilustra a sequência de aminoácido do VEGF₁₆₅ com pontes bissulfeto indicadas (SEQ ID NO:1).

25 A Figura 12 ilustra o efeito da presença de aminoácidos carregados. Na concentração de 0,75 M na segunda solução tamponada, tanto arginina como lisina são benéficas, enquanto histidina tem pouco efeito aditivo quando comparado à solução tamponada sem a mesma. Adicionalmente a arginina mostrou ter efeito similar em concentrações de 0,1 a 1M.

A Figura 13 ilustra o efeito da diluição na % de eficiência no redobramento, onde embora a concentração total de VEGF seja inferior conforme os aumentos de diluições, a porcentagem da eficiência no redobramento é maior com mais diluição.

5

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

DEFINIÇÕES

“Heparina” (também chamada de ácido heparínico) é um grupo heterogêneo de mucopolissacarídeos aniônicos de cadeia retas, altamente sulfatadas, chamados glicosaminoglicanos. Embora outros possam estar presentes, os principais açúcares na heparina são: ácido α -L-idurônico 2-sulfato, 2-desoxi-2-sulfamino- α -glicose 6-sulfato, ácido β -D-glicorônico, 2-acetamido-2-desoxi- α -D-glicose, e ácido L-idurônico. Estes e outros açúcares opcionais estão unidos por ligações glicosídicas, formando polímeros de tamanhos variados. Devido à presença destes grupos sulfato e ácido carboxílico ligados covalentemente, a heparina é fortemente ácida. O peso molecular da heparina varia de aproximadamente 3.000 a cerca de 20.000 daltons, dependendo da fonte e do método de determinação.

A heparina nativa é constituinte de vários tecidos, especialmente fígado e pulmão, e mastócitos em diversas espécies de mamíferos. Heparina e sais de heparina (heparina sódica) estão comercialmente disponíveis e são primeiramente usadas como anticoagulantes em várias situações clínicas.

“Sulfato de dextrano” é um sulfato de dextrano cuja principal estrutura é um polímero de D-glicose. Glicose e outros açúcares opcionais estão unidos por ligações α -D(1-6) glicosídicas, formando polímeros de tamanhos variados. Devido à presença do sulfato ligado covalentemente, o sulfato de dextrano é fortemente ácido. O conteúdo de enxofre é geralmente não menos que 10%, e tipicamente cerca de 15% a 20% com até 3 grupos sulfato por molécula de glicose. A média do peso molecular de sulfato de

dextrano é de aproximadamente 1.000 a cerca de 40.000.000 daltons. Exemplos de sulfato de dextrano empregados na invenção incluem sulfatos de dextrano produzidos por microorganismos, tais como *Leuconostoc mesenteroides* e *L. dextranicum*.

5 "Agente polianiônico" como usado dentro do escopo da invenção tem a intenção de descrever preparações de heparina nativa purificada comercialmente disponível e compostos que são capazes de se ligar às proteínas que se ligam à heparina incluindo outros "agentes poliônicos" como sulfato de sódio, sulfato de heparina, sulfato de heparana, pentosana (poli) 10 sulfato, dextrano, sulfato de dextrano, ácido hialurônico, condroitina, sulfato de condroitina, dermatan sulfato e keratan sulfato. Particularmente útil dentro deste contexto da invenção é um "agente polianiônico sulfatado" como, por exemplo, um derivado sulfato de um polissacarídeo, como sulfato de heparina, sulfato de dextrano, os sulfatos de ciclodextrina produzidos por 15 microorganismos como *Bacillus macerans* descrito na patente US 5.314.872, bem como sulfatos de outros glicanos como β -1,3-glicano-sulfatos, o β -1,3-glicano sendo produzido pelos microorganismos que pertencem aos gêneros *Alcaligenes* ou *Agrobacterium*, e sulfato de condroitina, bem como fragmentos de heparina sulfatada.

20 Os agentes mencionados acima estão geralmente disponíveis e são reconhecidos por um técnico no assunto. Por exemplo, fragmentos de heparina sulfatada podem ser obtidos a partir de uma biblioteca de oligossacarídeos derivados da heparina que foram fracionados por cromatografia de permeação em gel. A preparação de oligossacarídeos 25 derivados da heparina com afinidade fracionada foi relatada por Ishihara *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.*, 268:4675-4683. Estes oligossacarídeos foram preparados a partir de heparina suína comercial seguindo despolimerização parcial com ácido nitroso, redução com boroidrido de sódio e fracionamento por

cromatografia de permeação em gel. Os *pools* resultantes de di, tetra, hexa, octa e decassacarídeos foram seqüencialmente aplicados a uma coluna de afinidade de bFGF recombinante humano, ligado covalentemente à SEPHAROSE™ 4B, e foram ainda fracionados em *subpools* com base em suas eluições a partir desta coluna em resposta aos gradientes de cloreto de sódio. Isto resultou em cinco *pools*, designados Hexa-1 até Hexa-5, as estruturas e atividades biológicas destes foram ainda avaliadas. A estrutura do Hexa-5C e seu espectro 500-MHz NMR estão mostradas na Figura 4 de Tyrell *et al.*, (1993) *J. Biol. Chem.*, 268:4684-4689. Este hexassacarídeo tem a estrutura

10 [IdoA(2-OSO₃)α1-4GlcNSO₃(6-OSO₃)α1-4]₂IdoA(2-OSO₃)α1-4AMan_R(6-OSO₃).

Todos os oligossacarídeos derivados da heparina discutidos acima, bem como outros oligossacarídeos similares à heparina são adequados e podem ser usados de acordo com a invenção. Em uma realização da invenção, hexassacarídeos e polissacarídeos da heparina com tamanho de unidade

15 maior (por exemplo, hepta, octa, nona e decassacarídeos) são usados. Além disso, oligossacarídeos derivados da heparina ou similares à heparina com uma ampla rede de carga negativa, por exemplo, devido a um alto grau de sulfonação, são vantajosos.

O termo “proteína de ligação à heparina” ou “HPB” como usado

20 no presente pedido refere-se a um polipeptídeo capaz de se ligar à heparina (como definido acima). A definição inclui as formas nativas madura, pré, pré-pro e pro de proteínas de ligação à heparina produzidas de forma recombinante. Exemplos típicos de proteínas de ligação à heparina são “fatores de crescimento de ligação à heparina” incluindo, mas não limitado fator de

25 crescimento epidermal (EGF); fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); fator de crescimento básico de fibroblastos (bFGF); fator de crescimento ácido de fibroblastos (aFGF); fator de crescimento endotelial vascular (VEGF); fator de crescimento de hepatócito (HGF) (também conhecido

como fator scatter, SF), e fator de crescimento do nervo (NGF), IL-8, etc.

Como usado no presente, "fator de crescimento endotelial vascular", ou "VEGF", refere-se a um fator de crescimento de mamífero originalmente derivado das células foliculares pituitárias bovinas que têm a
5 sequência de aminoácido divulgada em Castor, C.W., *et al.*, (1991) *Methods in Enzymol.* 198:391-405, junto com derivados funcionais deste que tem a atividade biológica qualitativa de um VEGF correspondente, incluindo, mas não limitado à sequência de aminoácido do VEGF humano como relatado em Houck *et al.*, (1991) *Mol. Endocrin.* 5:1806-1814. Ver também, Reyes *et al.*
10 (1989) *Science*, 246:1306, e, Robinson & Stringer, (2001) *Journal of Cell Science*, 144(5):853-865, patente US 5.332.671. A forma predominante do VEGF é um homodímero com 165 aminoácidos que tem dezesseis resíduos de cisteína que formam 7 pontes bissulfeto intramoleculares e duas pontes bissulfeto intermolecular. A montagem de genes (*splicing*) alternativa foi
15 envolvida na formação de polipeptídeos VEGF humanos múltiplos que consistem de 121, 145, 165, 189 e 206 aminoácidos, no entanto o VEGF₁₂₁ variante é desprovido de domínio de ligação à heparina de outros variantes e, dessa forma, não se inclui na definição da proteína de ligação à heparina apresentada no presente pedido. Todas as isoformas do VEGF compartilham
20 um domínio de aminoácido comum, mas diferem no comprimento da porção terminal carboxila da molécula. A forma ativa preferida do VEGF, VEGF₁₆₅, tem pontes bissulfeto entre os resíduos de aminoácidos Cys26-Cys68; Cys57-Cys104; Cys61-Cys102; Cys117-Cys135; Cys120-Cys137; Cys139-Cys;158; Cys146-Cys160 em cada monômero. Ver Figura 11. Ver também, por exemplo,
25 Keck *et al.*, (1997) *Archives of Biochemistry and Biophysics* 344(1):103-113. A molécula VEGF₁₆₅ é composta de dois domínios: um domínio de ligação de receptor da terminação amina (homodímero ligado por bissulfeto de 1 a 110 aminoácidos) e um domínio de ligação à heparina da terminação carboxila

(resíduos 111 a 165). Ver, por exemplo, Keyt *et al.*, (1996) *J. Biol. Chem.*, 271(13):7788-7795. Em certas realizações da invenção, o VEGF₁₆₅ isolado e purificado não é glicosilado no resíduo 75 (Asn). Ver, por exemplo, Yang *et al.*, (1998) *Journal of Pharm. & Experimental Therapeutics*, 284:103-110. Em certas realizações da invenção, o VEGF₁₆₅ isolado e purificado é substancialmente não deamidado no resíduo Asn10. Em certas realizações da invenção, o VEGF₁₆₅ isolado e purificado é uma mistura de proteína deamidada (no resíduo Asn10) e não deamidada, tipicamente com a grande parte da proteína sendo não deamidada. Visto que o VEGF₁₆₅ é um homodímero, a deamidação pode ocorrer em uma ou ambas as cadeias polipeptídicas.

Como usado no presente, VEGF ou outro HBP e similares “dobrados corretamente” ou “biologicamente ativos” referem-se a uma molécula com uma conformação biologicamente ativa. O técnico no assunto reconhecerá que intermediários dobrados de forma incorreta e misturados com bissulfeto podem ter atividade biológica. Em tal caso, o VEGF ou HBP dobrado corretamente ou biologicamente ativo corresponde ao padrão de dobramento nativo do VEGF (descrito acima) ou outro HBP. Por exemplo, VEGF dobrado corretamente tem pontes de bissulfeto apontados acima, além das duas pontes bissulfeto intermoleculares na molécula dimérica embora outros intermediários possam ser produzidos pela cultura celular bacteriana. (Figura 1 e 3A-3D). Para o VEGF dobrado corretamente as duas pontes bissulfeto intermoleculares ocorrem entre os mesmos resíduos, Cys51 e Cys60, de cada monômero. Ver, por exemplo, patente WO 98/16551. Atividades biológicas do VEGF incluem, mas não estão limitadas a, por exemplo, promoção da permeabilidade vascular, promoção do crescimento de células endoteliais vasculares, ligação ao receptor VEGF, ligação e sinalização através de um receptor VEGF (ver, também, Keyt *et al.*, (1996) *Journal of Biological Chemistry*, 271(10):5638-5646), que induz angiogênese, etc.

Os termos “purificada” ou “HBP pura” e similares referem-se a um material livre de substâncias que normalmente acompanham estas, como encontradas em sua produção recombinante e especialmente na cultura celular procarionte ou bacteriana. Assim os termos se referem a uma HBP recombinante que é livre de DNA contaminante, proteínas de células hospedeiras ou outras moléculas associadas com este em ambiente *in situ*. Os termos se referem a um grau de pureza de pelo menos cerca de 75%, pelo menos cerca de 80%, pelo menos cerca de 85%, pelo menos cerca de 90%, pelo menos cerca de 95% ou pelo menos cerca de 98% ou mais.

Os termos “corpos de inclusão” ou “corpos refrativos” referem-se à massa intracelular densa de polipeptídeo agregado de interesse, que constitui uma porção significativa da proteína celular total, incluindo todos os componentes celulares. Em alguns casos, mas não todos os casos, estes agregados de polipeptídeo podem ser reconhecidos como manchas brilhantes visíveis dentro do limite das células com um microscópio de contraste de fase com aumentos abaixo de 1000 vezes.

Como usado no presente, o termo proteína “dobrada de forma incorreta” refere-se aos polipeptídeos precipitados ou agregados que estão contidos dentro dos corpos refrativos. Como usado no presente, VEGF ou outro HBP “insolúvel” ou “dobrado de forma incorreta” refere-se ao VEGF precipitado ou agregado que está contido dentro do periplasma ou espaço intracelular das células hospedeiras procariontes, ou está de outra forma associado a células hospedeiras procariontes, e assume uma conformação inativa biologicamente com pontes bissulfeto não formadas ou combinadas de forma incorreta. A HBP insolúvel geralmente está, mas não precisa estar contida nos corpos refrativos, isto é, podem ou não ser visíveis sob um microscópio de contraste de fase.

Como usado no presente, “agente caotrópico” refere-se a um composto que, em uma concentração adequada em uma solução aquosa, é capaz de mudar de configuração ou conformação espacial dos polipeptídeos através de alterações na superfície destes, de forma que produza um polipeptídeo solúvel em meio aquoso. As alterações podem ocorrer pela mudança, por exemplo, do estado de hidratação, o meio solvente, ou a interação da superfície com o solvente. A concentração do agente caotrópico irá afetar diretamente sua força e eficácia. Uma solução caotrópica fortemente desnaturante contém um agente caotrópico em grandes concentrações que, na solução, irá efetivamente desdobrar um polipeptídeo presente na solução, eliminando efetivamente a estrutura secundária das proteínas. O desdobramento será relativamente abrangente, mas reversível. Uma solução caotrópica moderadamente desnaturante contém um agente caotrópico que, em concentração suficiente na solução, permite dobramento parcial de um polipeptídeo a partir da conformação contorcida de qualquer forma que o polipeptídeo assumiu através de intermediários solúveis na solução, para a conformação espacial na qual se encontra quando operando na sua forma nativa sob condições fisiológicas endógenas ou homólogas. Exemplos de agentes caotrópicos incluem guanidina, hidrocloreto, uréia e hidróxidos como hidróxido de sódio ou potássio. Agentes caotrópicos incluem uma combinação destes reagentes, como uma mistura de um hidróxido com uréia ou hidrocloreto de guanidina.

Como usado no presente pedido, “agente redutor” refere-se a um composto que, em uma concentração adequada na solução aquosa, mantém grupos sulfidril livres, de forma que as pontes bissulfeto intra ou intermoleculares sejam quimicamente rompidas. Exemplos representativos de agentes de redução adequados incluem ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), beta-mercaptoetanol (BME), cisteína, cisteamina, tioglicolato, glutatona, Tris[2-carboxetil]fosfina (TCEP), e boridrido de sódio.

Como usado no presente, “solução tamponada” refere-se a uma solução que resiste a mudanças de pH pela ação de seus componentes conjugados ácido-base.

O termo “bactéria” para os propósitos no presente pedido incluem *Eubacteria* e *Archaeobacteria*. Em certas realizações da invenção, *Eubacteria*, incluindo bactéria Gram-positiva e Gram-negativa, são usadas nos métodos e processos descritos no presente pedido. Em uma realização da invenção, são usadas bactérias Gram-negativas, por exemplo, Enterobacteriaceae. Exemplos de bactérias que pertencem ao gênero Enterobacteriaceae incluem *Escherichia*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, *Serratia*, e *Shigella*. Outros tipos adequados de bactéria incluem *Azotobacter*, *Pseudomonas*, *Rhizobia*, *Vitreoscilla*, e *Paracoccus*. Em uma realização da invenção, é usado *E. coli*. Hospedeiros *E. coli* adequados incluem *E. coli* W3110 (ATCC 27.325), *E. coli* 294 (ATCC 31.446), *E. coli* B, e *E. coli* X1776 (ATCC 31.537). Estes exemplos são mais ilustrativos do que limitantes, e W3110 é um exemplo. Células mutantes de qualquer uma das bactérias mencionadas acima também podem ser empregadas. É claro que é necessário selecionar a bactéria apropriada levando em conta a replicabilidade do *replicon* nas células de uma bactéria. Por exemplo, espécies *E. coli*, *Serratia* ou *Salmonella* podem ser adequadas para serem usadas como hospedeiras quando pelos plasmídeos conhecidos como pBR322, pBR325, pACYC177, ou pKN410 são usados para suprir o *replicon*. Ver ainda abaixo exemplos relativos a células hospedeiras bacterianas adequadas.

Como usado no presente pedido, as expressões “célula”, “linhagem celular”, “linhagem” e “cultura celular” são usadas alternadamente e tais designações incluem progênie. Dessa forma, as palavras “transformantes” e “células transformadas” incluem a célula primária do sujeito e culturas derivadas a partir desta, sem considerar o número de transferências. Entende-

se também que toda a progênie pode não ser precisamente idêntica em conteúdo de DNA, devido a mutações premeditadas ou acidentais. Progênies mutantes que têm a mesma função ou atividade biológica como selecionadas para a célula originalmente transformada, estão também incluídas. Quando
5 diferentes designações são pretendidas, será claro a partir do contexto.

Como usado no presente pedido, “polipeptídeo” refere-se geralmente aos peptídeos e proteínas a partir de qualquer fonte celular que tem mais que aproximadamente dez aminoácidos. Polipeptídeos “heterólogos” são aqueles polipeptídeos estranhos à célula hospedeira sendo utilizada, como
10 uma proteína humana produzida por *E. coli*, enquanto o polipeptídeo heterólogo pode ser um procarionte ou eucarionte, preferivelmente é eucarionte, mais preferivelmente mamífero e mais preferivelmente humano. Em certas realizações da invenção, este é produzido de forma recombinante ou polipeptídeo recombinante.

15

PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À HEPARINA

ISOLAMENTO DA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À HEPARINA

A proteína com ligação à heparina (HBP), insolúvel e dobrada de forma incorreta, é isolada a partir de células hospedeiras procariontes que expressam a proteína por diversas técnicas padrão. Por exemplo, a HBP
20 insolúvel é isolada em um tampão de isolamento adequado pela exposição das células a um tampão com força iônica capaz de solubilizar a maior parte das proteínas hospedeiras, mas no qual a proteína em questão é substancialmente insolúvel, ou pela ruptura das células para que os corpos de inclusão possam ser liberados, ou pela formação da proteína no espaço periplasmático ou
25 intracelular tornado-as disponíveis para recuperação, por exemplo, por centrifugação. Esta técnica é bastante conhecida e está descrita, por exemplo, na patente US 4.511.503. Kleid *et al.*, divulgam a purificação de corpos refráteis por homogeneização seguida por centrifugação (Kleid *et al.*, (1984) em

Developments in Industrial Microbiology, (Sociedade de Microbiologia Industrial, Arlington, VA) 25:217-235). Ver também, por exemplo, Fischer *et al.*, (1993) *Biotechnology and Bioengineering* 41:3-13.

A patente US 5.410.026 descreve o método típico para
5 recuperação de proteínas a partir de corpos de inclusão e está resumida como
a seguir. As células procariontes são suspensas em um tampão adequado.
Normalmente, o tampão consiste em um agente tamponante adequado para o
tamponamento em pH entre 5 a 9, ou entre 6 a 8, e um sal. Qualquer sal
adequado, incluindo NaCl, é útil para manter força iônica suficiente na solução
10 tamponada. Normalmente emprega-se um força iônica de aproximadamente
0,01 a 2 M ou 0,1 a 0,2 M. As células, enquanto suspensas neste tampão, são
rompidas ou lisadas usando-se técnicas comumente empregadas como
métodos mecânicos, por exemplo, homogeneizador (homogeneizador a
pressão Manton-Gaulin, Microfluidificador ou Niro-Soavi), *French press*
15 (rompimento descontínuo), moinhos de bolas, um oscilador sônico ou através
de métodos químicos ou enzimáticos.

Exemplos de métodos químicos ou enzimáticos de ruptura celular
incluem uso de esferoplastos, que envolvem o uso de uma lisozima para lisar a
parede bacteriana (H. Neu *et al.*, (1964) *Biochem. Biophys. Res. Comm.*,
20 17:215), e choque osmótico, que envolve o tratamento de células viáveis com
uma solução de alta tonicidade e uma lavagem em água fria de baixa
tonicidade para a liberação dos polipeptídeos (H. Neu *et al.*, 1965 *J. Biol.*
Chem., 240(9):3685-3692). A sonicação é geralmente usada para o
rompimento da bactéria contida em volumes de escala analítica do caldo de
25 fermentação. Em escalas maiores, normalmente é utilizada a homogeneização
de alta pressão.

Depois que as células são rompidas, a solução é normalmente
centrifugada a baixas velocidades, geralmente por volta de 500 a 15.000 x g,

por exemplo, em uma realização da invenção, utilizam-se cerca de 12.000 x g, em uma centrífuga padrão por tempo suficiente para peletizar substancialmente todas as proteínas insolúveis. Esse intervalo de tempo pode ser facilmente determinado e depende do volume a ser centrifugado, bem como do tipo de centrífuga. Normalmente cerca de 10 minutos a 0,5 hora são suficientes para peletizar proteínas insolúveis. Em uma realização, a suspensão é centrifugada a 12.000 x g por 10 minutos.

Os pellets resultantes contêm substancialmente toda a fração de proteína insolúvel. Se o processo de ruptura celular não for completo, o pellet pode também conter células intactas ou fragmentos de células rompidas. A integridade da ruptura celular pode ser avaliada através de nova suspensão do pellet em uma pequena quantidade da mesma solução tampão e o exame da suspensão sob microscopia de contraste de fase. A presença de fragmentos de células rompidas ou células inteiras indica que a uma sonicação adicional ou outros meios de ruptura são necessários para a remoção de fragmentos ou células e polipeptídeos não-refrativos associados. Após tal ruptura adicional, se necessário, a suspensão é novamente centrifugada e o pellet recuperado, resuspenso e examinado. O processo é repetido até que o exame visual revele a ausência de fragmentos de células rompidas no material peletizado ou até que os tratamentos adicionais não consigam mais reduzir o tamanho do pellet resultante.

O processo acima pode ser empregado para proteínas insolúveis no espaço intracelular ou periplasmático. Em uma realização da invenção, as condições fornecidas aqui para o isolamento de proteínas de ligação à heparina são direcionadas a corpos de inclusão precipitados no espaço periplasmático ou no espaço intracelular e estão relacionadas especificamente ao VEGF. No entanto, acredita-se que os processos e procedimentos se apliquem às proteínas de ligação à heparina em geral, com pequenas modificações conforme apontado ao longo do texto. Em certas realizações da

invenção, os processos e procedimentos se aplicam à fabricação ou produção, redobramento e purificação da HBP em escala industrial.

REDOBRAMENTO DAS PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À HEPARINA

A proteína de ligação à heparina insolúvel e dobrada de forma incorreta isolada é incubada em uma primeira solução tamponada contendo
5 determinada quantidade de um agente caotrópico e quantidade suficiente de um agente redutor para solubilizar substancialmente a proteína de ligação à heparina. Essa incubação é feita sob condições de concentração, tempo e temperatura de incubação que permitirão a solubilização de parte ou de quase
10 toda a proteína de ligação à heparina, bem como seu desdobramento.

A medida do grau de solubilidade na solução tamponada pode ser facilmente determinada e é adequadamente realizada, por exemplo, pela análise de turbidez e análise do fracionamento entre o sobrenadante e pellet após a centrifugação em géis SDS-PAGE reduzidos, por teste protéico (por exemplo,
15 teste protéico com reagente Bradford (Pierce, Bio-Rad, etc.)), ou por HPLC.

A primeira solução tamponada compreende um agente de tamponamento adequado para manutenção da faixa de pH do tampão em pelo menos cerca de 7,0, com uma faixa típica de 7,5 a 10,5. Em uma realização, o pH do VEGF é 8,0. Exemplos de tampões adequados para manter o pH na
20 faixa citada anteriormente incluem TRIS-HCl (Tri[hidroximetil]aminometano), HEPPS (ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[3-propano sulfônico]), HEPES (ácido N-[2-Hidroxietil] piperazina-N'-[2-etano sulfônico]), CAPSO (ácido 3-[Ciclohexilamino]-2-hidroxi-1-propano sulfônico), AMP (2-Amino-2-metil-1-propanol), CAPS (ácido 3-[Ciclohexilamino]-1-propano sulfônico), CHES (ácido
25 2-[N-Ciclohexilamino]etano sulfônico), glicina e acetato de sódio. Em uma realização da invenção, o tampão do presente pedido tem pH próximo de 8,0. Em ainda uma realização adicional, os tampões, por exemplo, como HEPPS, são sulfatados.

Agentes caotrópicos adequados para a prática desta invenção incluem, por exemplo, uréia e sais de guanidina ou tiocianato, por exemplo, uréia, hidrocloreto de guanidina, tiocianato de sódio, etc. A quantidade de agente caotrópico necessário que deve estar presente no tampão é aquela
5 suficiente para desdobrar a HBP na solução. Em certas realizações da invenção, o caotropo está presente em cerca de 4 a 10 molares. Em uma realização da invenção, o agente caotrópico é a uréia em aproximadamente 5 a 8 M, ou cerca de 7 M. Em outro exemplo, o agente caotrópico é o hidrocloreto de guanidina em aproximadamente 6 a 8 M.

10 Exemplos de agentes redutores adequados incluem, mas não estão limitados, a ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), β -mercaptoetanol (BME), cisteína, DTE, etc. A quantidade de agente redutor que deve estar presente no tampão dependerá principalmente do tipo de agente redutor e caotrópico, tipo e pH do tampão empregado, da quantidade de oxigênio presente ou introduzida
15 na solução, e da concentração da proteína do tampão. Por exemplo, com 0,5 a 1,5 mg/ml de proteína em uma solução tamponada em pH 7,0 a 10,0, contendo 4 a 8 M de uréia e agente redutor, por exemplo, usa-se DTT com concentração de cerca de 1 a 15 mM, ou BME com concentração de cerca de 0,2 a 2 mM, ou cisteína com concentração de cerca de 2 a 10 mM. Em uma realização, o
20 agente redutor é o DTT com cerca de 0,5 a 4 mM ou 2 a 4 mM. A Figura 9 ilustra o efeito da uréia e do DTT na extração do VEGF. O Pico 3 do VEGF se refere ao VEGF biologicamente ativo e dobrado corretamente. Em uma realização, o agente redutor é o DTT em concentração de cerca de 10 mM. Um único agente redutor ou uma combinação de agentes redutores podem ser
25 usados nos tampões descritos no presente pedido.

A concentração da proteína na solução tamponada deve ser tal que a proteína seja substancialmente solubilizada conforme determinado por densidade óptica. A quantidade exata a ser empregada dependerá, por

exemplo, das concentrações e tipos dos demais ingredientes na solução tamponada, principalmente a concentração de proteína, de agente redutor e o pH do tampão. Em uma realização, a concentração de proteína de ligação à heparina está na faixa de 0,5 a 5,5 mg por ml, ou 1,5 a 5,0 mg/ml. A solubilização é normalmente realizada a cerca de 0 a 45°C, ou em aproximadamente 20°C a 40°C, ou 23°C a 37°C, ou cerca de 25°C a 37°C, ou cerca de 25°C por pelo menos 1 a 24 horas. Em uma realização, a solubilização é realizada por pelo menos duas horas em temperatura ambiente. Normalmente, a temperatura não parece ser afetada pelo sal, pelo agente redutor ou pelos níveis do agente caotrópico.

Depois que o polipeptídeo é solubilizado, ele é colocado ou diluído em uma segunda solução tampão contendo o agente caotrópico e um agente polianiônico sulfatado como descrito acima, mas sob uma concentração de agente caotrópico que permita o redobramento da proteína de ligação à heparina.

As condições desta segunda incubação da proteína solubilizada e mal dobrada em geral serão aquelas em que houver o redobramento parcial, substancial ou completo da proteína. As condições exatas dependerão, por exemplo, do pH e tipos de tampão e concentrações dos agentes polianiônicos sulfatados e dos agentes caotrópicos e redutores, se algum destes estiver presente. A temperatura de incubação geralmente é de 0°C a 40°C, ou 10°C a 40°C, e a incubação em geral ocorrerá por pelo menos 1 hora até que se atinja o efeito de redobramento. Em certas realizações, a reação é realizada em temperaturas próximas de 15°C a 37°C, ou 20°C a 30°C, por pelo menos cerca de 6 horas, pelo menos cerca de 10 horas, ou entre cerca de 10 a 48 horas, ou entre cerca de 15 a 20 horas, ou entre 6 a 20 horas, ou entre 12 a 24 horas.

O grau de redobramento é apropriadamente determinado por radioimunoensaio (RIA) para titulação da HPB ou por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) usando-se, por exemplo, uma coluna POROS HE2/M

(PerSeptive BioResearch Products) ou outra coluna de afinidade à heparina apropriada. Titulações crescentes de RIA ou tamanhos de picos da HBP corretamente dobrada se correlacionam diretamente com quantidades crescentes da HBP biologicamente ativa e corretamente dobrada presentes no tampão. A incubação é feita para maximizar a taxa da HBP corretamente dobrada para HBP dobrada de forma incorreta e recuperada, conforme determinado por RIA ou HPLC.

Em uma realização, a qualidade e a quantidade do VEGF corretamente dobrado são avaliadas usando-se um teste de ligação à heparina. As amostras contendo a proteína de ligação à heparina diluída são carregadas, por exemplo, em uma coluna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA) ou outra coluna de afinidade à heparina adequada. Por exemplo, a coluna de afinidade à heparina é equilibrada em 10 mM de fosfato de sódio, pH 7 contendo 0,15 M de cloreto de sódio. Sob uma taxa de fluxo de 1 ml/min ou 2 ml/min, a coluna é eluída utilizando-se um gradiente linear a partir de 0,15 a 2 M de cloreto de sódio, ou 10 mM de fosfato de sódio, em pH 7 por 10 minutos. O eluente é monitorado em 280 nm. Em uma realização, a proteína é recuperada em um único pico que corresponde à HBP biologicamente ativa dobrada corretamente. Em uma realização da invenção, um teste para determinar a HBP dobrada corretamente é o RPHPLC. Ligações bissulfeto podem ser opcionalmente confirmadas pelo mapa peptídico. Dicroísmo circular também pode ser usado para determinar a estrutura secundária e terciária.

O tampão usado para a segunda solução tamponada pode ser qualquer um dos listados acima para a primeira solução tamponada, por exemplo, HEPES em pH 8,0, por exemplo, a uma concentração de cerca de 50 mM para o dobramento do VEGF. O polipeptídeo pode ser diluído com o tampão de redobramento, por exemplo, pelo menos 5 vezes, ou pelo menos cerca de

dez vezes, cerca de 20 vezes, ou cerca de 40 vezes. Alternativamente, o polipeptídeo pode ser dialisado contra o tampão de redobramento.

A segunda solução tamponada contém um agente caotrópico em uma concentração que permita o redobramento da HPB. Em geral, o caotropo está presente entre aproximadamente 0,5 a 2 molares. Em uma realização da invenção, o agente caotrópico no presente pedido é a uréia a aproximadamente 0,5 a 2 M, ou cerca de 1 M. Em uma realização, o agente caotrópico é uréia a uma concentração de cerca de 1,3 M. Em outra realização da invenção, o agente caotrópico é o hipocloreto de guanidina com aproximadamente 1 M. A Figura 10 ilustra o efeito da uréia e a redução do agente DTT no redobramento do VEGF. O Pico 3 do VEGF se refere ao VEGF biologicamente ativo e dobrado corretamente.

Como observado, a solução opcionalmente também contém um agente redutor. O agente redutor é devidamente selecionado entre os descritos acima para a etapa de solubilização na faixa de concentração de cerca de 0,5 a cerca de 10 mM para cisteína, 0,1 a 1,0 mM para o DTT, e/ou menos de 0,2 mM para BME. Em uma realização da invenção, o agente redutor é o DTT a aproximadamente 0,5 a 2 mM. Em uma realização da invenção, o agente redutor é o DTT a aproximadamente 0,5 mM. Exemplos de agentes redutores adequados incluem, mas não estão limitados a, ditioneitol (DTT), β -mercaptoetanol (BME), a cisteína, o DTE, etc. Enquanto o DTT e o BME podem ser usados em associação com os procedimentos fornecidos no presente pedido para proteínas de ligação à heparina em geral, a combinação de cisteína a aproximadamente 0,1 a 10 mM e DDT a aproximadamente 0,1 e 1,0 mM, como descrito no presente pedido, é um exemplo para a recuperação do VEGF.

A etapa de redobramento inclui um agente polianiónico sulfatado em concentração suficiente para atingir o redobramento completo da proteína solubilizada. Exemplos de agentes polianiónicos adequados estão descritos no

presente pedido acima, por exemplo, um derivado sulfatado de polissacarídeo como apontado acima, com agentes polianiônicos sulfatados como o sulfato de heparina, sulfato de dextrano, e sulfato de condroitina, bem como fragmentos de heparina sulfatada. Para os sulfatos de heparina usados no contexto desta
5 invenção, o peso molecular geralmente está entre aproximadamente 3.000 e 10.000 daltons, ou entre aproximadamente 3.000 a 6.000 daltons.

Em uma realização da invenção, o sulfato de dextrano é empregado no contexto da invenção. O peso molecular do agente polianiônico sulfatado ou outro agente como o sulfato de dextrano empregado nesta
10 invenção depende do tamanho da proteína de ligação à heparina específica a ser recuperada. Em geral, emprega-se sulfato de dextrano entre aproximadamente 3.000 e 10.000 daltons. Em uma realização da invenção, utiliza-se o sulfato de dextrano entre aproximadamente 5.000 e 10.000 daltons, por exemplo, para a recuperação do VEGF. Em outra realização, utiliza-se um
15 sulfato de dextrano entre aproximadamente 5.000 e 8.000 daltons para a recuperação da HBP. As Figuras 3A-3D mostram a recuperação do VEGF em várias concentrações e pesos moleculares de sulfato de dextrano (Figuras 3A-C) e heparina (Figura 3D) conforme analisado por cromatografia de afinidade à heparina. O pico 3 corresponde ao VEGF dobrado corretamente.

20 A concentração do composto polianiônico empregado depende da proteína a ser recuperada, de sua concentração e de condições como temperatura e pH do tampão de redobrimento. As concentrações típicas estão entre cerca de 50 e 500 mM para o sulfato de sódio, entre cerca de 10 a 200 µg/ml para heparinas de baixo peso molecular como 6.000
25 daltons (Sigma Chemical Co.), entre cerca de 10 a 200 µg/ml para heparinas de alto peso molecular como a heparina I-A de porcino (Sigma Chemical Co.) e entre cerca de 10 a 400 µg/ml, ou entre cerca de 10 a 200 µg/ml para os sulfatos dextrano.

O tampão de redobrimento pode opcionalmente conter agentes adicionais como diversos detergentes não-iônicos como TRITON™ X-100, NONIDET™ P-40, a série TWEEN™ e a série BRIJ™. O detergente não-iônico está presente na faixa entre aproximadamente 0,01% a 1,0%. Em um exemplo, as concentrações para o detergente não-iônico estão entre cerca de 0,025% e 0,05%, ou aproximadamente 0,05%.

Opcionalmente, aminoácidos positivamente carregados como a arginina (por exemplo, L-arginina/HCl), lisina, etc., podem estar presentes no tampão de redobrimento. Em certas realizações da invenção, a concentração de arginina é, por exemplo, de aproximadamente 0 a 1000 mM, ou cerca de 25 a 750 mM, ou cerca de 50 a 500 mM, ou cerca de 50 a 250 mM, ou aproximadamente 100 mM, em concentração final, etc. Em certas realizações da invenção, a proteína está em uma solução tampão com pH 7,0 a 9,0 contendo 0,5 a 3 M de uréia, 0 a 30 mg/L de sulfato de dextrano, 0 a 0,2% de Triton X-100, 2 a 15 mM de cisteína, 0,1 a 1 mM de DTT e 0 a 750 mM de arginina, em concentração final. Em uma realização, utiliza-se 50 mM de HEPPS. Em uma realização, a concentração final da solução tampão de redobrimento é 1 M de uréia, 50 mM de HEPPS, 15mg/L de sulfato de dextrano, 0,05% de Triton X-100, 7,5 mM de cisteína, 100 mM de arginina, pH 8,0. Em uma realização, a concentração final da solução tampão de redobrimento é 1,3 M de uréia, 50 mM de HEPPS, 15mg/L de sulfato de dextrano, 0,05% de Triton X-100, 7,5 mM de cisteína, 0,5 mM de DTT, 100mM de arginina, pH 8,0.

RECUPERAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À HEPARINA

Embora a recuperação e a purificação da proteína de ligação à heparina a partir do meio de cultura possam empregar diversos métodos e procedimentos conhecidos para a separação dessas proteínas, por exemplo, sais e solventes de fracionamento, adsorção com materiais coloidais, filtração

em gel, cromatografia de troca iônica, cromatografia de afinidade, cromatografia de afinidade imunológica, eletroforese e cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), um exemplo de um procedimento cromatográfico de quatro etapas que exige a recuperação dessa HBP redobrada com um suporte cromatográfico de hidroxapatita está descrito; um primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, um suporte cromatográfico catiônico e um segundo suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, com eluição seletiva da HBP em cada suporte. Alternativamente, outro procedimento cromatográfico está descrito, referindo-se ao contato dessa proteína de ligação à heparina redobrada com um suporte de troca catiônica; um suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, e um suporte cromatográfico de troca iônica, com eluição seletiva da HBP em cada suporte. Está contemplado que as etapas de cada procedimento possam ser realizadas em qualquer ordem. Em uma realização da invenção, as etapas são realizadas em sequência.

Uma primeira etapa adequada para a recuperação e purificação adicionais da HBP caracteristicamente fornece a concentração da proteína de ligação à heparina e uma redução no volume da amostra. Por exemplo, o segundo passo de incubação descrito acima pode resultar em um grande aumento de volume da proteína de ligação à heparina recuperada e concomitante a diluição da proteína no tampão de redobrimento. Os primeiros suportes cromatográficos adequados produzem uma redução do volume da proteína de ligação à heparina recuperada e podem ter a vantagem de certa purificação da proteína de contaminações indesejadas. Os primeiros suportes cromatográficos adequados incluem suportes cromatográficos que podem ser eluídos e carregados diretamente em um suporte cromatográfico de interação hidrofóbica. Por exemplo, são utilizados suportes cromatográficos a partir dos quais a HBP pode ser eluída em alta concentração de sal para carregar um suporte cromatográfico de interação hidrofóbica.

Os primeiros suportes cromatográficos exemplares incluem, mas não estão limitados a, suportes cromatográficos de hidroxiapatita, por exemplo, cerâmica CHT tipo I e tipo II (formalmente conhecida como cerâmica MacroPrep), Bio-Gel HT, Bio-Gel HTP, Biorad, Hercules, CA, etc.; suportes cromatográficos de metais quelantes consistindo de uma resina inerte de íons metálicos imobilizados como cobre, níquel, etc.; bem como géis não derivados de sílica. Em uma realização da invenção, os primeiros suportes cromatográficos para a purificação e recuperação do VEGF são suportes cromatográficos de hidroxiapatita. Em outra realização da invenção, os primeiros suportes cromatográficos para a purificação e recuperação do VEGF são suportes de troca catiônica, por exemplo, descritos abaixo em maiores detalhes.

A eluição a partir do primeiro suporte cromatográfico é realizada de acordo com práticas padrão na técnica. Condições adequadas de eluição e tampões facilitarão o carregamento da HPB eluída diretamente para o primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, conforme descrito abaixo.

A cromatografia por interação hidrofóbica é uma técnica bastante conhecida e é atribuída à interação das porções hidrofóbicas da molécula que interage com os ligantes hidrofóbicos anexados aos "suportes cromatográficos". Um ligante hidrofóbico acoplado a uma matriz é muitas vezes chamado de suporte cromatográfico HIC, gel HIC ou coluna HIC e similares. Sabe-se também que a força da interação entre a proteína e a coluna HIC não é somente uma função da proporção de superfícies não-polares para polares na proteína, mas também da distribuição das superfícies não-polares.

Diversas matrizes podem ser empregadas no preparo de colunas HIC. A mais usada é a agarose, embora a sílica e as resinas de polímeros orgânicos possam também ser usadas. Ligantes hidrofóbicos úteis incluem, mas não se limitam aos grupos alquil, com 2 a 10 átomos de carbono, como os grupos butil, propil, octil ou grupos aril como o fenil. Os suportes HIC

convencionais para géis e colunas podem ser encontrados comercialmente de fornecedores como GE Healthcare, de Uppsala, Suécia, com os nomes comerciais butil-SEPHAROSE™, fenil-SEPHAROSE™ CL-4B, octil SEPHAROSE™ FF e fenil SEPHAROSE™ FF, e da Tosoh Corporation, de 5 Tóquio, Japão, com os nomes TOYOPEARL™ butil 650M (Fractogel TSK Butil-650) ou TSK-GEL fenil 5PW. Em uma realização, a purificação e a recuperação do VEGF são feitas primeiramente em um suporte cromatográfico HIC com butil-agarose e um segundo suporte cromatográfico hidrofóbico que é a fenil agarose. Em outra realização, o primeiro suporte cromatográfico HIC é a fenil agarose.

10 A densidade do ligante constitui um parâmetro importante, pois ele influencia não somente a força de interação da proteína, mas também a capacidade da coluna. A densidade do ligante dos géis fenil ou octil fenil disponíveis comercialmente é da ordem de 5-40 $\mu\text{mol/ml}$ de gel. A capacidade do gel é uma função da proteína específica em questão, bem como do pH, 15 temperatura e concentração do sal, mas geralmente se espera que se enquadre na faixa de 3-20 mg/ml de gel.

A escolha do gel específico pode ser determinada por um técnico no assunto. Em geral, a força de interação entre a proteína e o ligante HIC aumenta com o comprimento da cadeia dos ligantes alquil, mas os ligantes 20 com cerca de 4 a 8 átomos de carbono são adequados para a maioria das separações. Um grupo fenil tem aproximadamente a mesma força hidrofóbica que um grupo pentil, embora a seletividade possa ser diferente em função da possibilidade de interação pi-pi com grupos aromáticos da proteína.

A adsorção da proteína à coluna HIC é favorecida por uma 25 concentração alta de sal, mas a concentração real pode variar ao longo de uma faixa dependendo da natureza da proteína e do ligante HIC específico escolhido. Em geral, concentrações de sal entre 1 e 4 M são úteis.

A eluição a partir de um suporte HIC, por etapas ou na forma de gradiente, pode ser realizada de várias maneiras, como a) pela alteração da concentração do sal, b) pela alteração da polaridade do solvente ou c) pela inclusão de detergentes. Reduzindo-se as concentrações de sal, as proteínas adsorvidas são eluídas a fim de se aumentar a hidrofobicidade. As mudanças na polaridade podem ser alcançadas pela inclusão de solventes como o etileno glicol ou o isopropanol, reduzindo assim a força das interações hidrofóbicas. Os detergentes funcionam como deslocadores de proteínas e têm sido utilizados principalmente no contexto da purificação das proteínas da membrana.

Diversos elementos aniônicos podem ser anexados às matrizes para formar suportes catiônicos para cromatografia. Os elementos aniônicos incluem os grupos carboximetil, sulfetil, sulfopropil, fosfato e sulfonato (S). Resinas de trocas iônicas celulósicas como SE52 SE53, SE92, CM32, CM52, CM92, P11, DE23, DE32, DE52, EXPRESS ION™ S e EXPRESS ION™ C estão disponíveis pela Whatman LTD, Maidstone Kent, Reino Unido. Trocadores iônicos baseados em SEPHADEX™ e SEPHAROSE™ e reticulados, também são conhecidos pelos nomes comerciais CM SEPHADEX™ C-25, CM SEPHADEX™ C-50 e SP SEPHADEX™ C-25 SP SEPHADEX™ C-50 e SP-SEPHAROSE™ de Alto Desempenho, SP-SEPHAROSE™ de Fluxo Rápido, SP-SEPHAROSE XL, CM-SEPHAROSE™ de Fluxo Rápido e CM-SEPHAROSE™, CL-6B, todos disponíveis pela GE Healthcare. Exemplos de trocadores iônicos para a realização dessa técnica incluem, mas não estão limitados, por exemplo, aos trocadores iônicos da marca MACROPREP™, como o suporte MACROPREP™ S, suporte MACROPREP™ High S e MACROPREP™ CM, da BioRad, Hercules, Califórnia.

A eluição a partir de suportes cromatográficos catiônicos costuma ser realizada pelo aumento da concentração do sal. Uma vez que a eluição a partir de colunas iônicas envolve a adição de um sal e porque, como

mencionado, o HIC é potencializado em concentração salina, a introdução da etapa HIC após a etapa iônica ou outra etapa salina é utilizada opcionalmente. Em uma realização da invenção, uma etapa cromatográfica de troca catiônica precede a etapa HIC.

5 Exemplos de métodos para a purificação de VEGF estão descritos abaixo, por exemplo, nos itens V e VI. Após redobramento, o material insolúvel no *pool* é removido por filtração profunda. O *pool* clarificado é então carregado em uma cerâmica hidroxiapatita (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrada em 5 mM de HEPPS/0,05% de TRITON™ X100/pH 8. A proteína sem ligação é removida
10 por lavagem com a solução tampão de equilíbrio e o VEGF é eluído utilizando-se uma etapa isocrática de 50 mM de HEPPS/0,05% TRITON™ X100/0,15 M fosfato de sódio/pH 8. O *pool* de VEGF é carregado na coluna de Butil SEPHAROSE™ de Fluxo Rápido (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) equilibrada em 50 mM de HEPPS/0,05% de TRITON™ X100/0,15 M fosfato de sódio/pH 8.
15 A coluna é lavada com um tampão de equilíbrio e o VEGF coletado na coluna efluente. O *pool* da Butil SEPHAROSE™ é carregado na coluna de Macro Prep High S (BioRad, Hercules, CA) que é equilibrada em 50 mM de HEPES/pH 8. Após lavagem, com absorbância efluente a 280 nm para a linha de base, a coluna é lavada com dois volumes de coluna de 50 mM de HEPES/0,25 M
20 cloreto de sódio/pH 8. O VEGF é eluído utilizando-se um gradiente linear de 8-coluna-volume a partir de 0,25-0,75 M de cloreto de sódio em 50 mM de HEPES/pH 8. As frações são coletadas e aquelas contendo VEGF devidamente dobrado, como determinado por um teste de ligação à heparina, são agrupadas.

 O *pool* de Macro Prep High S é condicionado com igual volume de
25 50 mM HEPES/0,8 M de citrato de sódio/pH 7,5. O *pool* condicionado é então carregado em uma coluna de Phenyl 5PW TSK (Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA) equilibrada com 50 mM HEPES/0,4 M de citrato de sódio/pH 7,5. Após a lavagem da proteína não ligada, através de uma coluna

com tampão de equilíbrio, o VEGF é eluído da coluna usando-se uma gradiente de volume de coluna 10 de 0,4 a 0 M de citrato de sódio em 50 mM HEPES, pH 7,5. As frações são avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e aquelas contendo VEGF com pureza suficiente são agrupadas.

5 **EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À HEPARINA EM CÉLULAS HOSPEDEIRAS**

Em resumo, os vetores de expressão capazes de replicação autônoma e expressão protéica relativa ao genoma da célula hospedeira procarionte são introduzidos na célula hospedeira. A construção de vetores de expressão adequados é bastante conhecida na técnica, incluindo as sequências
10 de nucleotídeos das proteínas de ligação à heparina descritas no presente pedido. Ver, por exemplo, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nova Iorque) (2001); Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology*, Current Protocols John Wiley e Sons (Nova Jersey) (2002); e, Baneyx, (1999) *Current Opinion in*
15 *Biotechnology*, 10:411-421. Células procariontes adequadas, incluindo bactérias, como vetores de expressão estão comercialmente disponíveis, por exemplo, na Coleção America de Tipos de Cultura (ATCC), Rockville, Maryland. Métodos para o crescimento em larga escala de células procariontes, e especialmente culturas de células bacterianas são bastante conhecidos na técnica, e podem
20 ser utilizados no contexto da presente invenção.

Por exemplo, células hospedeiras procariontes são transfectadas com vetores de expressão ou clonagem codificando as proteínas de ligação à heparina de interesse e mantidas em cultura em meio nutriente convencional modificado para promotores de indução como apropriado, selecionando
25 transformantes ou amplificando os genes que codificam as seqüências desejadas. O ácido nucléico que codifica o polipeptídeo de interesse é adequado para RNA, cDNA ou DNA genômico de qualquer fonte, desde que codifique o(s) polipeptídeo(s) de interesse. Os métodos são bastante

conhecidos para a seleção de ácido nucléico próprio para a expressão de polipeptídeos heterólogos (inclusive de seus variantes) em hospedeiros microbianos. As moléculas de ácido nucléico que codificam o polipeptídeo são preparadas com uma série de métodos conhecidos na técnica. Por exemplo, um DNA que codifica VEGF é isolado e seqüenciado, por exemplo, utilizando-se sondas de oligonucleotídeos capazes de ligação específica com o gene codificador do VEGF.

O ácido nucléico heterólogo (por exemplo, cDNA ou DNA genômico) é devidamente inserido em um vetor de replicação para a expressão no microorganismo sob o controle de um promotor adequado. Muitos vetores estão disponíveis para este propósito, e a escolha do vetor mais adequado dependerá principalmente do tamanho do ácido nucléico a ser inserido no vetor e a célula hospedeira específica a ser transformada com o vetor. Cada vetor contém diversos componentes dependendo da célula hospedeira com a qual é compatível. Dependendo do tipo específico de hospedeiro, os componentes do vetor geralmente incluem, mas não estão limitados, a um ou mais dos seguintes: uma sequência sinal, uma origem de replicação, um ou mais genes marcadores, um promotor e uma sequência de término da transcrição.

Em geral, os plasmídeos que contêm *replicons* e seqüências de controle derivadas de espécies compatíveis com a célula hospedeira são utilizados juntamente com hospedeiros microbianos. O vetor normalmente carrega um sítio de replicação, bem como seqüências marcadoras capazes de produzir seleção fenotípica em células transformadas. Por exemplo, a *E. coli* é tipicamente transformada com pBR322, um plasmídeo derivado de uma espécie de *E. coli* (ver, por exemplo, Bolivar *et al.*, (1977) *Gene*, 2: 95). O pBR322 contém genes de resistência a ampicilina e tetraciclina e, assim, fornecem meios que facilitam a identificação das células transformadas. O plasmídeo pBR322, ou outros plasmídeos ou fagos bacterianos, também

costumam conter, ou são modificados para conter, promotores que podem ser usados pelo hospedeiro para a expressão de genes marcadores escolhidos.

(I) SEQÜÊNCIA SINAL

Polipeptídeos da invenção podem ser produzidos de forma recombinante não somente diretamente, mas também como uma fusão do polipeptídeo com um polipeptídeo heterólogo, que pode ser uma seqüência sinal ou outro polipeptídeo que possui um sítio de clivagem específico no N-terminal da proteína ou polipeptídeo maduro. A seqüência sinal heteróloga selecionada, tipicamente é aquela reconhecida e processada (isto é, clivada por uma peptidase sinal) pela célula hospedeira. Para células hospedeiras procariontes que não reconhecem e processam a seqüência sinal do polipeptídeo, a seqüência sinal é substituída por uma seqüência sinal procarionte selecionada, por exemplo, do grupo da fosfatase alcalina, penicilinase, lpp, ou líderes enterotoxina II estáveis ao calor.

(II) COMPONENTE ORIGEM DE REPLICAÇÃO

Vetores de expressão contêm uma seqüência de ácido nucléico que permite ao vetor replicar-se em uma ou mais células hospedeiras selecionadas. Tais seqüências são bem conhecidas para uma variedade de micróbios. A origem de replicação do plasmídeo pBR322 é adequada para a maioria das bactérias Gram-negativas como *E. coli*.

(III) SELEÇÃO DO COMPONENTE GENE

Vetores de expressão geralmente contêm um gene de seleção, também chamado de marcador selecionável. Este gene codifica uma proteína necessária para a sobrevivência ou crescimento de células hospedeiras transformadas cultivadas em um meio de cultura seletivo. Células hospedeiras não transformadas com o vetor que contém o gene de seleção não irão sobreviver no meio de cultura. Este marcador selecionável está separado dos marcadores genéticos como utilizado e definido por esta invenção. Seleções

típicas de genes codificam proteínas que (a) conferem resistência a antibióticos ou outras toxinas, por exemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato, ou tetraciclina, (b) complementam deficiências auxotróficas, exceto aquelas causadas pela presença do(s) marcador(es) genético(s) (c) suprem nutrientes críticos não disponíveis a partir de meios complexos, por exemplo, o gene que codifica D-alanina racemase para *Bacilli*.

Um exemplo de um esquema de seleção utiliza uma droga para interromper o crescimento de uma célula hospedeira. Neste caso, essas células que são sucessivamente transformadas com o ácido nucléico, produzem um polipeptídeo que confere resistência à droga e, dessa forma, sobrevivem ao regime de seleção. Exemplos de tal seleção dominante usam as drogas neomicina (Southern *et al.*, (1982) *J. Molec. Appl. Genet.*, 1: 327), ácido micofenólico (Mulligan *et al.*, (1980) *Science* 209: 1422) ou higromicina (Sugden *et al.*, (1985) *Mol. Cell. Biol.*, 5: 410-413). Os três exemplos dados acima empregam genes bacterianos sob controle eucarionte para conduzir resistência à droga apropriada G418 ou neomicina (geneticina), xgpt (ácido micofenólico), ou higromicina, respectivamente.

(IV) COMPONENTE PROMOTOR

Vetores de expressão para produzir a proteína de ligação de heparina de interesse contêm um promotor adequado que é reconhecido pelo organismo hospedeiro e está operacionalmente ligado ao ácido nucléico do polipeptídeo de interesse. Promotores adequados para uso com hospedeiros procariontes incluem β -lactamase e sistemas promotores lactose (Chang *et al.*, (1978) *Nature*, 275: 615; Goeddel *et al.*, (1979) *Nature*, 281: 544), o sistema promotor arabinose (Guzman *et al.*, (1992) *J. Bacteriol.*, 174: 7716-7728), fosfatase lacalina, um sistema promotor triptofano (*trp*) (Goeddel, (1980) *Nucleic Acids Res.*, 8: 4057 e patente EP 36,776) e promotores híbridos como promotor tac (deBoer *et al.*, (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 21-25). No

entanto, outros promotores bacterianos conhecidos são adequados. Suas seqüências de nucleotídeo foram publicadas, com isso permitindo a um técnico no assunto ligá-los ao DNA que codifica o polipeptídeo de interesse (Siebenlist *et al.* 269) usando-se ligantes ou adaptadores para fornecer qualquer sítio de restrição necessário. Ver também, por exemplo, Sambrook *et al.*, acima; e Ausubel *et al.*, acima.

Promotores para uso em sistemas bacterianos também irão conter geralmente uma seqüência Shine-Dalgarno (S.D) operacionalmente ligada ao DNA que codifica o polipeptídeo de interesse. O promotor pode ser removido a partir de fontes de DNA bacterianas pela digestão da enzima de restrição e inseridos no vetor que contém o DNA desejado.

(V) CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DE VETORES

A construção de vetores adequados contendo um ou mais destes componentes listados acima emprega técnicas de ligação padrão. Plasmídeos isolados ou fragmentos de DNA são clivados, reunidos e religados na forma desejada para gerar os plasmídeos necessários.

Para análise da confirmação de seqüências corretas em plasmídeos construídos, as misturas de ligação são usadas para transformar *E. coli* K12 linhagem 294 (ATCC 31,446) ou outras linhagens, e os transformantes são sucessivamente selecionados pela resistência à ampicilina ou tetraciclina quando apropriado. Plasmídeos a partir de transformantes são preparados, analisados pela digestão da endonuclease de restrição, e/ou seqüenciados pelos métodos de Sanger *et al.*, (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74: 5463-5467 ou Messing *et al.*, (1981) *Nucleic Acids Res.*, 9: 309, ou pelo método de Maxam *et al.*, (1980) *Methods in Enzymology*, 65: 499. Ver também, por exemplo, Sambrook *et al.*, acima; e Ausubel *et al.*, acima.

O ácido nucléico que codifica a proteína de ligação à heparina de interesse é inserido nas células hospedeiras. Tipicamente, isto é realizado pela

transformação das células hospedeiras com os vetores de expressão descritos acima e cultivadas em meio de nutriente convencional modificado como apropriado para induzir os diversos promotores.

CULTURA DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS

5 Células procariontes para uso na expressão de proteínas de ligação à heparina de interesse são bem conhecidas na técnica. Células hospedeiras que expressam a proteína recombinante de forma abundante na forma de corpos de inclusão no espaço periplasmático ou intracelular são tipicamente usadas. Células hospedeiras procariontes incluem bactérias, por exemplo, Eubacteria, como organismos Gram-negativos ou Gram-positivos, por 10 exemplo, *E. coli*, *Bacilli* como *B. subtilis*, *Pseudomonas sp* como *P. aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, ou *Serratia marcescens*. Um exemplo de um hospedeiro *E. coli* é *E. coli* 294 (ATCC 31.446). Outras linhagens como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537), e *E. coli* W3110 (ATCC 27.325) são também 15 adequadas. Estes exemplos são mais ilustrativos do que limitantes. A linhagem W3110 é um hospedeiro típico e uma linhagem hospedeira comum para DNA recombinante produto de fermentações. Em um aspecto da invenção, a célula hospedeira deveria secretar quantidades mínimas de enzimas proteolíticas. Por exemplo, a linhagem W3110 pode ser modificada para efetuar uma mutação 20 genética nos genes que codificam proteínas, com exemplos de tais hospedeiros que incluem *E. coli* W3110 linhagens 1A2, 27A7, 27B4, e 27C7 descritas na patente US 5.410.026 emitida em 25 de abril de 1995. Por exemplo, uma linhagem para a produção de VEGF é *E. coli* linhagem W3110 que tem o genótipo *tonAΔ ptr3 phoAΔE15 Δ(argF-lac)169 degP41 ilvG* 25 designado 49B3. Em outro exemplo, uma linhagem para a produção de VEGF é a linhagem *E. coli* (62A7) que tem o genótipo $\Delta fhuA (\Delta tonA) ptr3, lacI^f, lacL8, \Delta ompT \Delta(nmpC-fepE) \Delta degP ilvG^+$. Ver também, por exemplo, tabela das páginas 23 a 24 do WO 2004/092393.

Células procariontes usadas para produzir a proteína de ligação à heparina de interesse são cultivadas em meio conhecido da técnica e adequados para cultura das células hospedeiras selecionadas, incluindo o meio descrito em geral em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nova York) (2001). Meios que são adequados para bactérias incluem, mas não estão limitados a, meio AP5, caldo de nutriente, caldo Luria-Bertani (LB), meio mínimo de Neidhardt e meio mínimo ou completo de C.R.A.P., mais nutrientes suplementares necessários. Em certas preferidas, o meio também contém um agente de seleção escolhido com base na construção do vetor de expressão, para seletivamente permitir o crescimento de células procariontes que contém o vetor de expressão. Por exemplo, ampicilina é adicionada no meio para crescimento de células com genes que expressam resistência à ampicilina. Qualquer suplemento necessário além das fontes de carbono, nitrogênio e fosfato inorgânico pode também ser incluído em concentrações apropriadas, introduzido sozinho ou como uma mistura com outro suplemento ou meio, como uma fonte de nitrogênio complexa. Opcionalmente o meio de cultura pode conter um ou mais agentes de redução selecionados do grupo que consiste de glutatona, cisteína, cistamina, tioglicolato, ditioeritritol e ditiotreititol.

Exemplos de meios adequados são fornecidos nas patentes US 5.304.472 e US 5.342.763. O meio C.R.A.P. limitante de fosfato consiste de 3,57 g de $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$, 0,71 g de Na citrato- $2\text{H}_2\text{O}$, 1,07 g de KCl, 5,36 g de Extrato de Levedura (certificado), 5,36 g de HycaseSFTM-Sheffield, pH ajustado com KOH para 7,3, qs volume ajustado para 872 ml com H_2O deionizada e autoclavada; resfriado para 55°C. e suplementado com 110 ml 1 M MOPS pH 7,3, 11 ml de glicose a 50%, 7 ml de 1M MgSO_4 . Carbenicilina pode então ser adicionada à cultura de indução a uma concentração de 50 µg/ml.

As células hospedeiras procariontes são cultivadas em temperaturas adequadas. Para o crescimento de *E. coli*, por exemplo, a temperatura varia de, por exemplo, aproximadamente 20°C para cerca de 39°C, ou de aproximadamente 25°C para cerca de 37°C, ou a

5 aproximadamente 30°C.

Quando o promotor fosfatase alcalina é empregado, células *E. coli* usadas para produzir o polipeptídeo de interesse desta invenção são cultivadas em meio adequado, no qual o promotor fosfatase alcalino possa ser parcialmente ou completamente induzido como descrito em geral, por exemplo,

10 em Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, Nova York) (2001). A cultura nunca deve ser realizada na ausência de fosfato inorgânico ou em níveis de inanição de fosfato inorgânico. Inicialmente, o meio contém fosfato inorgânico em uma quantidade acima do nível de indução da síntese de proteína e

15 suficiente para o crescimento da bactéria. À medida que as células crescem e utilizam fosfato, o nível de fosfato no meio diminui, causando com isso a indução da síntese do polipeptídeo.

Se o promotor é um promotor induzível, para a indução ocorrer, as células são tipicamente cultivadas até que certa densidade óptica seja atingida, por exemplo, uma A_{550} de cerca de 200, usando-se um processo de

20 densidade celular alto, no qual o ponto de indução seja iniciado (por exemplo, pela adição de um indutor, pela depleção de um componente do meio, etc.), para induzir a expressão do gene que codifica o polipeptídeo de interesse.

Qualquer suplemento necessário pode também ser incluído em

25 concentrações apropriadas que seriam conhecidas pelos técnicos no assunto, introduzido sozinho ou como uma mistura com outro suplemento ou meio, como uma fonte de nitrogênio complexa. O pH do meio pode ser qualquer pH de aproximadamente 5 a 9, dependendo principalmente do organismo

hospedeiro. Para *E. coli*, o pH pode ser, por exemplo, de aproximadamente 6,8 para cerca de 7,4, ou cerca de 7,0.

FORMULAÇÕES DE PROTEÍNAS DE LIGAÇÃO À HEPARINA

O polipeptídeo recuperado, por exemplo, usando-se os métodos
5 descritos no presente pedido, pode ser formulado em um veículo
farmaceuticamente aceitável e para diversos usos diagnósticos, terapêuticos e
outros usos conhecidos para tais moléculas. Por exemplo, o VEGF descrito no
presente pedido pode ser usado em imunoenaios, como o imunoenensaio de
enzima. Usos terapêuticos para as proteínas de ligação à heparina obtidas
10 usando-se os métodos descritos no presente pedido são também
contemplados. Por exemplo, um fator de crescimento ou hormônio, por
exemplo, VEGF, pode ser usado para aumentar o crescimento conforme
desejado. Por exemplo, o VEGF pode ser usado para promover cicatrização,
por exemplo, de feridas agudas (por exemplo, queimaduras, feridas cirúrgicas,
15 feridas normais, etc.) ou uma ferida crônica (como, úlcera diabética, úlcera de
pressão, uma úlcera nervosa, uma úlcera venosa, etc.), para promover o
crescimento do cabelo, para promover o crescimento e reparo de tecido (por
exemplo, osso, fígado, etc.), etc.

Formulações terapêuticas de proteínas de ligação à heparina são
20 preparadas para armazenamento pela mistura de uma molécula, por exemplo,
um polipeptídeo que tem o grau desejado de pureza, com veículos opcionais
farmaceuticamente aceitáveis, excipientes ou estabilizantes, (*Remington's
Pharmaceutical Sciences* 18^a edição, Gennaro, A. Ed. (1995)), na forma de
formulações liofilizadas ou soluções aquosas. Veículos aceitáveis, excipientes ou
25 estabilizantes não são tóxicos para receptores nas dosagens e concentrações
empregadas, e incluem tampões como fosfato, citrato, e outros ácidos orgânicos;
antioxidantes incluindo ácido ascórbico e metionina; conservantes (como
octadecildimetilbenzil cloreto de amônio; cloreto de hexametônio; cloreto de

benzalcônio, cloreto de benzetônio; fenol, butil ou álcool benzílico; alquilparabenos como metil- ou propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; e m-cresol); polipeptídeos de baixo peso molecular (menos que aproximadamente 10 resíduos); proteínas, como albumina de soro, gelatina, ou imunoglobulinas; polímeros hidrofílicos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina, ou lisina; monossacarídeos, dissacarídeos, e outros carboidratos incluindo glicose, manose ou dextrinas; agentes quelantes como EDTA; açúcares como sacarose, manitol, trealose ou sorbitol; formação de sais de contra íons como sódio; complexos metálicos (por exemplo, complexo Zn-proteína); e/ou surfactantes não-iônicos como TWEENTM, PLURONICSTM ou polietileno glicol (PEG).

Em certas realizações, as formulações a serem usadas para administração *in vivo* são estéreis. Isto é facilmente realizado por filtração através de membranas de filtração estéreis. O HBP pode ser armazenado na forma liofilizada ou como uma solução aquosa ou na forma de gel. O pH das preparações de HBP pode ser de aproximadamente 5 a 8, embora valores de pH mais altos ou mais baixos possam também ser apropriados em certos casos. Deve-se entender que o uso de certos excipientes, veículos ou estabilizantes podem resultar na formação de sais do HBP.

Tipicamente para cicatrização de ferida, o HBP é formulado para entrega em local específico. Quando aplicado de forma tópica, o HBP é adequadamente combinado com outros ingredientes como veículos e/ou adjuvantes. Não existem limitações na natureza de tais ingredientes, exceto que eles devam ser farmacologicamente aceitáveis e eficazes para a administração pretendida, e não podem degradar significativamente a atividade dos ingredientes ativos da composição. Exemplos de veículos adequados incluem pomadas, cremes, géis, sprays ou suspensões, com ou sem colágeno purificado. As composições também podem ser impregnadas em curativos

estéreis, adesivos transdérmicos, emplastos e bandagens, opcionalmente na forma líquida ou semi-líquida.

Para se obter uma formulação em gel, o HBP formulado em uma composição líquida pode ser misturado com uma quantidade efetiva de um polissacarídeo solúvel em água ou polímero sintético como polietileno glicol para formar um gel de viscosidade apropriada para ser aplicado topicamente. Os polissacarídeos que podem ser usados incluem, por exemplo, derivados da celulose como derivados da celulose esterificada, incluindo alquil celulosas, hidroxialquil celulosas e alquilhidroxialquil celulosas, por exemplo, metilcelulose, hidroxietil celulose, carboximetil celulose, hidroxipropil metilcelulose e hidroxipropil celulose; amido e amido fracionado; ágar; ácido algínico e alginatos; goma arábica; pululana; agarose; carragena; dextranos; dextrinas; frutanos; inulina; mananos; xilanos; arabinanos; quitosanas; glicogênios; glucanos e biopolímeros sintéticos; como também gomas como goma xantana, goma guar, goma de alfarroba; goma arábica; goma de tragacanto e goma karaya; e derivados e misturas destes. Em certas realizações da invenção, o agente coloidal no presente pedido é aquele que, por exemplo, é inerte em sistemas biológicos, não tóxico, simples para preparar e/ou não muito líquido ou viscoso, e não irá desestabilizar o HBP contido neste.

Em certas realizações da invenção, o polissacarídeo é um derivado de celulose esterificada, em outra realização é aquele bem definido, purificado e listado na USP, por exemplo, metilcelulose e os derivados de hidroxialquil celulose, como hidroxipropil celulose, hidroxialquil celulose e hidroxipropil metil celulose. Em uma realização, a metilcelulose é o polissacarídeo. Se a metilcelulose é empregada no gel, por exemplo, compreende aproximadamente 2% a 5%, ou cerca de 3%, ou aproximadamente 4% ou aproximadamente 5%, do gel e o HBP está presente em uma quantidade de aproximadamente 300 a 1.000 mg por ml de gel.

O polietileno glicol útil para gelificação é tipicamente uma mistura de polietileno glicóis de baixo e alto peso molecular para se obter a viscosidade apropriada. Por exemplo, uma mistura de um polietileno glicol de peso molecular de 400 a 600 com um de peso molecular de 1500 seria efetiva para este propósito quando misturado na razão apropriada para se obter uma pasta.

O termo "água solúvel" quando aplicado aos polissacarídeos e polietileno glicóis tem a intenção de incluir soluções coloidais e dispersões. Em geral, a solubilidade dos derivados de celulose é determinada pelo grau de substituição de grupos éter, e os derivados estabilizantes úteis no presente pedido devem ter uma quantidade suficiente de tais grupos éter por unidade de anidroglicose na cadeia de celulose para fornecer os derivados solúveis em água. Um grau de substituição de éter de pelo menos 0,35 grupos éter por unidade de anidroglicose é geralmente suficiente. Adicionalmente, os derivados de celulose podem estar na forma de sais de metal alquil, por exemplo, os sais Li, Na, K ou Cs.

Os ingredientes ativos também podem ser inseridos em microcápsulas ou preparações de liberação contínua. Ver, por exemplo, *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18ª edição, Gennaro, A. Ed. (1995). Ver também Johnson *et al.*, *Nat. Med.*, 2:795-799 (1996); Yasuda, *Biomed. Ther.*, 27:1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology*, 8:755-758 (1990); Cleland, *Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems*, em *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell e Newman, eds, (Plenum Press: Nova Iorque, 1995), páginas 439-462; WO 97/03692, WO 96/40072, WO 96/07399 e US 5.654.010; DE 3.218.121; Epstein *et al.*, (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688-3692; Hwang *et al.*, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030-4034; EP 52.322; EP 36.676; EP 88.046; EP 143.949; EP 142.641; pedido de patente JP 83-118008; US 4.485.045 e US 4.544.545; e EP 102.324.

Os exemplos a seguir são oferecidos com o objetivo de exemplos e não com o objetivo de limitação.

EXEMPLOS

EXEMPLO I

5 VEGF RECOMBINANTE HUMANO EXPRESSO EM *ESCHERICHIA COLI*

O VEGF recombinante humano foi expresso em *Escherichia coli*. Durante a síntese, a proteína foi secretada no espaço periplasmático e acumulada em corpos refráteis. Assim, foram realizados estudos para alcançar a extração e o redobramento da proteína. Estes estudos
10 revelaram pelo menos 3 tipos de VEGF (Figura 1), isoladas através de técnicas padrão de recuperação sem a adição de um agente polianiónico. Estudos com VEGF nativo mostraram que a adição à heparina aumenta a resistência à desnaturação induzida por grupos caotrópicos e tiol (Figura 2). Além disso, a heparina aumentou significativamente a quantidade do
15 VEGF redobrado corretamente em experimentos de redobramento de pequena escala. Para adaptar este resultado a um processo em larga escala, foram descobertas condições que permitiram o redobramento VEGF na presença de sulfato de dextrano, uma molécula estruturalmente análoga à heparina. A adição de sulfato de dextrano melhorou o
20 rendimento em 3 a 5 vezes do VEGF biologicamente ativo corretamente dobrado comparado aos controles.

MÉTODOS

PLASMÍDEO PARA A EXPRESSÃO DO VEGF₁₆₅

O plasmídeo pVEGF171 foi designado para a expressão do
25 VEGF₁₆₅ (ver, por exemplo, Leung *et al.*, (1989) *Science*, 246:1306-1309) no periplasma de *E. coli*. A transcrição da sequência de codificação do VEGF foi mantida sob estrito controle do promotor de fosfatase alcalina (AP) (ver, por exemplo, Kikuchi *et al.*, (1981) *Nucleic Acids Research*,

9:5671-8), enquanto as seqüências necessárias para o início da tradução foram fornecidas pela região trp Shine-Dalgarno (ver, por exemplo, Yanofsky *et al.*, (1981) *Nucleic Acids Research*, 9:6647-68). A seqüência de codificação do VEGF foi unida a jusante da seqüência sinal de enterotoxina II (STII) bacteriana estável para calor (ver, por exemplo, Lee *et al.*, (1983) *Infect. Immun.* 42:264-8; e, Picken *et al.*, (1983) *Infect. Immun.* 42:269-75) para secreção subsequente no periplasma de *E. coli*. As modificações de códon na seqüência sinal de STII forneceram um nível de tradução ajustado, o qual levou à taxa ideal de acúmulo do VEGF no periplasma (ver, por exemplo, Simmons e Yansura, (1996) *Nature Biotechnology*, 14:629-34). O lambda para o terminador da transcrição (ver, por exemplo, Scholtissek e Grosse, (1987) *Nucleic Acids Research* 15:3185) foi localizado a jusante do códon de terminação da tradução do VEGF. A origem de replicação, e ambos os genes de resistência a ampicilina e tetraciclina, foram fornecidos pelo plasmídeo pBR322. Ver, por exemplo, Bolivar *et al.*, (1977) *Gene* 2:95-113.

HOMOGENEIZAÇÃO CELULAR E PREPARO DO CORPO REFRACTIVO

Células coletadas de *Escherichia coli* foram congeladas e armazenadas a -70C°. As células foram coletadas por centrifugação com BTUX (centrífuga, Alfa laval) e congeladas utilizando-se BEPEX (freezer de larga escala). As células foram suspensas em 5 volumes de 50 mM HEPES/150 mM de NaCl/5 mM EDTA pH 7,5 (5L/kg grânulo) e homogeneizadas em um modelo Gaulin de 15 M (pequena escala) ou M3 (larga escala) (Gaulin Corporation, Everett, MA). A suspensão celular foi então diluída com um volume igual do mesmo tampão e corpos refráteis foram colhidos por centrifugação em uma centrífuga de alimentação contínua BTPX 205 (Alfa Laval Separation AB (Tumba, Suécia). Uma centrífuga de escala intermediária utilizou SA1. Alternativamente, as

células podem ser homogeneizadas e os pellets podem ser colhidos diretamente sem congelamento em BEPEX e reidratação.

EXEMPLO II

EXTRAÇÃO E REDOBRAMENTO DO VEGF HUMANO RECOMBINANTE EXPRESSO EM *E. COLI*

5

MÉTODOS

EXTRAÇÃO E REDOBRAMENTO

O pellet refrativo foi suspenso em um tampão de extração contendo 7 M de Uréia/50 mM HEPES/pH 8 (concentração final) em 5 L de tampão/kg de pellet. Ditioneitol sólido foi então adicionado a 3,7 g/kg de pellet para uma concentração final de 4 mM. Ver, por exemplo, a Figura 9 para o efeito da uréia e do DTT sobre a extração do VEGF. A suspensão foi completamente misturada por 1 a 2 h a 20°C. O pH pode ser ajustado com 50% de hidróxido de sódio (w/w) a pH 8,0. O redobramento foi iniciado com a adição de 19 volumes de tampão de redobramento por volume de tampão de extração. O tampão de redobramento continha 50 mM HEPES/1 M a 2M de Uréia/2 a 5 mM de cisteína/0,05% a 0,2% TRITON™ X100/pH 8, em concentração final. Ver, por exemplo, a Figura 10 para o efeito da concentração de uréia e DTT presente durante o redobramento. Foram adicionados sulfato de dextrano, heparina ou sulfato de sódio conforme indicado. A incubação de redobramento foi realizada em temperatura ambiente por 4 a 24 horas. Opcionalmente, a incubação pode ser conduzida em temperatura ambiente por até 48 horas. O dobramento foi monitorado por SDS-PAGE e/ou HPLC de heparina. O produto foi purificado por filtração profunda com um filtro Cuno 90SP seguido por 25 filtração de 0,45 µm.

TESTE HPCL DE LIGAÇÃO DE HEPARINA

A qualidade e a quantidade do VEGF redobrado corretamente foram determinadas usando-se uma coluna contendo heparina imobilizada. A

coluna POROS HE2/M (4,6 x 100 mm, HE2/M da PerSeptive BioResearch Products, Cambridge, MA) foi equilibrada em 10 mM de fosfato de sódio, pH 7 contendo 0,15 M de cloreto de sódio. Com uma taxa de fluxo de 1 mL/min ou 2 ml/min, as colunas foram eluídas utilizando-se um gradiente linear de 0,15 M a 2 M de cloreto de sódio em tampão balanceado durante 10 min. Em alguns testes, a eluição foi feita em 16 min. O agente de eluição foi monitorado a 280 nm. Tipicamente, a maior parte das proteínas foi eluída no volume nulo e 3 classes do VEGF puderam ser identificadas. A afinidade mais alta, o tipo com eluição mais tardia foi identificado como o VEGF dobrado corretamente e subseqüentemente identificado como "Pico 3 de VEGF".

RESULTADOS

A HEPARINA PROTEGE O VEGF CONTRA A DESNATURAÇÃO MEDIADA POR CISTEÍNA

A adição de 10 mM de cisteína ao VEGF nativo levou a uma grande redução do número de moléculas dobradas corretamente (Figura 2). Essa desnaturação foi inibida pela adição de 2 formas diferentes de heparina em concentrações a partir de 20 mM.

TABELA IA

O EFEITO DA HEPARINA E DO SULFATO DE DEXTRANO NO REDOBRAMENTO DO VEGF

Adição	Concentração (µg/ml)						% de aumento ou aumento do dobramento
	0	10	55	100	200	400	
Nenhum	5,3*						-
Heparina baixo MW(3 kd)		12,2	14,2	14,8	14,1		179%
Heparina alto MW(6 kd)		15,3	16,6	13,9	15,3		213%
Sulfato de Dextrano(10kd)		15,9	15,4	13,6	7,4	8,3	191%

Os valores na tabela referem-se à quantidade do VEGF em Pico 3 formada (em mg) por g de pellet refrativo. A concentração de cada adição está indicada. * Controle médio (5,6+5,0=5,3).

TABELA IB**O EFEITO DO SULFATO DE SÓDIO NO REDOBRAMENTO DO VEGF**

Adição	Concentração (µg/ml)						%	
	0	50	98	195	293	455	de aumento	ou aumento do dobramento
Nenhum	5,3						-	-
Sulfato de Sódio		6,9	9,1	10,4	10,9	10,4	106%	2,1

Os valores na tabela referem-se à quantidade do VEGF em Pico 3 formada (em mg) por g de pellet refrativo. A concentração de sulfato de sódio está indicada.

TABELA II**O EFEITO DE HEPARINAS E SULFATOS DE DEXTRANO NO REDOBRAMENTO DO VEGF**

Adição	Concentração (µg/ml)					%	
	0	2,5	12,5	50	100	de aumento	ou aumento do dobramento
Nenhum	2,2					-	-
Sulfato de Dextrano (5kd)		10,1	13,7	13,4	11,2	523%	6,2
Sulfato de Dextrano (8kd)		9,9	17,2	14,0	12,9	682%	7,8
Sulfato de Dextrano (10kd)		13,8	19,2	14,6	10,1	773%	8,7
Heparina baixo MW (3kd)		10,4	16,9	14,7		66,8%	7,7
Heparina alto MW (6kd)		14,1	18,8	20,2		818%	9,2

Os valores na tabela referem-se à quantidade do VEGF em Pico 3 formada (em mg) por g de pellet refrativo.

RESUMO**HEPARINA E SULFATO DE DEXTRANO AUMENTAM O RENDIMENTO DE****REDOBRAMENTO**

Devido às propriedades protetoras contra desnaturação descritas acima, o efeito de diversas formas diferentes de polímeros sulfatados sobre o redobramento do VEGF foi investigado. Como observado na TABELA Ia (e na Fig. 5), tanto as formas de heparina de alto peso molecular como as de baixo

peso molecular aumentaram o rendimento de VEGF re-enovelado em aproximadamente 3 vezes. Como observado na TABELA Ib (e na Figura 6), o sulfato de sódio aumentou o rendimento de VEGF redobrado em aproximadamente 2 vezes. A forma de sulfato dextrano 10 Kd também se mostrou eficaz no aumento do rendimento de redobramento; contudo, a faixa de concentração mais alta investigada levou à inibição do substrato. Pesquisas adicionais demonstraram que as formas de sulfato de dextrano 5 Kd, 8 Kd e 10 Kd aumentaram significativamente o rendimento do VEGF no redobramento (TABELA II). Ver Figura 7. Ver também Figura 8.

EXEMPLO III

EFEITO DE DIFERENTES TAMPÕES E TRITON™ X-100 SOBRE A RECUPERAÇÃO DO VEGF

RESULTADOS

<u>Tampão</u>	<u>VEGF (mg/g de pellet)</u>
HEPES, pH 8	13,3
HEPES, pH 8 com TRITON™	14,3
HEPPS, pH 8	16,6
Tris HCl, pH 8	12,8

<u>Tampão</u>	<u>VEGF (mg/g de pellet)</u>
HEPES, pH 7,2	9,1
HEPPS, pH 7,2	10,7
HEPES, pH 8	10,3
HEPPS, pH 8	12,8
HEPES, pH 8 + TRITON™ X-100	12,4
HEPPS, pH 8 + TRITON™ X-100	13,9

RESUMO

A combinação dos dados dos Exemplos I, II e III demonstra um aumento significativo (2 a 5 vezes) do rendimento pela inclusão de sulfatos de heparina ou sulfatos de dextrano no redobramento do VEGF, um fator de

crescimento de ligação à heparina, bem como das condições de recuperação. Este método foi implementado com sucesso em escala industrial. Espera-se que este método seja aplicável ao redobramento de outros fatores básicos de crescimento e outras proteínas com sítio de ligação à heparina.

5

EXEMPLO IV

EXTRAÇÃO E REDOBRAMENTO DO VEGF HUMANO RECOMBINANTE EXPRESSO EM

ESCHERICHIA COLI-II

MÉTODOS

EXTRAÇÃO E REDOBRAMENTO

10 O pellet refrativo foi suspenso em tampão de extração com concentração final de 7 M de Uréia, 2-30 mM de DTT (por exemplo, 10 mM de DTT), 50 mM de HEPPS/pH 7-9 (por exemplo, pH 8) em 5 L de tampão/kg de pellet. A suspensão foi completamente misturada por 1 a 2 h em temperatura ambiente. O redobramento foi iniciado com a adição de 19 volumes de
15 tampão de redobramento por volume de tampão de extração. O tampão de redobramento contido na concentração final de 1 M ou 1,3 M de uréia, 2-15 mM de cisteína (por exemplo, 7,5 mM de cisteína), 0,5 mM de DTT, 0 a 0,75 M de arginina (por exemplo, 100 mM de arginina), 15 mg/L de sulfato de dextrano, 50 mM de HEPPS, 0,05% TRITON™ X100/pH 8. Ver, por exemplo,
20 Figura 12 para o efeito sobre o redobramento na presença de aminoácidos carregados, onde a adição de histidina produziu o mesmo efeito obtido sem aminoácidos aditivos. A incubação de redobramento foi realizada em temperatura ambiente por 12 a 24 horas. Opcionalmente, a incubação pode ser conduzida em temperatura ambiente por até 48 horas. Opcionalmente,
25 pode-se adicionar ar ou oxigênio durante o processo de redobramento (0,3 a 1 cm³/min/L). O dobramento foi monitorado por SDS-PAGE e/ou HPLC de heparina. O produto foi purificado por filtração profunda com um filtro Cuno 90SP seguido por filtração de 0,45 µm.

A diluição total das etapas de extração e redobramento foi de 1:100. O aumento da diluição total das etapas de extração e redobramento, por exemplo, de 1:100 para 1:200, aumentou a quantidade total do VEGF ativo embora a concentração fosse mais baixa. Ver Figura 13.

5 A eficiência do redobramento pode ser determinada pela quantidade de dímeros/monômeros, sendo que os monômeros podem ser determinados por uma coluna de HPLC de fase reversa com C18 e a formação de dímeros pode ser determinada por cromatografia em coluna de heparina ou teste de cromatografia de troca catiônica SP-5PW.

10 EXEMPLO V

REDOBRAMENTO EM LARGA ESCALA

A fim de testar a escalabilidade das condições otimizadas de redobramento, foram realizados estudos para examinar a cinética de redobramento em pequena (0,1 L), média (1 L) e larga (250 L a 400 L) escalas. Como mostrado na Figura 4, a cinética de redobramento em larga escala não mostrou distinção das escalas mais baixas e a titulação final do VEGF redobrado aumentou levemente. Estes dados demonstram a escalabilidade do redobramento com sulfato de dextrano. O produto foi ainda purificado por filtração profunda com um filtro Cuno 90SP seguido por filtração de 0,45 µm.

20 EXEMPLO VI

PURIFICAÇÃO I DE rhVEGF APÓS REDOBRAMENTO

CROMATOGRAFIA COM HIDROXIAPATITA CERÂMICA MACROPREP

25 Após o redobramento, o material insolúvel no *pool* foi removido por filtração profunda. O *pool* purificado foi então carregado em uma coluna de hidroxapatita cerâmica (35D x 31H= 30L) (Bio Rad, Hercules, CA) equilibrada em 50 mM de HEPES/0,05% TRITON™ X100/pH 8. As proteínas não ligadas foram removidas por lavagem com tampão de equilíbrio e o VEGF eluído utilizando-se uma etapa isocrática de 50 mM de HEPES/0,05% TRITON™ X100/0,15 M de

fosfato de sódio/pH 8. A taxa de fluxo foi de 120 cm/h. As frações em *pools* foram determinadas por análise de frações por HPLC de heparina.

CROMATOGRAFIA DE FLUXO RÁPIDO EM BUTIL SEPHAROSE™

O *pool* do VEGF foi carregado em uma coluna de Fluxo Rápido em Butil SEPHAROSE™ (35 D x 26 H=25L) (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) equilibrada em 50 mM de HEPPS/0,05% TRITON™ X100/0,15 M de fosfato de sódio/pH 8. A taxa de fluxo foi de 100 cm/h. A coluna foi lavada com tampão de equilíbrio e o VEGF recolhido na coluna efluente. As frações foram colhidas e aquelas que continham proteínas foram agrupadas, pela medida de A280nm.

CROMATOGRAFIA MACRO PREP HIGH S

O *pool* de Butil SEPHAROSE™ foi carregado em uma coluna Macro Prep High S (30D x 39 H=27 L) (BioRad, Hercules, CA) que foi equilibrado em 50 mM de HEPES/pH 8. Após a lavagem do efluente com absorvância a 280 nm para a linha de base, a coluna foi lavada com dois volumes de coluna de 50 mM de HEPES/0,25 M de cloreto de sódio/pH 8. O VEGF foi eluído utilizando-se um gradiente volume coluna 8 a partir de 0,25 a 0,75 M de cloreto de sódio em 50 mM de HEPES/pH 8. A taxa de fluxo foi de 75 a 200 cm/h. As frações foram recolhidas e aquelas contendo VEGF corretamente dobrado conforme determinado por um ensaio de ligação à heparina, por exemplo, HPLC de heparina, foram agrupadas.

CROMATOGRAFIA EM FENIL 5PW TSK

O *pool* de Macro Prep High S foi condicionado com igual volume de 50 mM de HEPES/0,8 M de citrato de sódio/pH 7,5. O *pool* condicionado foi então carregado em uma coluna de Phenyl 5PW TSK (Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA) equilibrada com 50 mM de HEPES/0,4 M de citrato de sódio/pH 7,5. Após lavagem da proteína não ligada através de uma coluna com tampão de equilíbrio, o VEGF foi eluído da coluna usando-se um gradiente de volume de coluna 10 de 0,4 a 0 M de citrato de sódio em 50 mM de HEPES, pH

7,5. As frações foram avaliadas por eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e aquelas contendo VEGF com pureza suficiente foram agrupadas.

ULTRAFILTRAÇÃO/DIAFILTRAÇÃO

O *pool* de VEGF foi ultrafiltrado por uma membrana de celulose regenerada de 5kD (G30619); Unit Pellicon; taxa de alimentação de 17,1 L/min. A membrana foi condicionada com polissorbato 20. O *pool* de VEGF foi ultrafiltrado em uma concentração de 6 g/L (UF1). A amostra foi diafiltrada com 7 a 14 DV (Diavolume) com 5 mM de succinato de sódio/275 mM de trealose/pH 5,0. A formulação final foi de 5 mM de succinato de sódio/275 mM trealose/0,01% polissorbato 20/pH 5,0, em uma concentração de 5 mg/ml.

EXEMPLO VII

PURIFICAÇÃO II DO RHVEGF APÓS REDOBRAMENTO

CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE TROCA CATIONICA

Após redobramento, o material insolúvel no *pool* pode ser removido por filtração profunda. O *pool* redobrado é condicionado em pH 5,0 a 7,5 e cerca de 2 a 6,5 mS/cm. Em uma realização, o *pool* é condicionado em pH 6,5 e 5 mS/cm. O *pool* de redobramento pode então ser carregado em uma coluna de carregamento extremo de sulfopropil (SPXL) e eluído utilizando-se gradiente com concentração salina crescente. As frações separadas em *pool* podem ser determinadas por análise das frações de HPLC de heparina.

COLUNA DE INTERAÇÃO HIDROFÓBICA (HIC)

O *pool* de VEGF eluído a partir do SPXL pode ser condicionado a 50mS/cm para ser carregado em uma coluna de cromatografia Fenil TSK (Tosohaas, Montgomeryville, PA). As frações são coletadas e aquelas contendo a proteína são agrupadas.

IEX Ou MODO MISTO

O *pool* do fenil TSK pode ser carregado em uma coluna de cromatografia de troca iônica (IEX) ou cromatografia de modo misto. As frações

são coletadas e aquelas que contêm VEGF dobrado corretamente, como determinado nos ensaios descritos no presente pedido, são agrupadas.

ULTRAFILTRAÇÃO/DIAFILTRAÇÃO

O *pool* de VEGF pode ser ultrafiltrado por uma membrana de
5 celulose regenerada de 5kD (G30619); Unit Pellicon; taxa de alimentação de
17,1 L/min. Por exemplo, a membrana é condicionada com polissorbato 20. O
pool de VEGF é ultrafiltrado até uma concentração de 6 g/L (UF1). A amostra é
diafiltrada com 7-14 DV (Diavolume) com 5 mM de Succinato de Sódio/275 mM
de Trealose/pH 5,0.

10 Nos métodos e processos aqui descritos, a pureza final e/ou
atividade pode ser avaliada por mapeamento peptídico, mapeamento de
bissulfeto, SDS-PAGE (tanto reduzido como não-reduzido), dicróismo
circular, lisado de amebócito *Limulus* (LAL), cromatografia de heparina,
HPLC de heparina (por exemplo, HPLC de heparina pode ser usado para
15 determinar a concentração de dímeros de VEGF), cromatografia HPLC de
fase reversa (rp) (por exemplo, a rPHPLC pode ser usada para determinar
a concentração de monômeros de VEGF), ligação à heparina, ligação ao
receptor (por exemplo para VEGF como: Bioanalytic R&D de ligação ao
receptor KDR, e/ou ligação ao receptor Flt1), Análise SEC, teste celular,
20 teste de potência HUVEC, ELISA com anticorpos anti-VEGF, análise por
espectrometria de massa, etc.

Sabe-se que os depósitos, exemplos e realizações descritas no
presente pedido são somente para fins ilustrativos e que quaisquer
modificações ou alterações, em vista do já exposto, serão sugeridas aos
25 técnicos no assunto e deverão ser incluídas no espírito e alcance deste pedido,
e escopo das reivindicações anexas. Todas as publicações, citações, patentes
e pedidos de patentes citados no presente pedido são integralmente
incorporados ao presente, como referência para todos os propósitos.

Lys Cys Ser Cys Lys Asn Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln
140 145 150

Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg
155 160 165

REIVINDICAÇÕES

1. MÉTODO PARA RECUPERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO A HEPARINA, em que dita proteína de ligação à heparina é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que se liga a heparina, a partir de uma cultura celular procarionte, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) isolamento da dita proteína de ligação à heparina a partir do periplasma da dita cultura celular procarionte;

(b) solubilização da dita proteína de ligação à heparina em uma primeira solução tamponada que compreende um agente caotrópico e um agente redutor;

(c) incubação da dita proteína de ligação à heparina em uma segunda solução tamponada que compreende um agente caotrópico e um agente polianiônico sulfatado, em que dito agente polianiônico sulfatado é sulfato de dextrano ou sulfato de sódio, por um período e sob condições tais que o redobramento da proteína de ligação à heparina ocorra; e

(d) recuperação da dita proteína de ligação à heparina redobrada, em que há um aumento de cerca de 2 a 5 vezes na proteína de ligação à heparina redobrada recuperada comparado à incubação sem agente polianiônico sulfatado.

2. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o VEGF é VEGF₁₆₅.

3. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sulfato de dextrano tem entre cerca de 3.000 e 10.000 daltons.

4. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que o sulfato de dextrano tem entre cerca de 8.000 e 10.000 daltons.

5. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que as ditas primeira e segunda soluções tamponadas compreendem HEPPS a pH 8,0.

6. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a concentração de sulfato de sódio está compreendida entre cerca de 50 e 500 mM.

7. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita segunda solução tamponada compreende adicionalmente:

- (i) um agente redutor;
- (ii) um detergente não-iônico; ou
- (iii) arginina e/ou lisina.

8. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o agente redutor da segunda solução tamponada compreende uma combinação de cisteína e DTT.

9. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que a dita etapa de recuperação (d) compreende:

(i) seqüencialmente colocar em contato a dita proteína de ligação à heparina redobrada com um suporte cromatográfico de hidroxiapatita; um primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica; um suporte cromatográfico catiônico e um segundo suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, e eluir seletivamente a proteína de ligação à heparina de cada suporte, ou

(ii) seqüencialmente colocar em contato a dita proteína de ligação à heparina redobrada com um suporte de troca catiônica, um suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, e um suporte cromatográfico de troca iônica, e eluir seletivamente a proteína de ligação à heparina de cada suporte.

10. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que ditos primeiro e segundo suportes cromatográficos de interação hidrofóbica são selecionados do grupo que consiste em resinas butil-, propil-, octil- e aril-agarose.

11. MÉTODO, de acordo com a reivindicação 9, caracterizado pelo fato de que dito primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica é

um suporte de butil-agarose e dito segundo suporte cromatográfico de interação hidrofóbica é um suporte de resina fenil-agarose.

12. MÉTODO PARA RECUPERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À HEPARINA, em que dita proteína de ligação à heparina é o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) que se liga a heparina, caracterizado pelo fato de compreender as etapas de:

(a) isolamento da dita proteína de ligação à heparina a partir do periplasma da dita cultura celular procarionte;

(b) solubilização da dita proteína de ligação à heparina em uma primeira solução tamponada que compreende um agente caotrópico e um agente redutor;

(c) incubação da dita proteína de ligação à heparina desnaturada em uma segunda solução tamponada que compreende um agente caotrópico e um agente polianiônico sulfatado, em que dito agente polianiônico sulfatado é sulfato de dextrano ou sulfato de sódio, por um período e sob condições tais que o redobramento da dita proteína de ligação à heparina possa ocorrer, em que há um aumento de cerca de 2 a 5 vezes de proteína de ligação à heparina redobrada recuperada comparado à incubação sem agente polianiônico sulfatado; e

(d) seqüencialmente colocar em contato a dita proteína de ligação à heparina redobrada com (i) um suporte cromatográfico de hidroxiapatita, um primeiro suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, um suporte cromatográfico catiônico e um segundo suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, e eluir seletivamente a proteína de ligação à heparina de cada suporte ou (ii) um suporte de troca catiônica; um suporte cromatográfico de interação hidrofóbica, e um suporte cromatográfico de troca iônica, e eluir seletivamente a proteína de ligação à heparina de cada suporte.

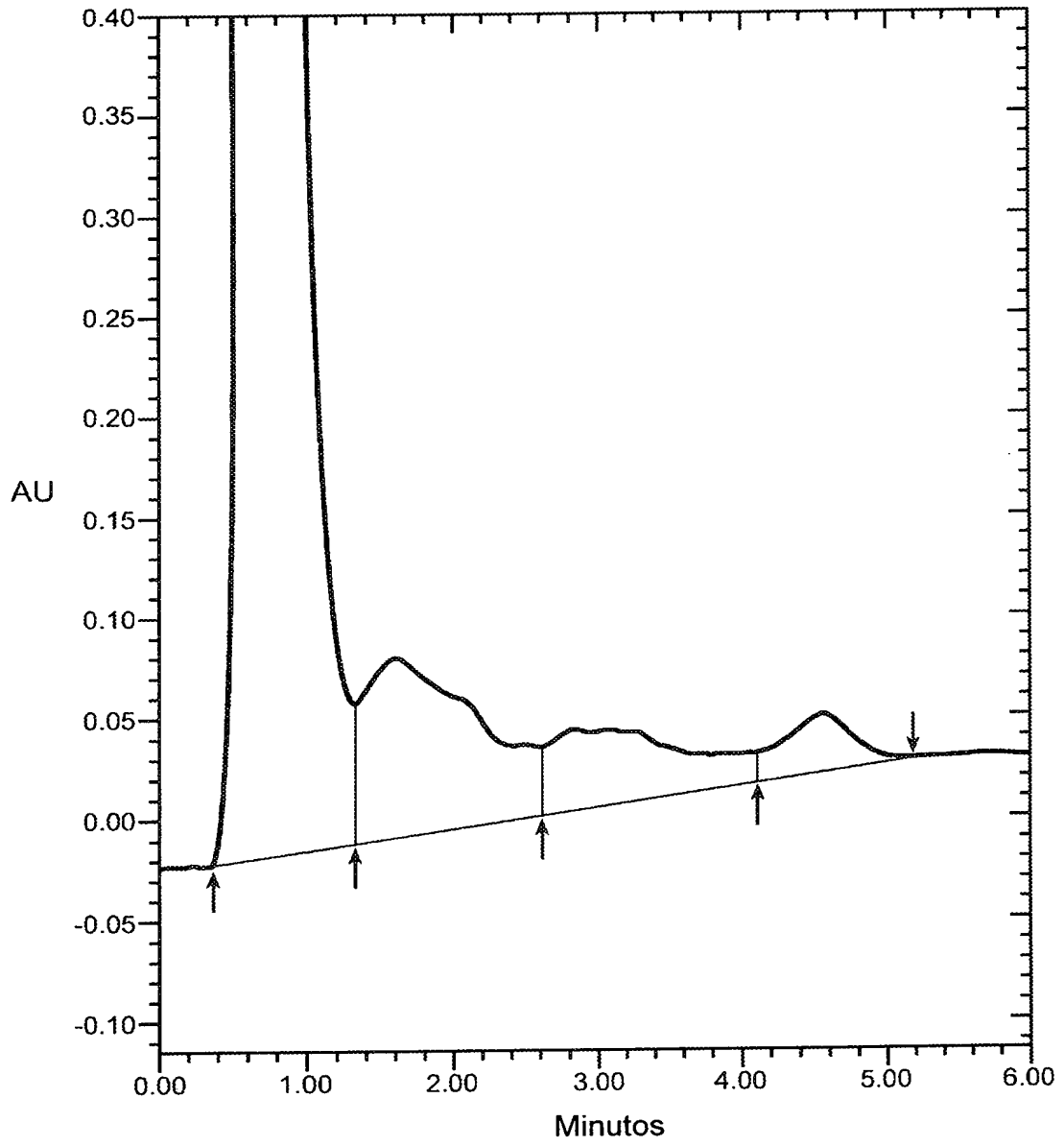


Fig. 1

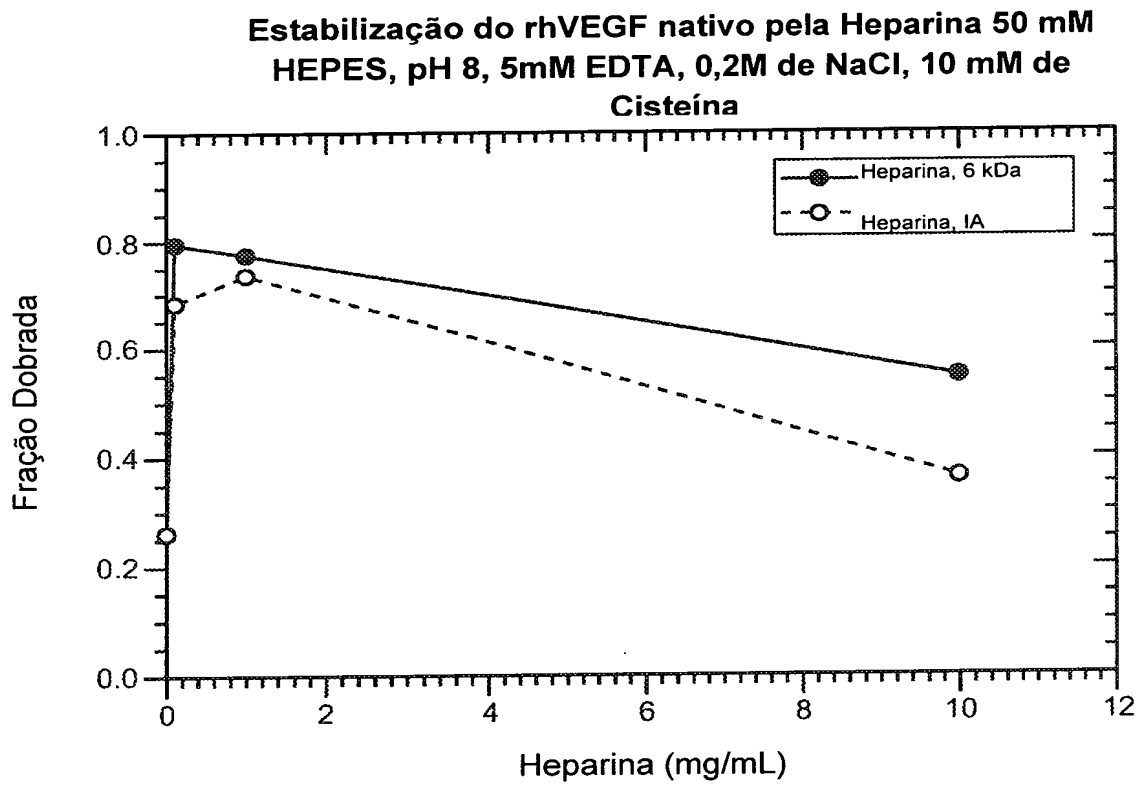


Fig. 2

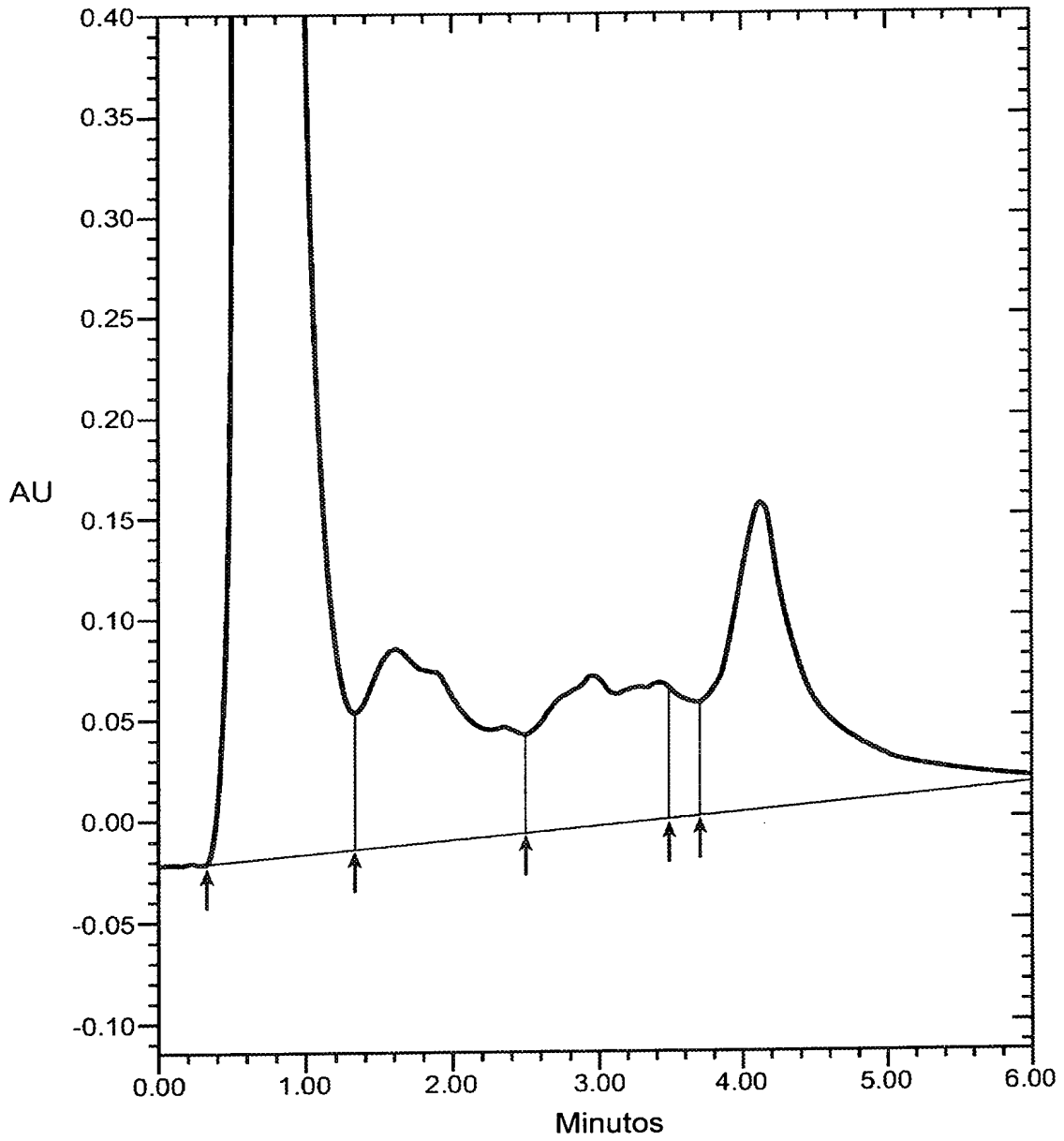


Fig. 3A

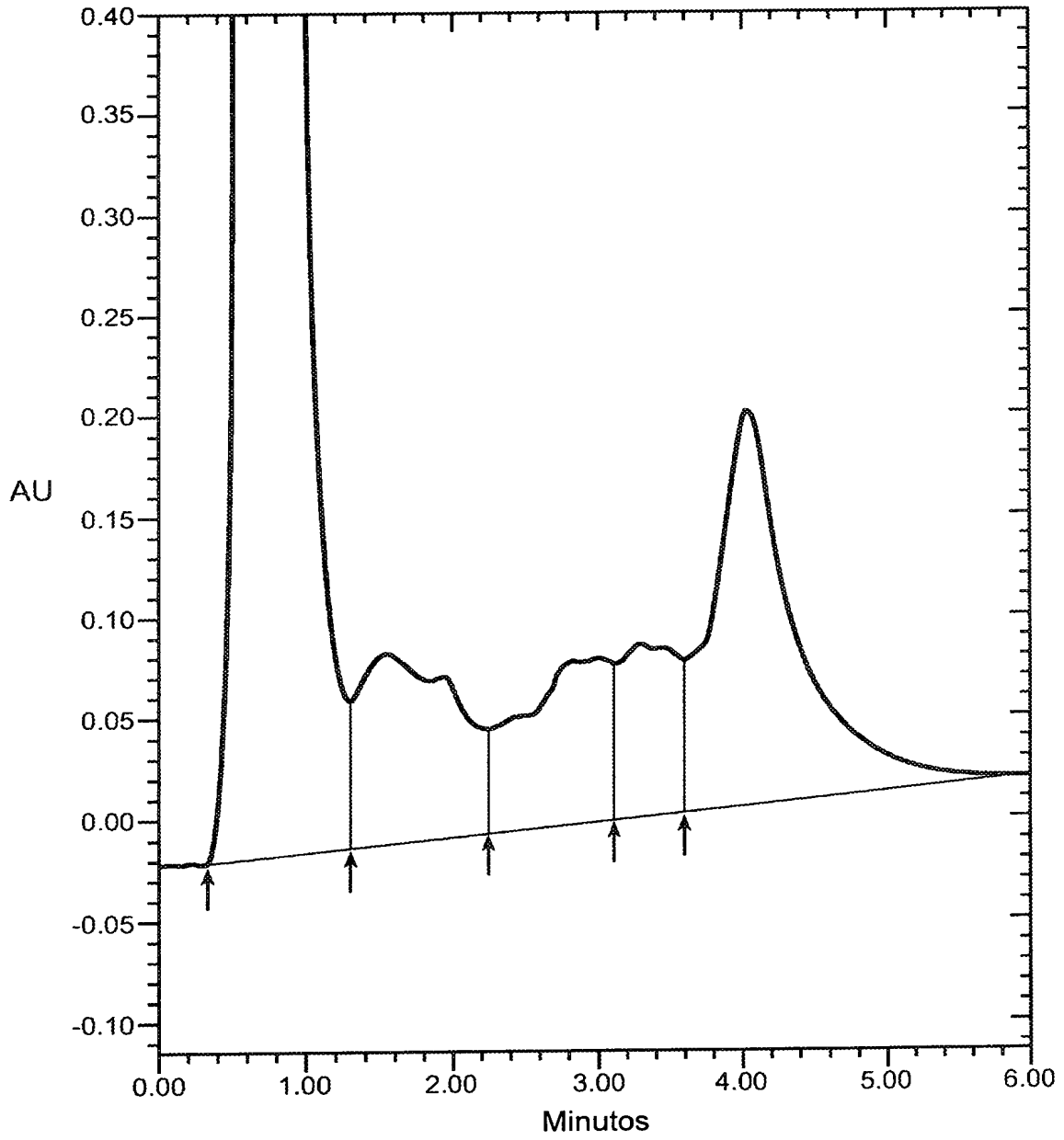


Fig. 3B

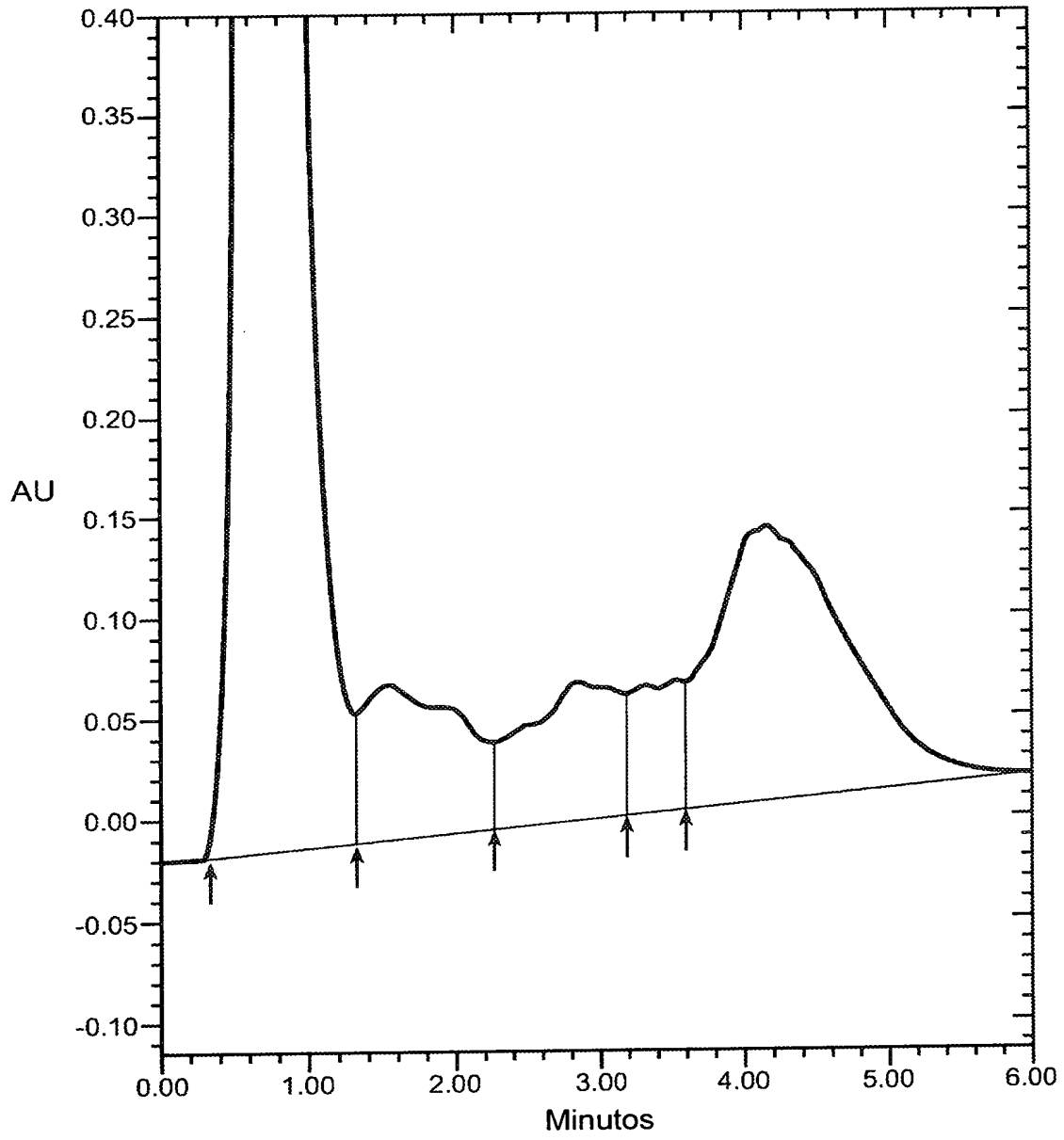


Fig. 3C

6/12

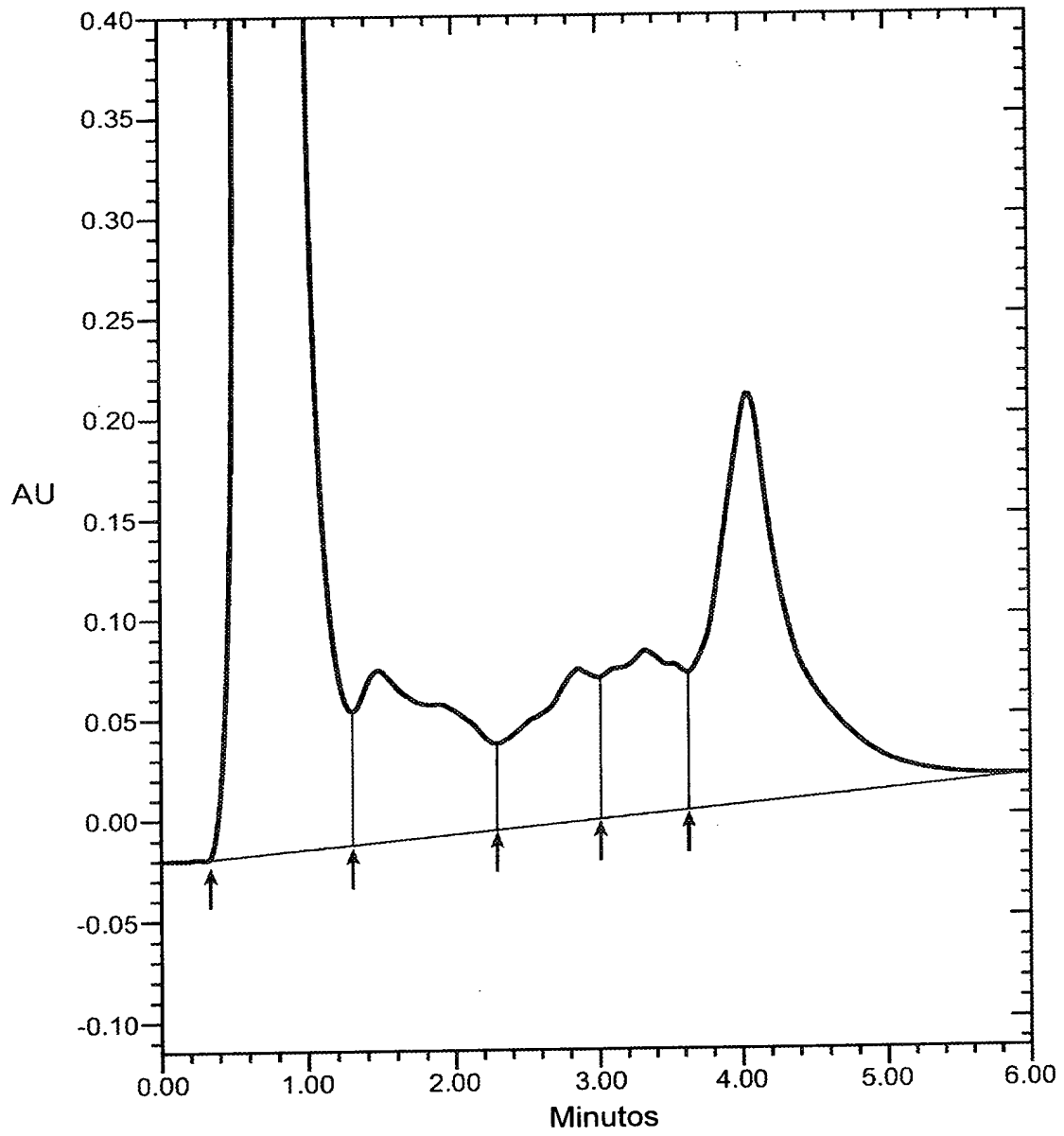


Fig. 3D

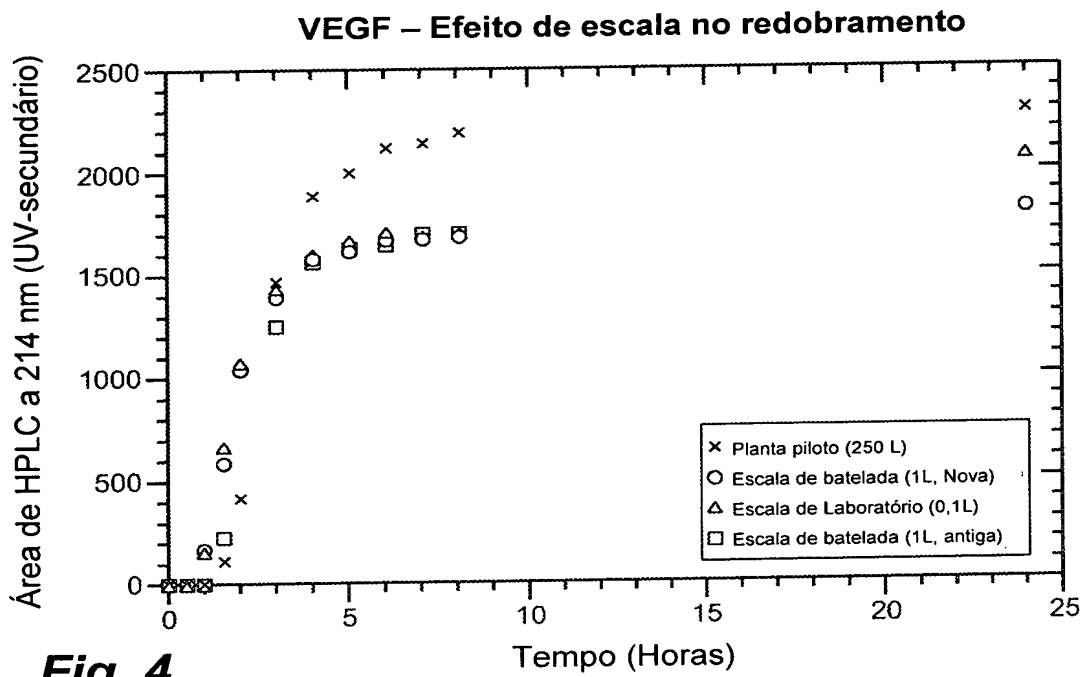
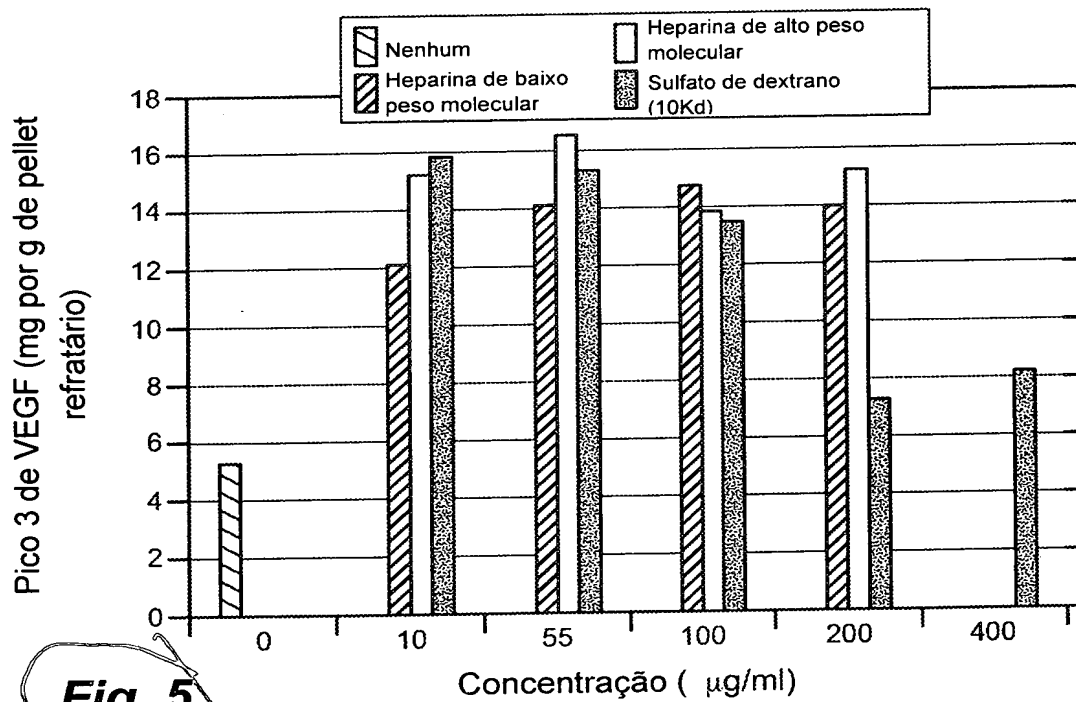
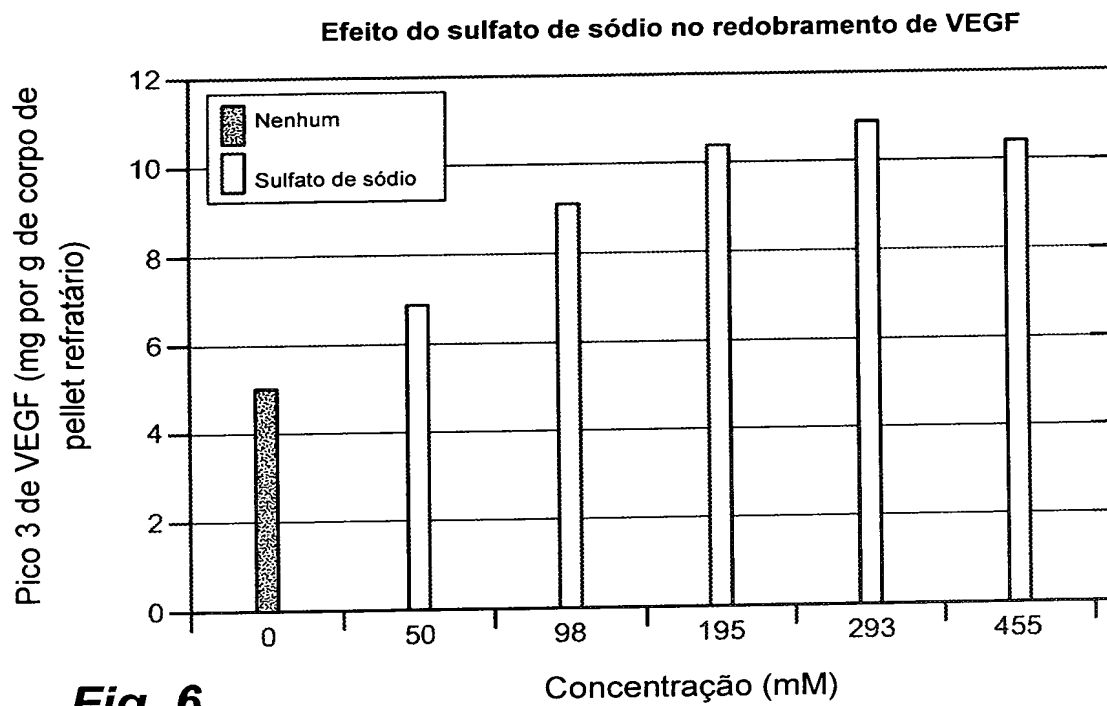
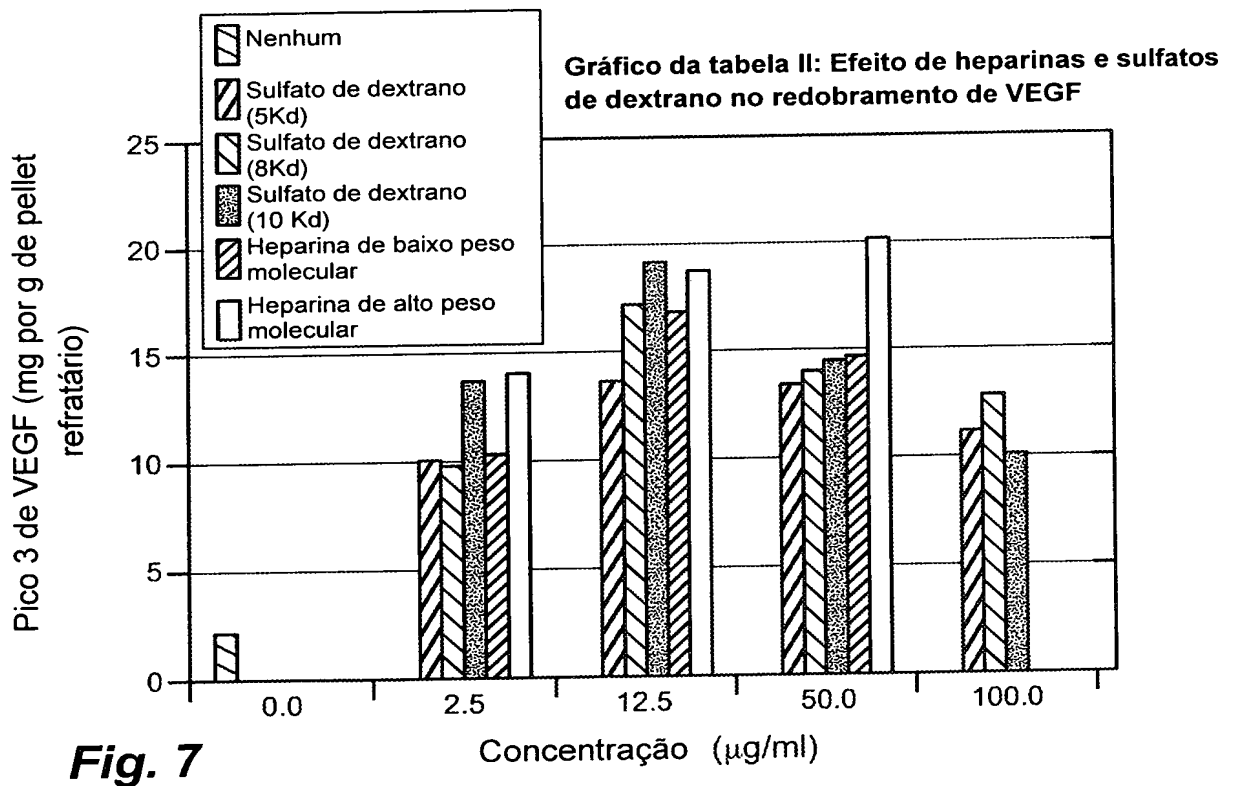
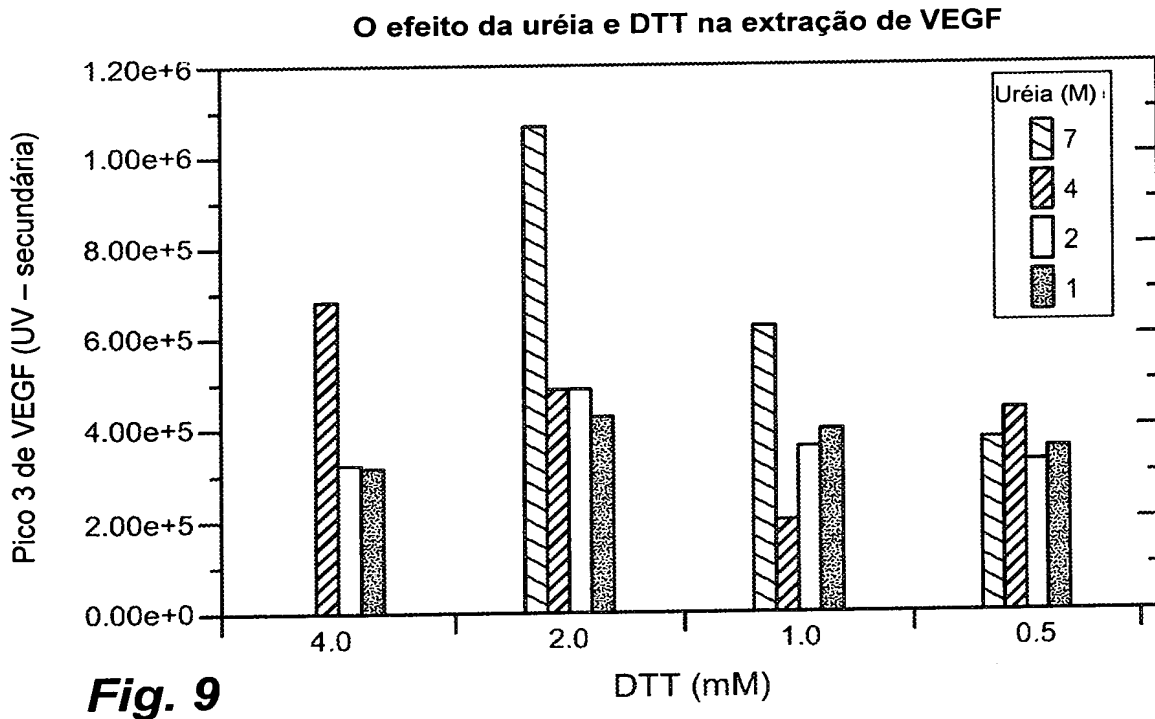
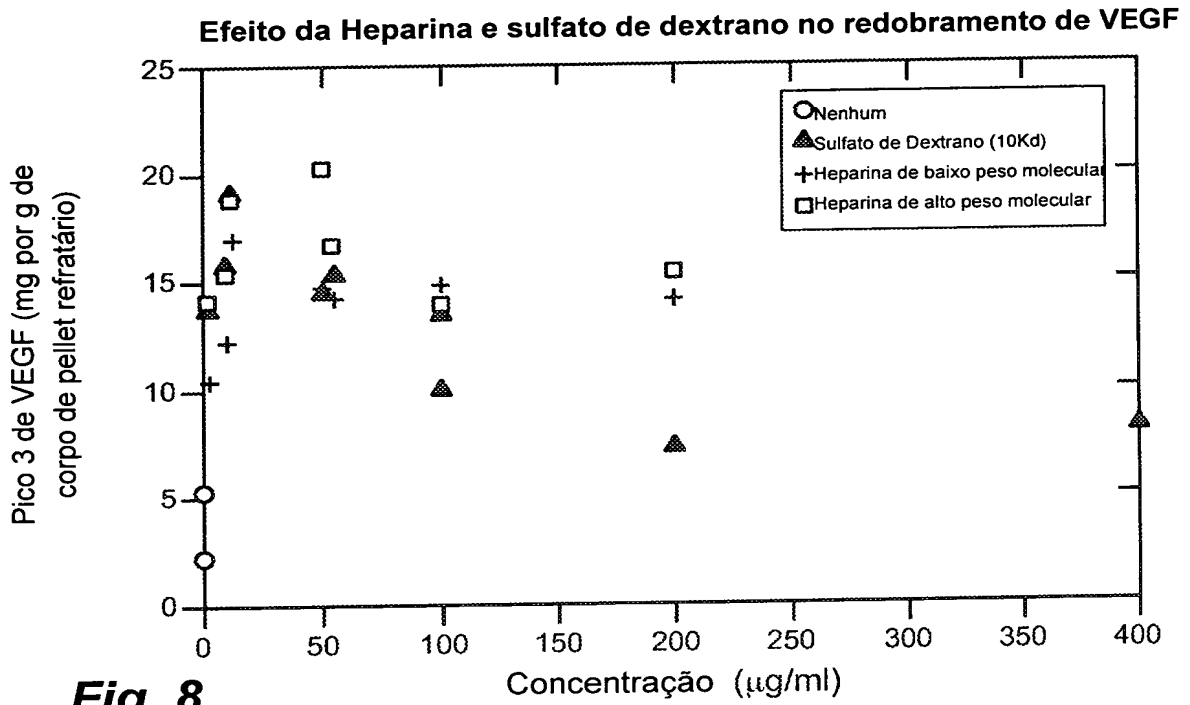
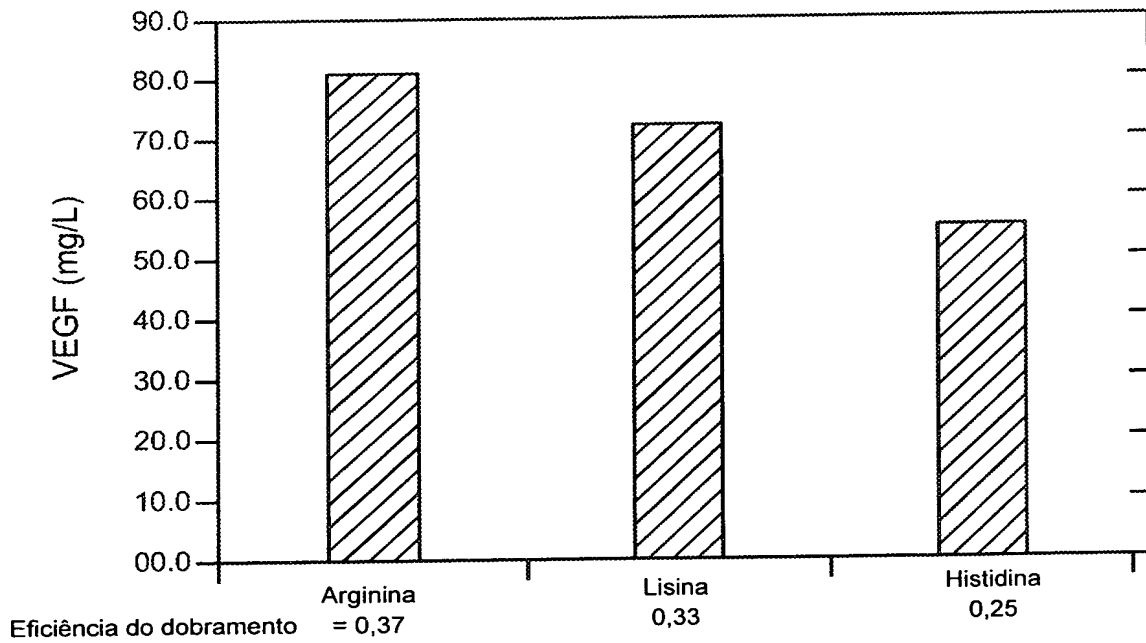
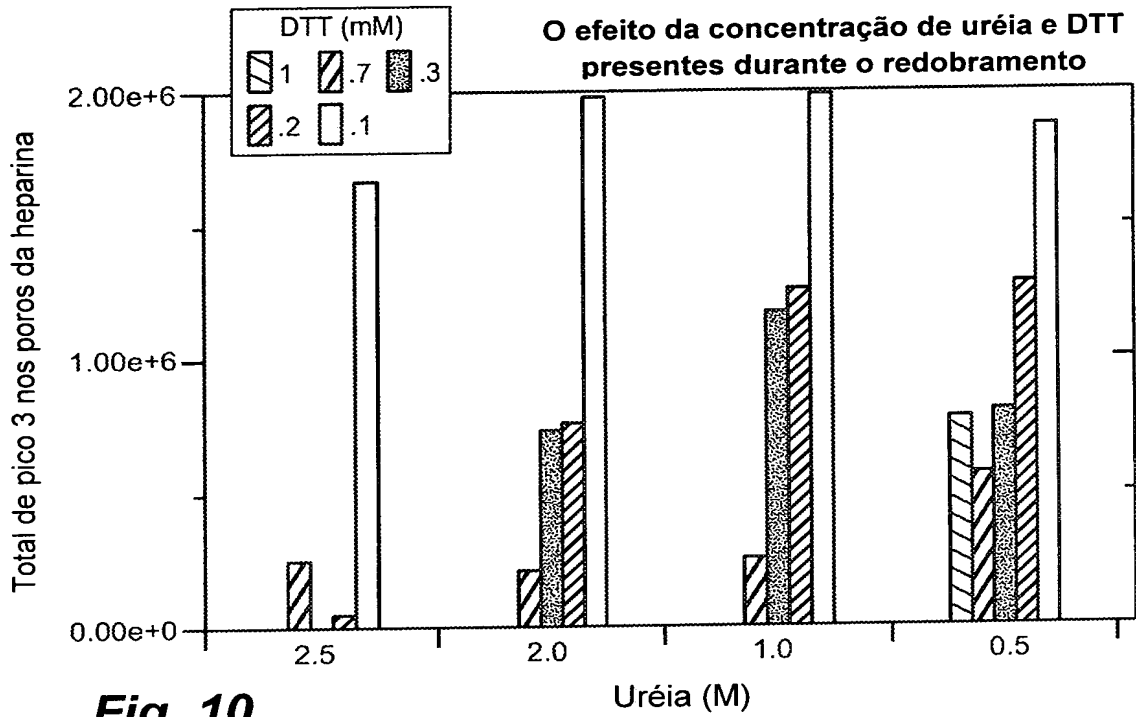


Gráfico da tabela 1: Efeito da Heparina e Sulfato de dextrano no redobramento de VEGF



**Fig. 6****Fig. 7**

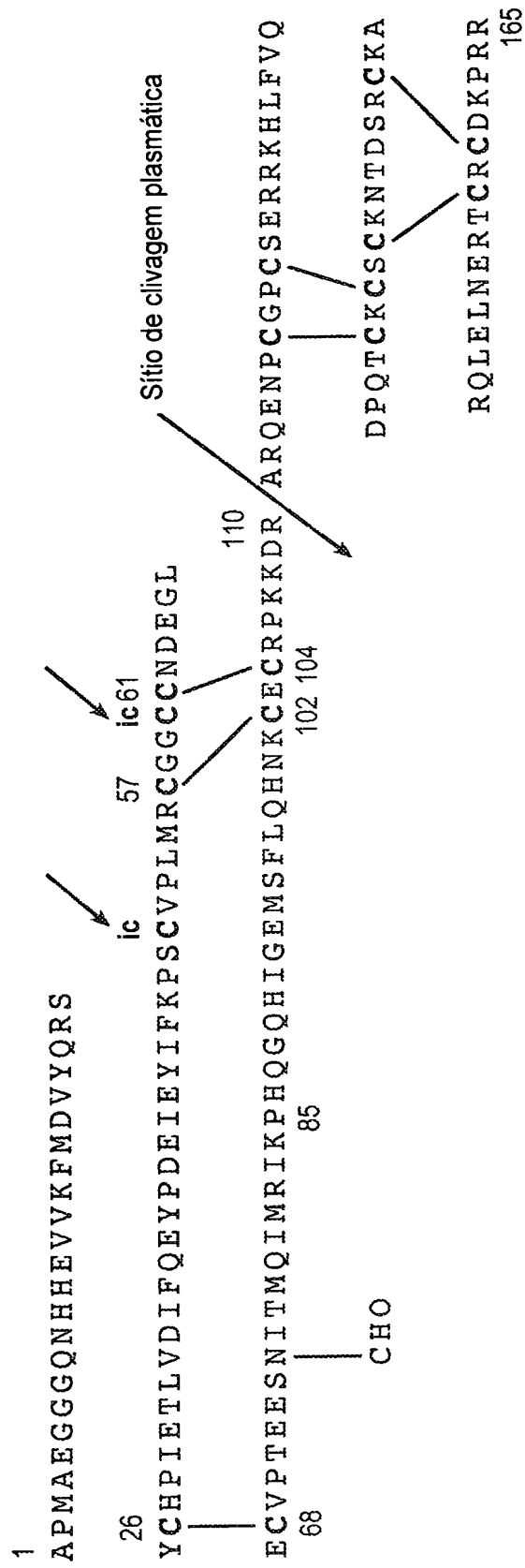




Seqüência de aminoácido do VEGF₁₆₅

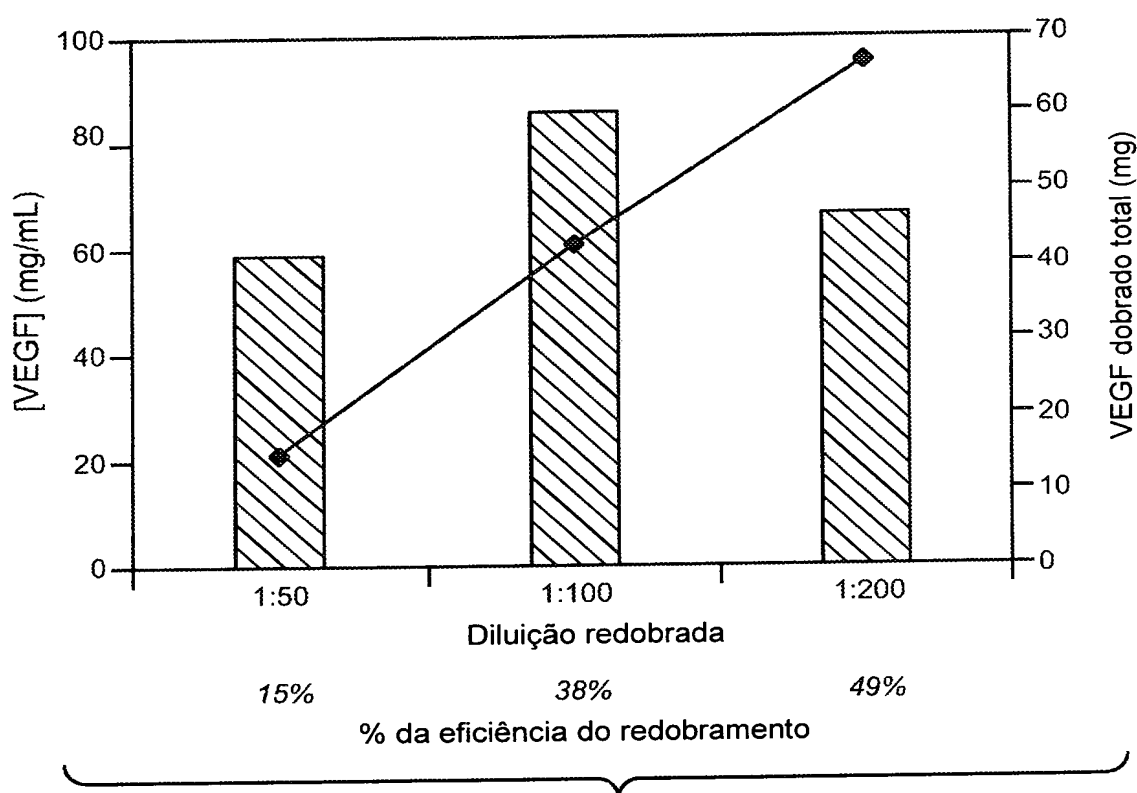
Domínio de ligação do receptor (1-110)

Domínio N-terminal



Domínio de ligação a Heparina (110-165)

Fig. 11

**Fig. 13**

RESUMO**“MÉTODOS PARA RECUPERAÇÃO DE UMA PROTEÍNA DE LIGAÇÃO À
HEPARINA”**

A presente invenção refere-se a um processo para recuperação
5 de proteínas de ligação à heparina redobradas produzidas em células
hospedeiras heterólogas que inclui a etapa de incubação da proteína
solubilizada com um tipo polianiónico, tal como sulfato de dextrano.