



BT

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

PCT
SUPERINTENDENCIA DE REGISTRO Y COMERCIO
INVENTARIO

08-99914

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO PLEGAMIENTO DE PROTEINA

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C07K 1/113; C07K 14/51; C07K 14/495

71. SOLICITANTE RENOVO LIMITED

DOMICILIO MANCHESTER, INGLATERRA, REINO UNIDO

74. APODERADO GERMAN CASTILLO GRAU

22. BOGOTÁ, D. C.,

REMITENTE

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-099914- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:46:27
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACIÓN

Dep. 2020 NUECREACIONI
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 188

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE

PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

Oct. 11 / 2008

1

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: RENOVO LIMITED

Dirección: Incubator Building, 48 Grafton Street

Nacionalidad o domicilio: Manchester,
Inglaterra, Reino
Unido

Lugar de Constitución: Reino Unido

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐

C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: GERMAN CASTILLO GRAU

Dirección: Carrera 13 No. 37-43 Piso 12

Teléfono: 285 74 60 Fax: 285 92 67
E-mail info@castillograu.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐

C.E. ☐ OTRO ☐

Cual _____

Número 17.017.671 de TP 2.978 del C.S.J.
Bogotá

4

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre: Mark William James Ferguson; Phillip Mellors; Hugh Gerard Lavery; Nick Occleston;
Sharon O'Kane; Simon Higginbottom

Dirección Incubator Building, 48 Grafton Street

Nacionalidad o Domicilio: Manchester, Inglaterra, Reino Unido

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2007/000814

Fecha: Marzo 9, 2007

Publicación Internacional No. WO 2007/104934 A3

Fecha: Septiembre 20, 2007

6

Título (54) PLEGAMIENTO DE PROTEINA

7

Clasificación Internacional (51) C07K 1/113; C07K 14/51; C07K 14/495

8

Prioridad

(33) País de origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

Gran Bretaña

Marzo 11, 2006

0604964.7

Si

☒

No

☐

9

Comprobante de pago N°:

75051

Fecha:

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

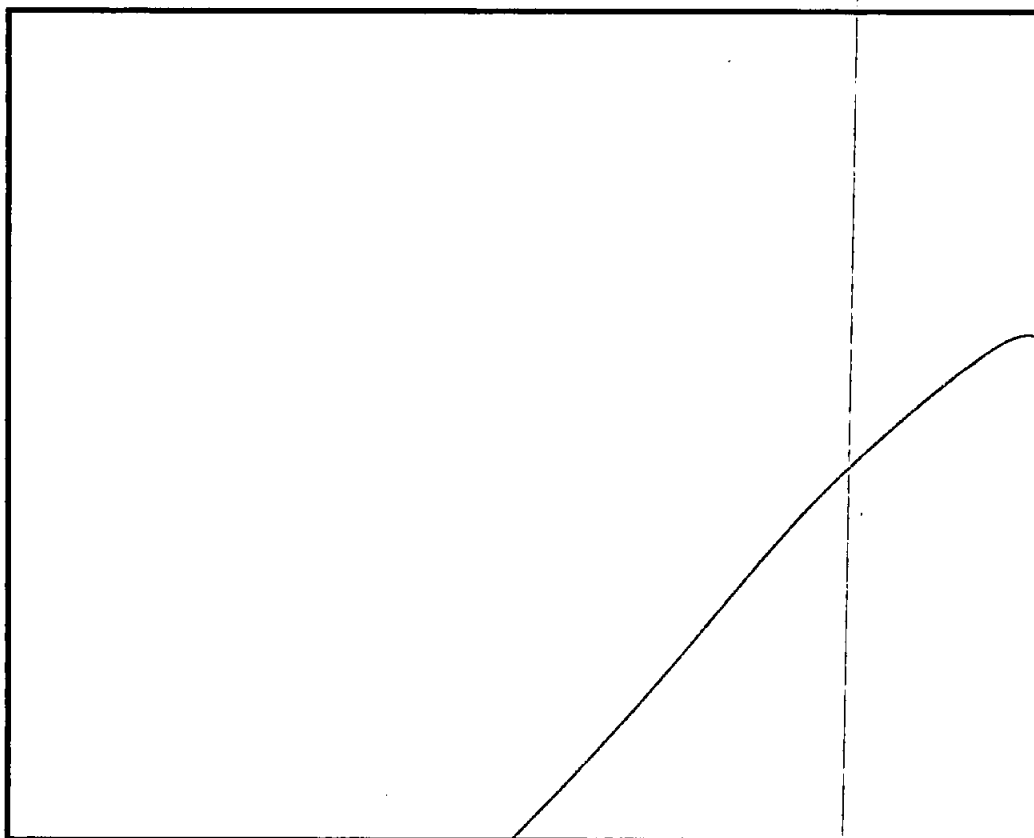
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso **copia auténtica**
- ☐ Certificado de existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Documento de Cesión del inventor al solicitante o a su acusante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud Internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito de material biológico.
- ☒ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ Otros

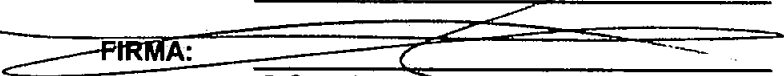
11

FIGURA CARACTERISTICA



12

Solicito la concesión de patente,

NOMBRE: GERMAN CASTILLO GRAUFIRMA: C.C. 17.017.671
de BogotáT.P. 2.978
del C.S.J.

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

3

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099914- -00000-0000

Fecha: 2008-09-22 12:46:27 Dep. 2020 NUECREACION
 Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
 Act. 411 PRESENTACION Folios: 188

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 75,051
 FECHA : SEPTIEMBRE 22 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CASTILLO GRAU Y ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	76145	22/09/2008	11,219,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
1		TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____



RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

1. PENDING FOR THE 1971-72 FISCAL YEAR

2. 1971-72 FISCAL YEAR

3. 1971-72 FISCAL YEAR
4. 1971-72 FISCAL YEAR

5. 1971-72 FISCAL YEAR

6. 1971-72 FISCAL YEAR

7. 1971-72 FISCAL YEAR

8. 1971-72 FISCAL YEAR

9. 1971-72 FISCAL YEAR

10. 1971-72 FISCAL YEAR

11. 1971-72 FISCAL YEAR

12. 1971-72 FISCAL YEAR

13. 1971-72 FISCAL YEAR

Extracto Folio 4

FOR PATENTS AND TRADEMARKS IN

COLOMBIA

PODER GENERAL

(1) RENOVO LIMITED

domiciliado en (2) Incubator Building, 48 Grafton Street, Manchester, Reino Unido

nombra al Dr. Germán Castillo Grau y/o Adriana Castillo Gibsone y/o Luis Felipe Castillo Gibsone

con oficinas en la Carrera 13 No. 37-43, Piso 12 en Bogotá, D.C., Colombia como sus representantes con poder especial amplio y suficiente, para recabar de las oficinas y autoridades Colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en primera o segunda instancia, la Obtención de Patentes de Invención, Registro de Marcas, de Diseños Industriales, de Nombres y Enseñas Comerciales, lo mismo que traspasos, extensiones, renovaciones, cambios de nombre y domicilio, registro de licencias de explotación y registro de licencias de uso referentes a tales actuaciones, a cuyo efecto les faculta para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado, elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, apelaciones y reclamos, solicitar la aplicación de medidas cautelares, aceptar en nuestro nombre y representación la Cesión de derechos de invención y de patente de invención que se nos haga por cualquier persona, abonar todos los impuestos cuotas y pagos determinados por la ley, recibir todos los documentos y valores dando el descargo respectivo, llenar cualesquiera otros requisitos, desistir, y tomar en fin todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses y en caso de presentarse oposiciones para que intervengan como demandantes o como demandados, con todas las demás facultades legales necesarias. Este poder comprende además las facultades de recibir, desistir, transigir, comprometer, sustituir, revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extra-judiciales

Dado y firmado en (4)

Firma/Signature

Firma/Signature

GENERAL POWER OF ATTORNEY

(1) RENOVO LIMITED

domiciled in (2) Incubator Building, 48 Grafton Street, Manchester, Great Britain.

hereby appoint Dr. Germán Castillo Grau and/or Adriana Castillo-Gibsone and/or Luis Felipe Castillo-Gibsone

with offices at Carrera 13 No. 37-43, 12th Floor in Bogotá, Colombia as our representatives with special ample and sufficient power to obtain from the offices and Colombian authorities, administrative, judicial and police, in first or in second instance, Patents of Invention, registration of Trade or Service Marks, Industrial Designs, of Commercial Names and Ensigns, as well as assignments, extensions, renewals, changes of names and addresses, registration of licences of exploitation and licences of use referring to said actions who are empowered to take before said authorities all of the necessary steps for the purposes indicated, to file applications, to formulate descriptions, corrections, protests, declarations, appeals and claims, apply for precautionary measures, to accept on our behalf and representation the assignment of rights on invention and titles of invention that may be given to us by any person, to pay all taxes, quotas and payments prescribed by law, to receive all the documents and proceeds giving the respective acquiescence or receipt, to fulfill any other requisites to desist and take in fact any other measures that may be deemed conducive to the safeguard of our interests, and in case oppositions are presented to intervene as plaintiff or defendant, with all necessary legal faculties. This power includes the faculties to receive, desist, compromise, transact, substitute it in all or in part, to revoke substitutions, to receive notifications and to appoint judicial or extra-judicial attorneys.

Given and signed as a deed in
England.

Como Notario Venticésimo del Circulo de
Bogotá, D.C., Colombia, esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C., Colombia.

15 SET 2008

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VENTISEIS

DECLARACION NOTARIAL

(Individual)

A los días del mes de de 2007
compareció personalmente ante mí, Notario
Público el/la señor(a)

A quien(es) doy fe de conocer y me consta que
es(son) la(s) persona(s) descrita(s) y firmante(s)
del documento que precede, declarando ante mí
que otorga(n) el mismo para los fines y
propósitos que en él se expresan.

El Notario Público.....

(Sociedades)

El infrascrito Notario certifica: que la(s) firma(s)
que antecede(n) y dice(n):

es (son) auténtica(s); que el (los) signatario(s)
desempeña(n) el (los)
cargo(s) de

de **RENOVO LIMITED**

que tiene(n) facultad para otorgar este poder; y
que dicha compañía está domiciliada en
Manchester, Reino Unido.

y actualmente existe y está organizada de
acuerdo a las leyes del Estado de Delaware

Todos los hechos anteriores le constan por
haber examinado los documentos respectivos y
de todo ello da fe.

Dado y firmado en.....

El Notario Público

(Con Apostilla)

Como Notario Veintiseis del Circuito de
Bogotá, hago constar que esta copia
coincide con original que se ha presentado
Bogotá D.C. Colombia.

15 SET 2008

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

NOTARIAL CERTIFICATE

(Individuals)

On this day of of 2007
personally appeared before me, a Notary Public,

to me known, and known to be the person(s)
described in and who executed the foregoing
document, and he(they) duly acknowledged to
me that he(they) executed same for the uses
and purposes therein expressed.

Notary Public

(Corporations)

The undersigned Notary Public certifies: that

The preceeding signature(s) reading

Mark W. J. Ferguson

Sharon O'Hare

are authentic; that the signors at present each fill
the posts of

DIRECTOR

of **RENOVO LIMITED**

and that they are empowered to execute this
power; and that said company is domiciled in
Manchester, Great Britain

and actually exists and is organized in
accordance with the laws of England and Wales.

All the foregoing facts are known to the Notary
due to his/her having examined the respective
documents to which he/she, the Notary, attests.

Granted and signed in Manchester, England on
15th February 2008.

Notary Public

(With Apostille)

Michael John Copestave

MICHAEL JOHN COPESTAVE

DR. J. COPESTAVE

NOTARY PUBLIC

EN BLANCO
NOTARIA VEINTISEIS

APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961 / Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

UNITED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document / Le présent acte public

2. Has been signed by **Michael John Copestake**
a été signé par
3. Acting in the capacity of **Notary Public**
agissant en qualité de
4. Bears the seal/stamp of **The Said Notary Public**
est revêtu du sceau/timbre de

Como Notario Veintiseis del Circulo de Bogotá, hago constar que esta copia coincide con original que se ha presentado Bogotá D.C. - Colombia.

15 SET 2008

GUSTAVO SAMPER RODRIGUEZ
NOTARIO VEINTISEIS

5. at London/à Londres
6. the/le **22 February 2008**
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs /
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.
8. Number/sous No **H688611**
9. Stamp:
timbre:
10. Signature: **M. Western**



For the Secretary of State / Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is not party to the Hague Convention of 5 October 1961, it should be presented to the consular section of the mission representing that country. An apostille or legalisation certificate only confirms that the signature, seal or stamp on the document is genuine. It does not mean that the contents of the document are correct or that the Foreign & Commonwealth Office approves of the contents.

Título: PLEGAMIENTO DE PROTEÍNA

Resumen: La presente invención se refiere a un métodos para plegar un factor de crecimiento transformante beta, o un análogo funcional de este, en una forma dimérica biológicamente activa. El método incluye el agregado de un factor de crecimiento monomérico no plegado solubilizado a una solución que contiene ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico (CHES) o un análogo funcional de este y un sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular. La solución luego se incuba en condiciones adecuadas para generar el factor de crecimiento transformante beta dimérico biológicamente activo.

PLEGAMIENTO DE PROTEÍNAS

La presente invención se refiere a un método para plegado o replegado de proteínas en una forma activa. La invención se refiere en particular al plegado de miembros de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta.

La superfamilia del factor de crecimiento transformante beta (TGF-Beta) de los factores de crecimiento está involucrada en la regulación de muchos procesos celulares que incluye proliferación, migración, apoptosis, adhesión, diferenciación, inflamación, inmunosupresión y expresión de proteínas extracelulares. La superfamilia TGF-Beta incluye: TGF-Beta 1, TGF-Beta 2, TGF-Beta 3, TGF-Beta 4, TGF-Beta 5, proteínas morfogenéticas de hueso (BMP 1-16), factores de crecimiento y diferenciación (GDF 1-16) y activinas/inhibinas.

Existen tres isoformas de mamíferos de TGF-Beta, denominadas TGF-Beta 1, 2 y 3. Las TGF-Beta son producidas prácticamente por todos los tipos celulares (por ej., células de tejido epitelial, endotelial, hematopoyético, neuronal, y conectivo). Las TGF-Beta se secretan como moléculas precursoras inactivas latentes de 100 kDa (LTGF-Beta). Las moléculas de LTGF-Beta consisten en: (a) un péptido señal dimérico C-terminal de 25 kDa (fragmento activo) y (b) el péptido asociado latente (LAP). LTGF-Beta se activa por la escisión de LAP del fragmento activo por medio de las endopeptidasas tales como furina, plasmina, trombina y la acidificación del espacio pericelular. El fragmento dimérico activo de TGF-Beta liberado se estabiliza por interacciones hidrofóbicas y por un puente disulfuro entre las subunidades. Además cada monómero comprende varias

cadenas beta extendidas entrelazadas por tres o cuatro enlaces intra-disulfuro y forma una estructura apretada conocida como "nudo de cisteína".

Se han propuesto las proteínas de la familia TGF-Beta para numerosos propósitos médicos. Estos incluyen la reducción de la formación de cicatrices, promoción de la cura de heridas y la estimulación del reemplazo de tejido dañado o enfermo en una variedad de sitios. Estos sitios incluyen la piel, hueso, cartílago, tejido neural, tejido conectivo (por ej., tendones y ligamentos), tejido ocular, hígado y vasos sanguíneos, etc. Se ha demostrado que TGF-Beta 1 y TGF-Beta 2 aceleran la curación de heridas en modelos animales experimentales, mientras que su inhibición reduce la posterior formación de cicatrices. TGF-Beta 3 también reduce significativamente la formación de cicatrices tanto en modelos animales y humanos y, en 2006, representa uno de los miembros de la superfamilia que está más próximo a obtener la aprobación regulatoria para uso como medicamento.

Se apreciará que dichos usos clínicos de los miembros de la superfamilia TGF-Beta requiere disponer de métodos eficientes para producir cantidades significativas de los factores de crecimiento.

Los miembros de la superfamilia TGF-Beta se han aislado o producido por medios recombinantes durante muchos años. A modo de ejemplo, TGF-Beta 3 se purificó originalmente a partir de plaquetas humanas, placenta humana y riñón bovino durante los 1980. En vista del potencial terapéutico de TGF-Beta 3, se han realizado numerosos intentos de producir esta proteína por métodos recombinantes. Debido a la complejidad de las moléculas de TGF-Beta nativas biológicamente activas (proteína homodimérica con 8 enlaces disulfuro intracatenarios y un

enlace disulfuro entre cadenas), ellas se expresaron originalmente en organismos eucarióticos (por ej., ver EPO200341B1). Sin embargo, la expresión eucariótica originó niveles de expresión relativamente bajos y también se asoció con altos costos de procesamiento.

En consecuencia, se investigaron los huéspedes procarióticos. Sin embargo, se halló que los huéspedes microbianos eran incapaces de formar correctamente los múltiples enlaces disulfuro necesarios para que los factores de crecimiento se plieguen en una forma activa. La proteína mal plegada que se forma como cuerpos de inclusión dentro de la célula huésped y estos cuerpos requirieron la solubilización seguida por la renaturalización permite que la proteína se repliegue en su conformación nativa biológicamente activa.

Se han realizado numerosos intentos para superar los problemas asociados con la formación de los factores de crecimiento activos a partir de huéspedes procarióticos. Por ejemplo, US 5.922.846, US 5.650.494 y EP-B-0433 225 proponen métodos para la renaturalización de las proteínas de la familia TGF-Beta provenientes de los cuerpos de inclusión. Si embargo, ninguno de estos métodos proporciona métodos rápidos y eficientes para la producción de factores de crecimiento de calidad clínica. Por ejemplo los inventores han hallado que muchos de los métodos de replegamiento del arte previo contemplados en las patentes mencionadas anteriormente son ineficaces. Además, los inventores han hallado que aun las condiciones de replegamiento del arte previo más preferidas (por ej., 0,05 M de Tris, 1 M de NDSB-201, 20%(v/v) de DMSO, 2%(p/v) de CHAPS, 1 M de NaCl, 1%(p/v) de GSH, 0,2 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,3 a 2-8 °C) pueden llevar aproximadamente 7 días para replegar los factores

de crecimiento. Este tiempo de plegamiento representa un retraso inaceptable en la fabricación de cGMP y debería producir altos costos operativos no deseables cuando se requieren grandes cantidades de factor de crecimiento activo.

En consecuencia es un objetivo de la presente invención superar los problemas asociados con los métodos de la arte previo para plegar o replegar los miembros la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta.

De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención se proporciona un método para plegar un factor de crecimiento transformante beta, o análogo funcional de éste en una forma dimérica biológicamente activa que comprende agregar un factor de crecimiento monomérico no plegado solubilizado a una solución que contiene:

(i) ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico o un análogo funcional de este; y

(ii) un sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular; e

incubar el factor de crecimiento de la solución hasta que se forma un factor de crecimiento dimérico biológicamente.

La presente invención se basa en experimentos realizados por los inventores que se llevaron a cabo en un intento de mejorar los métodos de plegamiento del arte previo.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-Beta) puede ser cualquier TGF-Beta (por ej., TGF- β 1, TGF- β 2 o TGF- β 3). Sin embargo se prefiere que el TGF-Beta sea TGF-Beta3 (TGF- β 3).

Por "análogo funcional de este" se entienden las variantes de un TGF-beta que retiene la actividad biológica del factor de crecimiento de tipo salvaje. El

análogo funcional con preferencia es una proteína y, en forma madura, puede comprender un dímero de polipéptidos monoméricos de aproximadamente 112 aminoácidos de longitud si bien se apreciará que los análogos funcionales pueden estar truncados o elongados cuando se comparan con los de tipo salvaje. El término también abarca las mutantes de TGF-beta tipo salvaje y en particular de TGF-beta 3 que retienen, o incluso han mejorado la actividad cuando se comparan con los de tipo salvaje. Los inventores han hallado que los métodos de la invención también son aplicables para el plegamiento o replegamiento de dichos mutantes.

Se apreciará que "plegamiento", definido en la presente invención, abarca el "replegamiento" de proteínas plegadas previamente, y en efecto este replegamiento de proteínas constituye un subconjunto preferido del plegamiento más amplio abarcado por la invención.

EP 0 433 225 contempla una amplia variedad de "condiciones de replegamiento" que se afirma que permiten que un monómero desnaturalizado se dimerice y supone una forma biológica activa. EP 0 433 225 describe que dichas condiciones deben incluir la presencia de un "agente solubilizante" y un sistema redox que permite la oxidación y reducción continua de los pares tiol/disulfuro. Además contempla una larga lista de dichos agentes solubilizantes que incluyen detergentes; solventes orgánicos miscibles en agua y fosfolípidos o una mezcla de dos o más de dichos agentes. Los ejemplos de los detergentes contemplados en la memoria descriptiva incluyen: compuestos tensioactivos, tales como dodecilsulfato de sodio (SDS), Tritón o Tween, detergentes moderados no iónicos (por ej., digitonina), detergentes moderados catiónicos (por ej., N-[2,3-

(Dioleiloxi)-propil]-N,N,N-trimetilamonio), detergentes moderados aniónicos (por ej., colato de sodio, desoxicolato de sodio) y onas zwitteriónicas (por ej., sulfobetainas (Zwittergent), 3-(3-clolamidopropil)-dimetilamonio-1-propan-sulfonato (Chaps), 3-(3-clolamidopropil)dimetilamonio-2-hidroxi-1-propan-sulfonato (Chapso).

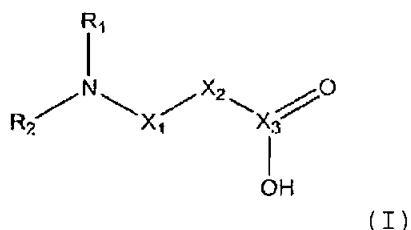
Los inventores decidieron examinar una variedad de detergentes, que incluyen los contemplados en EP 0 433 225, y se sorprendieron al hallar que la mayoría de los detergentes que ellos examinaron fueron ineficaces para el plegamiento o replegamiento de miembros de la superfamilia TGF-Beta mientras que los que actuaron, llevaron una cantidad de tiempo inaceptable para producir cantidad útil de factor de crecimiento activo. Las tablas 1 y 2 del ejemplo ilustran que muchos de estos detergentes fueron ineficaces. Sin embargo los inventores se sorprendieron al hallar que el uso del ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico (CHES), y sus análogos, en combinación con un sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular, de acuerdo con el primer aspecto de la invención fue particularmente efectivo para producir correctamente el factor de crecimiento dimérico plegado.

Los inventores han hallado que el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención representa una mejora significativa respecto de los métodos del arte previo. El método da como resultado una velocidad significativamente mejorada del proceso en comparación con los métodos previamente descritos en la bibliografía. En realizaciones preferidas del método de la invención, el plegamiento del factor de crecimiento se puede completar dentro de 5 días; con preferencia dentro de 3 días; con

más preferencia dentro de 2 días; y con máxima preferencia después de aproximadamente 24 horas de iniciar el proceso de plegamiento.

Por el término "ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico o sus análogos" se entiende el detergente CHES y sus análogos químicos que retienen las propiedades de replegamiento del CHES.

Los análogos adecuados de CHES que se pueden usar de acuerdo con los métodos de la invención se pueden definir por la siguiente fórmula:



en donde:

R_1 y R_2 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C_{1-4} sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo C_{3-8} sustituidos o no sustituidos, o un núcleo aromático sustituido o no sustituido, o R_1 y R_2 juntos forman un sistema anular que tiene hasta 10 átomos;

X_1 y X_2 se seleccionan de modo independiente de $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O_2)-$, $-NR_3-$, $-CHR_4-$ y CHR_5 donde R_3 , R_4 , y R_5 son iguales o diferentes y se seleccionan de modo independiente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C_{1-4} sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo C_{3-8} sustituidos o no sustituidos, o un núcleo aromático sustituido o no sustituidos, o un núcleo aromático sustituido o no sustituido o dos de R_3 , R_4 y R_5 pueden formar juntos un sistema anular que tiene hasta 6

átomos de carbono, sujeto a la condición de que al menos uno de X1 y X2 es -CHR4- o -CHR5-; y

X3 se selecciona de C, S, S=O, o P-OH.

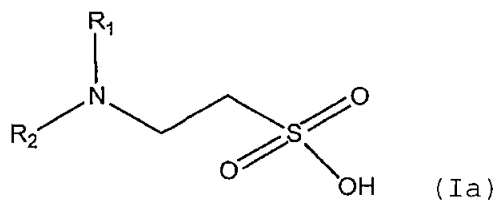
Si uno o más de R₁₋₅ son grupos alquilo, de acuerdo con la cantidad de átomos de carbono que contienen, estos pueden ser grupos secundarios, terciarios o iso normales. Los ejemplos de grupos alquilo adecuados para R₁₋₅ son los grupos Me, Et, n-Pr, i-Pr, n-Bu, sec-Bu y E-Bu.

Si uno o más de R₁₋₅ son cicloalifáticos, entonces ellos con preferencia son un grupo ciclohexilo sustituido o no sustituido, con máxima preferencia no sustituido.

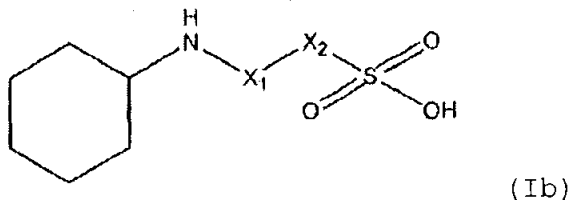
Si uno o más de R₁₋₅ son aromáticos entonces estos con preferencia son un grupo fenilo sustituido o no sustituido.

Con preferencia R₁ es hidrógeno y R₂ es ciclohexilo. En forma alternativa o adicional X1 y X2 con preferencia son -CH2-, en forma alternativa o adicional X3 es -S=O.

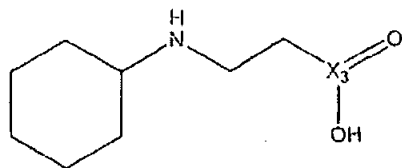
Los ejemplos preferidos de los compuestos de fórmula (I) que se pueden emplear en la invención son:



(es decir, un compuesto de fórmula (I) en el que X1 y X2 son -CH2- y X3 es S=O);



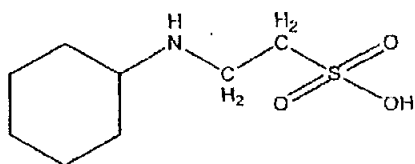
(es decir, un compuesto de fórmula (I) en el que R₁ es hidrógeno, R₂ es ciclohexilo y X3 es S=O); y



(Ic)

(es decir, un compuesto de fórmula (I) en el que R_1 es hidrógeno, R_2 es ciclohexilo, y X_1 y X_2 son $-CH_2-$).

El ejemplo preferido de cada fórmula (Ia), (Ib) y (Ic) es CHES, es decir,



Los inventores han establecido que CHES, y el sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular, se puede usar solo para plegar el factor de crecimiento. Sin embargo, en algunas realizaciones de la invención, los inventores han hallado que CHES también se puede combinar ventajosamente con otros agentes que tienen actividad detergente/plegamiento. Los ejemplos de dichos agentes incluyen: taurodesoxicolato, alcohol isopropílico, arginina-HCl, sulfobeatina-201 no detergente y sulfobeatina-211 no detergente.

Se prefiere que la solución comprenda una concentración de aproximadamente 10 mM a 2,0 M de CHES; con más preferencia 100 mM-1,0 M y con máxima preferencia aproximadamente 0,7 M de CHES.

Las concentraciones mencionadas anteriormente de CHES también se pueden usar cuando se combina CHES con otros agentes. Por ejemplo una combinación preferida de los

agentes que promueven el replegamiento es aproximadamente 30 mM de taurodesoxicolato y 0,7 M de CHES.

Por el término "sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular" se entiende a los sistemas que permiten la formación de enlaces disulfuro en la solución. Los sistemas adecuados incluyen combinaciones de reactivos tales como glutatión en su forma oxidada y reducida, ditiotreitól en su forma oxidada y reducida, beta-mercaptoetanol o beta-mercaptometanol en su forma oxidada y reducida, cistina y su forma reducida, y cistamina y su forma reducida. Estos reactivos se pueden usar a una concentración de aproximadamente 1 μ M a 250 mM, especialmente de aproximadamente 100 μ M a 10 mM. La relación molar de dichos sistemas para las formas oxidadas y reducidas puede estar entre 100: 1 y 1: 100, especialmente entre 6: 1 y 1: 6.

Se prefiere que el sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular comprenda el uso de glutatión en sus formas reducidas (GSH) y oxidada (GSSG). Con preferencia la solución contiene aproximadamente 20 μ M-200 mM de glutatión reducido; con más preferencia 200 μ M-20 mM de glutatión reducido; y con máxima preferencia aproximadamente 2 mM de glutatión reducido. La solución también puede contener aproximadamente 4 μ M-40 mM de glutatión oxidado; con más preferencia 40 μ M-4 mM de glutatión oxidado; y con máxima preferencia aproximadamente 400 μ M de glutatión oxidado.

Conforme a ello, los sistemas redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular preferidos pueden comprender 200 μ M-20 mM de glutatión reducido y 40 μ M-4 mM de glutatión oxidado. La relación exacta de GSH:GSSH dependerá de varios factores que incluyen: qué factor de crecimiento se está plegando; el pH de la solución y el análogo de

CHES empleado en el método de la invención. A modo de ejemplo, los sistemas redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular preferidos para el plegamiento de TGF-Beta 3 comprenden aproximadamente 2 mM de glutatión reducido y aproximadamente 400 μ M o aproximadamente 2 mM de glutatión reducido.

Como se explica con más detalle a continuación, en realizaciones preferidas de la invención el sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular se puede "envejecer" antes de usar para replegar el TGF-Beta.

Los métodos preferidos para el plegamiento de los factores de crecimiento incluye el uso de CHES en combinación con GSH y GSSG como sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular. Los ejemplos de condiciones preferidas incluyen la exposición del factor de crecimiento no plegado a:

- (a) 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH y 0,4 mM de GSSG;
- (b) 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH y 0,4 mM de GSSG; o
- (c) 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH y 2 mM GSSG.

Se apreciará que los agentes mencionados anteriormente se pueden disolver en agua para obtener una solución de acuerdo con la invención. Sin embargo, también se apreciará que los agentes se pueden disolver en una solución que comprende muchos otros compuestos. Por ejemplo, la solución también comprender sales. Las sales que se pueden usar en la solución incluyen sales de sodio, potasio y calcio con cloruro, sulfato, fosfato, acetato, etc. Se prefiere que la solución sea una solución de cloruro de sodio a una concentración de 0,5 a 2 M. La solución, por ejemplo, puede ser solución salina buferizada con fosfato.

19

Durante estas investigaciones los inventores también establecieron que se podrían optimizar las condiciones de plegamiento por ajuste del pH y la temperatura a la que se estimula que proceda el plegamiento.

La temperatura óptima depende de numerosos factores tales como los agentes usados, el pH y también la cantidad de factor de crecimiento para replegarse. En la mayor parte de las circunstancias se prefiere una temperatura inferior a aproximadamente 15°C (por ejemplo 2-8°C o aproximadamente 10°C). Sin embargo, en algunas condiciones también fueron efectivas temperaturas superiores (por ej., temperatura ambiente).

Los inventores descubrieron que generalmente fue preferible llevar a cabo el método de la invención a pH alcalino. El pH es con preferencia aproximadamente superior a pH 8,0 y con preferencia superior a un pH de aproximadamente pH 8,5. Un pH de máxima preferencia para la solución es un pH de aproximadamente 9,5.

También se halló que la cantidad de factor de crecimiento no plegado agregado a la solución influencia la eficiencia del plegamiento. En general se pueden agregar aproximadamente 0,005-0,75 mg/ml de un factor de crecimiento a la solución; con preferencia 0,01-0,5 mg/ml; con más preferencia aproximadamente 0,12-0,25mg/ml del factor de crecimiento; y con máxima preferencia aproximadamente 0,25 mg/ml (es decir, 250 µg/ml).

Los métodos de la invención se pueden emplear para plegar cualquier monómero de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta en una forma dimérica biológicamente activa. Se prefiere que el método se use para plegar un TGF-Beta per se (por ejemplo, TGF-Beta 1, TGF-Beta 2 o TGF-Beta 3).

20

También se prefiere que el método se use para plegar precursores monoméricos (en un factor de crecimiento dimérico activo) que se han producido en huéspedes procarióticos que se han transformado para expresar el factor de crecimiento. Por ejemplo, el método es particularmente útil para el plegamiento de factores de crecimiento que se ubican dentro de los cuerpos de inclusión de las bacterias que han sido transformadas con un vector de expresión que codifica un factor de crecimiento recombinante.

Es de máxima preferencia que los métodos de la invención se usen para plegar TGF-Beta 3 monomérico que se ubica en un cuerpo de inclusión de una bacteria transformada con un vector de expresión de TGF-Beta 3 (por ej., como se describen en el Ejemplo 1 o como es conocido en el arte). Es de máxima preferencia que el TGF-Beta 3 sea TGF-Beta 3 humano, TGF-Beta 3 humano recombinante o TGF-Beta 3 humano que contiene mutaciones que optimizan el factor de crecimiento para uso clínico en seres humanos.

Los ejemplos de las condiciones de máxima preferencia empleadas para plegar TGF-Beta 3 incluyen:

- (a) 0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C;
- (b) 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,12 mg/ml TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C;
- (c) 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C; o

- (d) 0,7 M de CHES, 1M de NaCl, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,25 mg/ml de TGFBeta 3, pH 9,5 a 2-8°C/temperatura ambiente.

Los inventores desarrollaron los métodos de plegamiento de acuerdo con la invención en un laboratorio (como se describe en el Ejemplo 1) y luego se llevaron a metodología en escala como se describe en el Ejemplo 2. Se apreciará que los métodos en escala representan una característica importante de la invención. En consecuencia, de acuerdo con un segundo aspecto de la invención se proporciona un método de producir un miembro activo de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta a partir de un huésped procariótico, el método comprende:

- (a) fermentación de organismos procarióticos que han sido transformados para expresar un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta;
- (b) aislamiento de los cuerpos de inclusión y recuperación de la proteína expresada a partir de los cuerpos de inclusión;
- (c) replegamiento del miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta de acuerdo con el primer aspecto de la invención; y
- (d) purificación del miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta replegado.

Se prefiere que la etapa (a) incluya la fermentación de las bacterias que se han transformado con un vector de expresión que codifica un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta. El vector con preferencia codifica un TGF-Beta y con máxima preferencia codifica un TGF-Beta 3 humano, o un análogo funcional de este. Se apreciará que la bacteria transformada se puede

generar usando técnicas de biología molecular conocidas en el arte. Un ejemplo de dicha bacteria se da en el Ejemplo 1.

Se prefiere que los organismos se fermenten de acuerdo con técnicas convencionales. Estas pueden incluir la fermentación de una pasta de células y la recolección de las células por la toma de muestras de la fermentación y centrifugación de la muestra para aislar los organismos. La etapa (b) del método del segundo aspecto de la invención puede incluir la lisis de los organismos recuperados por la centrifugación. Luego se pueden recuperar los cuerpos de inclusión (IB) por centrifugación adicional y etapas de lavado. Con preferencia los IB se procesan adicionalmente adoptando los pasos de solubilizar la proteína dentro de los IB y luego clarificarlos.

La proteína (es decir, el factor de crecimiento no plegado) proveniente de los IB aislados luego se somete a los métodos de plegamiento del primer aspecto de la invención de acuerdo con la etapa (c) del método del segundo aspecto de la invención.

El factor de crecimiento replegado luego se debería purificar de acuerdo con la etapa (d). La purificación puede incluir numerosos pasos de purificación bioquímica tales como ultrafiltración y cromatografía. Los procedimientos de purificación se ilustran en 1.15, 1.16 y 1.17 del Ejemplo 1. En una realización preferida, primero se filtra el factor de crecimiento; posteriormente se purifica por cromatografía de interacción hidrofóbica; y luego finalmente se purifica por cromatografía de intercambio catiónico.



Opcionalmente el método del segundo aspecto de la invención puede comprender adicionalmente un paso (e) en donde el factor de crecimiento se formula a una concentración deseada en una solución y se coloca en viales. Esta solución puede ser la formulación final para uso clínico o se puede formular almacenamiento y/o transporte. El factor de crecimiento luego se puede terminar para formar el producto clínico final en una fecha posterior.

Los inventores han reconocido que W099/18196 describe el uso de CHES par el replegamiento de proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs). Si embargo las técnicas descriptas en W099/18196 no deberían ser consideradas por los expertos en el arte como útiles para el replegamiento de TGF-Beta, y TGF-Beta3 en particular, de acuerdo con los métodos del primer o segundo aspecto de la invención. Los expertos deben llegar a esta conclusión por numerosas razones. Estas incluyen:

(a) W099/18196 describe métodos para la solubilización de los cuerpos de inclusión BMP, se debería usar desnaturalizantes tales como Guanidina-HCL o por acidificación con un ácido tal como ácido acético. Los inventores han hallado que la acidificación produjo bajas recuperaciones del TGF-Beta 3 de los cuerpos de inclusión. Ellos hallaron que cuando TGF-Beta 3 se solubilizó en ácido y luego el pH se tituló a 9,5 (el pH preferido para el replegamiento de acuerdo con la invención), este cambio del pH ácido al alcalino produjo una agregación irreversible de TGF-Beta 3 (debido al cruzamiento de TGF-Beta 3 en sus punto isoeléctrico (pH 6.4)). Esto produjo muy bajos rendimientos de TGF-Beta 3. También se examinó guanidina-HCL como agente de solubilización, si bien este dio muy buenas

2X

recuperaciones de TGF-Beta 3 de los cuerpos de inclusión fue un desnaturalizante demasiado potente e impidió el replegamiento de TGF-Beta 3. Por consiguiente, los inventores hallaron que los pasos de solubilización del arte previo no son adecuados. La experimentación estableció que la solubilización de los cuerpos de inclusión usando 6 M de urea y 0,1 M de DTT dio buenas recuperaciones de TGF-Beta 3 y permitió que el TGF-Beta 3 se repliegue una vez que se diluyó en el buffer replegado. Por consiguiente, se prefiere que TGF-Beta 3 se solubilice a partir de los cuerpos de inclusión usando urea y DTT.

(b) WO99/18196 también establece que los BMP se pueden clarificar usando cromatografía por exclusión de tamaño (SEC) o cromatografía líquida de alta resolución de fase reversa (RP-HPLC). Estos métodos no serían adecuados para la fabricación en escala comercial del TGF-Beta 3. En SEC, el volumen de muestra influye en la resolución de la muestra (a menor volumen de muestra, mejor resolución de la purificación). Los métodos de escala comercial de acuerdo con el segundo aspecto de la invención pueden producir aproximadamente 50 L de cuerpos de inclusión solubilizados. No sería práctico usar la SEC para dichos volúmenes ya que procesar este en una corrida única requeriría una columna (o columnas múltiples) con volumen de lecho simple/combinado de 724 L. En general se usa RP-HPLC como herramienta analítica debido al volumen de columna pequeño y nuevamente no sería poco práctico para la fabricación en escala comercial del TGF-Beta 3 por las mismas razones. Se prefiere que el método del segundo aspecto de la invención use filtración de flujo tangencial (TFF) que brinda purezas de TGF- β 3 de 70% y superiores.

(c) Se sabe que la pureza de la proteína expresada afecta los rendimientos del replegamiento. Por regla general a mayor pureza de la proteína expresada mayores rendimientos de replegamiento. Los inventores han hallado que las purezas de TGF- β 3 de 70% (de proteína total) y superiores dieron altos rendimientos de replegamiento y que las purezas bajas de TGF- β 3 (<50% de proteína total) dieron bajos rendimientos de replegamiento. Por consiguiente se prefiere que el TGF- β 3 usado en los métodos de la invención sea mayor que 50% puro y con más preferencia aproximadamente 70% (o más) puro. Esta pureza se puede obtener incluyendo etapas de lavado de cuerpos de inclusión y clarificación del TGF-Beta 3 solubilizado usando TFF (por ej., ver Ejemplo 2).

(d) TGF-Beta 3 experimenta cambios significativos en la conformación (estructura secundaria) y solubilidad a pH diferentes. Debido a que el pH de una solución que contiene TGF-Beta 3 se mueve de ácido (<pH 3,8) a alacalino (<pH 8,0), aparecen agregados con un máximo de agregación que ocurre entre pH 6,5 y pH 8,5. WO99/18196 establece que el pH preferido de replegamiento de los BMP es de aproximadamente 8,5. Sin embargo, sería inadecuado para el replegamiento de TGF-Beta 3 ya que podría causar que el TGF-Beta 3 se agregue y en consecuencia se reduce significativamente la eficiencia y rendimiento del replegamiento. Por consiguiente, se prefiere que los métodos de la invención utilicen un buffer de replegamiento a un pH mayor de 8,5, con preferencia mayor de pH 9,0 y con máxima preferencia un pH de aproximadamente 9,5.

(e) Los inventores también han hallado que las concentraciones óptimas del par Redox (por ej., glutatión

reducido y oxidado) en el buffer de replegamiento puede ser diferente para BMP y TGF-Beta 3. Las concentraciones preferidas de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) usadas en la fabricación de TGF-Beta 3 de acuerdo con la invención es 2 mM y 0,4 mM respectivamente. Además, los inventores han hallado que es más preferible, una vez que se ha disuelto el par redox en solución, que el buffer envejezca durante al menos 2 horas, con preferencia al menos 3-5 horas y con máxima preferencia durante aproximadamente 7 horas. Los inventores sin desear estar ligados a ninguna hipótesis con respecto a los beneficios del "envejecimiento" del par redox, han indicado que en soluciones acuosas el GSH se oxida fácilmente para producir GSSG y a pH fisiológicos la vida media de GSH es aproximadamente 4 horas. Además los inventores presumen que la vida media de GSH en el buffer de replegamiento de TGF-Beta preferido (pH 9,5) se reduciría significativamente (a pH alacalinos habría menos iones hidrógeno para protonar los grupos tiolato reactivos en GSH a tioles no reactivos producidos). Una estimación conservadora de la vida media de GSH a pH 9,5 sería de 3 horas. En consecuencia después de 7 horas de envejecimiento del buffer las concentraciones del par redox sería en consecuencia de aproximadamente 0,5 mM de GSH y 1,15 mM de GSSG. Por consiguiente, estas concentraciones son las concentraciones preferidas para el replegamiento de TGF-Beta3. WO99/18196 establece la concentración preferidas del par redox en 2 mM de GSH y 1 mM de GSSG (para el plegamiento de BMP). Esta concentración aumentada de GSH prolongaría significativamente el replegamiento de TGF-Beta 3, y puede reducir el rendimiento (ya que GSH rompe los enlaces disulfuro de las proteínas). Además

WO99/18196 establece el requerimiento de 5 mM de EDTA en el buffer de replegamiento. La presencia de agentes quelantes tales como EDTA en el buffer de replegamiento estabilizaría el GSH (es decir aumento de la vida media de GSH), lo que aumentaría adicionalmente el tiempo de replegamiento de TGF-Beta 3 y puede reducir el rendimiento.

(f) WO99/18196 establece la concentración de BMP preferida en el buffer de replegamiento en 1-100 µg/ml, este es significativamente más bajo que las concentraciones que los inventores han hallado que son útiles para la fabricación de TGF-Beta 3 (en forma óptima 250 µg/ml). 250µg/ml de TGF-Beta 3 dieron eficiencias de replegamiento superiores que 100 µg/ml de TGF-Beta 3. En consecuencia, se prefiere que los métodos de la invención utilicen más de 100 µg/ml de TGF-Beta 3 en el paso de replegamiento y con preferencia aproximadamente 250 µg/ml de TGF-Beta 3.

(g) WO99/18196 establece la temperatura preferida del replegamiento de los BMP en 20°C. Los inventores han observado que los replegamientos de TGF-Beta 3 realizados a temperatura ambiente (22°C) producen la agregación de TGF-Beta 3 y que el replegamiento de TGF-Beta 3 debería ocurrir a menos de 15°C (con preferencia 2-8°C o aproximadamente 10°C) para sostener la vía de plegamiento productivo de TGF-Beta 3 y la supresión de la interacción hidrofóbica.

Un método más preferido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención se ilustra en la Figura 10. Los detalles de las condiciones y protocolos adecuados para usar en el método preferido ilustrado en la Figura 10 se exponen en las Figuras 11 a 26. Será apreciado por los expertos en el arte, que si bien las condiciones y protocolos

expuestos en estas Figura con preferencia se pueden usar en el método ilustrado en la Figura 10, ellas se pueden usar, excepto que el contexto lo requiera de otro modo, para efectuar cualquier método de plegamiento adecuado de acuerdo con la presente invención.

La invención se ilustrará adicionalmente con los Ejemplos y con referencia a los siguientes dibujos, en los que:

Figura 1: es una fotografía de un gel de SDS-PAGE ilustrativo de muestras pos-inducción de los matraces de agitación referidos a 1.4 del Ejemplo 1 en donde la calle 1 & 6 son estándares Mark 12 (Invitrogen); y las calles 2-5 se cargan con 3 μ L de clones 1-4 respectivamente (3 horas pos-inducción);

Figura 2: es una fotografía de una transferencia Western ilustrativa donde la primera calle es un estándar de TGF-Beta 3 no reducido y las calles 2-12 corresponden a o condiciones experimentales 2-12 de la Tabla 1 del Ejemplo 1 y demuestra que la condición 12 fue exitosa en producir correctamente TGF-Beta 3 dimérico plegado;

Figura 3: es una fotografía de una transferencia Western ilustrativa que demuestra que el plegamiento de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico descrito en 1.14 del Ejemplo 1 en donde las calles 1-18 corresponden a las condiciones experimentales 1-18 de la Tabla 3 del Ejemplo 1 después de incubaciones de 7 días;

Figura 4: es una fotografía de una transferencia Western ilustrativa que demuestra que el plegamiento de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico descritos en 1.14 del Ejemplo 1 en donde las calles 19-36 corresponden a condiciones experimentales 19-36 en la Tabla 4 del Ejemplo 1 después de incubaciones de 7 días;

Figura 5: es una fotografía de una transferencia Western ilustrativa que demuestra que el plegamiento de TGF-Beta

29

3 monomérico y dimérico para condiciones de replegamiento de máxima preferencia de acuerdo con la invención descriptas en 1.14 del Ejemplo 1 en donde la calle 1 representa el replegamiento del día 0; calle 2 representa replegamiento después de 1 día; calle 3 representa replegamiento después de 2 días; calle 4 representa replegamiento después de 3 días y calle 5 es un estándar de TGF-Beta 3 no reducida;

Figura 6: es una fotografía de una transferencia Western ilustrativa que demuestra que el plegamiento de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico que utilizan técnicas de replegamiento del arte previo descriptos en 1.14 de Ejemplo 1 en donde calle 1 representa replegamiento después de 1 día; calle 2 representa replegamiento después de 2 días; calle 3 representa replegamiento después de 3 días; y calle 5 representa replegamiento después de 7 días de tratamiento;

Figura 7: representa cromatogramas que ilustran la cantidad de TGF-Beta 3 dimérico producido por una condición de replegamiento de máxima preferencia de acuerdo con la invención descripta en 1.14 del Ejemplo 1 después de la purificación por HPLC de intercambio catiónico de muestras de TGF-Beta 3 replegadas (a) en día 0, (b) después de 1 día y (c) después de 2 días.

Figura 8: representa un cromatograma que ilustra la cantidad de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico producido por la condición de replegamiento de máxima preferencia de acuerdo con la invención descripto en 1.15 del Ejemplo 1 después de la purificación por ultrafiltración y cromatografía de interacción hidrofóbica en una columna de butil-Sefarosa;

Figura 9: representa un cromatograma que ilustra la cantidad de TGF-Beta 3 dimérico producido por una

20

condición de replegamiento de máxima preferencia de acuerdo con la invención descrito en 1.16 del Ejemplo 1 después de la purificación por cromatografía de intercambio catiónico en una columna de SP-Sefarosa;

Figura 10: es un diagrama de flujo esquemático que ilustra un método preferido de acuerdo con el segundo aspecto de la invención en que: (A) representa la etapa de fermentación y recuperación de cuerpo de inclusión (IB); (B) representa la etapa de solubilización de IB y clarificación; (C) representa una etapa de replegamiento de acuerdo con el primer aspecto de la invención; (D) representa una etapa de purificación; y (E) representa una etapa de formulación y presentación del producto del fármaco.

Figura 11: ilustra condiciones preferidas y protocolos para fermentación adecuados para usar en los métodos de la invención tales como las que se exponen en la Figura 10(A) (i);

Figura 12: ilustra condiciones preferidas y protocolos para la recolección y centrifugación adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los expuestos en la Figura 10(A) (ii);

Figura 13: ilustra condiciones preferidas y protocolos para lisis celular y recuperación de IB adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los expuestos en la Figura 10(A) (iii);

Figura 14: ilustra condiciones preferidas y protocolos para la solubilización de los cuerpos de inclusión adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los expuestos en la Figura 10(B) (i);

Figura 15: ilustra condiciones preferidas y protocolos para: (A) preparación de la membrana de clarificación (Figura 10(B) (ii)); y (B) preparación de la membrana de

pre-replegamiento UF/DF (Figura 10(B) (iii)) adecuados para usar en los métodos de la invención;

Figura 16: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para la clarificación de cuerpos de inclusión adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los expuestos en la Figura 10(B) (ii);

Figura 17: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para pre-replegamiento UF/DF adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los expuestos en la Figura 10 B (iii);

Figura 18: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para el replegamiento de proteínas adecuados para usar en los métodos de la invención tales como en la Figura 10 (C) (i);

Figura 19: ilustra condiciones preferidas y protocolos para preparación de la membrana de pos-replegamiento adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (i);

Figura 20: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para la ultrafiltración de pos-replegamiento y preparación de carga de butilo adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (i);

Figura 21: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para empacamiento de la resina de flujo rápido 4 de butilsefarosa adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (ii);

Figura 22: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para usar la resina de flujo rápido 4 de butil sefarosa de una manera adecuada para usar en los

32

métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (ii);

Figura 23: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para la limpieza y regeneración de la resina de flujo rápido 4 de butil sefarosa después de usar en los métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (ii),

Figura 24: ilustra condiciones preferidas y protocolos para la limpieza de la resina de flujo rápido de sefarosa SP antes de usar los métodos de la invención como los que se exponen en la Figura 10 (D) (iii);

Figura 25: ilustra condiciones preferidas y protocolos para empacamiento de la resina de flujo rápido de sefarosa SP adecuados para usar en los métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (iii);

Figura 26: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para usar la resina de flujo rápido de sefarosa SP de una manera adecuada para usar en los métodos de la invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (D) (iii);

Figura 27: ilustra condiciones preferidas y protocolos para la limpieza de la resina de flujo rápido de sefarosa SP: (A) después del uso; y (B) pre-uso/regeneración como se expone en la Figura 10 (D) (iii);

Figura 28: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para la preparación de membrana final UF/DF adecuada para usar en los métodos de la invención que se exponen en la Figura 10 (E) (i); y

Figura 29: ilustra dos condiciones preferidas y protocolos (A y B) para UF/DF de la solución de TGF- β 3 purificada por elución en Sefarosa SP, y llenado final, que son adecuados para usar en los métodos de la

invención tales como los que se exponen en la Figura 10 (E) (i).

EJEMPLO 1

Los inventores investigaron si se podrían establecer o no métodos mejorados de re-plegamiento de miembros de la superfamilia de TGF-Beta. El siguiente ejemplo es ilustrativo de la aplicación de los métodos de la invención al re-plegamiento de TGF-Beta 3.

Primero, se estableció un estudio para una primera prueba de reactivos de replegamiento (ver 1.13). Se halló que los reactivos que ayudaban al re-plegamiento en la prueba primaria que luego se llevó adelante como se describió en la presente, para optimización adicional para maximizar el rendimiento y reducir el cronograma de replegamiento (ver 1.14). Finalmente se investigaron los métodos de purificar el factor de crecimiento replegado (1.5-1.7).

Los métodos empleados para examinar la actividad biológica de TGF-Beta 3 se describen en 1.18.

Estos estudios llevaron a los inventores a darse cuenta que los métodos mejorados de plegamiento de los miembros de la superfamilia de TGF-Beta en una forma activa se pueden establecer por el siguiente método definido por el primer aspecto de la invención.

EXPERIMENTAL

1.1 Secuencia de nucleótidos

La secuencia de nucleótidos que codifica para el fragmento activo de TGF-Beta 3 es el siguiente:

GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC
 TGC TGT GTG CGC CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG
 GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT AAG GGC TAC TAT GCC AAC
 TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA GAC ACA
 ACC CAC AGC ACG GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT
 GAA GCA TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG
 CCC CTG ACC ATC CTG TAC TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG
 GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT TGT AAA TGT AGC

(SEC ID No. 1)

1.1 Generación de ADNc

El ARN total de un herida incisional humana (tomado el día 5 pos-herida) se trató con ADN libre (Ambion) para eliminar cualquier ADN contaminante. Usando ARN total como templado, se generó ADNc de TGF-Beta3 por la reacción en cadena de polimerasa-transcriptasa reversa (RT-PCR). Se preparó la mezcla maestra de RT-PCR a partir del kit de QRT-PCR Core Reagent 1-paso Brilliant® (Stratagene). Se agregó un microgramo de ARN a 50 µl de una solución que contiene: buffer QRT-PCR de 1 paso, 0,2 mM de dNTP, 3,5 mM de MgCl₂, 1 µL de transcriptasa reversas StrataScript, 2,5 unidades de Taq Polymerase, 0,4 µM de cebador de sentido (5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3') (SEC ID No. 2), 0,4 µM de cebador de sentido (5'-CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA C 3') (SEC ID No. 3). La reacción se colocó en un ciclador térmico (Hybaid PCR Express) y se corrió en las siguientes condiciones: 30 min a 45°C, 10 min a 95°C, luego 40 ciclos de 95°C durante 30 seg, 65°C durante 1 min y 72°C durante 1 min. La etapa final fue de 72°C durante 10 min. Las muestras de PCR se corrieron en gel de agarosa 2% (p/p) para verificar el tamaño de banda y se purificó usando el kit Wizard PCR Prep (Promega).

1.2 Clonación del vector y transformación en célula huésped.

El vector pET-24d se deriva del vector pBR322 y contiene un promotor T7 bajo control de *LacUV5* control y un gen marcador resistente a kanamicina.

Los fragmentos de ADNc de TGF-Beta 3 (generados en la Sección 1.1) se digirieron con 0,75 µl de NcoI (New England Biolabs) y 0,75 µl de BamHI (New England Biolabs) con buffer BamHI 1X (New England Biolabs) en una reacción de 15 µL (agua libre de nucleasa, Novagen) a 37°C durante 4 horas. Se digirió un microlitro de plásmido pET-24d (Novagen) de la misma manera. El ADNc digerido y el fragmento del plásmido mayor se purificaron en gel de agarosa y se recuperaron usando el kit de extracción de ADN en gel SpinPrep (Novagen).

El ADNc y los fragmentos de plásmido purificados se ligaron usando un kit de T4 ligasa (Novagen). El ADNc/plásmido ligado se transformó en HMS174 (DE3) (kit de transformación Novagen HMS174 (DE3)). Se seleccionaron los transformantes por sembrado en placas de agar con caldo Luria (LB) que contienen 50 µg/ml de kanamicina (Invitrogen). Se seleccionaron tres clones para la digestión por restricción y/o expresión.

1.3 Selección del clon para la expresión del producto

Los clones se cultivaron en cultivos en matraces de agitación de "caldo Terrific" de concentración media (6 g/L de peptona de fitona (Becton Dickinson), 12 g/L de extracto de levadura (Becton Dickinson), 2 g/L de glicerol (IT Baker), 1,16 g/L de fosfato de potasio monobásico (JT Baker), 6,25 g/L de fosfato de potasio dibásico (IT Baker), con cs a 1 litro de agua destilada) y se induce una fase exponencial a una DO₆₀₀ entre 0,65 y

26

0,85 con 1 mM de beta-D-tiogalactopiranosido de isopropilo (IPTG). Se tomaron las muestras pos-inducción 3 horas después de la adición de IPTG y se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) para la inducción y expresión del producto. Se corrieron alícuotas de muestra de los clones 1-4 pre/pos-inducción y estándares de peso molecular Mark 12 (Invitrogen- rango de peso molecular 2,5-200 kDa) en un gen NuPAGE® Novex 12% de Bis-Tis, 1,0 mm (Invitrogen) durante aproximadamente 40-50 minutos a 120 miliAmp y 200 voltios y luego se tiñeron con azul de Coomassie. Una proteína con un tamaño entre 6 y 14,4 kDa (es decir, monómero de TGF-Beta 3) es claramente inducida en cada uno de estos cultivos (ver Figura 1) con el Clon 2 que expresa la mayor cantidad de proteína de TGF-Beta 3.

1.4 Patrón de células congeladas

Los clones 1-4 se cultivaron en un matraces de agitación en caldo Terrific de concentración media a una DO_{600} de aproximadamente 1 y se conservaron como patrones de glicerol por la adición de glicerol a 20% (v/v). Se alicuotaron 1,2 ml de caldo en crioviales de 12 x 2 ml (que contenían 0,3 ml de glicerol) y luego se conservaron a -70°C .

1.5 Confirmación de secuencia del gen de TGF-Beta 3.

Se tomaron muestras de los cultivos usados para los patrones de células congeladas antes de la adición de glicerol y se usaron para el aislamiento del plásmido usando un kit Qiagen MiniPrep. El plásmido aislado se secuenció y verificó usando un cebador promotor T7 (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') (SEC ID No. 4) y un

X
M

cebador terminador T7 (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3')
(SEC ID No. 5).

1.6 Cultivo de semilla.

Debido a que el Clon 2 expresó la mayor cantidad de proteína de TGF-Beta 3, se recuperó una ampolla de patrón congelado (de la Sección 1.4) y se inoculó en un matraz erlenmeyer con tabique de 2 litros, que contiene 500 ml de medio HySoy (12 g/L de Hy-Soy (Quest Internacional), 24 g/L de extracto de levaduras (Becton Dickinson), 10 g/L de NaCl (Sigma) y 10 g/L de glicerol (Sigma) y 50 µg/ml de kanamicina. El matraz se incubó con agitación a 37°C y 200 rpm y se muestreó periódicamente para medir la DO₅₅₀. Cuando la DO del cultivo alcanzó 3,21 U/ml (después de 7 horas) se usó el caldo de células para sembrar un fermentador de 150 L (volumen de trabajo de 100 L).

1.7 Fermentación

Se usaron novecientos mililitros de caldo celular (de la Sección 1.6) para inocular un fermentador de 150 L (WHE) que contiene 90 L de medio de cultivo en lote (0,6 g/L de K₂HPO₄, 0,4 g/L de KH₂PO₄, 1,25 g/L de NH₄SO₄, 12 g/L de HY-Soy, 24 g/L de extracto de levaduras y 10 g/L de glicerol). Los parámetros operativos de la fermentación se controlaron de la siguiente manera: punto de ajuste de temperatura 37°C; punto de ajuste de pH, 7,0 (mantenido usando 4 N de hidróxido de amonio y 4 N de ácido fosfórico), y oxígeno disuelto (DO) calibrado inicialmente a 100%. La presión del cabezal del recipiente fue 7 psi, y la agitación y flujo de aire fueron de 200-400 rpm con un volumen de aire por volumen de medio por minuto (vvm o slpm), respectivamente. El DO se mantuvo por encima de 20% por el ajuste de los

36

parámetros de ajuste con la siguiente prioridad: agitación (máx. 400 rpm), aereación (máx. 1,5 vvm), suplemento de oxígeno (máx. 33,3 lpm), y presión trasera (máx 12 psi). La formación de espuma se controló con Pluronic L-61 (25% v/v). Cuando la DO del cultivo alcanzó 10 U/ml se inició una alimentación de glicerol (50% v/v) con una velocidad de flujo de 45 ml/min. Cuando la DO alcanzó 40 U/ml, las células se indujeron con la adición de IPTG hasta una concentración final de 0,2 mM.

1.8 Recolección

Después de 4 horas pos-inducción, el fermentador se refrigeró a 10°C y se redujeron el flujo de aire y la agitación a 0,3 vvm y 100 rpm respectivamente. Los controles de espuma y pH terminaron y se ajustó la presión trasera a 3 psi. Se recolectó el cultivo por centrifugación continua con una centrífuga continua Westfalia CSA8 a 10°C. La centrífuga operó a 15.000 rpm y una velocidad de flujo de 3 litros por minutos y se recolectaron las suspensiones celulares.

1.9 Lisis celular y recuperación de IB

La pasta de células de fermentación (de la Sección 1.8) se diluyó 1:5 con buffer de lisis (6,1 g/L de TrizmaBase (Tris), 3,7 g/L de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 58,44 g/L de NaCl y 10 g/L de Triton X-100, pH 8,0) y se resuspendió usando un homogenizador manual. La pasta celular resuspendida se pasó dos veces a través de un homogenizador de alta presión (parámetros: presión, 10.000 psig; velocidad de flujo, 450 ml/min; y temperatura, 15°C). El lisado celular homogenizado luego se centrifugó (centrífuga de cabezal, rotor de ángulo fijo) a 5.000 xg durante 20 minutos a 4°C. Se descartó el

34

sobrenadante dejando el TGF-Beta 3 insoluble (cuerpos de inclusión). El pellet de cuerpos de inclusión (IB) se resuspendió en buffer de lavado (6,1 g/L de Tris y 3,72 g/L de EDTA, pH 8,0) usando un homogenizador manual y se centrifugó (5.000 xg durante 20 minutos a 4°C).

1.10 Solubilización de cuerpos de inclusión

El sedimento de la Sección 1.9 se diluyó 1:10 con el buffer de solubilización (6,1 g/L de Tris, 15,4 g/L de DL-ditiotreitol (DTT) y 360,4 g/L de urea, pH 8,0) y resuspendió en un homogenizador manual. La suspensión se cubrió y dejó agitar durante 60-75 minutos, a temperatura ambiente para solubilizar los cuerpos de inclusión y reducir el TGF-Beta 3 a sus forma monomérica. El pH del pellet resuspendido se ajustó a pH 9,4-9,6 con NaOH/ácido acético antes de la incubación durante un segundo tiempo de 60-75 minutos.

1.11 Clarificación/ultrafiltración y diafiltración

El material solubilizado de la Sección 1.10 se clarificó, concentró y diafiltró en un sistema de flujo tangencial (TFF) (Millipore). La clarificación y concentración iniciales se obtuvo con una membrana de clarificación TFF preacondicionada (Millipore Pellicon 1000 kDa, celulosa regenerada, prueba V). El TGF-Beta 3 clarificado se recolectó en el permeato. Luego se cambia a una membrana de ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) (Millipore Pellicon 5kDa, celulosa regenerada, prueba C), el TGF-Beta 3 luego se lava en 6 volúmenes de diafiltración del buffer de solubilización (6,1 g/L de Tris, 15,4 g/L de DTT y 360,4 g/L de urea, pH 9,5).

1.12 Prueba de replegamiento en matriz 1

40

1.12.1 Metodología

El contenido de proteína de TGF-Beta 3 en el material clarificado de la Sección 1.11 se cuantificó usando el ensayo de proteína RC DCTM (BioRad) en conjunto con SDS-PAGE, tinción con azul de Coomassie y densitometría. El material de TGF-Beta 3 se diluyó en una serie de bufferes de replegamiento (ver Tablas 1 y 2). Se tomaron diariamente muestras de 1 ml durante un cronograma de 6 días y se analizaron en condiciones no reductoras usando SDS-PAGE. Se corrieron las alícuotas de las muestras y los estándares de peso molecular Mark 12 (Invitrogen-rango de peso molecular 2,5-200 kDa) en gel NuPAGE® Novex 12% de Bis-Tris 1,0 mm (Invitrogen) durante aproximadamente 40-50 minutos a 120 miliAmp y 200 voltios. Las muestras de proteína luego transfirieron por electroforesis a la membrana de nitrocelulosa (Invitrogen) usando un aparato Novex Blotting (Invitrogen). La membrana se bloqueó con 5% (p/v) de leche en polvo descremada, 1% (v/v) de monolaurato de polioxietilensorbitano (Tween 20;Sigma) en solución buffer salina (PBS). Se lavó la membrana (PBS, 0,1% (v/v) Tween 20) y se incubó durante 1 hora en anticuerpo primario (Anti-TGF-Beta 3, MAB643 (sistemas R&D) diluido 1:500 en PBS y 0,1 (v/v) de Tween 20). Después de la incubación con el anticuerpo primario, la nitrocelulosa se lavó con buffer de lavado (PBS, 1% (v/v) de Tween 20). Luego la nitrocelulosa se incubó durante 1 hora adicional en el anticuerpo secundario (IgG anti-ratón de cabra conjugada con fosfatasa alcalina (Abcam PO397) diluida 1:2000 con PBS, 0,1% (v/v) de Tween 20). La membrana se lavó nuevamente (PBS, 1% (v/v) de Tween 20 antes de desarrollar color con el substrato estabilizado Western Blue para fosfatasa alcalina (Promega).

El anticuerpo MAB 643 detecta especies de TGF-Beta 3 monoméricas y diméricas correctamente replegadas.

1.12.2 Resultados

Las tablas 1 y 2 sintetizan los resultados obtenidos por el análisis de replegamiento de TGF-Beta 3 en 50 condiciones experimentales diferentes.

Los inventores establecieron que las condiciones que se describen a continuación (es decir, las condiciones experimentales 12, 19, y 44) produjeron TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado:

1. 0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C (Condición experimental 12).

2. 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C (Condición experimental 19).

3. 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2 mM de GSSG, 0,12 mg/ml TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C (Condición experimental 44).

A modo de ejemplos la Figura 2 ilustra la efectividad de de la Condición experimental 12.

Tabla 1. Matriz de prueba de replegamiento y resultados

Condición experimental	Temp	Detergente	TGF-Beta 3 conc.	GSH conc.	GSSG Conc.	Presencia de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por análisis de transferencia
1	2-8°C	100 mM de Zwittergent 3-08	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
2	2-8°C	40 mM de Taurocolato	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
3	2-8°C	40 mM de Big CHAP	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
4	2-8°C	60 mM de glucopirano-6-sido de hexilo	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
5	2-8°C	0,5% (p/v) de ASB-14	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
6	2-8°C	0,5% (p/v) de DDMAB	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
7	2-8°C	0,5% (p/v) de CTAB	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
8	2-8°C	0,2% (p/v) de SDS	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
9	2-8°C	0,1% (p/v) de Dodecil-b-D-maltósido	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
10	2-8°C	0,1% (p/v) de Tween 20	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
11	2-8°C	1M de NDSB-201	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
12	2-8°C	0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Dímero
13	2-8°C	20% (v/v) sacarosa	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
14	2-8°C	20% (v/v) de glicerol	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
15	2-8°C	20 mM de Zwittergente 3-12 + 0,5M	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
16	2-8°C	20 mM de Zwittergente 3-08 + 1M NDSB-	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
17	2-8°C	30 mM de taurodesoxico lato	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado

43

18	2- 8°C	30 mM de taurodesoxico lato	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
19	2- 8°C	30 mM taurodesoxicolato + 0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Dímero
20	2- 8°C	0,5 M de arginina	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
21	2- 8°C	40 mM de Octil-Tioglucopiranósido	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
22	2- 8°C	60 mM de hexilglucopiranósido 0,1% (p/v) PEG-6000	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
23	2- 8°C	30% (v/v) de etanol	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
24	2- 8°C	20% (v/v) de alcohol isopropílico	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado
25	2- 8°C	30 mM de taurodesoxico lato	0,12 mg/ml	2 mM	0,4 mM	Ninguno detectado

Tabla 2. Matriz de prueba de replegamiento y resultados

Condición experimental	Temp	Detergente	Conc de TGF-Beta 3	Conc de GSH	Conc de GSSG	Presencia de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por análisis de transferencia
26	2- 8°C	100 mM de Zwittergente 3-08	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
27	2- 8°C	40 mM de Taurocolato	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
28	2- 8°C	40 mM de Big CHAP	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
29	2- 8°C	60 mM de Hexil glucopiranósido	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
30	2- 8°C	0,5% (p/v) de ASB-14	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
31	2- 8°C	0,5% (p/v) de DDMAB	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
32	2- 8°C	0,5% (p/v) de CTAB	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado

44

33	2- 8°C	0,2% (p/v) de SDS	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
34	2- 8°C	0,1% (p/v) de Dodecil- b-D-maltósido	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
35	2- 8°C	0,1% (p/v) de Tween 20	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
36	2- 8°C	1M de NDSB-201	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
37	2- 8°C	0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
38	2- 8°C	20% (v/v) de sacarosa	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
39	2- 8°C	20% (v/v) de glicerol	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
40	2- 8°C	20 mM de Zwittergente 3- 12 + 0,5M Arginine	0,12 mg/ml	2 mM	21 mM	Ninguno detectado
41	2- 8°C	20 mM de Zwittergente 3- 08 + 1M NDSB-221	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
42	2- 8°C	30 mM de taurodesoxicola-to + 0,5M Arginine	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
43	2- 8°C	30mM taurodesoxicola-to + 1M NDSB-221	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
44	2- 8°C	30 mM de taurodesoxicola-to + 0,7 M de CHES	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Dimero
45	2- 8°C	0,5 M de arginina	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
46	2- 8°C	40 mM de Octil- Tioglucopiranosido	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
47	2- 8°C	60 mM de Hexilglucopiranosido 0,1 % (p/v) PEG-6000	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
48	2- 8°C	30% (v/v) de Etanol	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
49	2- 8°C	20% (v/v) de alcohol isopropílico	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado
50	2- 8°C	30 mM de taurodesoxicola-to	0,12 mg/ml	2 mM	2 mM	Ninguno detectado

1.13 Optimización de replegamiento

Las condiciones del Experimento 12 (0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3 a pH 9,5 a 2-8°C) produjeron TGF Beta 3 particularmente bien

plegado. En consecuencia se seleccionaron estas condiciones para una optimización adicional.

Los parámetros investigados fueron:

Concentración de TGF-Beta 3 (0,1 mg/ml, 0,25 mg/ml y 0,5 mg/ml)

pH (8,0, 9,0 y 9,5)

Temperatura (2-8°C y temperatura ambiente)

Adición de NaCl 1M

El material de TGF-Beta 3 de la Sección 1.12 se diluyó en una serie de condiciones de replegamiento (ver Tablas 3 y 4). Se tomaron diariamente muestras de 1 ml durante un cronograma de 6 días. Las muestras del día 6 se analizaron en condiciones no reductoras usando SDS-PAGE y transferencia Western (ver Sección 1.13 para la metodología). Se detectó TGF-Beta 3 monomérico correctamente replegado por transferencia Western blot en todas las condiciones de replegamiento. Se detectó TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por transferencia Western en todos los experimentos que contienen 1,0 M de NaCl (ver Figuras 3 y 4).

Las condiciones en las que se replegó la mayor cantidad de TGF-Beta 3 en su estado dimérico fue la condición experimental 34 (0,7 M de CHES, 1M de NaCl, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,25 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C/temperatura ambiente).

Las muestras de los días 0, 1, 2 y 3 de la condición experimental 34 se corrieron en SDS-PAGE no reductor y transferencia Western para determinar los puntos de tiempo en los que se produjo TGF-Beta 3 correctamente replegado. Como se muestra en la Figura 5 el material de partida inicial y la muestra del día 1 contenían cantidades pequeñas de TGF-Beta 3 monomérico y dimérico correctamente replegados. Existe un aumento significativo

44

de la cantidad de TGF-Beta 3 correctamente replegado en el día 2 y 3 de replegamiento.

La Figura 6 ilustra el replegamiento obtenido por las condiciones de replegamiento del arte previo contempladas en US 5.922.846, US 5.650.494 y EP 0 433 225 (0,05 M de Tris, 1M de NDSB-201, 20% (v/v) de DMSO, 2% (p/v) de CHAPS, 1M de NaCl, 1% (p/v) de GSH, 0,2 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,3 a 2-8 °C). Se puede observar que la cantidad de TGF-Beta 3 replegado es todavía creciente después de 7 días de tratamiento (contrastar calles 4 y 5 de la Figura 6) mientras que, en contraste, el factor de crecimiento se plegó por completo después de 2 días de tratamiento cuando se emplean los métodos de acuerdo con la invención (comparar calles 3 y 4 de la Figura 5).

El replegamiento de TGF-Beta 3 en la condición experimental 34 también se controló usando HPLC de intercambio catiónico (CEX). Se equilibró una columna HPLC de PoliSulfoetil-A (200 x 4,6 mm, 5 µm, 1000 Å de PolyLC Inc.) con una fase móvil A (10% (v/v) de ácido acético, 30% (v/v) de alcohol isopropílico). Las muestras de replegamiento se acidificaron por la mezcla 1:1 con 20% de ácido acético, 60% de alcohol isopropílico. Se cargaron 100 µL de muestra de replegamiento acidificada en una columna de velocidad de flujo de 0,5 ml/min (esta velocidad de flujo se usó en todo el procedimiento). La columna se lavó con fase móvil A durante 5 minutos. Se corrió un gradiente lineal durante 10 minutos finalizando con una mezcla de 60% de fase móvil A y 40% de fase móvil B (10% (v/v) de ácido acético, 30% (v/v) de alcohol isopropílico y 1M de NaCl). La aplicación de este buffer se mantuvo durante 5 minutos adicionales. Se aplicó un segundo gradiente lineal durante 10 minutos finalizando con 100% de fase móvil B y se mantuvo durante 5 minutos.

La Figura 7 ilustra que en el día 0 existen pequeñas cantidades de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado (ver 7(a)) mientras que en el día 1 existe un aumento significativo de la concentración de la proteína de TGF-Beta 3 correctamente plegada (ver 7(b)). La concentración de TGF-Beta 3 dimérico en el día 2 es similar al día 1, lo que indica que el replegamiento está completo después 24 horas (ver 7(c)). La finalización del replegamiento después de 24 horas es significativamente más rápida que en las técnicas del arte previo (ver Figura 6).

Tabla 3. Matriz de optimización de replegamiento y resultados (Condiciones experimentales 1-18)

Condiciones experimentales	Temp	Detergente	Conc. de NaCl	Conc. de TGF-Beta 3 (mg/ml)	Conc de GSH	pH	Conc de GSSG	Presencia de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por análisis de transferencia Western (MAB643)
1	2-8°C	0,7 M de CHES	0	0,1	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
2	2-8°C	0,7 M de CHES	1	0,1	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero
3	2-8°C	0,7 M de CHES	0	0,25	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
4	2-8°C	0,7 M de CHES	1	0,25	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero
5	2-8°C	0,7 M de CHES	0	0,5	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
6	2-8°C	0,7 M de CHES	1	0,5	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero
7	2-8°C	0,7 M de CHES	0	0,1	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero
8	2-8°C	0,7 M de CHES	1	0,1	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero
9	2-8°C	0,7 M de CHES	0	0,25	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero
10	2-8°C	0,7 M de CHES	1	0,25	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero
11	2-8°C	0,7 M de CHES	0	0,5	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero
12	2-8°C	0,7 M de CHES	1	0,5	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero

13	RT	0,7 M de CHES	0	0,1	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
14	RT	0,7 M de CHES	1	0,1	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero +dímero
15	RT	0,7 M de CHES	0	0,25	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
16	RT	0,7 M de CHES	1	0,25	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero
17	RT	0,7 M de CHES	0	0,5	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
18	RT	0,7 M de CHES	1	0,5	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero

Nota: RT= Temperatura ambiente

2-8°C/RT= 3 días a 2-8°C y 3 días a temperatura ambiente.

49

Tabla 4. Matriz de optimización de replegamiento y resultados (Condiciones experimentales 19-36)

Condiciones experimentales	Temp	Detergente	Conc. de NaCl	Conc. de TGF-Beta 3 (mg/ml)	Conc de GSH	pH	Conc de GSSG	Presencia de TGF-Beta 3 dimérico correctamente replegado por análisis de transferencia
19	RT	0,7 M de CHES	0	0,1	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero
20	RT	0,7 M de	1	0,1	2 mM	9,5	0,4 mM	No detectado
21	RT	0,7 M de CHES	0	0,25	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
22	RT	0,7 M de	1	0,25	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
23	RT	0,7 M de	0	0,5	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
24	RT	0,7 M de	1	0,5	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
25	2-8°C /RT	0,7 M de	0	0,1	2 mM	8,5	0,4 mM	No detectado
26	2-8°C /RT	0,7 M de	1	0,1	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero+dímero
27	2-8°C /RT	0,7 M de	0	0,25	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
28	2-8°C /RT	0,7 M de	1	0,25	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero
29	2-8°C /RT	0,7 M de	0	0,5	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero
30	2-8°C /RT	0,7 M de	1	0,5	2 mM	8,5	0,4 mM	Monómero + dímero
31	2-8°C /RT	0,7 M de	0	0,1	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
32	2-8°C /RT	0,7 M de	1	0,1	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
33	2-8°C /RT	0,7 M de	0	0,25	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
34	2-8°C /RT	0,7 M de	1	0,25	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero+dímero
35	2-8°C /RT	0,7 M de	0	0,5	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero
36	2-8°C /RT	0,7 M de	1	0,5	2 mM	9,5	0,4 mM	Monómero + dímero

Nota: RT= Temperatura ambiente

2-8°C/RT= 3 días a 2-8°C y 3 días a temperatura ambiente.

Secciones 1.14 - 1.16 describen experimentos realizados para establecer cómo se puede purificar el TGF-Beta 3



replegado de acuerdo con el primer aspecto de la invención.

1.14 Ultrafiltración/Cromatografía de interacción hidrofóbica.

La solución replegada de CHES identificada como condición experimental 34 de la Sección 1.13 se concentró 5 veces por ultrafiltración (la membrana fue una lámina plana Millipore Pellicon 5 kDa, 0,1 m², prueba de celulosa regenerada). El pH del material replegado concentrado luego se ajustó a un pH de 2,5-2,8 usando ácido acético glacial antes de diluir 1:1 en buffer de dilución (2,72 g/L de acetato de sodio, 264,28 g/L de sulfato de amonio, 100 g/L de ácido acético, y 210,7 g/L de clorhidrato de arginina de pH 3,3). Se equilibró una columna de flujo rápido de Butilsefaroza 4 (Amersham, 16 cm de altura de lecho) con cuatro volúmenes de columna de Buffer A (2,72 g/L de acetato de sodio, 132,14 g/L de sulfato de amonio y 100 g/L de ácido acético a pH 3,3). El material replegado se filtró a través de una membrana de 0,22 µm (filtro Millipore Millipak) antes de cargarse en una columna de butilsefaroza a una velocidad de flujo de 100 cm/hora (esta velocidad de flujo se usó en todo el procedimiento). La columna luego se lavó en Buffer A para cuatro volúmenes de columna. Las proteínas de TGF-Beta 3 se eluyeron de la columna usando Buffer B (2,72 g/L de acetato de sodio, 100 g/L de ácido acético y 300 g/L de etanol, pH 3,3). Se mezcló el primer pico, que contiene proteínas TGF-Beta 3 en formas monoméricas y diméricas (ver, Figura 8).

1.15 Cromatografía de intercambio catiónico

Se usó la cromatografía de intercambio catiónico para aislar las proteínas de TGF-Beta 3 dimérico de las

5

proteínas monoméricas. Las fracciones de TGF-Beta 3 combinadas de la Sección 1.14 se diluyeron 5 veces en SP buffer de dilución de carga (2,72 g/L de acetato de sodio, 100 g/L de ácido acético, 300 g/L de etanol pH 4,0). Se equilibró una columna de flujo rápido de Butilsefearosa 4 (Amersham) con cuatro volúmenes de columna de Buffer A (2,72 g/L de acetato de sodio, 100 g/L de ácido acético, 300 g/L de etanol y 1,46 g/L de cloruro de sodio, pH 4,0). El material de TGF-Beta 3 diluido se cargó en una columna de sefearosa SP con una velocidad de flujo de 169 cm/horas ((esta velocidad de flujo se usó en todo el procedimiento). La columna luego se lavó en Buffer B (2,72 g/L de acetato de sodio, 100 g/L de ácido acético, 300 g/L de etanol y 2,92 g/L de cloruro de sodio pH 4,0) para cuatro volúmenes de columna. Las proteínas de TGF-Beta 3 se eluyeron de la columna usando el Buffer C (2,72 g/L de acetato de sodio, 100 g/L de ácido acético, 300 g/L de etanol y 11,69 g/L de cloruro de sodio pH 4,0). El primer pico eluido es TGF-Beta 3 monomérico seguido por el TGF-Beta 3 dimérico. Se combinaron las fracciones que contienen el dímero TGF-Beta 3 dímero (ver Figura 9)

1.16 Ultrafiltración/Diafiltración

Las fracciones que contienen moléculas de TGF-Beta 3 diméricas purificadas de la Sección 1.15 se sometieron a ultrafiltración/diafiltración para cambiar el buffer a 20 mM de ácido acético, 20% (v/v) de etanol y concentrar la muestra a ~10 mg/ml (se determinó la concentración de TGF-Beta 3 por espectrometría de U.V).

1.17 Ensayo de actividad biológica

52

El ensayo de inhibición del crecimiento celular (A Meager, 1991 - Journal of Immunological Methods; 141; páginas 1 a 14) se usó como un ensayo de actividad biológica in vitro para las moléculas de TGFBeta. El ensayo colorimétrico se basa en el efecto inhibitorio de las moléculas de TGFBeta sobre el crecimiento de las células epiteliales de pulmón Mink (MLEC). Se agregaron 50 µL de medio de dilución (medio esencial mínimo con Glutamax I (Invitrogen) y 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (Sigma)) a cada pocillo de una placa de 96 pocillos. Se agregaron 50 µL de diluciones seriadas (5000 pg/ml a 9,75 pg/ml) de estándar de referencia de TGF-Beta 3 (National Institute of Biological Standards y Controls), 50 µL de diluciones seriadas (5000 pg/ml a 9,75 pg/ml) de TGF-Beta 3 (producida por métodos descriptos en la patentes: US 5.922.846, US 5.650.494 y EP-B-0433 225) y 50 µL de diluciones seriadas (5000 pg/ml a 9,75 pg/ml) de proteína TGF-Beta 3 (CHES factor de crecimiento replegado purificado de acuerdo con la sección 1.17) a la(s) placa(s). Se agregaron 50 µL de suspensión celular que contiene: 1×10^5 células MLEC/ml en medio completo (medio esencial mínimo con Glutamax I (Invitrogen), 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (Sigma) y 10% (v/v) de suero bovino fetal (Invitrogen) a cada pocillo.

La(s) placa(s) se incubaron durante 72 horas a 37°C en 5% de CO₂. Se aspiraron los contenidos de cada pocillo y se lavaron tres veces con 200 µL de solución salina bufferada con fosfato (Invitrogen). Se agregaron 100 µL de solución de sustrato (1M de acetato de sodio, 104 sustrato fosfatasa (Sigma) y 1% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma)) a cada pocillo y se incubó a 37°C. Después de 2 horas la reacción se inactivó usando hidróxido de sodio

1N. La(s) placa(s) se leyeron usando un lector multicanal a 405 nm y un filtro de referencia a 492 nm.

Los valores de IC_{50} del estándar de referencia de TGF-Beta 3 (NIBSC) y TGF-Beta 3 (producido por los métodos descriptos en la patentes: US 5.922.846, US 5.650.494 y EP-B-0433 225) fueron 242,33 pg/ml y 90 pg/ml respectivamente, que fueron similares a los estándares previamente ensayados. Se halló que el material replegado de acuerdo con la invención tenía una IC_{50} de 85,573 pg/ml, que indica la TGF-Beta 3 replegada de acuerdo con la invención, tiene al menos una potencia equivalente (actividad biológica) a TGF-Beta 3 producido por los métodos del arte previo.

CONCLUSIONES

A partir de la matriz de detección de replegamiento de las condiciones descriptas en las tablas 1 y 2, tres condiciones produjeron correctamente TGF-Beta 3 dimérico replegado:

1. 0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

2. 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

3. 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

Las condiciones experimentales de replegamiento que contienen CHES se optimizaron adicionalmente para maximizar el rendimiento y reducir los cronogramas de

54

tiempo. Las condiciones de replegamiento óptimas incluyeron 0,7 M de CHES, 1M de NaCl, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,25 mg/ml de TGF-Beta 3 y pH 9,5, que completo el replegamiento entre 24-48 horas. Esto es significativamente más rápido que 7 días usando métodos descriptos en las patentes: US 5.922.846, US 5.650.494 y EP-B-0433 225.

El replegamiento optimizado con CHES se purificó adicionalmente y se halló que tiene actividad biológica comparable de un estándar de TGF-Beta 3 (NIBSC) y TGF-Beta 3 generado usando la metodología descripta en el arte previo.

EJEMPLO 2

Se desarrolló un proceso industrial de acuerdo con el segundo aspecto de la invención. La Figura 10 provee un panorama del proceso mientras que las Figuras 11-29 proporcionan detalles adicionales, en la forma de diagramas de flujo de las etapas individuales descriptas en la Figura 10.

L
L
L**REIVINDICACIONES**

1. Un método de plegar un factor de crecimiento transformante beta, o un análogo funcional de este en una forma dimérica biológicamente activa que comprende agregar un factor de crecimiento monomérico no plegado solubilizado a una solución que contiene:

(i) ácido 2-(ciclohexilamino)-etansulfónico (CHES) o un análogo funcional de este; y

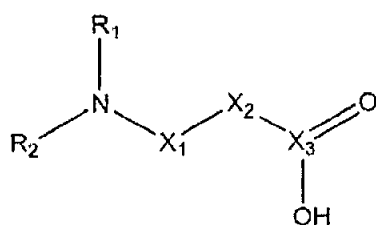
(ii) un sistema redox de sulfidrilo/disulfuro de bajo peso molecular; e

incubar el factor de crecimiento en la solución hasta que se forma el factor de crecimiento dimérico biológicamente activo.

2. El método de acuerdo con la reivindicación 1 en donde CHES se usa en una concentración de aproximadamente 100 mM-1,0 M.

3. El método de acuerdo con la reivindicación 2 en donde se usan aproximadamente 0,7 M de CHES.

4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el análogo funcional de CHES está definido por la fórmula:



(I)

en donde:

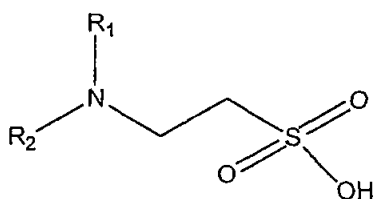
R_1 y R_2 son iguales o diferentes y se seleccionan del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C_{1-4} sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo C_{3-8} sustituidos o no sustituidos, o un núcleo aromático sustituido o no sustituido, o R_1 y R_2 juntos forman un sistema anular que tiene hasta 10 átomos;

X_1 y X_2 se seleccionan de modo independiente de $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O_2)-$, $-NR_3-$,

$-CHR_4-$ y CHR_5 donde R_3 , R_4 y R_5 son iguales o diferentes y se seleccionan de modo independiente del grupo que consiste en hidrógeno, grupos alquilo C_{1-4} sustituidos o no sustituidos, grupos cicloalquilo C_{3-8} sustituidos o no sustituidos, o un núcleo aromático sustituido o no sustituido o dos de R_3 , R_4 y R_5 pueden formar juntos un sistema anular que tiene hasta 6 átomos de carbono, sujeto a la condición de que al menos uno de X_1 y X_2 sea $-CHR_4-$ o $-CHR_5-$; y

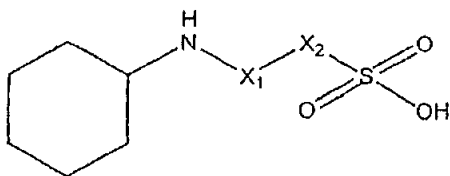
X_3 se selecciona de C, S, S=O, o P-OH

5. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el análogo funcional de CHES se define por la fórmula:



(Ia)

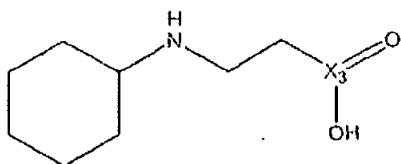
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el análogo funcional de CHES se define por la fórmula:



(Ib)

X
S

7. El método de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el análogo funcional de CHES se define por la fórmula:



(Ic)

8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el sistema redox sulfhidrilo/disulfuro es glutatión en sus formas oxidadas y reducidas.

9. El método de acuerdo con la reivindicación 8 en donde el sistema redox sulfhidrilo/disulfuro es aproximadamente 200 μ M-20 mM de glutatión reducido y 40 μ M-4 mM de glutatión oxidado.

10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el factor de crecimiento transformante beta se incuba a un pH de 8-10.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 10 en donde el factor de crecimiento transformante beta se incuba a un pH de aproximadamente 8,5 y 9,5.

12. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el factor de crecimiento transformante beta se incuba a temperaturas de 0°C-37°C.

13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el factor de crecimiento transformante beta se agrega a la solución en una concentración de entre 0,1-0,5 mg/ml.

14. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el factor de crecimiento transformante beta es factor de crecimiento transformante beta 3.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 14 en donde el factor de crecimiento transformante beta 3 se agrega a la solución en una concentración de entre aproximadamente 0,12-0,25 mg/ml.

16. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el plegado se lleva a cabo en las siguientes condiciones: 0,7 M de ácido 2-(ciclohexilamino)etansulfónico (CHES), 2 mM de glutatión reducido (GSH), 0,4 mM de glutatión oxidado (GSSG), 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C .

17. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-16 en donde el plegado se lleva a cabo en las siguientes condiciones: 0,7 M de CHES, 1 M de NaCl, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,25 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C/temperatura ambiente.

18. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde también se agrega taurodesoxicolato a la solución.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 17 en donde el factor de crecimiento transformante beta se incuba con taurodesoxicolato a una concentración de entre 10 mM-100 mM.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 19 en donde el factor de crecimiento transformante beta incuba con taurodesoxicolato a una concentración de aproximadamente 30 mM.

21. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el plegado se lleva a cabo en las siguientes condiciones: 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 0,4 mM de GSSG, 0,12 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C;

22. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 21 en donde el plegado se lleva a cabo en las siguientes condiciones: 30 mM de taurodesoxicolato, 0,7 M de CHES, 2 mM de GSH, 2 mM de GSSG, 0,25 mg/ml de TGF-Beta 3, pH 9,5 a 2-8°C.

23. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde el factor de crecimiento transformante beta representa más del 50% de la proteína de la solución.

24. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes en donde se obtiene un sistema redox sulfhidrilo/disulfuro de bajo peso molecular y se envejece durante aproximadamente 7 horas antes de agregar el factor de crecimiento transformante beta a la solución que contiene el sistema.

9

25. Un método de producir un factor de crecimiento transformante beta activo de un huésped procariótico, el método comprende:

(A) fermentación de organismos procarióticos que se han transformado para expresar un miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta;

(B) aislamiento de cuerpos de inclusión y recuperación de proteína expresada de los cuerpos de inclusión;

(C) replegado del miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta de acuerdo con el primer aspecto de la invención; y

(D) purificación del miembro de la superfamilia del factor de crecimiento transformante beta replegado.

26. El método de acuerdo con la reivindicación 25 en donde en paso (A) el huésped procariótico es una bacteria que ha sido transformada con un vector de expresión que codifica un factor de crecimiento transformante beta.

27. El método de acuerdo con la reivindicación 25 o 26 en donde en el paso (C) el factor de crecimiento se repliega de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 -24.

28. El método de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 25 - 27 en donde factor de crecimiento transformante beta se purifica de acuerdo con el paso (D) por ultrafiltración y cromatografía de intercambio iónico.

29. El método de acuerdo con la reivindicación 28 en donde la cromatografía de intercambio iónico comprende

6

cromatografía de interacción hidrofóbica seguida por cromatografía de intercambio catiónico.

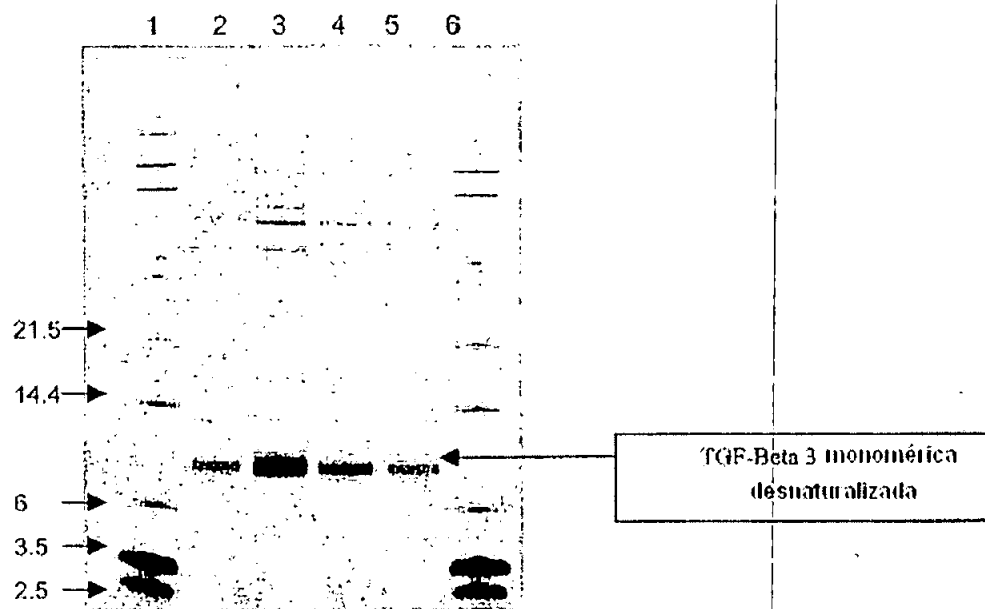
en donde el factor de crecimiento transformante beta factor de crecimiento se formula en una concentración deseada en una solución y se coloca en viales.(sic)

28. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25 - 27 en donde el método comprende un paso adicional (E) en donde el factor de crecimiento se formula en una concentración deseada en una solución y se coloca en viales.

29. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 25-28 en donde el método comprende esencialmente los pasos (A) a (E) definidos en la Figura 10.

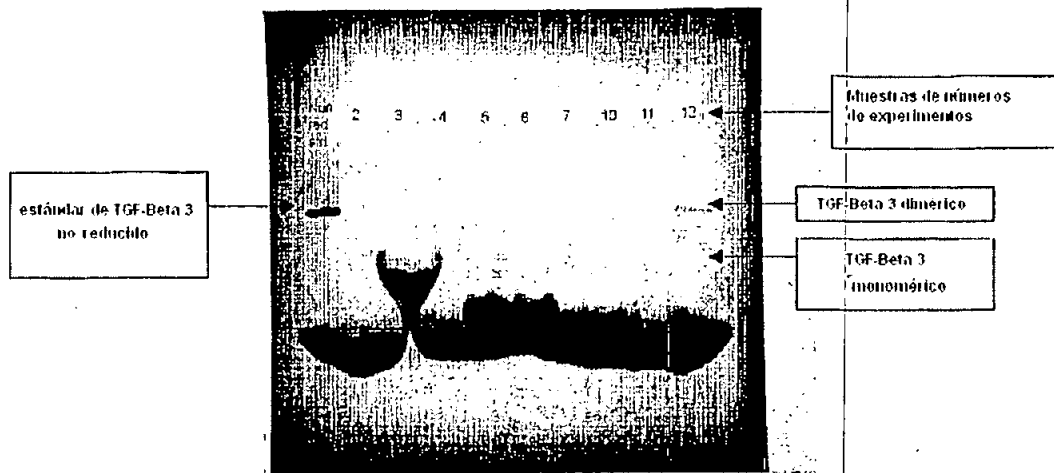
26

FIG. 1



Calle	Muestra
1	Estándar Mark 12
2	Clon 1 pos-inducción 3 horas (3 µL)
3	Clon 2 pos-inducción 3 horas (3 µL)
4	Clon 3 pos-inducción 3 horas (3 µL)
5	Clon 4 pos-inducción 3 horas (3 µL)
6	Estándar Mark 12

FIG. 2



3

FIG 3

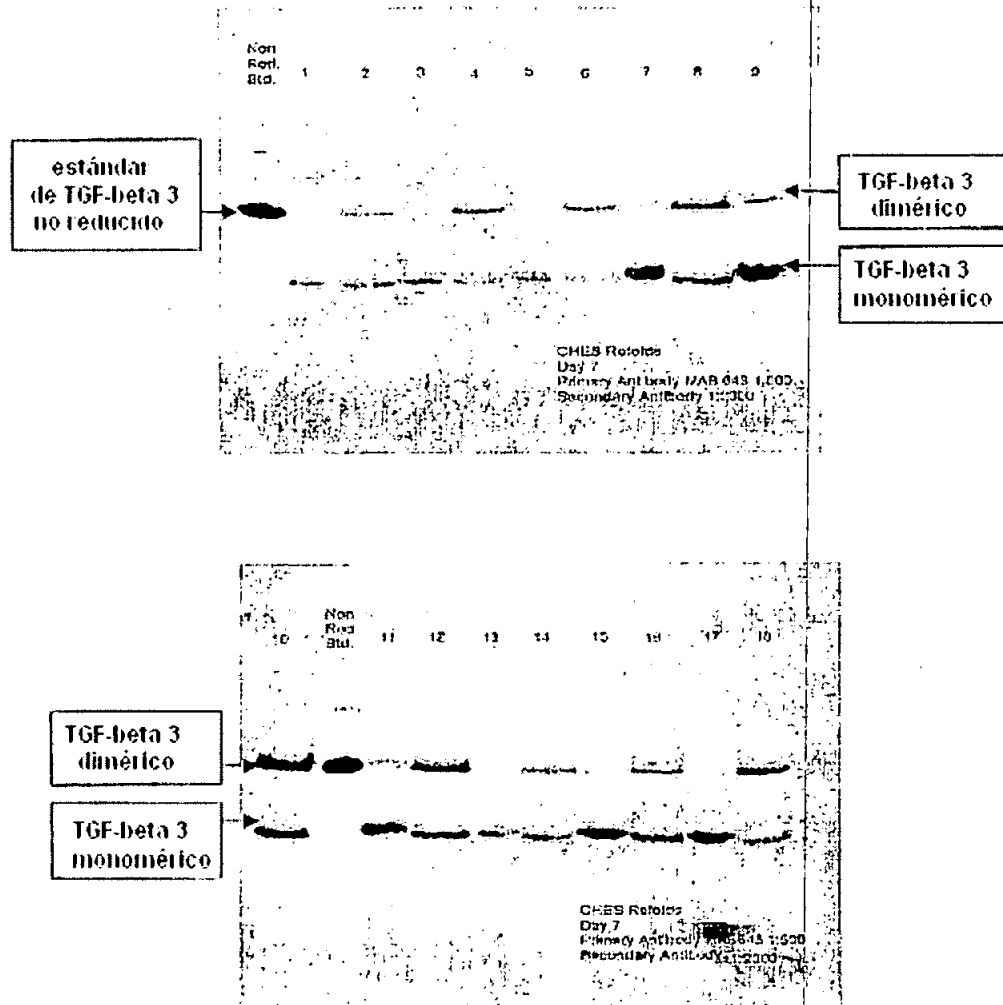
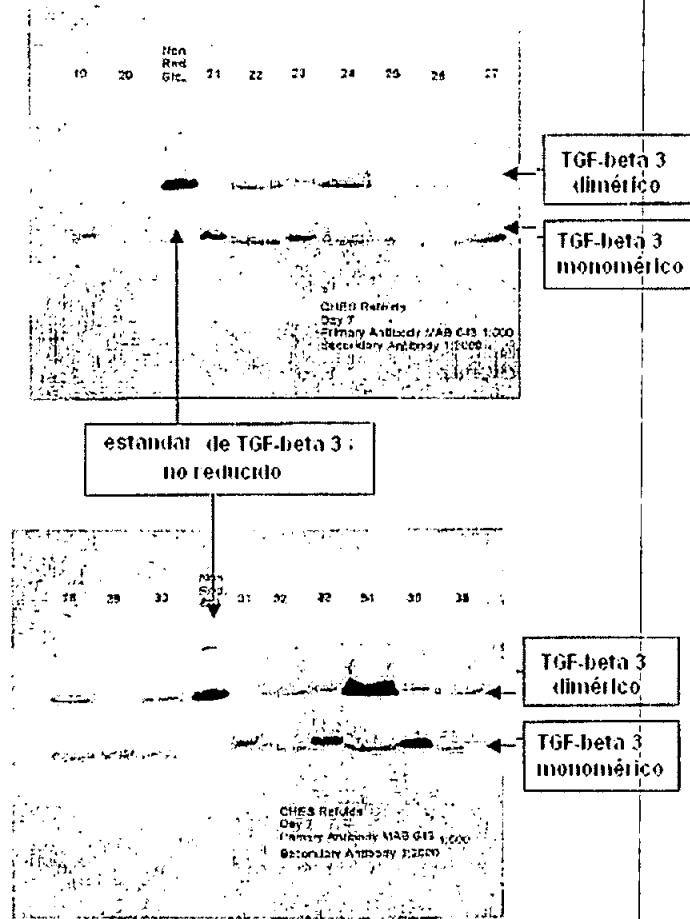
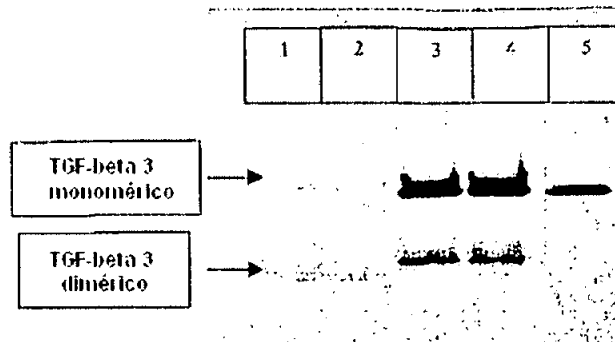


FIG 4



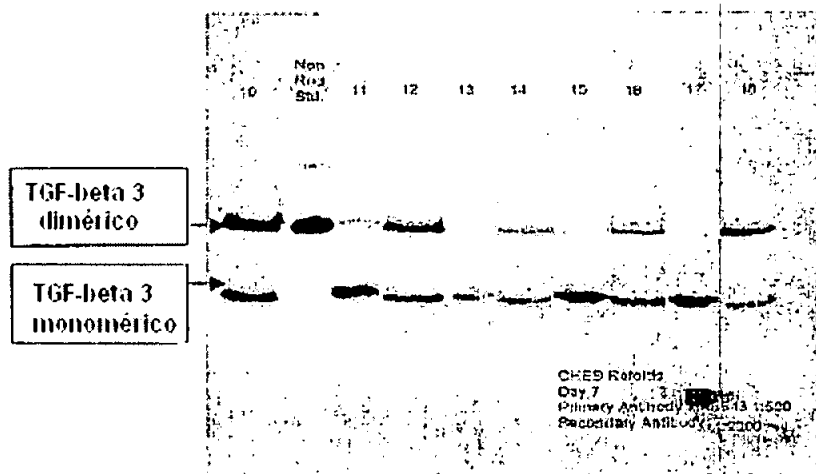
66

FIG. 5



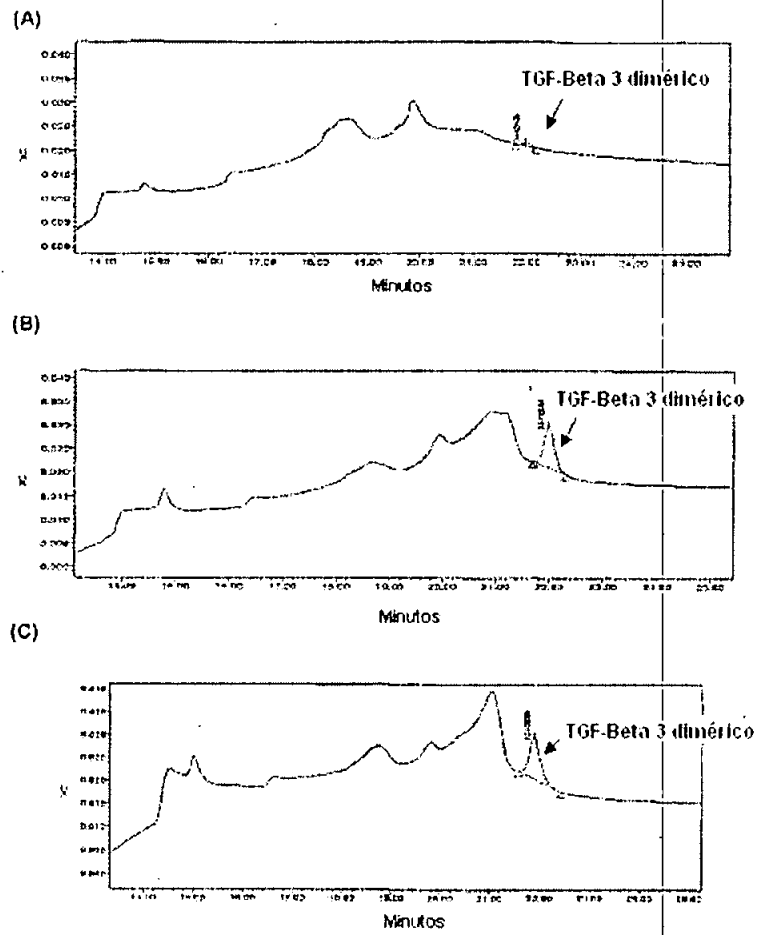
Calle	Muestra
1	Día 0 Replegamiento
2	Día 1 replegamiento
3	Día 2 replegamiento
4	Día 3 replegamiento
5	Estándar de TGF-Beta 3 Standard

FIG 6



Calle	Muestra
1	Día 1 replegamiento
2	Día 2 replegamiento
3	Día 3 replegamiento
4	Día 4 replegamiento
5	Día 7 replegamiento

FIG 7



68

FIG. 8

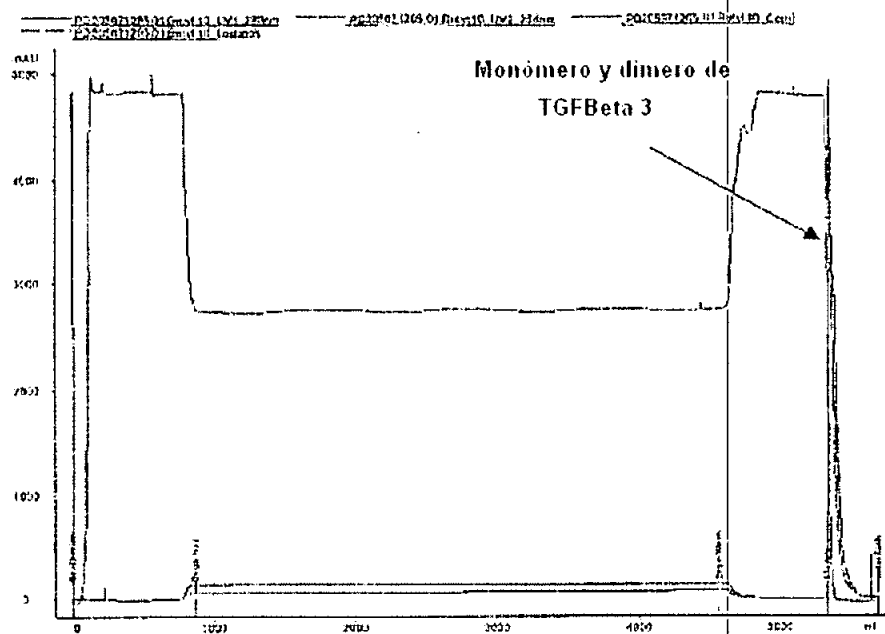
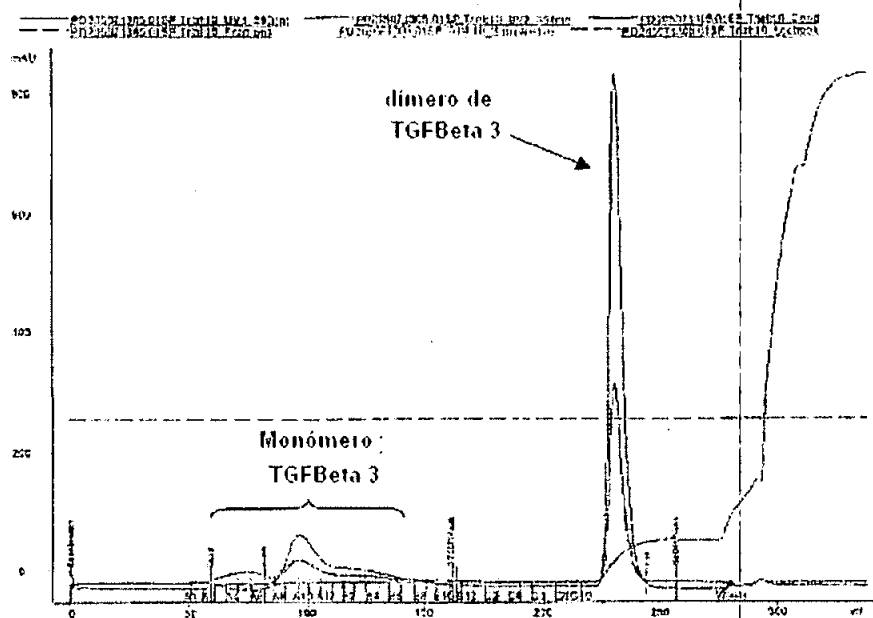


FIG. 9



20

FIG 10

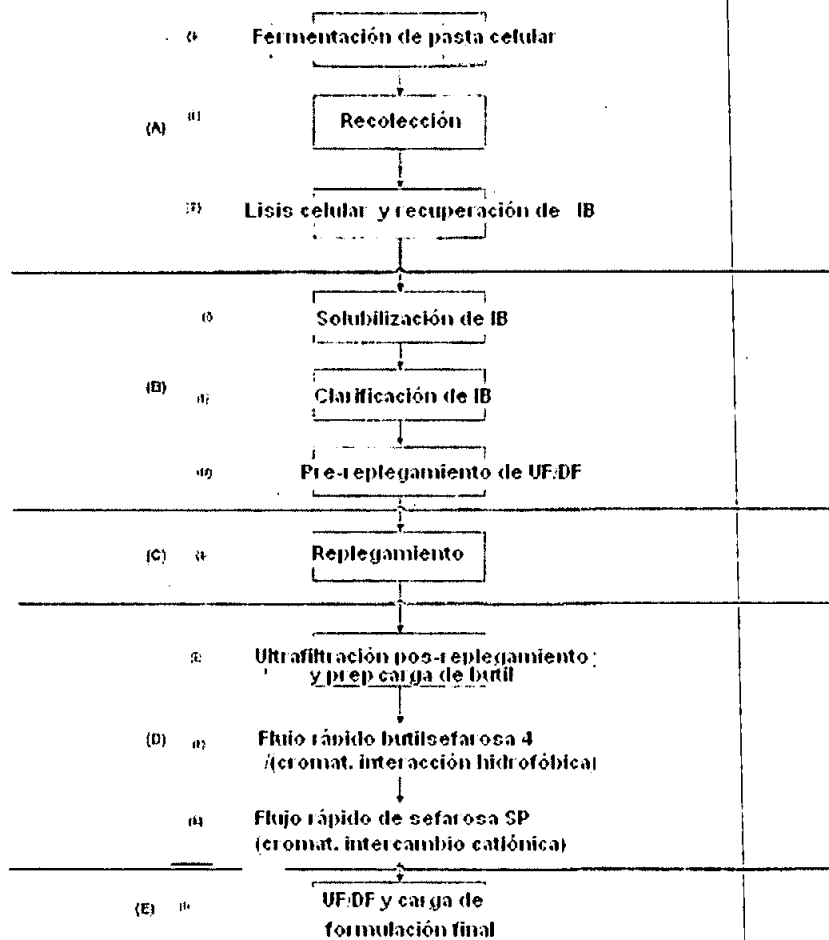


FIGURA 11

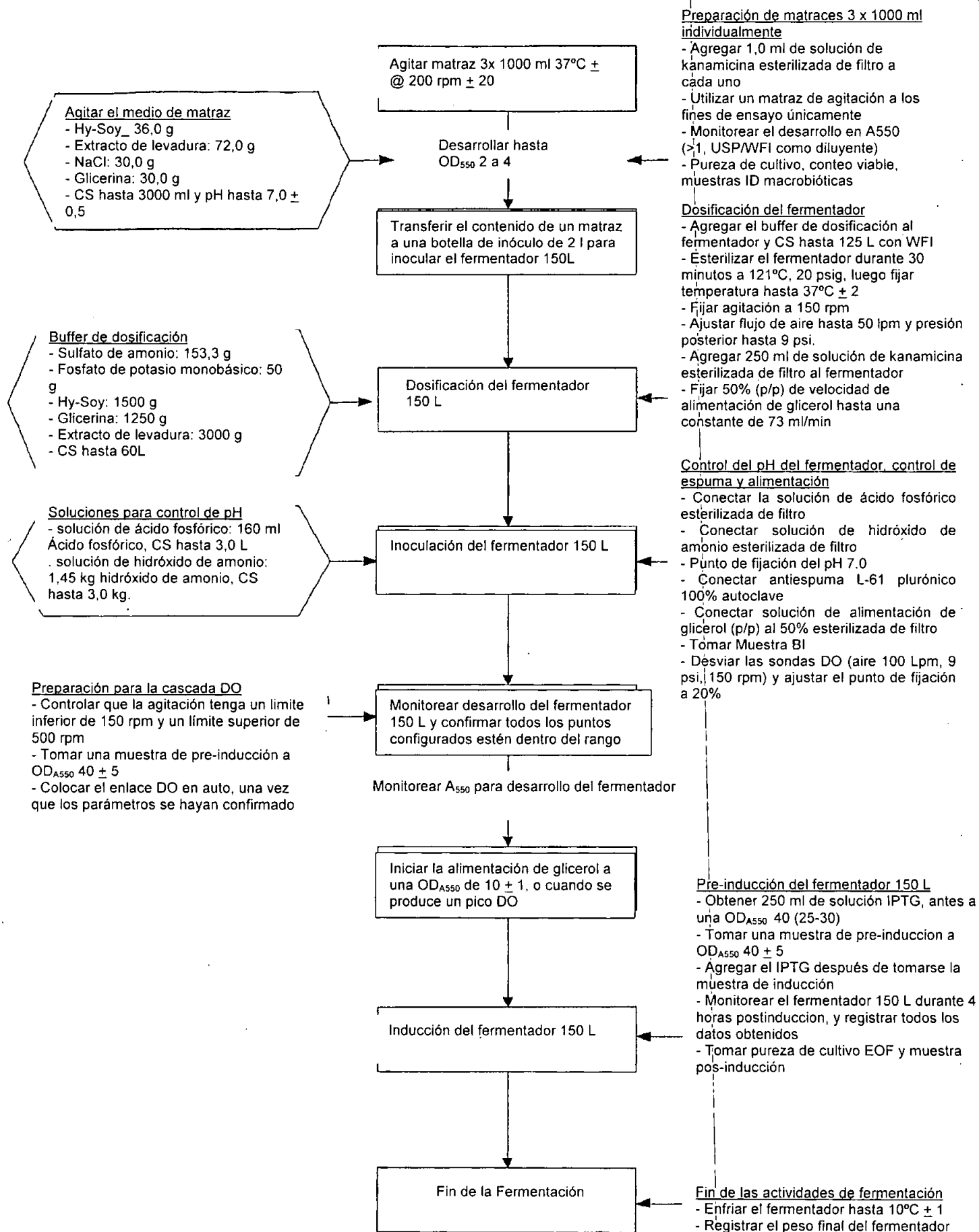
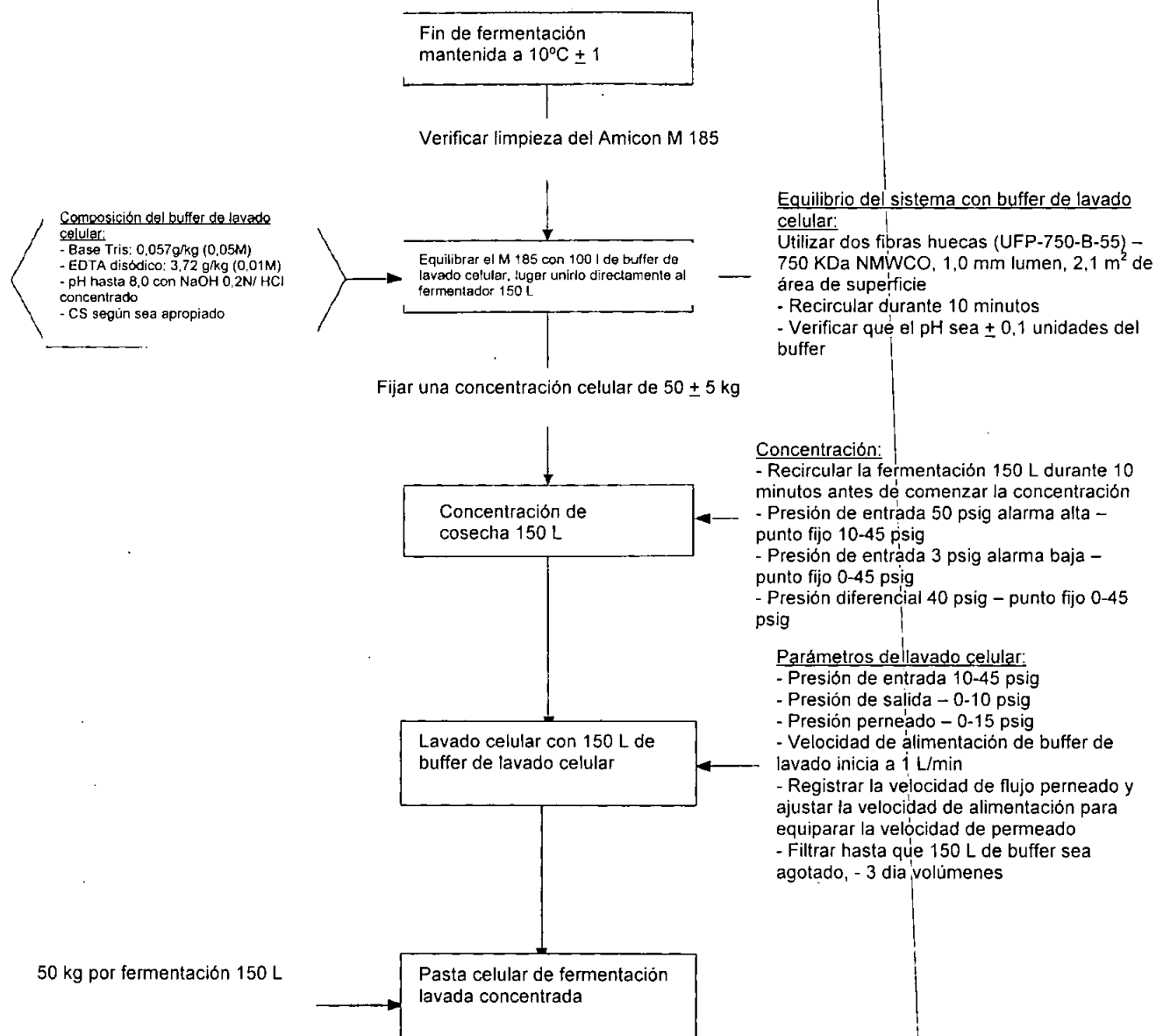
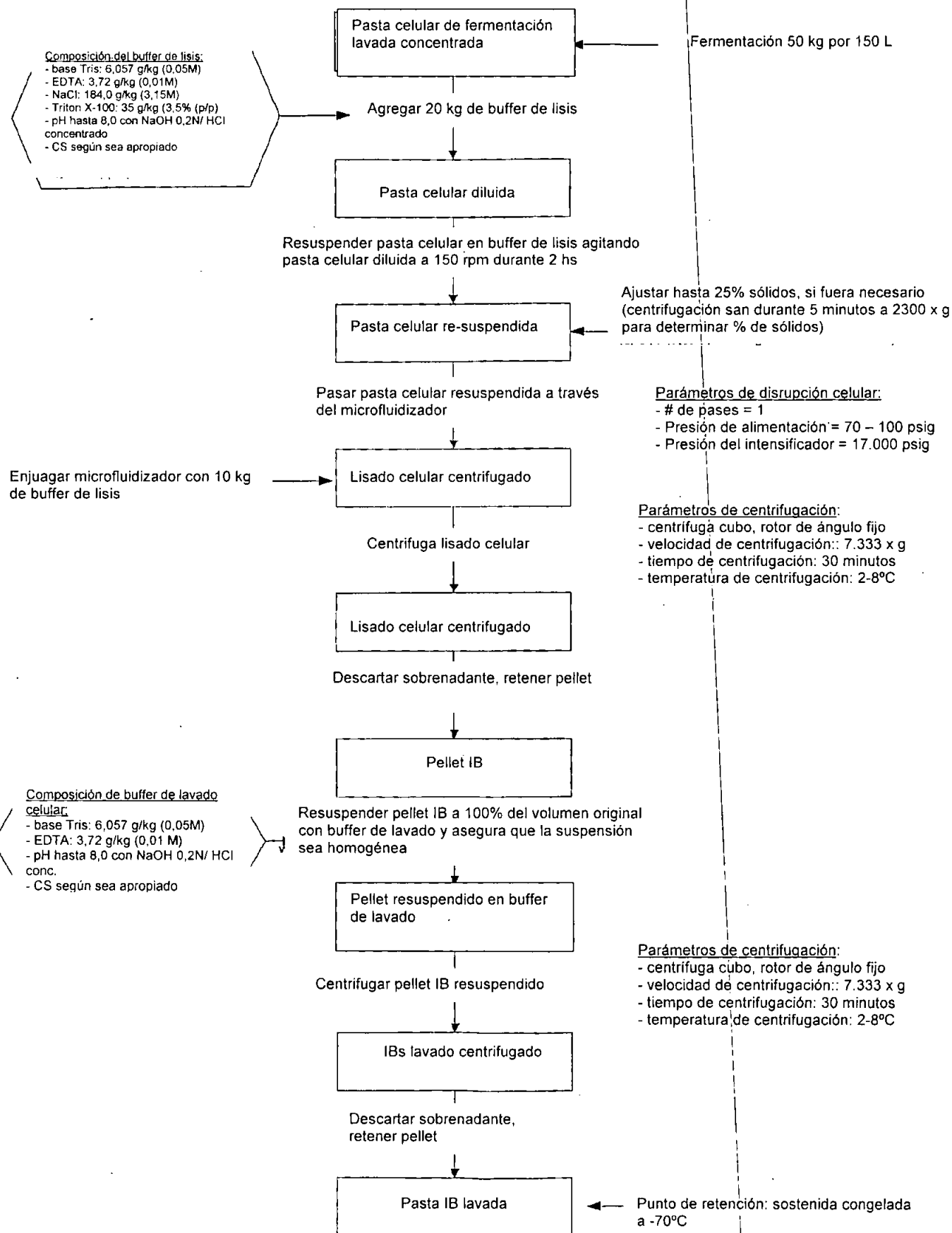


FIGURA 12



73

FIG 13



74

Entrada

FIG 14

Salida

Inclusión de solubilización coporal

Composición buffer de solubilización: 50 kg

- Base Tris: 6,057 g/kg
- Urea: 360,4 g/kg
- pH hasta 8,0 con NaOH 10N/ ácido acético glacial
- CS según sea apropiado

Agregar -DTT: 15,4 g /kg inmediatamente antes del uso
Usar dentro de 12 horas

Parámetros de incubación:

- temperatura ambiente (22-25°C)
- 60 – 75 minutos
- mezclar lentamente en un recipiente cubierto (% de rpm max)
- pH 8,0

Ajuste pH con NaOH 10N y ácido acético glacial

Parámetros de incubación:

- temperatura ambiente (22-25°C)
- 60 – 75 minutos
- mezclar lentamente en un recipiente cubierto (% de rpm max)
- pH 9,5

Pasta IB lavada

Resuspender pellet IB lavada 10 veces con buffer de solubilización agitando a % máximo durante 10 a 15 minutos

Pellet IB resuspendido en buffer de solubilización, y ajustar el pH hasta 8,0

Incubar – 1º paso de solubilización

Resuspender pellet IB en buffer de solubilización, pH 8

Ajustar pH hasta $9,5 \pm 0,1$ con NaOH/ácido acético

Resuspender pellet IB en buffer de solubilización, pH 9,5

Incubar – 2º paso de solubilización

Pellet IB solubilizado

5 kg pellet IB resuspendido hasta total de 50 kg

-250 ml de NaOH 10 N utilizado

Muestras:
15 ml CBSB Retener
2 ml SDS-PAGE CB
2 ml Western Blot
15 ml. QC Cliente retener

75

FIG 15

(A)

Lavar membrana UF/DF:
- Lavar con PW USP y limpiar por 05,116, para nuevos filtros, antes del uso

Clarificación membrana TFF:
8 0,5m² Millipore Pellicon 1000 kDa,
Celulosa regenerada, pantalla V (4 m¹) sobre
sistema Millipore Prostack

Lavar membrana con agua DI

Membrana TFF de clarificación lavada

(B)

Lavado de membrana UF/DF:
- Lavar con USP y limpiar por 05,116,
para nuevos filtros, antes del uso

Membrana UF/DF:
8 0,5 m² Millipore Pellicon 5 kDa, celulosa
regenerada, pantalla C (4 m²) sobre sistema
Millipore Prostack

Lavar membrana con agua DI

Membrana UF/DF lavada

FIG. 16 A

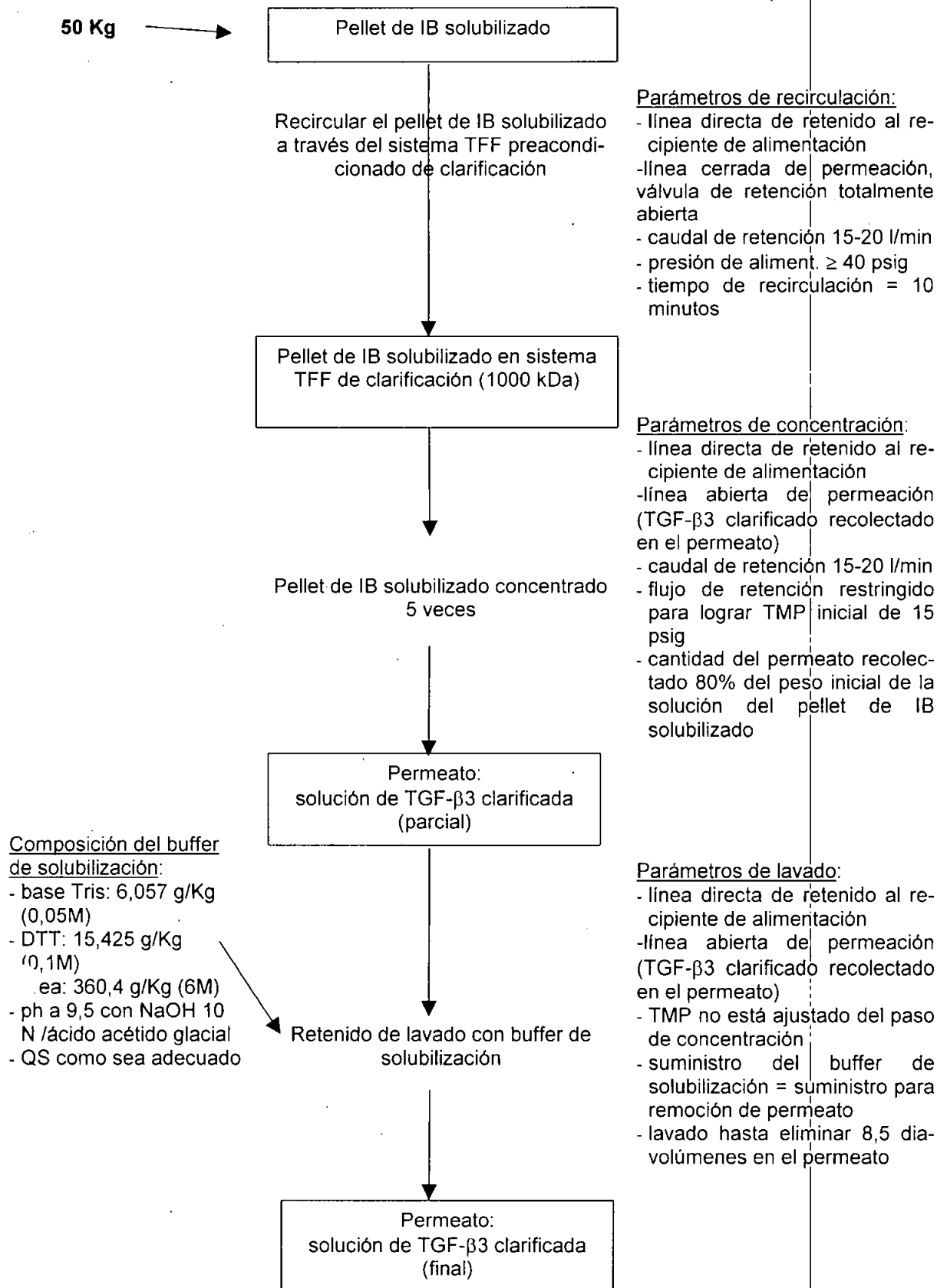


FIG. 16 B

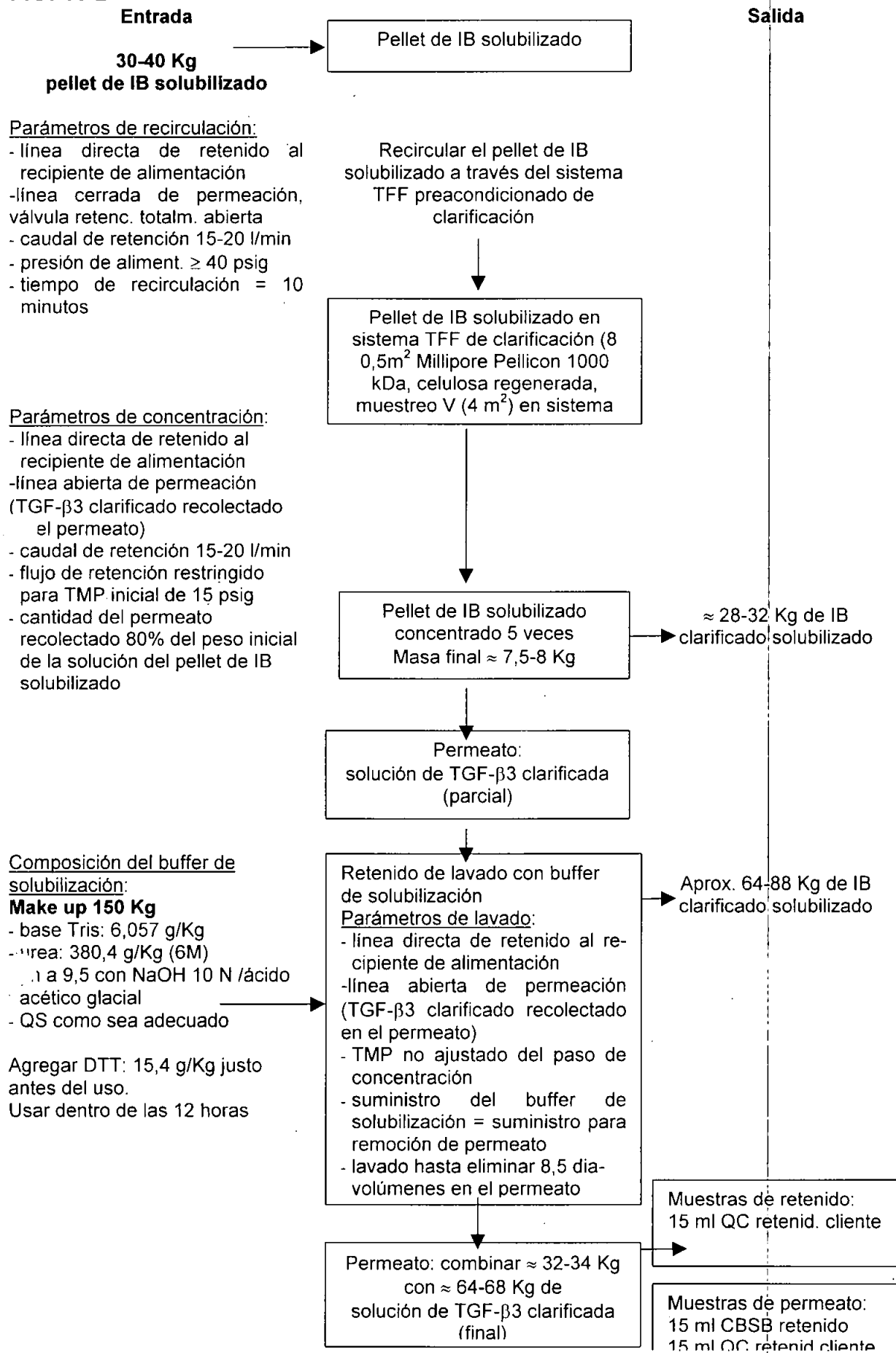
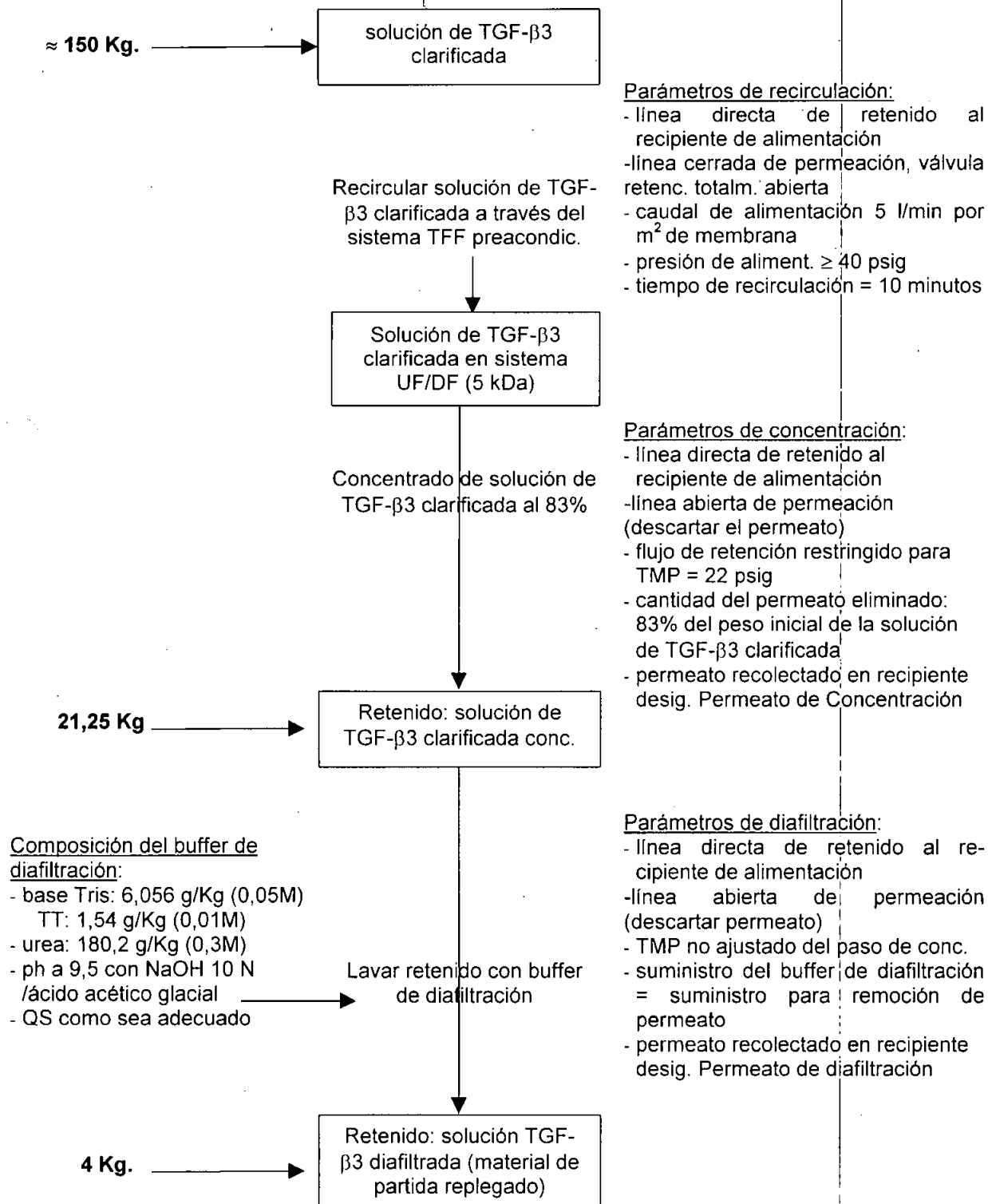
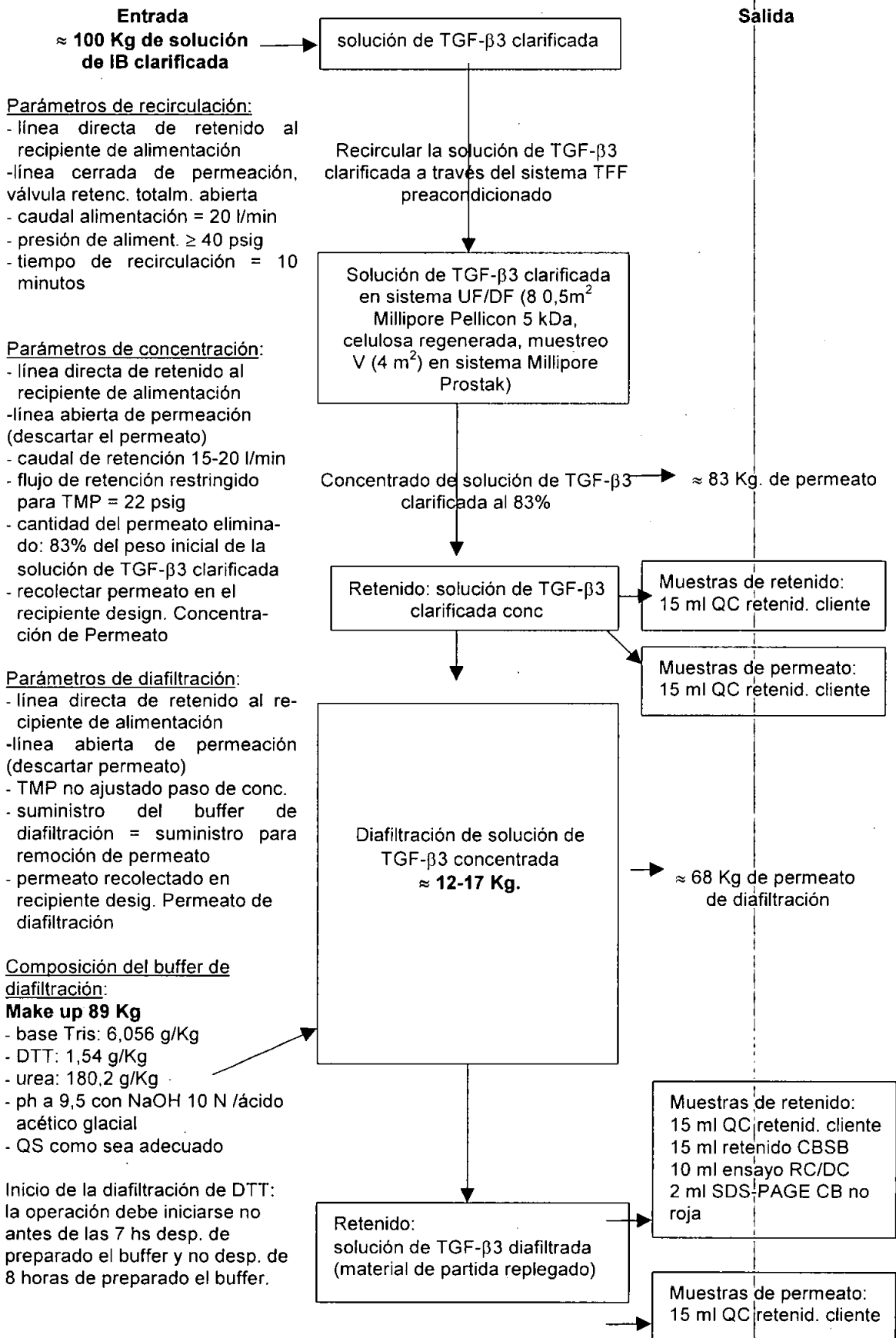


FIG. 17 A



29

FIG. 17 B



80

FIG. 18 A

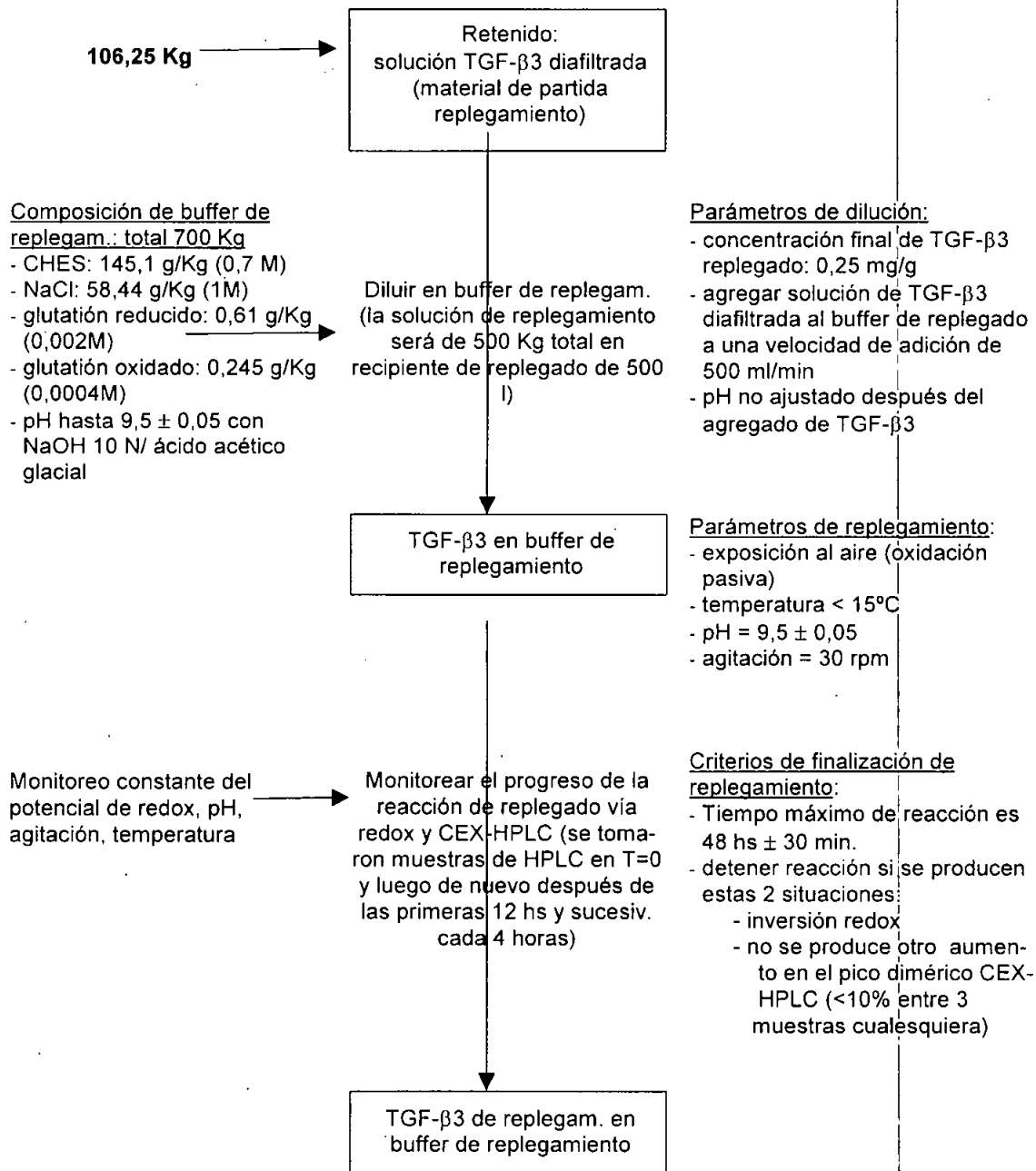


FIG. 18 B

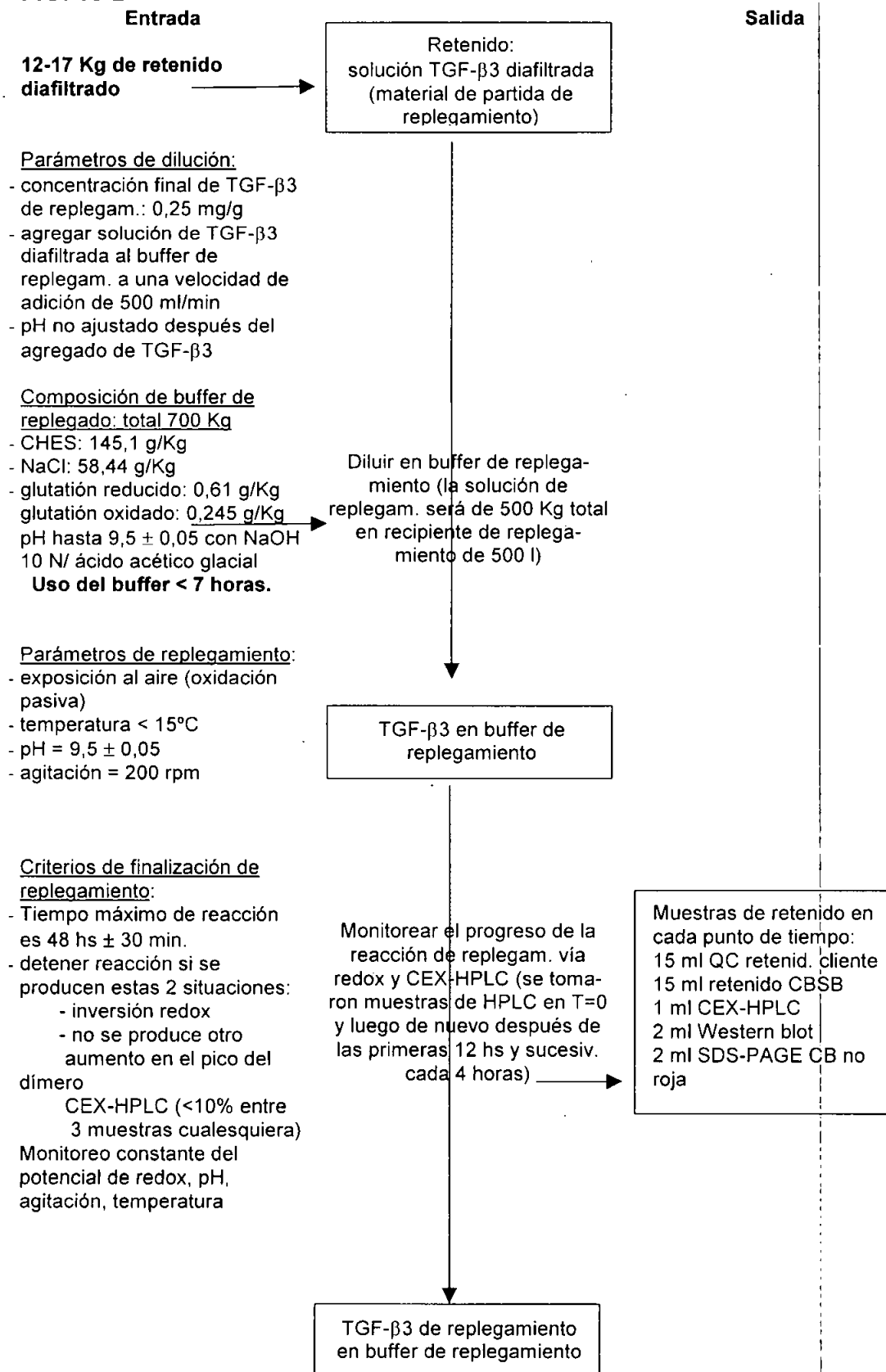
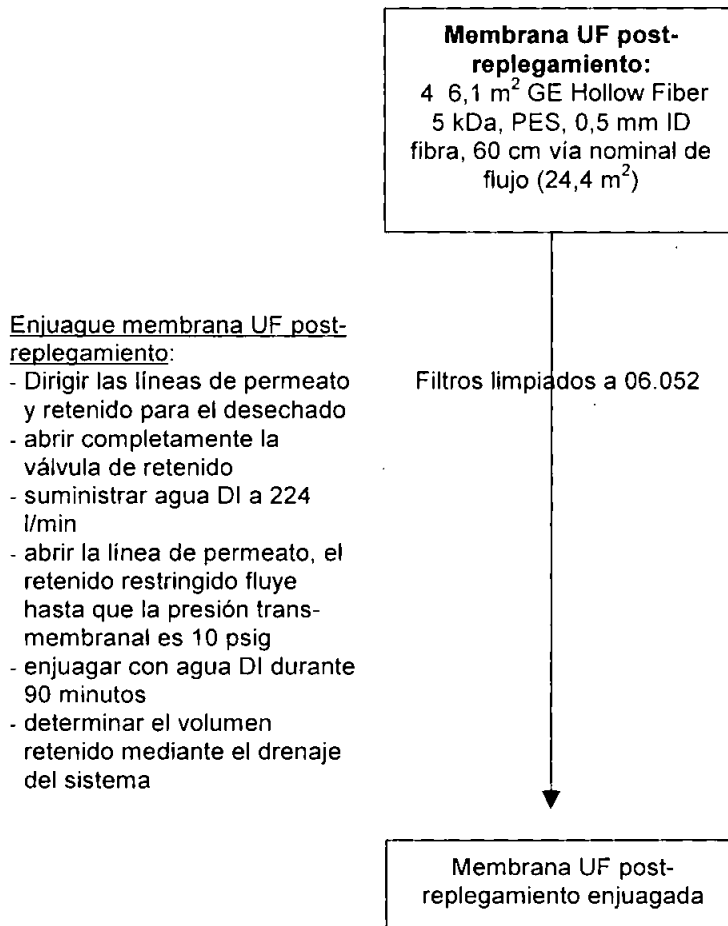


FIG. 19



82

84

FIG 20B

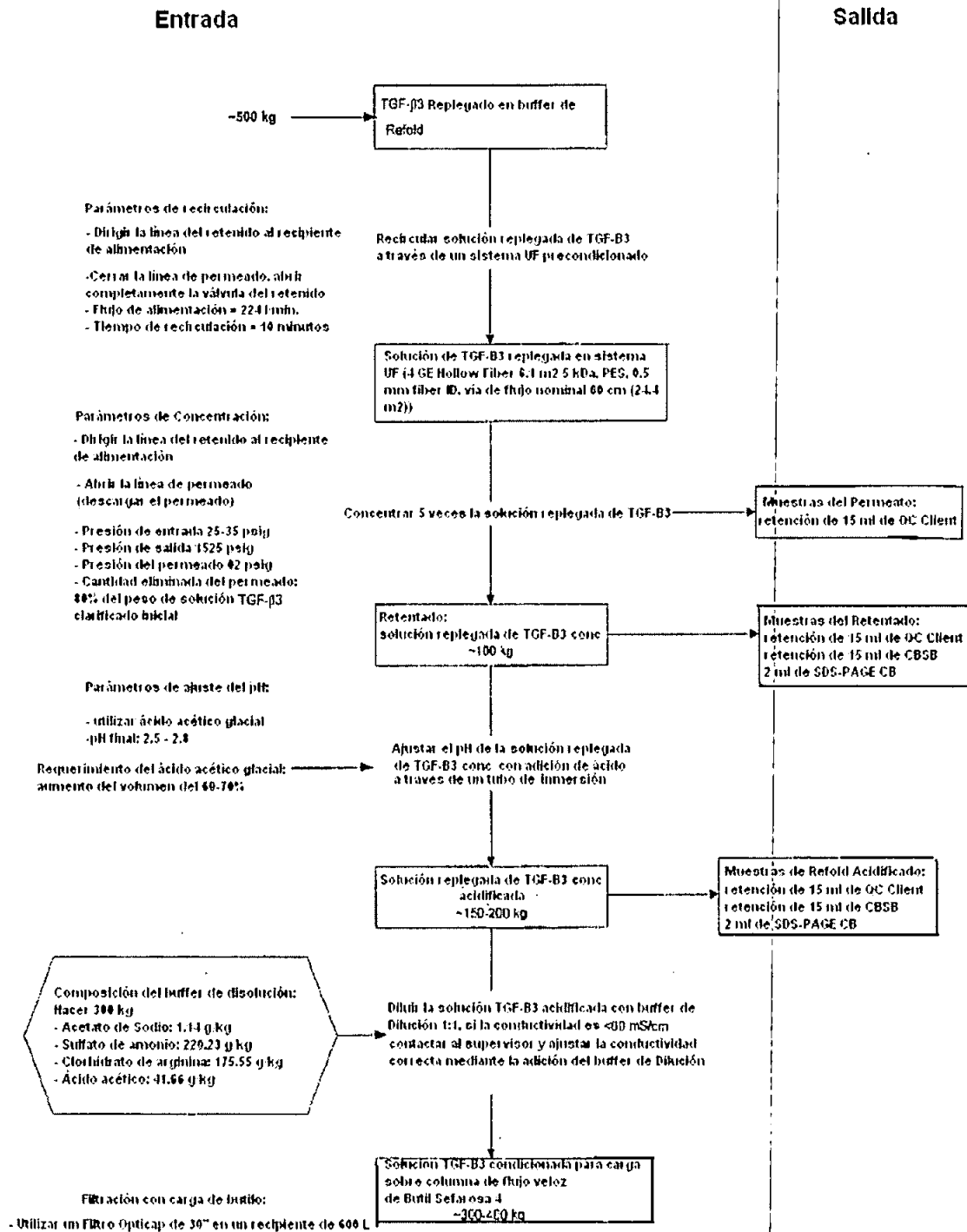


FIG 21A

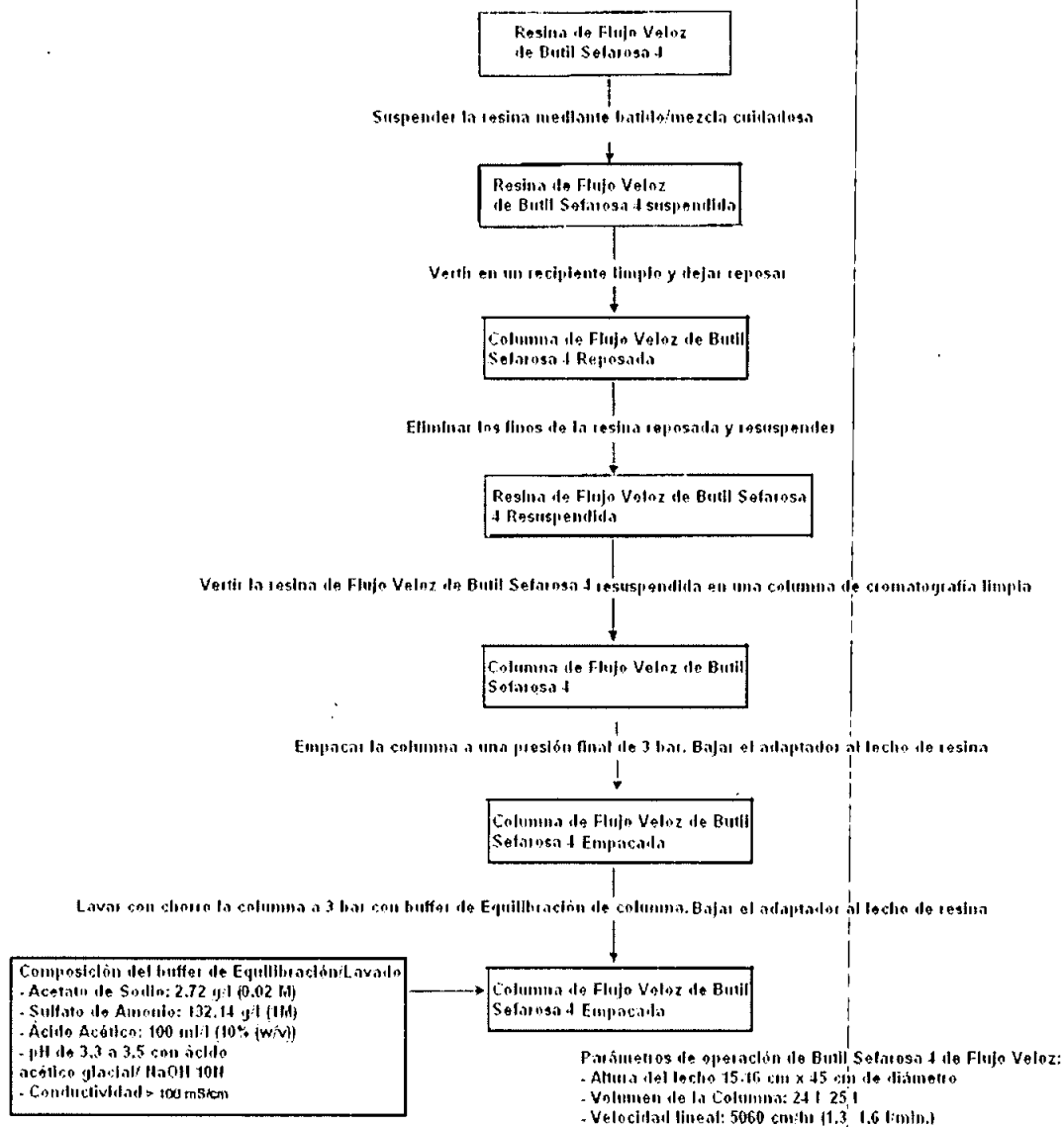
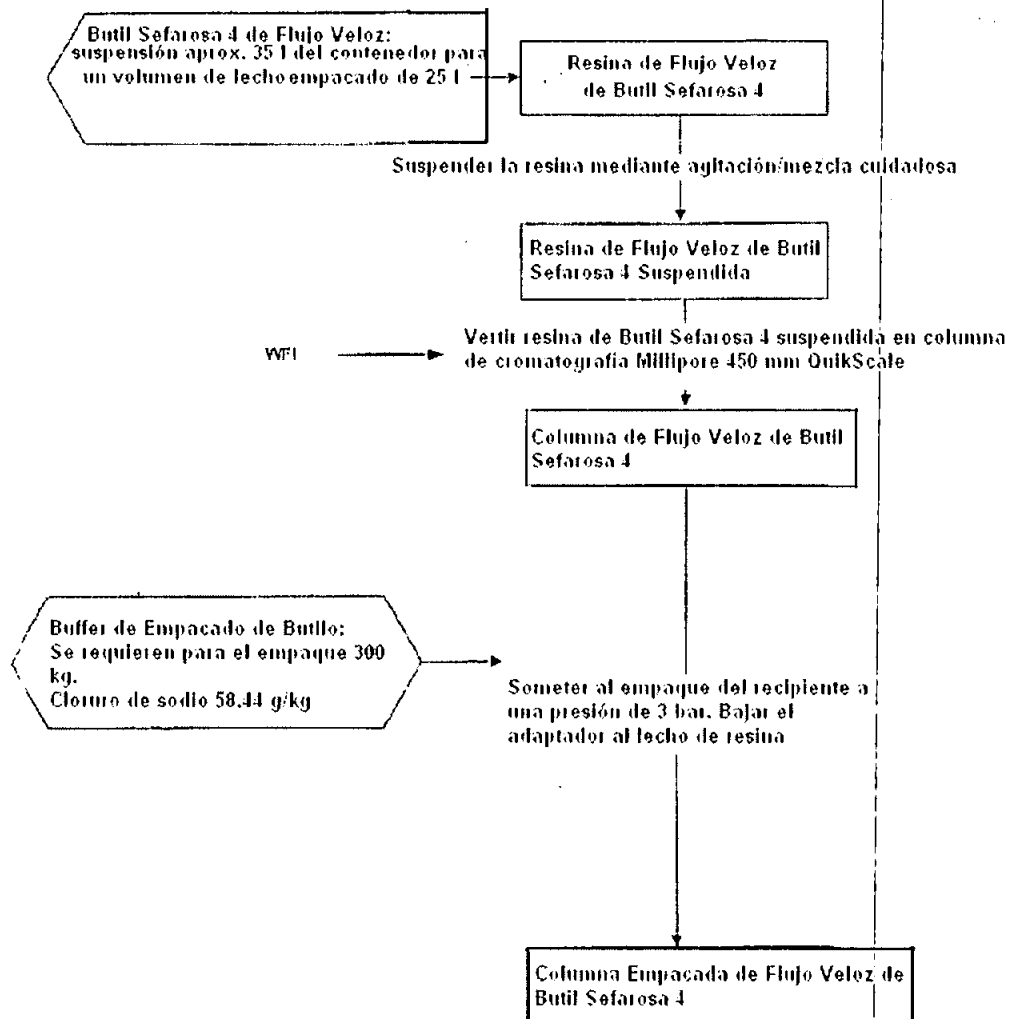


FIG 21B

Entrada

Salida



FIB 21B continuada

82

Entrada

Salida

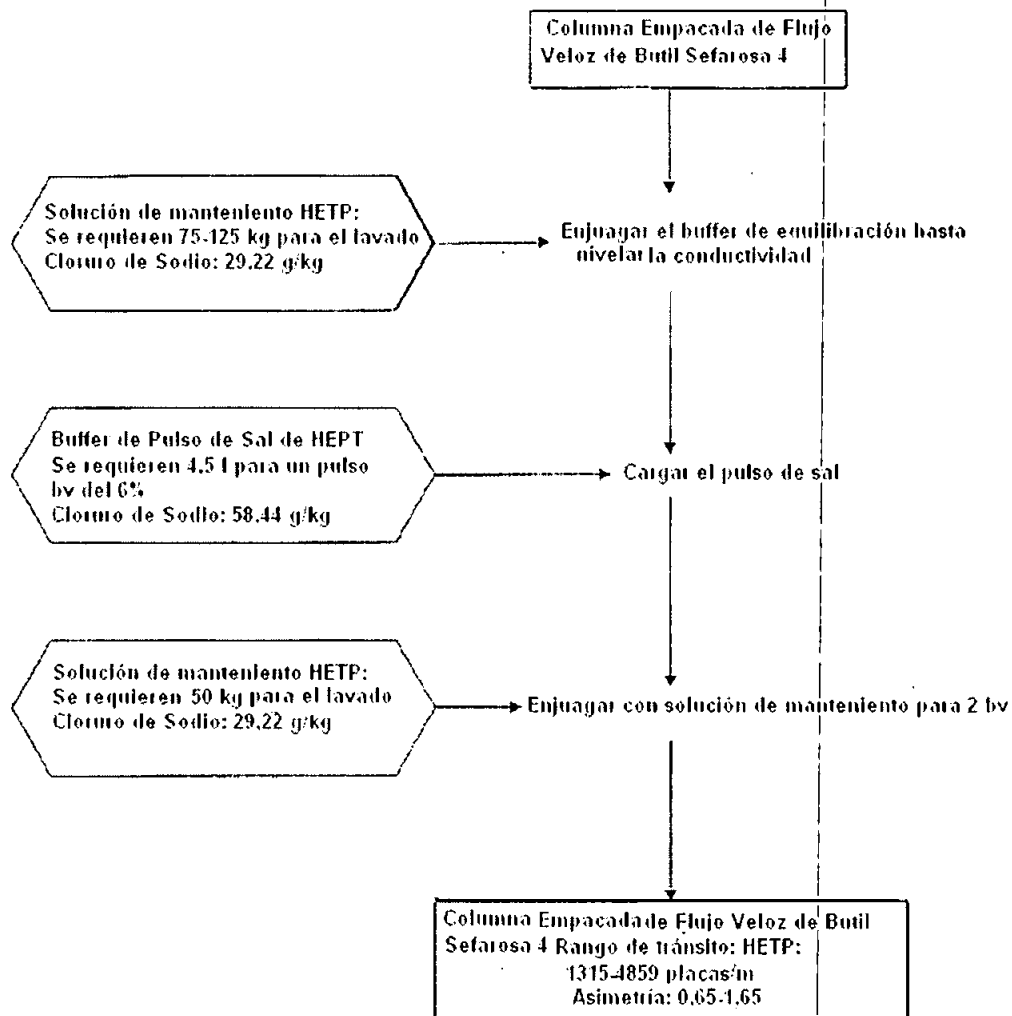


FIG 22A

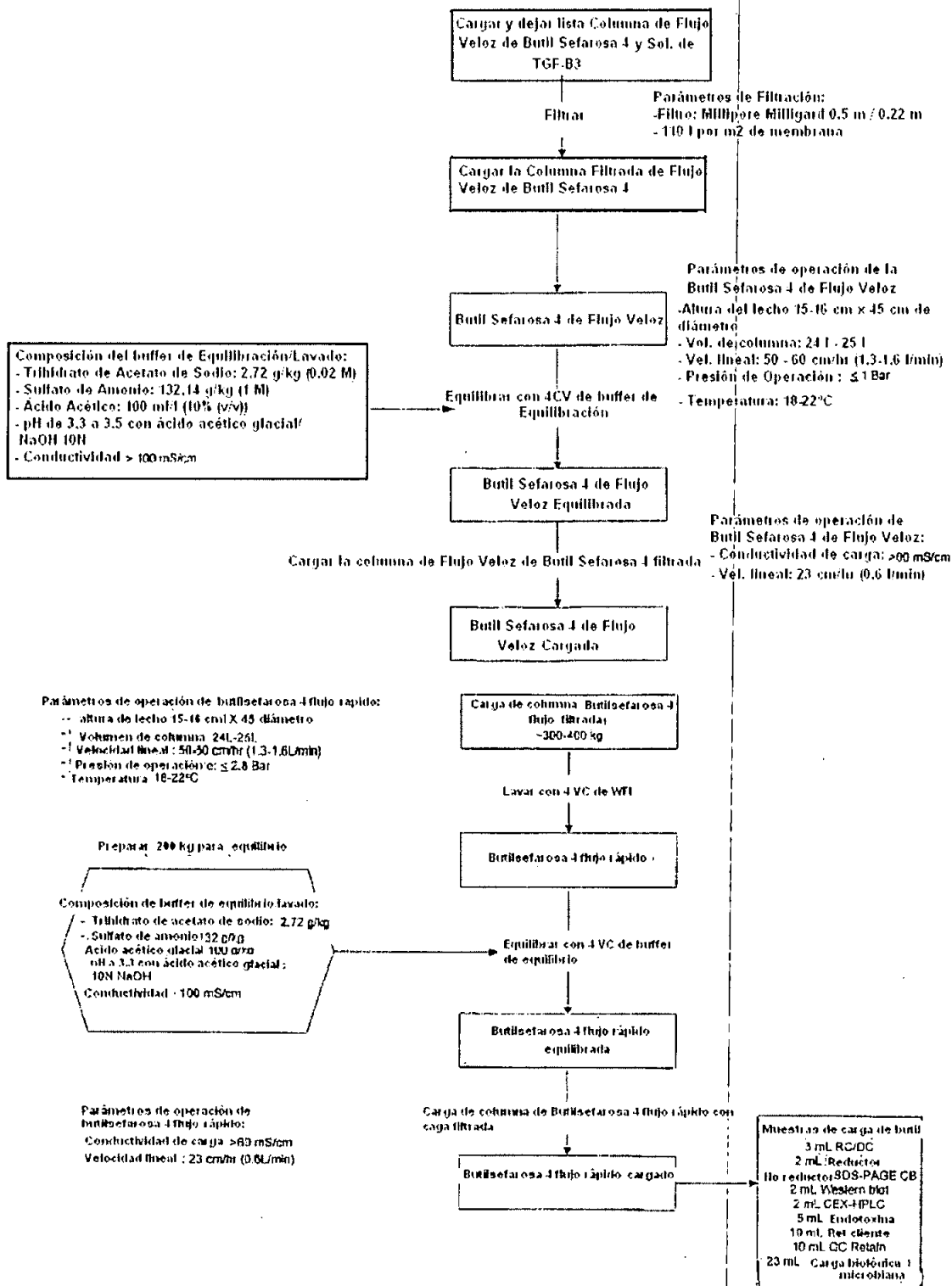


FIGURA 22A continuación

FLUJO DE BULTISEFAROSA 4 FLUJO RÁPIDO (cont)

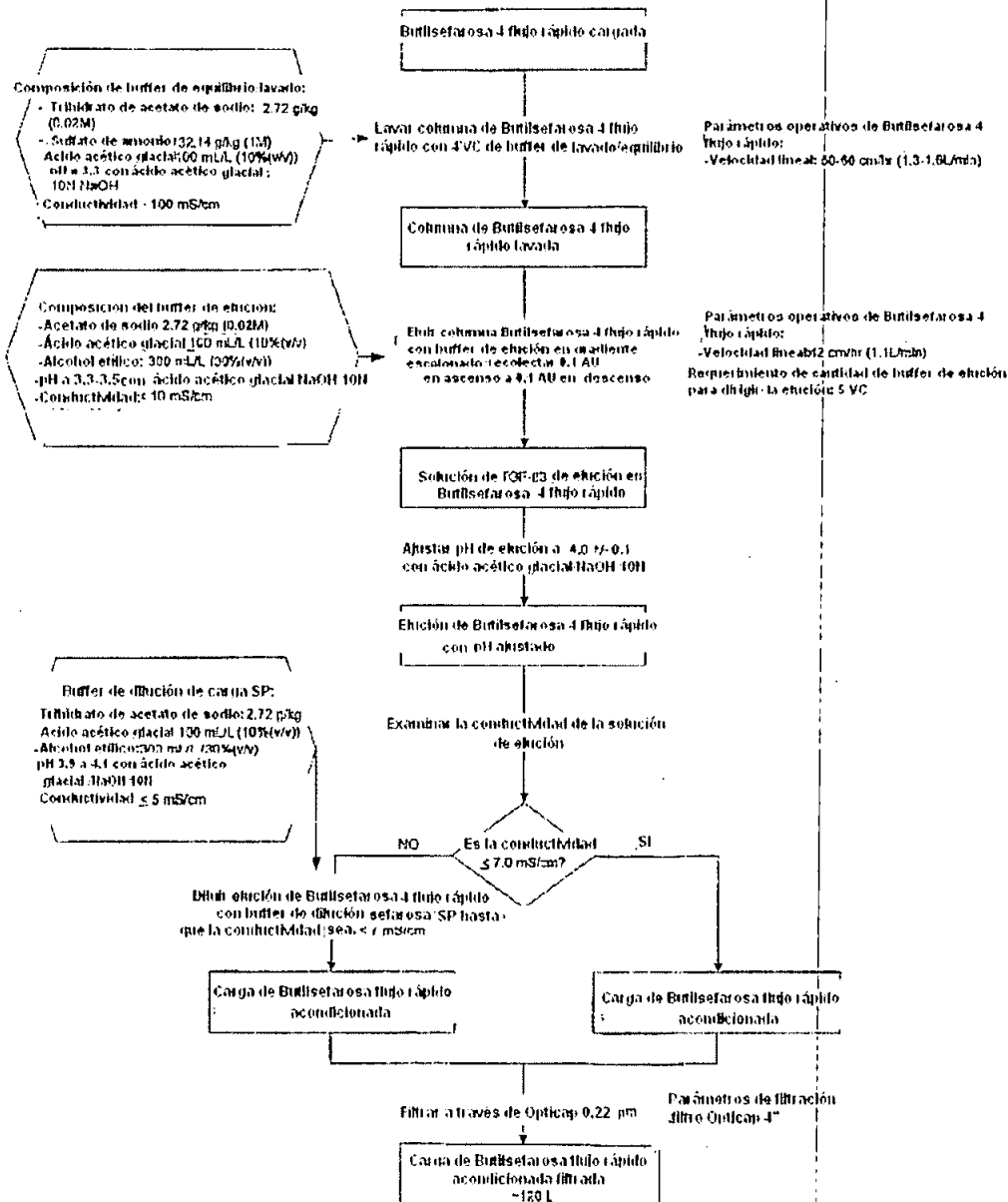


FIGURA 22B

Parámetros de operación de Biotsefaraosa 4 flujo rápido:

- altura de lecho 15-16 cm X 45 diámetro
- Volumen de columna: 241-25L
- Velocidad lineal: 50-30 cm/hr (1.3-1.8 L/min)
- Presión de operación: ≤ 2.8 Bar
- Temperatura: 18-22°C

Preparar 200 kg para equilibrio

Composición de buffer de equilibrio lavado:

- Trifluorato de acetato de sodio: 2.72 g/kg
- Sulfato de amonio: 32 g/kg
- Acido acético glacial 100 g/kg
- pH a 3.3 con ácido acético glacial
- 10N NaOH
- Conductividad: 100 mS/cm

Lavar con 4 VC de WFI

Biotsefaraosa 4 flujo rápido

Equilibrar con 4 VC de buffer de equilibrio

Biotsefaraosa 4 flujo rápido equilibrada

Carga de columna de Biotsefaraosa 4 flujo rápido con carga filtrada

Biotsefaraosa 4 flujo rápido cargado

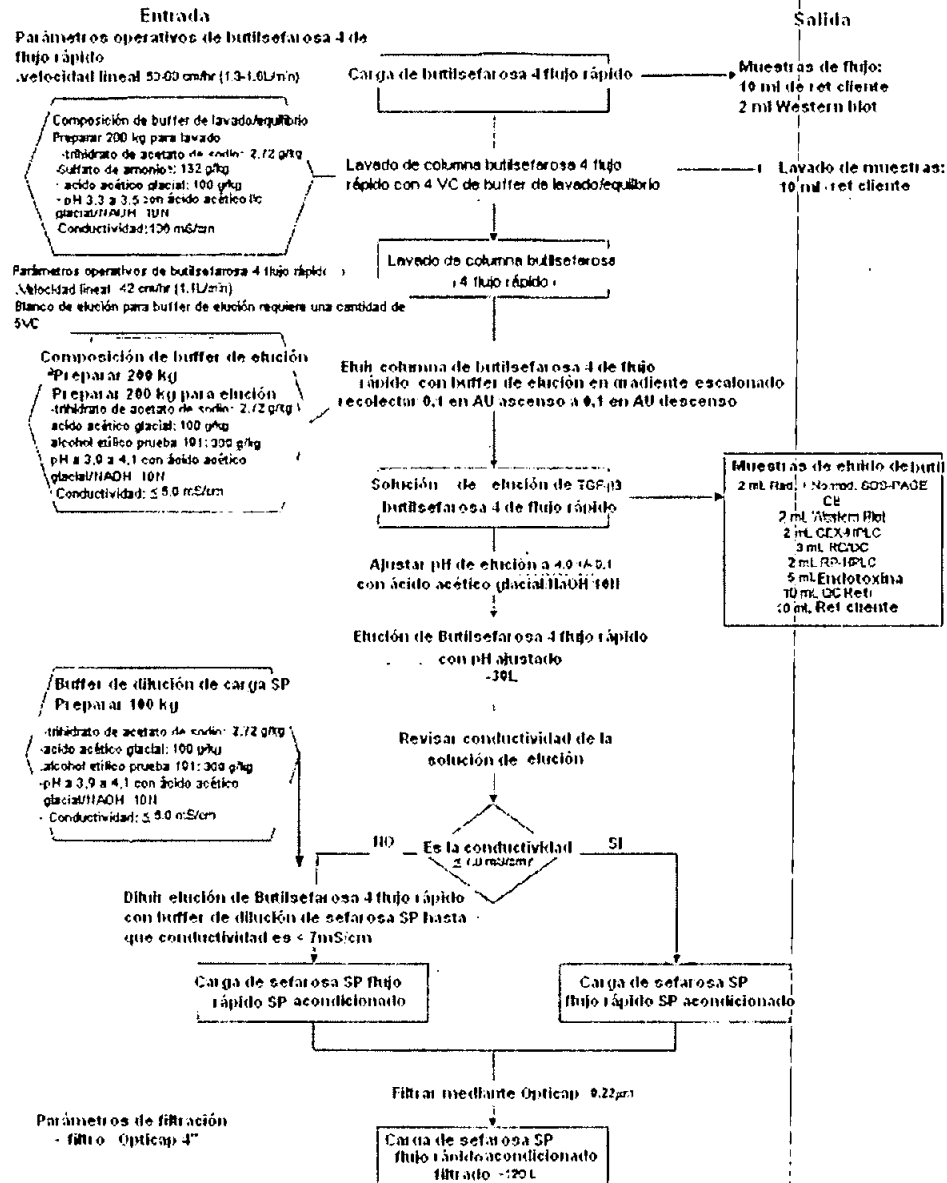
Parámetros de operación de Biotsefaraosa 4 flujo rápido:

- Conductividad de carga: >60 mS/cm
- Velocidad lineal: 23 cm/hr (0.6 L/min)

Muestras de carga de Biotsefaraosa 4 flujo rápido:

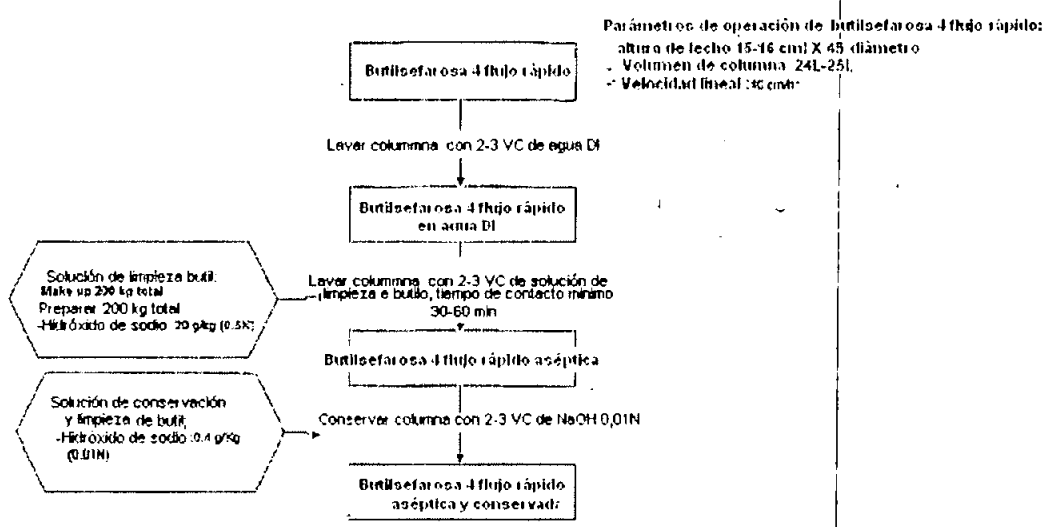
- 3 mL RC/DC
- 2 mL Reductor
- 10 mL reductor SDS-PAGE CB
- 2 mL Western blot
- 2 mL CEX-HPLC
- 5 mL Endotoxina
- 10 mL Ret cliente
- 10 mL CC Retain
- 23 mL Carga Biotsefaraosa 4 flujo rápido

FIGURA 22B continuación



92

FIGURA 23 A Limpieza pos-uso de Butilsefarosa 4 de flujo rápido



Limpieza pre-uso/regeneración de Butilsefarosa 4 de flujo rápido

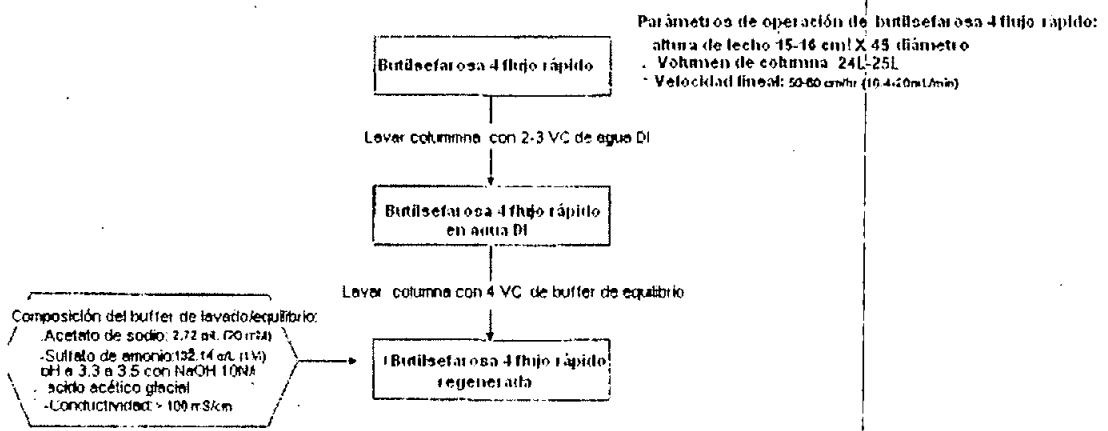


FIGURA 23B Limpieza preuso de butilsefarosa 4 flujo rápido

93

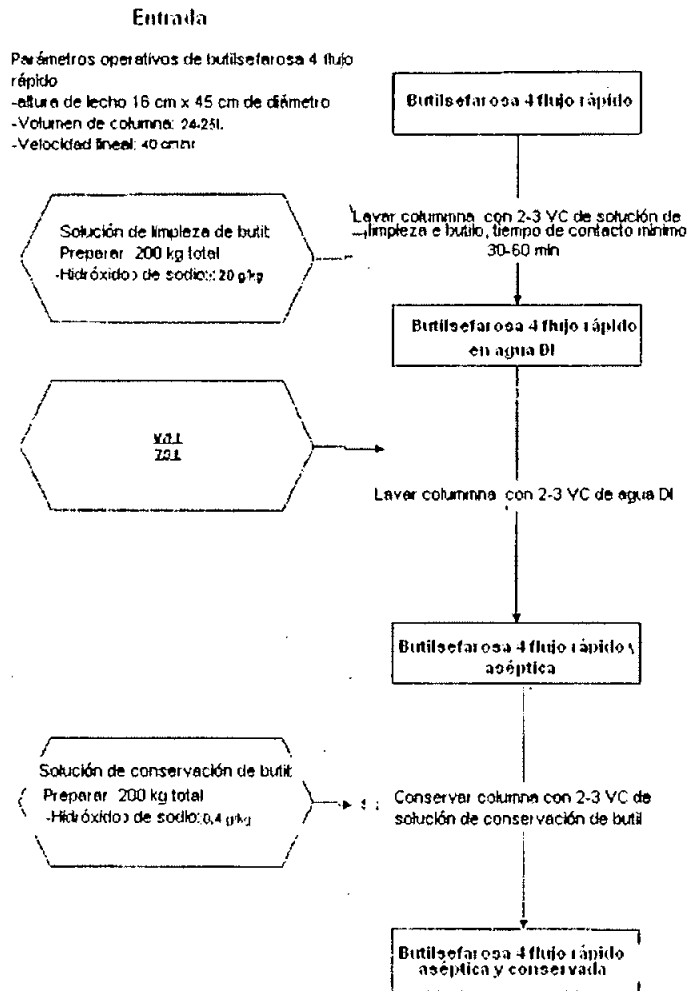


FIGURA 24

94

Entrada

Parámetros operativos de sefarosa SP
flujo rápido:
- altura de lecho 10-11 cm x diámetro 30cm
- Volumen de columna: 1.1-7.8L
- Velocidad lineal: 10 cm/hr (471 mL/min)

Salida

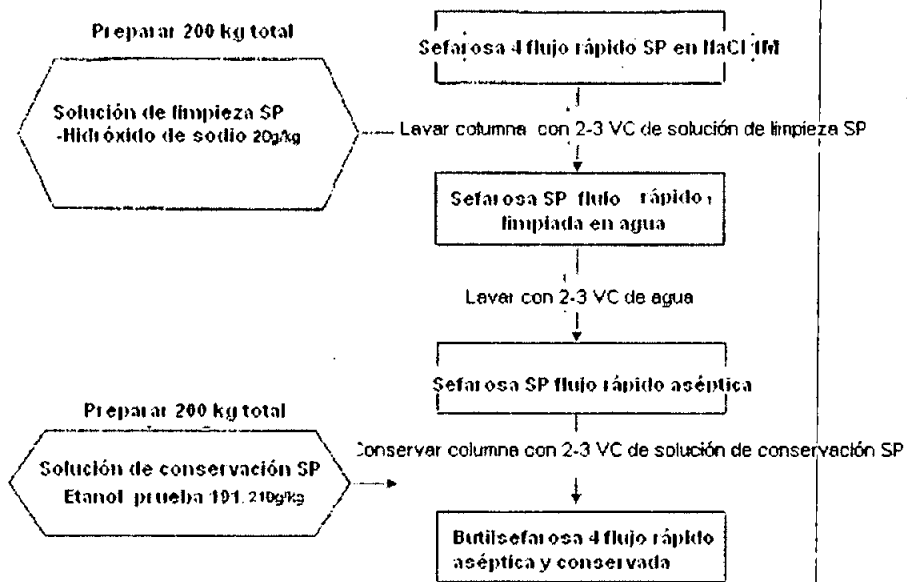


FIGURA 25

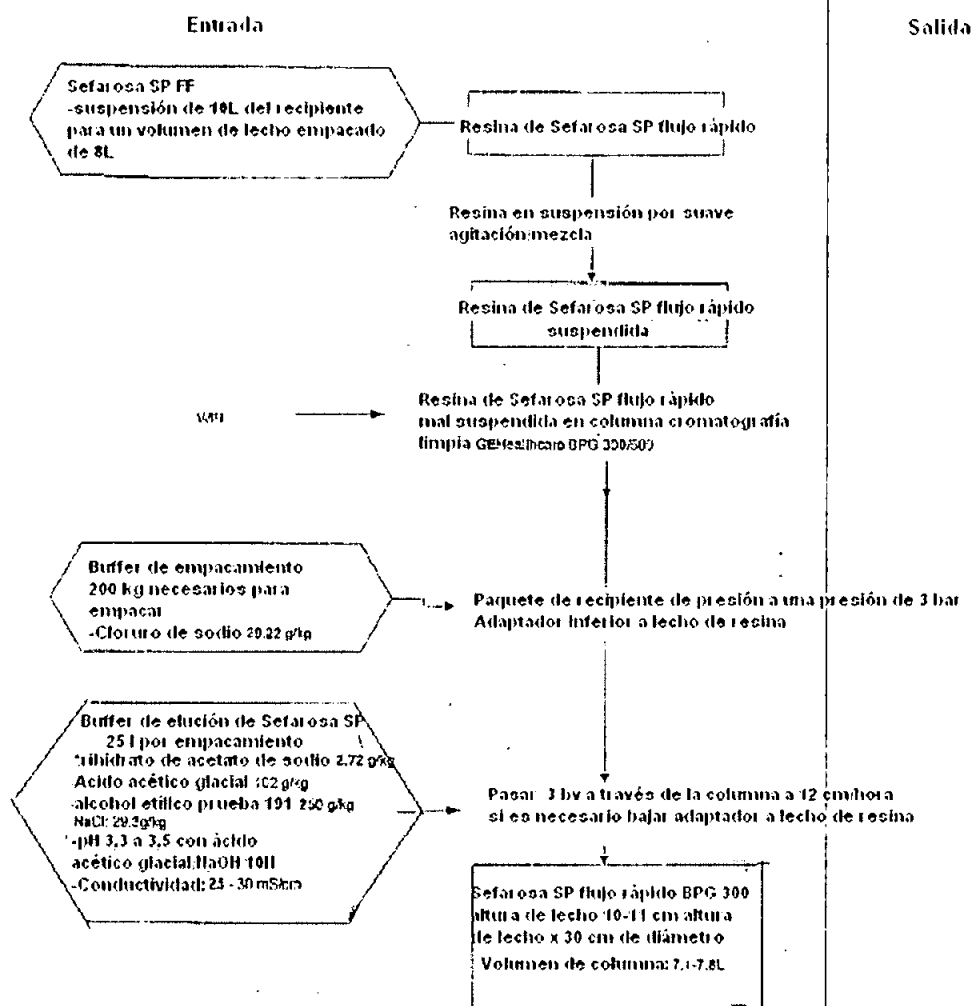


FIGURA 25 continuación

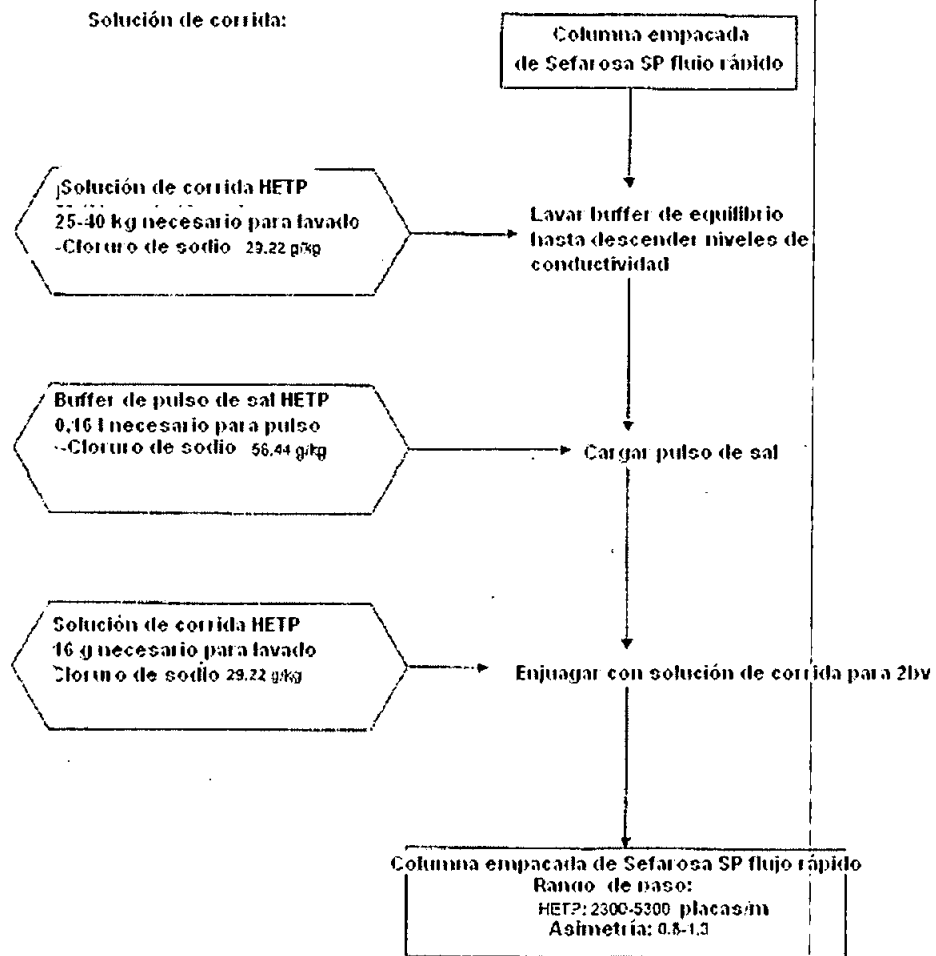


FIGURA 26A

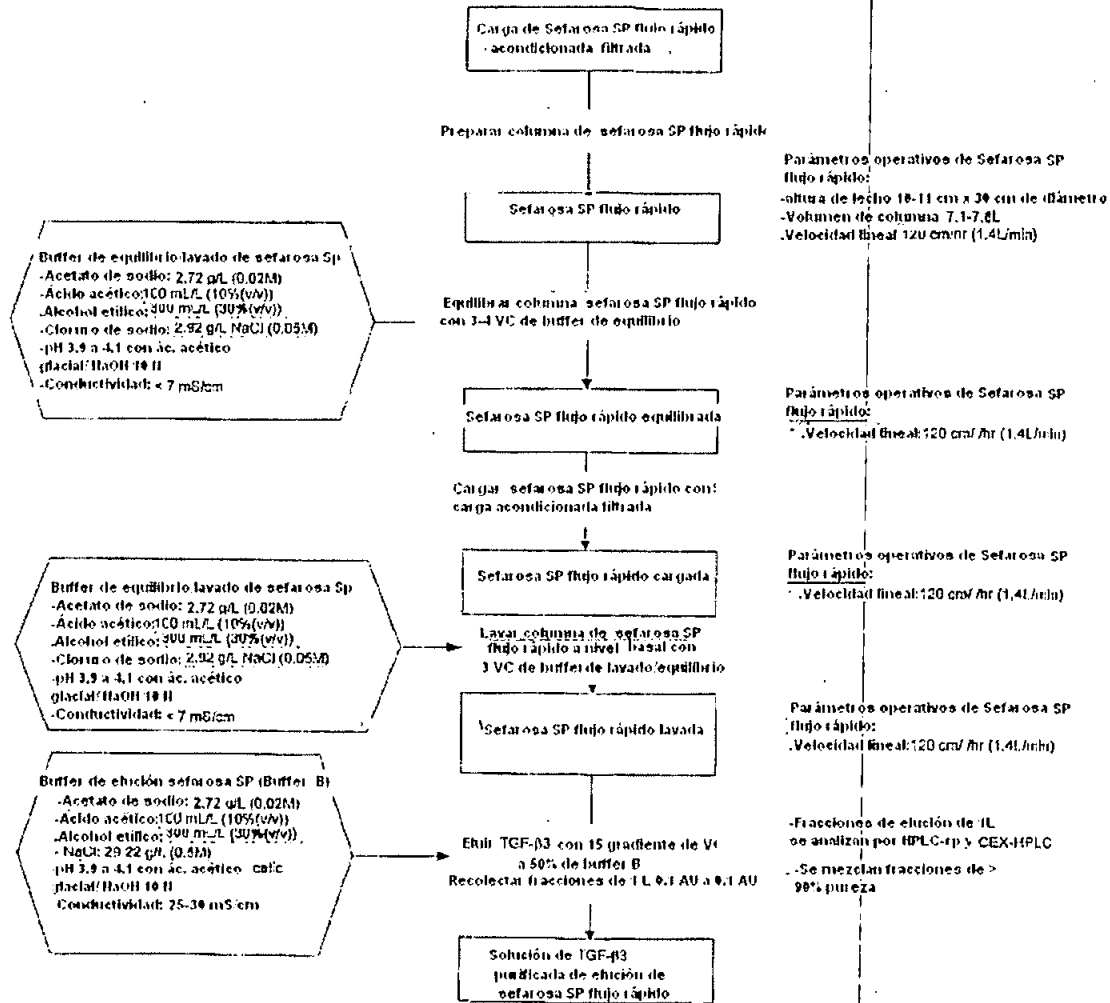
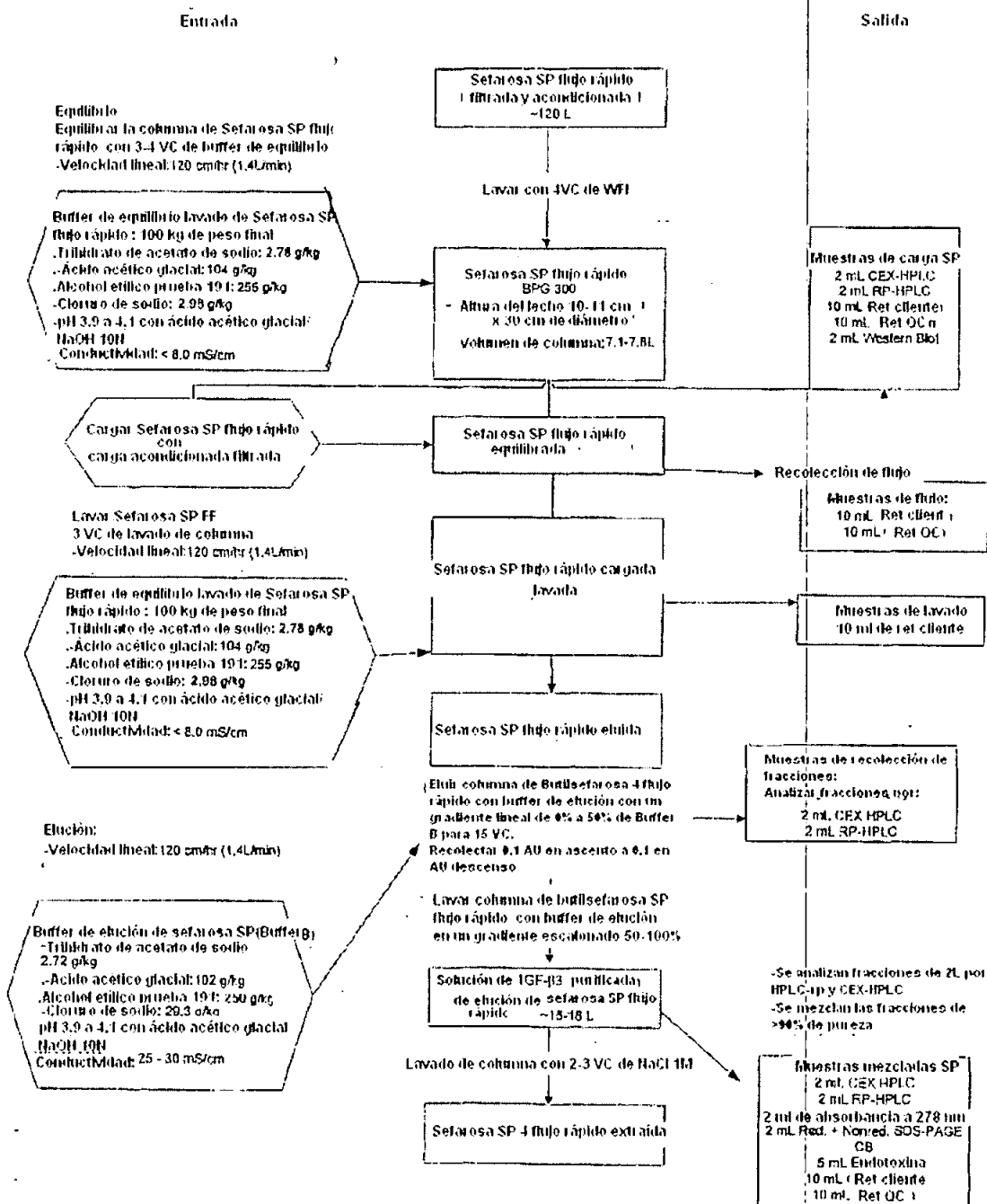
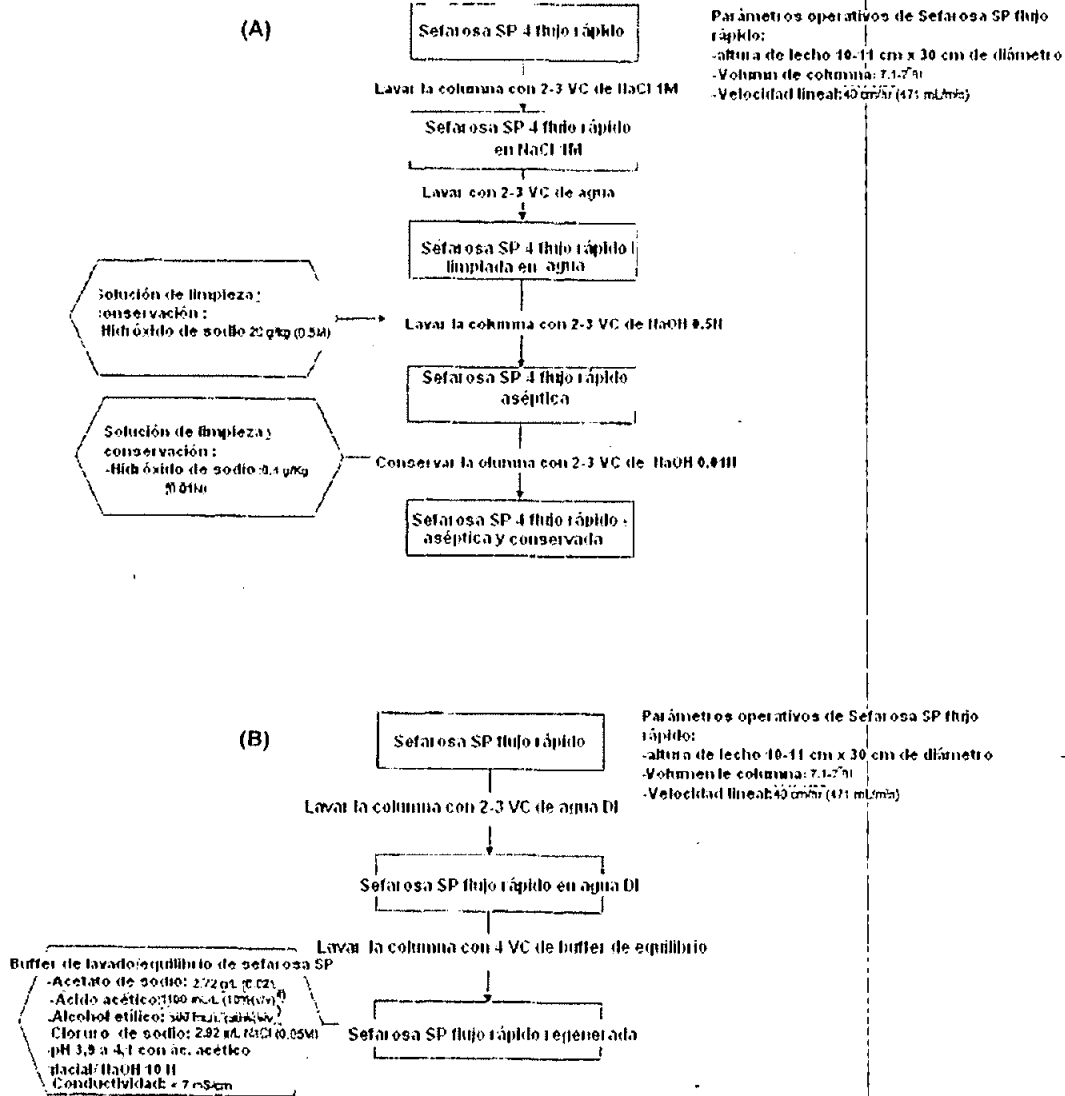


FIGURA 26B



98

FIGURA 27



100

FIGURA 28A

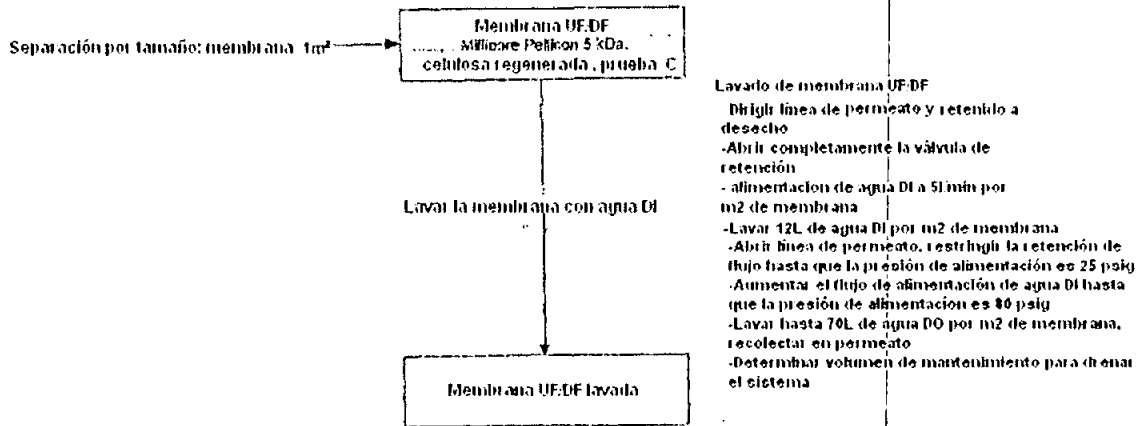


FIGURA 28B

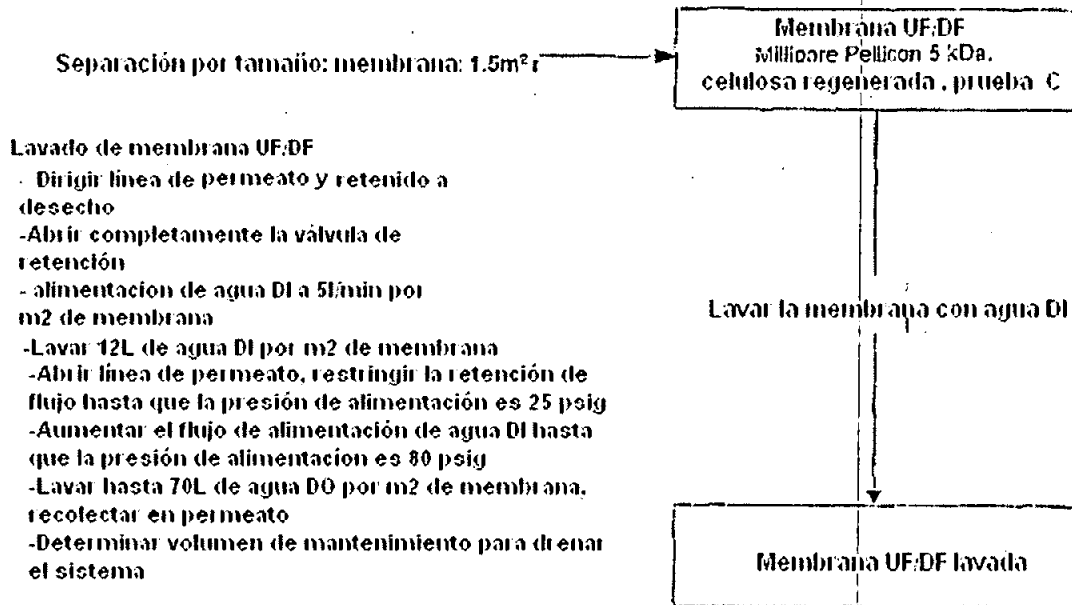
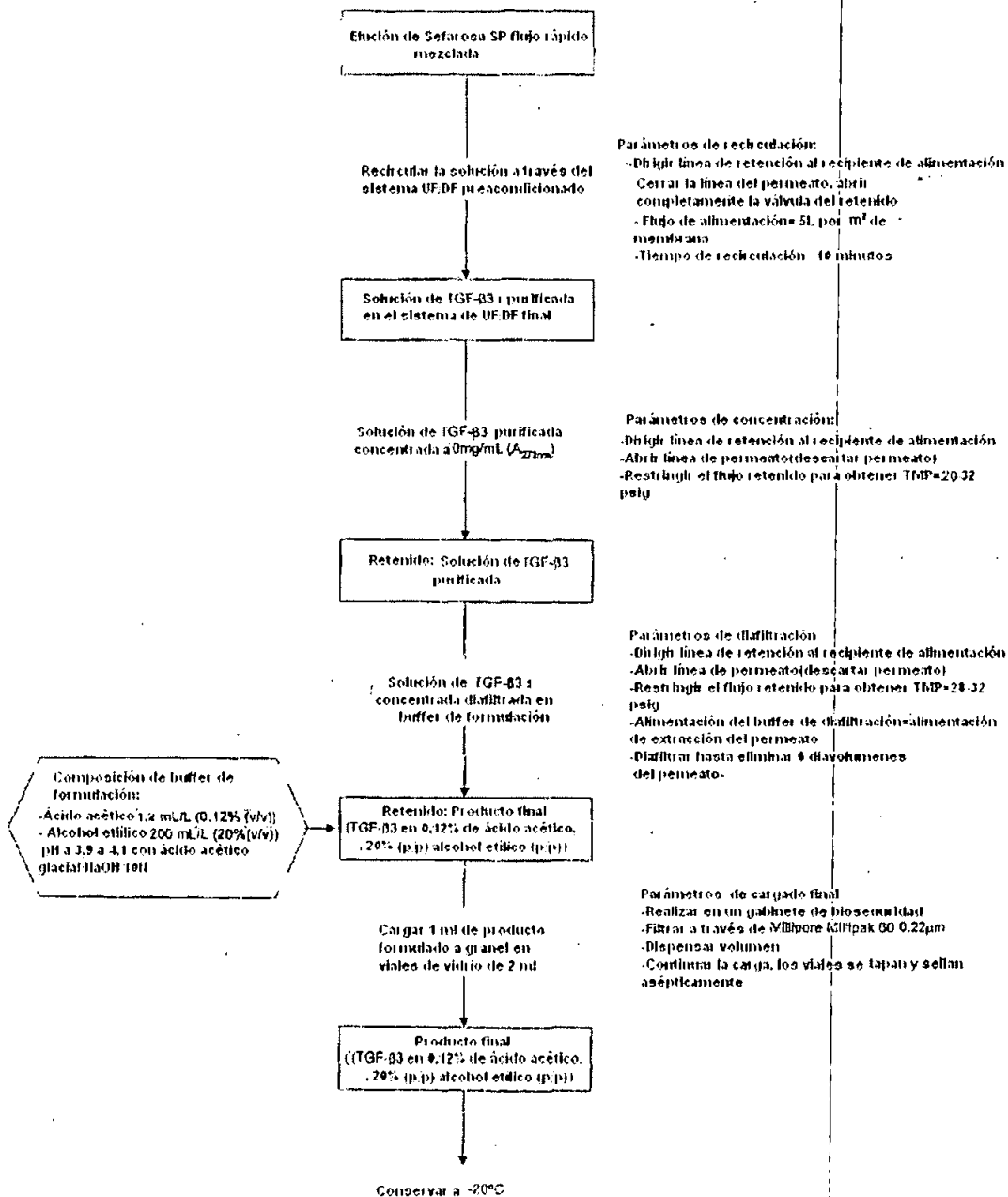
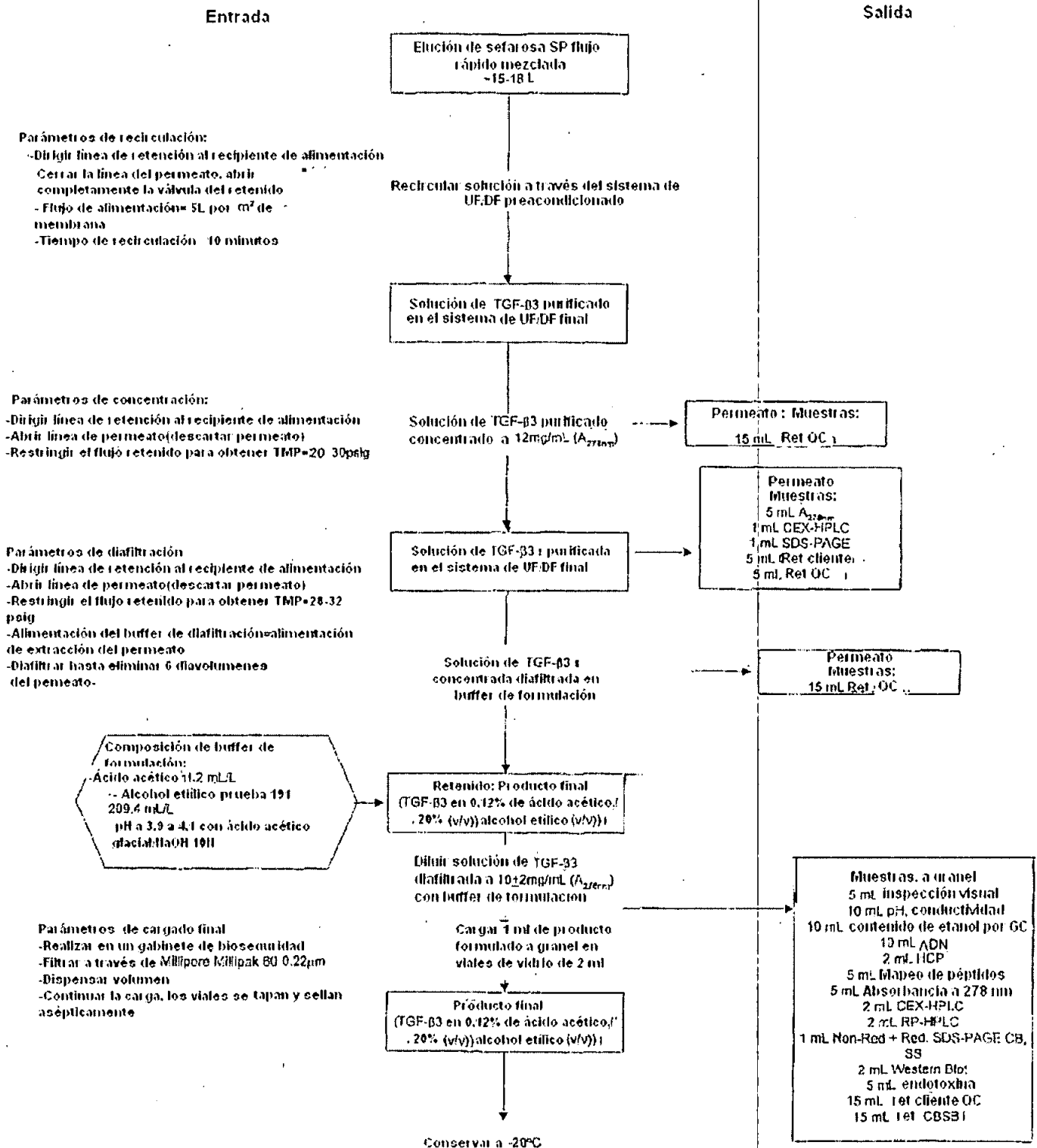


FIGURA 29A



102

FIGURA 29B



PROTEIN FOLDING

The present invention relates to a method for folding, or refolding, proteins into an active form. The invention particularly relates to folding of members of the Transforming growth factor beta superfamily.

The Transforming growth factor beta (TGF-Beta) superfamily of growth factors are involved in the regulation of many cellular processes including proliferation, migration, apoptosis, adhesion, differentiation, inflammation, immunosuppression and expression of extracellular proteins. The TGF-Beta superfamily include: TGF-Beta 1, TGF-Beta 2, TGF-Beta 3, TGF-Beta 4, TGF-Beta 5, bone morphogenetic proteins (BMPs 1-16) growth and differentiation factors (GDFs 1-16), and activins/inhibins.

There are three mammalian isoforms of TGF-Beta, termed TGF-Beta 1, 2 and 3. TGF-Betas are produced by virtually all cell types (e.g., epithelial, endothelial, hematopoietic, neuronal, and connective tissue cells). TGF-Betas are secreted as 100-kDa latent inactive precursor molecules (LTGF-Beta). The LTGF-Beta molecules consist of: (a) a C-terminal 25kDa dimer signal peptide (active fragment) and (b) the latent-associated peptide (LAP). LTGF-Beta is activated by cleavage of LAP from the active fragment by endopeptidases such as furin, plasmin, thrombin and acidification of the pericellular space. The liberated active TGF-Beta dimeric fragment is stabilized by hydrophobic interactions and by an inter-subunit disulfide bridge. Furthermore each monomer comprises several extended beta strands interlocked by three of the four intra-disulfide bonds and forms a tight structure known as the "Cysteine knot".

TGF-Beta family proteins have been proposed for a number of medical purposes. These include the reduction of scarring, promotion of wound healing and the stimulation of the replacement of damaged or diseased tissue at a variety of sites. These sites include the skin, bone, cartilage, neural tissue, connective tissue (e.g. tendons and ligaments), ocular tissue, liver and blood vessels etc. TGF-Beta 1 and TGF-Beta 2 have been shown to accelerate wound healing in experimental animal models, whilst their inhibition reduces subsequent scar formation. TGF-Beta 3 also significantly reduces scarring both in animal models and in humans and, in 2006,

represents one of the members of the superfamily that is closest to gaining regulatory approval for use as a medicament.

It will be appreciated that such clinical uses of members of the TGF-Beta superfamily requires that efficient methods for producing significant quantities of active growth factors are made available.

Members of the TGF-Beta superfamily have been isolated or produced by recombinant means for a number of years. By way of example TGF-Beta 3 was originally purified from human platelets, human placenta and bovine kidney during the 1980s. In view of the therapeutic potential of TGF-Beta 3, numerous attempts have been made to produce this protein by recombinant methods. Due to the complexity of native biologically active TGF-Beta molecules (homodimeric protein with 8 intra-chain disulfide bonds and one inter-chain disulfide bond) they were originally expressed in eukaryotic organisms (e.g. see EP0200341B1). However, eukaryotic expression resulted in relatively low expression levels and was also associated with high process costs.

Prokaryotic hosts were therefore investigated. However it was found that microbial hosts were unable to correctly form the multiple disulfide bonds required for the growth factors to fold into an active form. The misfolded protein formed as insoluble inclusion bodies within the host cell and these bodies required solubilisation followed by renaturation to allow the protein to refold into its native biological active conformation.

A number of attempts have been made to overcome the problems associated with the formation of active growth factors from prokaryotic hosts. For instance, US 5,922,846, US 5,650,494 and EP-B-0433 225 propose methods for the renaturation of TGF-Beta family proteins from inclusion bodies. However none of these methods provide quick and efficient methods for the production of clinical grade growth factors. For instance the inventors have found that many of the prior art refolding methods contemplated in the abovementioned patents are ineffective. Further, the inventors have found that with even the most preferred prior art refolding conditions (e.g. 0.05M Tris, 1M NDSB-201, 20%(v/v) DMSO, 2%(w/v) CHAPS, 1M NaCl,

1%(w/v) GSH, 0.2mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.3 at 2-8 °C) it can take about 7 days to refold growth factors. This folding time represents an unacceptable delay in cGMP manufacture and would result in undesirably high operational costs when large quantities of active growth factor are required.

It is therefore an object of the present invention to overcome the problems associated with prior art methods for folding, or refolding, members of the Transforming Growth Factor Beta superfamily.

According to a first aspect of the present invention there is provided a method for folding a Transforming Growth Factor Beta, or functional analogue thereof, into a dimeric, biologically active form comprising adding solubilized, unfolded monomeric growth factor to a solution containing:

- (i) 2-(cylcohexylamino)-ethanesulfonic acid or a functional analogue thereof; and
- (ii) a low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system; and

incubating the growth factor in the solution until dimeric biologically active growth factor is formed.

The present invention is based on experiments conducted by the inventors that were conducted in an attempt to improve prior art folding methods.

The Transforming Growth Factor Beta (TGF-Beta) may be any TGF-Beta (e.g., TGF- β 1, TGF- β 2 or TGF- β 3). However it is preferred that the TGF-Beta is TGF-Beta3 (TGF- β 3).

By "functional analogue thereof" we mean variants of a TGF-beta that retain the biological activity of the wild type growth factor. The functional analogue is preferably a protein and, in mature form, may comprise a dimer of two monomeric polypeptides of about 112 amino acids in length although it will be appreciated that functional analogues may be truncated or elongated when compared to the wild-type. The term also encompasses mutants of wild -type TGF-beta and particularly of TGF-Beta 3 that retain, or even have improved, activity when compared to the wild-type.

The inventors have found that the methods of the invention are also applicable to folding or refolding of such mutants.

It will be appreciated that "folding", as defined in the present invention, encompasses the "re-folding" of previously folded proteins, and indeed this re-folding of proteins constitutes a preferred subset of the broader folding encompassed by the invention.

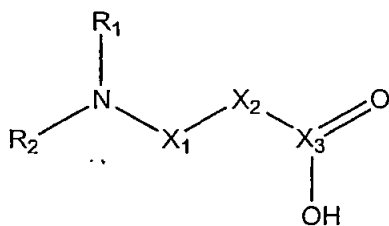
EP 0 433 225 contemplates a wide variety of "refolding conditions" that are alleged to permit a denatured monomer to dimerise and assume a biological active form. EP 0 433 225 discloses that such conditions should include the presence of a "solubilizing agent" and a redox system which permits the continuous oxidation and reduction of the thiol/disulfide pairs. It further contemplates a long list of such solubilizing agents including detergents; organic, water miscible, solvents; and phospholipids or a mixture of two or more such agents. Examples of the detergents contemplated in the specification include: surface active compounds, such as sodium dodecylsulfate (SDS), Triton or Tween, non-ionic mild detergents (e.g. digitonin), cationic mild detergents (e.g. N-[2,3-(Dioleyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylammonium), anionic mild detergents (e.g. sodium cholate, sodium deoxycholate) and zwitterionic ones (e.g. sulfobetaines (Zwittergent), 3-(3-chlolanamidopropyl)dimethylammonio-1-propane-sulfonate (Chaps), 3-(3-chlolanamidopropyl)dimethylammonio-2-hydroxy-1-propane-sulfonate (Chapso).

The inventors decided to test out a variety of detergents, including those contemplated in EP 0 433 225, and were surprised to find that most of the detergents they tested were ineffective for folding or refolding members of the TGF-Beta superfamily whereas those that did work took an unacceptable amount of time to yield useful amount of active growth factor. Tables 1 and 2 of the Example illustrate that a number of such detergents were ineffective. However to the inventors' surprise they found that the use of 2-(cylcohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES), and analogues thereof, in combination with a low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system, in accordance with the first aspect of the invention, was particularly effective for producing correctly folded dimeric growth factor.

The inventors have found that the method according to the first aspect of the invention represents a significant improvement over prior art methods. The method results in significantly improved speed of the process compared to methods previously disclosed in the literature. In preferred embodiments of the method of the invention folding of the growth factor may be completed within 5 days; preferably within 3 days; more preferably within 2 days; and most preferably after approximately 24 hours of initiating the folding process.

By the term "2-(cylcohexylamino)-ethanesulfonic acid or analogues thereof" we mean the detergent CHES and chemical analogues thereof that retain the refolding properties of CHES.

Suitable analogues of CHES that may be used in accordance with the methods of the invention may be defined by the following formula:



(I)

wherein:

R_1 and R_2 are the same or different and are selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_{1-4} alkyl groups, substituted or unsubstituted C_{3-8} cycloalkyl groups, or a substituted or unsubstituted aromatic nucleus, or R_1 and R_2 together form a ring system having up to 10 atoms;

X_1 and X_2 are independently selected from $-O-$, $-S-$, $-S(O)-$, $-S(O)_2-$, $-NR_3-$, $-CHR_4-$ and CHR_5 where R_3 , R_4 , and R_5 are the same or different and are independently selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C_{1-4} alkyl groups, substituted or unsubstituted C_{3-8} cycloalkyl groups, or a substituted or unsubstituted aromatic nucleus or any two of R_3 , R_4 and R_5 may together form a ring system having up to 6 carbon atoms, subject to the proviso that at least one of X_1 and X_2 is $-CHR_4-$ or $-CHR_5-$; and

108

X_3 is selected from C, S, S=O, or P-OH

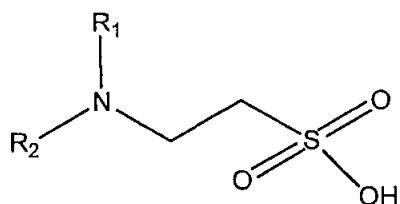
If one or more of R_{1-5} are alkyl groups then, depending on the number of carbon atoms they contain, they may be normal, secondary, tertiary or iso-groups. Examples of suitable alkyl groups for R_{1-5} are Me, Et, n-Pr, i-Pr, n-Bu, sec-Bu and E-Bu groups.

If one or more of R_{1-5} are cycloaliphatic then they are preferably a substituted or unsubstituted cyclohexyl group, most preferably unsubstituted.

If one or more of R_{1-5} are aromatic then they are preferably a substituted or unsubstituted phenyl group.

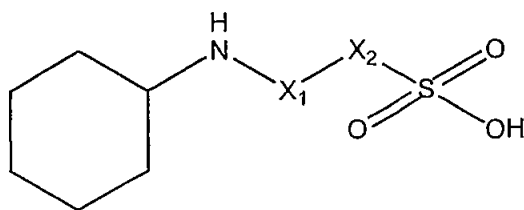
Preferably R_1 is hydrogen and R_2 is cyclohexyl. Alternatively or additionally X_1 and X_2 are preferably $-CH_2-$, alternatively or additionally X_3 is $-S=O$.

Preferred examples of compounds of formula (I) that may be employed in the invention are:



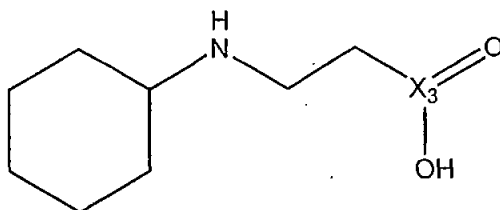
(Ia)

(i.e. a compound of formula (I) in which X_1 and X_2 are both $-CH_2-$ and X_3 is $S=O$);



(Ib)

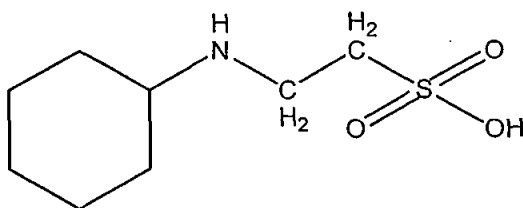
(i.e. a compound of formula (I) in which R_1 is hydrogen, R_2 is cyclohexyl and X_3 is S=O); and



(Ic)

(i.e. a compound of formula (I) in which R_1 is hydrogen, R_2 is cyclohexyl, and X_1 and X_2 are both $-\text{CH}_2-$).

The preferred example of each of formula (Ia), (Ib) and (Ic) is CHES, i.e.



The inventors have established that CHES, and the low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system, may be used alone to fold the growth factor. However, in some embodiments of the invention, the inventors have found that CHES may also be advantageously combined with other agents that have detergent/folding activity. Examples of such agents include: Taurodeoxycholate, Isopropyl Alcohol, Arginine-HCl, Non-detergent Sulphobetaine-201 and Non-detergent Sulphobetaine-211.

It is preferred that the solution comprises a concentration of about 10mM to 2.0M CHES; more preferably 100mM–1.0M and most preferably about 0.7M CHES.

The abovementioned concentrations of CHES may also be used when CHES is combined with other agents. For instance a preferred combination of agents that promote refolding is about 30mM Taurodeoxycholate and 0.7M CHES.

By the term "low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system" we mean systems that allow the formation of disulfide bonds in the solution. Suitable systems include reagent combinations such as Glutathione in its oxidized and reduced form, dithiothreitol in its oxidized and reduced form, beta-mercaptoethanol or beta-mercaptomethanol in its oxidized and reduced form, Cystine and its reduced form, and Cystamine and its reduced form. These reagents may be used at a concentration of about 1 μ M to 250 mM, especially of about 100 μ M to 10 mM. The molar ratio of such systems for the oxidized and the reduced forms may be between 100: 1 and 1: 100, especially between 6: 1 and 1: 6.

It is preferred that the low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system comprises the use of Glutathione in its reduced (GSH) and oxidised (GSSG) forms. Preferably the solution contains about 20 μ M–200mM reduced Glutathione; more preferably 200 μ M–20mM reduced Glutathione; and most preferably about 2mM reduced Glutathione. The solution may also contain about 4 μ M–40mM oxidised Glutathione; more preferably 40 μ M–4mM oxidised Glutathione; and most preferably about 400 μ M oxidised Glutathione.

Accordingly, preferred low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox systems may comprise 200 μ M–20mM reduced Glutathione and 40 μ M–4mM oxidised Glutathione. The exact ratio of GSH:GSSH will depend on a number of factors including: which growth factor is being folded; the pH of the solution and the CHES analogue employed in the method of the invention. By way of example, preferred low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox systems for folding TGF-Beta 3 comprises about 2mM reduced Glutathione and either about 400 μ M or about 2mM reduced Glutathione.

As explained in more detail below, in preferred embodiments of the invention the low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system may be "aged" before used to refold the TGF-Beta.

Preferred methods for folding the growth factors involve the use of CHES in combination with GSH and GSSG as the low molecular weight sulfhydryl/disulfide

redox system. Examples of preferred conditions include exposing unfolded growth factor to:

- (a) 0.7M CHES, 2mM GSH and 0.4mM GSSG;
- (b) 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH and 0.4mM GSSG;
- or
- (c) 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH and 2mM GSSG.

It will be appreciated that the abovementioned agents may be dissolved in water to make a solution according to the invention. However it will also be appreciated that the agents may be dissolved in a solution comprising a number of other compounds. For instance, the solution may also further comprise salts. Salts that can be used in the solution include salts of sodium, potassium, and calcium with chloride, sulphate, phosphate, acetate etc. It is preferred that the solution is a sodium chloride solution at a concentration of 0.5 to 2 M. The solution may, for example, be phosphate buffered saline.

During their investigations the inventors also established that folding conditions could be optimised by adjusting the pH and the temperature at which folding is encouraged to proceed.

Optimal temperature depended on a number of factors such as the agents used, the pH and also the amount of growth factor to be refolded. Under most circumstances a temperature of below about 15°C is preferred (for example 2-8°C or about 10°C). However higher temperatures (e.g. room temperature) were also effective for some conditions.

The inventors discovered that it was generally preferable to carry out the method of the invention at an alkaline pH. The pH is preferably above about pH 8.0. and more preferably above a pH of about pH 8.5. A most preferred pH for the solution is a pH of about 9.5.

The amount of unfolded growth factor added to the solution was also found to influence the efficiency of the folding. In general about 0.005–0.75 mg/mL of a

growth factor may be added to the solution; preferably 0.01–0.5 mg/mL; more preferably about 0.12–0.25mg/mL of the growth factor; and most preferably about 0.25mg/mL (i.e. 250µg/ml).

The methods of the invention may be employed to fold any monomer of the Transforming Growth Factor Beta superfamily into a dimeric, biologically active form. It is preferred that the method is used to fold a TGF-Beta *per se* (for example TGF-Beta 1, TGF-Beta 2, or TGF-Beta 3).

It is also preferred that the method is used to fold monomeric precursors (into active dimer growth factor) that have been produced in prokaryotic hosts that have been transformed to express the growth factor. For instance the method is particularly useful for folding growth factors that are located within inclusion bodies of bacteria that have been transformed with an expression vector encoding a recombinant growth factor.

It is most preferred that the methods of the invention are used to fold monomeric TGF-Beta 3 that is located in an inclusion body of a bacterium transformed with a TGF-Beta 3 expression vector (e.g. as described in Example 1 or as known to the art). It is most preferred that the TGF-Beta 3 is human TGF-Beta 3, recombinant human TGF-Beta 3, or human TGF-Beta 3 that contains mutations that optimise the growth factor for clinical use in humans.

Examples of most preferred conditions employed to fold TGF-Beta 3 include:

- (a) 0.7M 2-(cylcohexylamino) ethanesulfonic acid (CHES), 2mM reduced Glutathione (GSH), 0.4mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2–8°C ;
- (b) 30mM taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2–8°C;
- (c) 30mM taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 2mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2–8°C; or
- (d) 0.7M CHES, 1M NaCl, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.25mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2–8°C/room temperature.

113

The inventors developed the folding methods according to the invention in a laboratory (as described in Example 1) and then went on to scale-up the methodology as described in Example 2. It will be appreciated that the scale-up of the methods represent an important feature of the invention. Therefore according to a second aspect of the invention there is provided a method of producing an active member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily from a prokaryotic host, the method comprising:

- (a) fermentation of prokaryotic organisms that have been transformed to express a member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily;
- (b) isolation of inclusion bodies and recovery of expressed protein from the inclusion bodies;
- (c) refolding of the member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily according to the first aspect of the invention; and
- (d) purification of the refolded member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily.

It is preferred that step (a) involves the fermentation of bacteria that have been transformed with an expression vector encoding a member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily. The vector preferably encodes a TGF-Beta and most preferably encodes a human TGF-Beta 3, or a functional analogue thereof. It will be appreciated that the transformed bacterium may be generated using molecular biology techniques known to the art. An example of such a bacterium is given in Example 1.

It is preferred that the organisms are fermented according to conventional techniques. This may involve fermentation of a cell paste and harvesting the cells by taking samples from the fermentation and centrifuging the sample to isolate the organisms.

Step (b) of the method of the second aspect of the invention may involve lysis of the organisms recovered by centrifugation. The inclusion bodies (IB) may then be recovered by further centrifugation and washing steps. Preferably the IBs are further

processed by taking steps to solublize the protein within the IBs and then clarifying them.

The protein (i.e. the unfolded growth factor) from the isolated IBs is then subjected to the folding methods of the first aspect of the invention according to step (c) of the method of the second aspect of the invention.

The refolded growth factor should then be further purified according to step (d). Purification may involve a number of biochemical purification steps such as ultrafiltration and chromatography. Preferred purification procedures are illustrated in 1.15, 1.16 and 1.17 of Example 1. In a preferred embodiment the growth factor is first filtered; further purified by hydrophobic interaction chromatography; and then finally purified by cation exchange chromatography.

Optionally the method of the second aspect of the invention may further comprise a step (e) wherein the growth factor is formulated at a desired concentration in a solution and placed in vials. This solution may be the final formulation for clinical use or may be formulated for storage and/or transported. The growth factor may then be finished to form the final clinical product at a later date.

The inventors have recognised that WO99/18196 discloses the use of CHES for refolding Bone Morphogenetic Proteins (BMPs). However the techniques disclosed in WO99/18196 would not be considered by a skilled man to be useful for refolding TGF-Beta, and TGF-Beta3 in particular, according to the methods of the first or second aspects of the invention. The skilled person would come to this conclusion for a number of reasons. These include:

(a) WO99/18196 discloses methods for the solubilisation of the BMP inclusion bodies should use denaturants such as Guanidine-HCL or by acidification with an acid such as Acetic Acid. The inventors have found that acidification resulted in low recoveries of TGF-Beta 3 from the inclusion bodies. They found that when TGF-Beta 3 was solubilised in acid and the pH was then titrated to 9.5 (the preferred pH for refolding according to the invention), that this change from acid to alkaline pH resulted in irreversible aggregation of TGF-Beta 3 (due to the TGF-Beta 3 crossing

its isoelectric point (pH 6.4)). This resulted in very low TGF-Beta 3 yields. The Guanidine-HCL was also examined as a solubilisation agent, though it gave very good recoveries of TGF-Beta 3 from inclusion bodies it was too strong a denaturant and prevented TGF-Beta 3 from refolding. Accordingly the inventors found the solubilisation steps of the prior art unsuitable. Experimentation did establish that solubilisation of inclusion bodies using 6M Urea and 0.1M DTT gave good recoveries of TGF-Beta 3 and allowed the TGF-Beta 3 to refold once it was diluted in the refold buffer. Accordingly it is preferred that TGF-Beta 3 is solubilised from inclusion bodies using Urea and DTT.

(b) WO99/18196 also states that the BMP can be clarified using size exclusion chromatography (SEC) or reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). Both these methods would be unsuitable for the commercial scale manufacture of TGF-Beta 3. In SEC, sample volume influences the resolution of the sample (the smaller the sample volume the better the purification resolution). Commercial scale methods according to the second aspect of the invention may produce about 50L of solubilised inclusion bodies. It would be impractical to use SEC for such volumes because to process this volume in a single run would require a column (or multiple columns) with a single/combined bed-volume of 724 L. RP-HPLC is generally used as analytical tool due to the small column volume and again would be impractical to use in the commercial scale manufacture of TGF-Beta 3 for the same reasons. It is preferred that the method of the second aspect of the invention uses Tangential Flow Filtration (TFF) which gives TGF- β 3 purities of 70% and above.

(c) It is known that purity of an expressed protein affects refold yields. As a general rule the higher the purity of the expressed protein the higher the refold yields. The inventors have found that TGF- β 3 purities of 70% (of total protein) and above give high refold yields and that low TGF- β 3 purities (<50% of total protein) gave low refold yields. Accordingly it is preferred that TGF- β 3 used in methods of the invention are greater than 50% pure and more preferably about 70% (or more) pure. This purity may be achieved by including washing steps of the inclusion bodies and clarification of the solubilised TGF-Beta 3 using TFF (e.g. see Example 2).

116

(d) TGF-Beta 3 undergoes significant changes in conformation (secondary structure) and solubility at different pHs. As the pH of a TGF-Beta 3 containing solution is moved from acidic (<pH 3.8) to alkaline pH(<pH 8.0), aggregates appear, with an aggregation maximum occurring between pH 6.5 and pH 8.5. WO99/18196 states that the preferred pH of refolding BMPs to be approximately 8.5. However this would be unsuitable for the refolding of TGF-Beta 3 as this would cause TGF-Beta 3 to aggregate and therefore significantly reduce refold efficiency and yield. Accordingly it is preferred that the methods of the invention utilising a refolding buffer at pH greater than 8.5, preferably greater than pH 9.0 and most preferably a pH of about 9.5.

(e) The inventors have also found that the optimal concentrations of the Redox pair (e.g. reduced and oxidised Glutathione) in the Refold Buffer can be different for BMP and TGF-Beta 3. Preferred concentrations of Reduced Glutathione (GSH) and Oxidised Glutathione (GSSG) used in the manufacture of TGF-Beta 3 according to the invention is 2mM and 0.4mM respectively. Furthermore the inventors have found that it is most preferable, once the redox pair are dissolved in solution, that the buffer is aged for at least 2 hours, preferably at least 3-5 hours and most preferably for about 7 hours. The inventors do not wish to be bound by any hypothesis with regards the benefits of the redox pair "aging", they have noted that, in aqueous solutions GSH readily oxidises to produce GSSG and at physiological pHs the half-life of GSH is approximately 4 hrs. Furthermore the inventors suspect that the half-life of GSH in preferred TGF-Beta refolding buffer (pH 9.5) would be significantly lowered (at alkaline pHs there would be less hydrogen ions to protonate the reactive thiolate groups in GSH to produced unreactive thiols). A conservative estimation of half life of GSH at pH 9.5 would be 3hrs. Therefore after 7 hours of buffer aging the concentrations of the redox pair would therefore be approximately 0.5mM of GSH and 1.15mM of GSSG. Accordingly these concentrations are preferred concentrations for refolding TGF-Beta3. WO99/18196 states the preferred concentration of the redox pair to be 2mM of GSH and 1mM of GSSG (for folding BMP). This increased concentration of GSH would significantly prolong the refolding of TGF-Beta 3, and may reduce yield (as GSH breaks the disulfide bonds in proteins). In addition WO99/18196 states the requirement of 5mM EDTA in the refold buffer. The presence

of chelating agents such as EDTA in the refold buffer would stabilise GSH (i.e increase GSH half-life) this would further increase the refold time of TGF-Beta 3 and may reduce yield.

(f) WO99/18196 states the preferred concentration of BMP in the refold buffer to be 1-100 μ g/mL, this is significantly lower than the concentrations the inventors have found is useful in the manufacture of TGF-Beta 3 (optimally 250 μ g/mL). 250 μ g/mL of TGF-Beta 3 gave a higher refold efficiencies than 100 μ g/mL of TGF-Beta 3. It is therefore preferred that the methods of the invention utilise more than 100 μ g/mL of TGF-Beta 3 in the refolding step and preferably about 250 μ g/mL of TGF-Beta 3.

(g) WO99/18196 states the preferred temperature of the refold of BMPs to be 20°C. The inventors have observed that refolds of TGF-Beta 3 done at room temperature (22°C) results in the aggregation of TGF-Beta 3 and that refolding of TGF-Beta 3 should occur below 15°C (preferably 2-8°C or about 10°C) to support the productive folding pathway of TGF-Beta 3 and the suppression of hydrophobic interaction.

A most preferred method according to the second aspect of the invention is illustrated in Figure 10. Details of conditions and protocols suitable for use in the preferred method illustrated in Figure 10 are set out in Figures 11 to 26. It will be appreciated by the skilled person that, although the conditions and protocols set out in these Figures may preferably be used in the method illustrated in Figure 10, they may, except for where the context requires otherwise, be used to effect any suitable folding method in accordance with the present invention.

The invention will be illustrated further by Examples and with reference to the following drawings, in which:

Figure 1: is a photograph of an illustrative SDS-PAGE gel of post-induction samples from shake flasks referred to in 1.4 of Example 1 wherein lane 1 & 6 are Mark 12 standards (Invitrogen); and lanes 2-5 are loaded with 3 μ L of clones 1-4 respectively (3hrs post induction);

Figure 2: is a photograph of an illustrative Western blot wherein the first lane is a standard of non-reduced TGF-Beta 3 and lanes 2-12 correspond to Experimental conditions 2-12 in Table 1 of Example 1 and demonstrates that condition 12 was successful in producing correctly folded dimeric TGF-Beta 3;

Figure 3: is a photograph of an illustrative Western blot demonstrating the folding of monomeric and dimeric TGF-Beta 3 as discussed at 1.14 of Example 1 wherein lanes 1-18 correspond to Experimental conditions 1-18 in Table 3 of Example 1 after 7 day incubations;

Figure 4: is a photograph of an illustrative Western blot demonstrating the folding of monomeric and dimeric TGF-Beta 3 as discussed at 1.14 of Example 1 wherein lanes 19-36 correspond to Experimental conditions 19-36 in Table 4 of Example 1 after 7 day incubations;

Figure 5: is a photograph of an illustrative Western blot demonstrating the folding of monomeric and dimeric TGF-Beta 3 for most preferred refolding conditions according to the invention as discussed at 1.14 of Example 1 wherein lane 1 represents refolding at day 0; lane 2 represents refolding after 1 day; lane 3 represents refolding after 2 days; lane 4 represents refolding after 3 days and lane 5 is a standard of non-reduced TGF-Beta 3;

Figure 6: is a photograph of an illustrative Western blot demonstrating the folding of monomeric and dimeric TGF-Beta 3 utilising prior art refolding techniques as discussed at 1.14 of Example 1 wherein lane 1 represents refolding after 1 day ; lane 2 represents refolding after 2 days ; lane 3 represents refolding after 3 days; and lane 5 represents refolding after 7 days treatment;

Figure 7: represents chromatograms illustrating the amount of dimeric TGF-Beta 3 produced by a most preferred refolding condition according to the invention as discussed at 1.14 of Example 1 after purification by cation exchange HPLC of refolded TGF-Beta 3 samples (a) on day 0, (b) after 1 day and (c) after 2 days.

Figure 8: represents a chromatogram illustrating the amount of monomeric and dimeric TGF-Beta 3 produced by a most preferred refolding condition according to the invention as discussed at 1.15 of Example 1 after purification by ultrafiltration and hydrophobic interaction chromatography on a Butyl-Sepharose column;

Figure 9: represents a chromatogram illustrating the amount of dimeric TGF-Beta 3 produced by a most preferred refolding condition according to the invention as

discussed at 1.16 of Example 1 after purification by cation exchange chromatography on a SP-Sepharose column;

Figure 10: is a schematic flow diagram illustrating a preferred method according to the second aspect of the invention in which: (A) represents the fermentation and Inclusion Body (IB) recovery step; (B) represents the IB solubilization and clarification step; (C) represents a refold step according to the first aspect of the invention; (D) represents a purification step; and (E) represents a step for formulation and file of the drug product.

Figure 11: illustrates preferred conditions and protocols for fermentation suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10(A) (i);

Figure 12: illustrates preferred conditions and protocols for harvest and centrifugation suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10(A) (ii);

Figure 13: illustrates preferred conditions and protocols for cell lysis and IB recovery suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10(A) (iii);

Figure 14: illustrates preferred conditions and protocols for inclusion body solubilisation suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10(B) (i);

Figure 15: illustrates preferred conditions and protocols for: (A) clarification membrane preparation (Figure 10(B) (ii)); and (B) pre-refold UF/DF membrane preparation (Figure 10(B) (iii)) suitable for use in methods of the invention;

Figure 16: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for inclusion body clarification suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10(B) (ii);

Figure 17: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for pre-refold UF/DF suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (B) (iii);

Figure 18: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for protein refolding suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (C) (i);

Figure 19: illustrates preferred conditions and protocols for post-refold ultrafiltration membrane preparation suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (i);

20

Figure 20: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for post-refold ultrafiltration and butyl load preparation suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (i);

Figure 21: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for packing Butyl Sepharose 4 Fast Flow resin suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (ii);

Figure 22: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for using Butyl Sepharose 4 Fast Flow resin in a manner suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (ii);

Figure 23: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for cleaning and regeneration of Butyl Sepharose 4 Fast Flow resin after use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (ii),

Figure 24: illustrates preferred conditions and protocols for cleaning SP Sepharose Fast Flow resin before use in methods of the invention as that set out in Figure 10 (D) (iii);

Figure 25: illustrates preferred conditions and protocols for packing SP Sepharose Fast Flow resin suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (iii);

Figure 26: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for using SP Sepharose Fast Flow resin in a manner suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (D) (iii);

Figure 27: illustrates preferred conditions and protocols for cleaning SP Sepharose Fast Flow resin: (A) after use; and (B) pre-use/regeneration as set out in Figure 10 (D) (iii);

Figure 28: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for final UF/DF membrane preparation suitable for use in methods of the invention as that set out in Figure 10 (E) (i); and

Figure 29: illustrates two preferred conditions and protocols (A and B) for UF/DF of SP Sepharose elution purified TGF- β 3 solution, and final filling, that are suitable for use in methods of the invention such as that set out in Figure 10 (E) (i).

EXAMPLE 1

The inventors investigated whether or not improved methods of re-folding members of the TGF-Beta superfamily could be established. The following example is illustrative of the application of the methods of the invention to the re-folding of TGF-Beta 3.

First, a study was set up to first screen re-fold reagents (see 1.13). Reagents that were found to aid re-folding in the primary screen were then taken forward as described herein, for further optimisation to maximise yield and reduce refold timelines (see 1.14). Finally methods of purifying the refolded growth factor were investigated (1.15- 1.17).

Methods employed to test the biological activity of TGF-Beta 3 are described at 1.18,

These studies lead the inventors to realise that improved methods of folding members of the TGF-Beta superfamily into an active form may be established by following the method defined by the first aspect of the invention.

EXPERIMENTAL:**1.1 Nucleotide Sequence**

The nucleotide sequence coding for TGF-Beta 3 active fragment is as follows:

```
GCT TTG GAC ACC AAT TAC TGC TTC CGC AAC TTG GAG GAG AAC
TGC TGT GTG CGC CCC CTC TAC ATT GAC TTC CGA CAG GAT CTG
GGC TGG AAG TGG GTC CAT GAA CCT AAG GGC TAC TAT GCC AAC
TTC TGC TCA GGC CCT TGC CCA TAC CTC CGC AGT GCA GAC ACA
ACC CAC AGC ACG GTG CTG GGA CTG TAC AAC ACT CTG AAC CCT
GAA GCA TCT GCC TCG CCT TGC TGC GTG CCC CAG GAC CTG GAG
CCC CTG ACC ATC CTG TAC TAT GTT GGG AGG ACC CCC AAA GTG
GAG CAG CTC TCC AAC ATG GTG GTG AAG TCT TGT AAA TGT AGC
```

(SEQ ID No. 1)

1.1 cDNA Generation

Total RNA from a human incisional wound (taken day 5 post-wounding) was treated with DNA-Free (Ambion) to remove any contaminating DNA. Using total RNA as a template, TGF-Beta3 cDNA was generated by Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). The RT-PCR master mix was prepared from Brilliant® QRT-PCR Core Reagent Kit, 1-Step (Stratagene). One microgram of RNA was added to 50µL of a solution containing: One-step QRT-PCR buffer, 0.2mM dNTPs, 3.5mM

MgCl₂, 1μL StrataScript reverse transcriptase, Taq Polymerase 2.5 units, 0.4μM Sense primer (5' GAT ATA CCA TGG CTT TGG ACA CCA ATT ACT ACT GC 3') (SEQ ID No. 2), 0.4μM Sense primer (5'-CAG CCG GAT CCG GTC GAC TCA GCT ACA TTT ACA AGA C 3') (SEQ ID No. 3). The reaction was placed in a thermal cycler (Hybaid PCR Express) and run under the following conditions: 30min at 45°C, 10min at 95°C, then 40 cycles of 95°C for 30 sec, 65°C for 1 min and 72°C for 1 min. Final step of 72°C for 10 min. PCR samples were run on 2% (w/w) agarose gel to verify band size and purified using Wizard PCR Prep Kit (Promega).

1.2 Vector Cloning and Host Cell Transformation.

The pET-24d vector is derived from pBR322 vector and contains a T7 promoter under *LacUV5* control and a kanamycin resistant marker gene.

The TGF-Beta 3 cDNA fragments (generated in Section 1.1) were digested with 0.75μL of *Nco*I (New England Biolabs) and 0.75μL of *Bam*HI (New England Biolabs) with 1 X *Bam*HI Buffer (New England Biolabs) in a 15μL reaction (Nuclease Free Water, Novagen) at 37°C for 4 hours. One microliter of pET-24d plasmid (Novagen) was digested in the same manner. The digested cDNA and the large plasmid fragment were agarose gel purified and recovered using the SpinPrep Gel DNA extraction kit (Novagen).

The purified cDNA and plasmid fragments were ligated using T4 ligase kit (Novagen). The ligated cDNA /plasmid was transformed into HMS174 (DE3) (Novagen HMS174 (DE3) transformation kit). The transformants were selected by plating on Luria broth (LB) agar plates containing 50μg/mL kanamycin (Invitrogen). Three clones were selected for restriction digest and/or expression.

1.3 Clone Screening for Product Expression

Clones were grown in shake flask cultures of half strength 'Terrific Broth' (6g/L phytone peptone (Becton Dickinson), 12g/L yeast extract (Becton Dickinson), 2g/L glycerol (JT Baker), 1.16g/L potassium phosphate monobasic (JT Baker), 6.25g/L potassium phosphate dibasic (JT Baker), QS to 1 Litre with distilled water) and induced in exponential phase at OD₆₀₀ between 0.65 and 0.85 with 1mM isopropyl beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG). Post-induction samples were taken 3 hours after the addition of IPTG and analysed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) for product induction and expression. Clones 1-4 pre/post induction sample aliquots and Mark 12 molecular weight standards (Invitrogen- molecular weight range 2.5-200kDa) were run on NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris Gel, 1.0mm (Invitrogen) for approximately 40-50 minutes at 120milliAmps and 200 Volts and then stained with Coomassie Blue. A protein whose size is between 6 and 14.4 kDa (i.e., TGF-Beta 3 monomer) is clearly induced in each of these cultures (see Figure 1) with Clone 2 expressing the greatest amount of TGF-Beta 3 protein.

1.4 Frozen Cell stock

Clones 1-4 were grown in shake flasks in half strength Terrific Broth to an OD₆₀₀ of approximately 1. and stored as glycerol stocks by the addition of glycerol to 20%(v/v). 1.2mL of broth was aliquoted into 12 x 2mL cryovials (which contained 0.3mL of glycerol) and then stored at -70°C.

123

1.5 Sequence Confirmation of TGF-Beta 3 Gene.

Samples of the cultures used for frozen cell stocks were taken before the addition of glycerol and used for plasmid isolation using a Qiagen MiniPrep Kit. The isolated plasmid was sequenced and verified using a T7 promoter primer (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3') (SEQ ID No. 4) and a T7 terminator primer (5'-GCT AGT TAT TGC TCA GCG G-3') (SEQ ID No. 5).

1.6 Seed Culture.

As Clone 2 expressed the highest amount of TGF-Beta 3 protein an ampoule of frozen stock (from Section 1.4) was recovered and inoculated into a 2 Litre baffled Erlenmeyer flask, containing 500mL of HySoy medium (12g/L Hy-Soy (Quest International), 24g/L yeast extract(Becton Dickinson), 10g/L NaCl (Sigma) and 10g/L glycerol(Sigma) and 50µg/mL of kanamycin. The flask was incubated with shaking at 37°C and 200rpm and sampled periodically to measure OD₅₅₀. When the OD of the culture reached 3.21 U/mL (after 7 hours) the cell broth was used to seed a 150L fermenter (100 L working volume).

1.7 Fermentation

Nine hundred millilitres of cell broth (from Section 1.6) was used to inoculate a 150 L fermenter (WHE) containing 90 L of Batch Culture Media (0.6g/L K₂HPO₄, 0.4g/L KH₂HPO₄, 1.25g/L NH₄SO₄, 12g/L HY-Soy, 24g/L yeast extract and 10g/L glycerol). The fermentation operating parameters were controlled as follows: temperature set point, 37°C; pH set point, 7.0 (maintained using 4N ammonium hydroxide and 4N phosphoric acid), and; dissolved oxygen (DO) initially calibrated to 100%. The vessel head pressure was 7 psi, and the agitation and airflow were 200-400rpm with one volume of air per volume of medium per minute (vvm or slpm), respectively. DO was maintained above 20% by adjusting the fermentation set point parameters in the following priority: Agitation (max 400rpm), aeration (max 1.5 vvm), oxygen supplementation (max 33.3 lpm), and backpressure (max 12 psi). Foaming was controlled with Pluronic L-61 (25% v/v). When the OD of the culture reached 10U/mL a glycerol feed (50% v/v) was initiated at a flowrate of 45mL/min. When OD reached 40 U/mL, the cells were induced with the addition of IPTG to 0.2mM final concentration.

1.8 Harvest

After 4 hours post-induction, the fermenter was chilled to 10°C and the airflow and agitation were reduced to 0.3vvm and 100rpm respectively. Foam and pH controls were terminated and backpressure was adjusted to 3psi. The culture was harvested by continuous centrifugation with a Westfalia CSA 8 continuous centrifuge at 10°C. The centrifuge was operated at 15,000 rpm and a flow rate of 3 litres per min and cell slurries collected.

1.9 Cell Lysis and IB Recovery

The fermentation cell paste (from Section 1.8) was diluted 1:5 with Lysis Buffer (6.1g/L TrizmaBase(Tris), 3.7g/L ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA), 58.44g/L NaCl and 10g/L Triton X-100, pH 8.0) and re-suspended using a hand held homogenizer. The re-suspended cell paste was passed twice through a high-pressure homogenizer (parameters: pressure, 10,000 psig; flow rate, 450mL/min; and temperature, 15°C). The homogenised cell lysate was then centrifuged (bucket centrifuge, fixed-angle rotor) at 5,000xg for 20minutes at 4°C. The supernatant was

discarded leaving insoluble (inclusion bodies) TGF-Beta 3. The inclusion body (IB) pellet was re-suspended in Wash Buffer (6.1g/L Tris and 3.72g/L EDTA, pH 8.0) using a hand held homogenizer and centrifuged (5,000 x g for 20 minutes at 4°C).

1.10 Inclusion Body Solubilization

The sediment from Section 1.9 was diluted 1:10 with Solubilization Buffer (6.1g/L Tris, 15.4g/L DL-dithiothreitol (DTT) and 360.4g/L urea, pH 8.0) and re-suspended using a hand held homogenizer. The suspension was covered and left stirring for 60-75 minutes, at room temperature to solubilize the inclusion bodies and reduce TGF-Beta 3 to its monomeric form. The pH of the re-suspended pellet was adjusted to pH 9.4-9.6 with NaOH/acetic acid before incubation for a second time for 60-75 minutes.

1.11 Clarification/Ultrafiltration and Diafiltration

Solubilized material from Section 1.10 was clarified, concentrated and dia-filtered in a Tangential Flow Filtration (TFF) system (Millipore). Initial clarification and concentration was achieved with a pre-conditioned clarification TFF membrane (Millipore Pellicon 1000kDa, regenerated cellulose, screen V). The clarified TGF-Beta 3 was collected in the permeate. Switching to a Ultrafiltration/Diafiltration (UF/DF) membrane (Millipore Pellicon 5kDa, regenerated cellulose, screen C), the TGF-Beta 3 was then washed in 6 diavolumes of Solubilisation Buffer (6.1g/L Tris, 15.4g/L DTT and 360.4g/L urea, pH 9.5).

1.12 Re-fold Screening Matrix 1

1.12.1 Methodology

TGF-Beta 3 protein content in the clarified material from Section 1.11 was quantified using the RC DC™ Protein Assay (BioRad) in conjunction with SDS-PAGE, Coomassie Blue Staining and densitometry. The TGF-Beta 3 material was diluted into a series of refold buffers (See Tables 1 and 2). 1mL samples were taken daily over a 6-day timeline and analyzed under non-reducing conditions using SDS-PAGE. Sample aliquots and Mark 12 molecular weight standards (Invitrogen- molecular weight range 2.5-200kDa) were run on NuPAGE® Novex 12% Bis-Tris Gels, 1.0mm (Invitrogen) for approximately 40-50 minutes at 120milliAmps and 200 Volts. The protein samples were then electrophoretically transferred to nitrocellulose membrane (Invitrogen) using a Novex Blotting apparatus (Invitrogen). The membrane was blocked with 5%(w/v) skimmed milk powder, 1% (v/v) polyoxyethylenesorbitan monolaurate (Tween 20;Sigma) in phosphate buffered saline (PBS). The membrane was washed (PBS, 0.1%(v/v) Tween 20) and incubated for 1 hour in primary antibody (Anti- TGF-Beta 3, MAB643(R&D systems) diluted 1:500 in PBS and 0.1(v/v) Tween 20). Following incubation with the primary antibody, the nitrocellulose was washed in washing buffer (PBS, 1% (v/v) Tween 20). The nitrocellulose was then incubated for an additional 1 hour in the secondary antibody (Goat anti-mouse IgG conjugated with alkaline phosphatase (Abcam PO397) diluted 1:2000 with PBS, 0.1% (v/v) Tween 20). The membrane was again washed (PBS, 1% (v/v) Tween 20) before developing with Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega).

The MAB 643 antibody detects correctly refolded monomeric and dimeric TGF-Beta 3 species.

1.12.2 Results

Tables 1 and 2 summarise the results obtained testing refolding of TGF-Beta 3 under 50 different experimental conditions

The inventors established that the conditions described below (i.e. experimental conditions 12, 19, and 44) produced correctly refolded dimeric TGF-Beta 3:

1. 0.7M 2-(cylcohexylamino) ethanesulfonic acid (CHES), 2mM reduced glutathione (GSH), 0.4mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 12).
2. 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 19).
3. 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 2mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C (Experimental condition 44).

By way of example Figure 2 illustrates the effectiveness of Experimental Condition 12.

Table 1. Re-fold Screening Matrix and Results

Experimental Condition	Temp	Detergent	TGF-Beta 3 conc.	GSH conc.	GSSG Conc.	Presence of Correctly Re-folded dimeric TGF-Beta 3 by Western Blot (MAB643) analysis
1	2-8°C	100mM Zwittergent 3-08	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
2	2-8°C	40mM Taurocholate	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
3	2-8°C	40mM Big CHAP	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
4	2-8°C	60mM Hexyl glucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
5	2-8°C	0.5%(w/v) ASB-14	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
6	2-8°C	0.5%(w/v) DDMAB	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
7	2-8°C	0.5%(w/v) CTAB	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
8	2-8°C	0.2%(w/v) SDS	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
9	2-8°C	0.1%(w/v) Dodecyl-b-D-maltoside	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
10	2-8°C	0.1%(w/v) Tween 20	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
11	2-8°C	1M NDSB-201	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
12	2-8°C	0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	Dimer
13	2-8°C	20%(v/v) Sucrose	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
14	2-8°C	20%(v/v) Glycerol	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
15	2-8°C	20mM Zwittergent 3-12 + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
16	2-8°C	20mM Zwittergent 3-08 + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
17	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
18	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
19	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	Dimer
20	2-8°C	0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
21	2-8°C	40mM Octyl-Thioglucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
22	2-8°C	60mM Hexylglucopyranoside + 0.1%(w/v) PEG-6000	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
23	2-8°C	30% (v/v) Ethanol	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
24	2-8°C	20% (v/v) Isopropyl Alcohol	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected
25	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate	0.12mg/mL	2mM	0.4mM	None detected

127

Table 2. Re-fold Screening Matrix and Results

Experimental Condition	Temp	Detergent	TGF-Beta 3 conc.	GSH conc.	GSSG Conc.	Presence of Correctly Refolded dimeric TGF-Beta.3 by Western Blot (MAB643) analysis
26	2-8°C	100mM Zwittergent 3-08	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
27	2-8°C	40mM Taurocholate	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
28	2-8°C	40mM Big CHAP	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
29	2-8°C	60mM Hexyl glucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
30	2-8°C	0.5%(w/v) ASB-14	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
31	2-8°C	0.5%(w/v) DDMAB	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
32	2-8°C	0.5%(w/v) CTAB	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
33	2-8°C	0.2%(w/v) SDS	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
34	2-8°C	0.1%(w/v) Dodecyl- β -D-maltoside	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
35	2-8°C	0.1%(w/v) Tween 20	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
36	2-8°C	1M NDSB-201	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
37	2-8°C	0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
38	2-8°C	20%(v/v) Sucrose	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
39	2-8°C	20%(v/v) Glycerol	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
40	2-8°C	20mM Zwittergent 3-12 + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
41	2-8°C	20mM Zwittergent 3-08 + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
42	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
43	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 1M NDSB-221	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
44	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate + 0.7M CHES	0.12mg/mL	2mM	2mM	Dimer
45	2-8°C	0.5M Arginine	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
46	2-8°C	40mM Octyl-Thioglucopyranoside	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
47	2-8°C	60mM Hexylglucopyranoside + 0.1%(w/v) PEG-6000	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
48	2-8°C	30% (v/v) Ethanol	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
49	2-8°C	20% (v/v) Isopropyl Alcohol	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected
50	2-8°C	30mM Taurodeoxycholate	0.12mg/mL	2mM	2mM	None detected

28

1.13 Refold Optimisation

The conditions from Experiment 12 (0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3 at pH 9.5 at 2-8°C) resulted in particularly well-folded TGF-Beta 3. These conditions were therefore selected for further optimisation.

Parameters investigated were:

- TGF-Beta 3 concentration (0.1mg/mL, 0.25mg/mL and 0.5mg/mL)
- pH (8.0, 9.0 and 9.5)
- Temperature (2-8°C and room temperature)
- Addition of 1M NaCl

The TGF-Beta 3 material from Section 1.12 was diluted into a series of re-fold conditions (see Tables 3 and 4). 1ml samples were taken daily over a 6-day timeline. Day 6 samples were analyzed under non-reducing conditions using SDS-PAGE and Western blotted (see Section 1.13 for methodology). Correctly re-folded TGF-Beta 3 monomer was detected by Western blot in all re-fold conditions. Correctly re-folded TGF-Beta 3 dimer was detected by Western Blot in all experiments containing 1.0M NaCl (See Figures 3 and 4).

The conditions under which the greatest amount TGF-Beta 3 was re-folded into its dimeric state was experimental condition 34 (0.7M CHES, 1M NaCl, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.25mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C/room temperature).

Day 0, 1, 2 and 3 samples from experimental condition 34 were run on non-reducing SDS-PAGE and Western blotted to determine the time points at which correctly refolded TGF-Beta 3 was produced. As shown in Figure 5 the initial starting material and day 1 sample contained small amounts of correctly folded monomeric and dimeric TGF-Beta 3. There is a significant increase in the amount of correctly folded TGF-Beta 3 by day 2 and 3 of refolding.

Figure 6 illustrates refolding achieved by prior art refolding conditions contemplated in US 5,922,846, US 5,650,494 and EP 0 433 225 (0.05M Tris, 1M NDSB-201, 20%(v/v) DMSO, 2%(w/v) CHAPS, 1M NaCl, 1%(w/v) GSH, 0.2mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.3 at 2-8 °C). It can be seen that the amount of refolded TGF-Beta 3 is still increasing after 7 days treatment (contrast lanes 4 and 5 of Figure 6) whereas, in contrast, the growth factor was fully folded after 2 days treatment when methods according to the invention are employed (compare lanes 3 and 4 of Figure 5).

Re-folding of TGF-Beta 3 in experimental condition 34 was also monitored using Cation-Exchange (CEX) HPLC. A PolySulfoethyl-A HPLC column (200 x 4.6mm, 5µm, 1000A from PolyLC Inc.) was equilibrated with Mobile Phase A (10% (v/v) acetic acid, 30%(v/v) Isopropyl alcohol). Refold samples were acidified by mixing 1:1 with 20% acetic acid, 60% isopropyl alcohol. 100µL of acidified re-fold sample was loaded onto the column at flow rate of 0.5mL/min (this flow rate was used throughout the procedure). The column was washed with Mobile phase A for 5minutes. A linear gradient was run over 10 minutes ending with a mixture of 60% Mobile Phase A and 40% Mobile Phase B (10% (v/v) acetic acid, 30%(v/v) isopropyl alcohol and 1M NaCl). The application of this buffer was held for a further 5 minutes. A second linear gradient was applied over 10 minutes ending with 100% Mobile Phase B and maintained for 5 minutes. Figure 7 illustrates that on Day 0 there are

small amounts of correctly re-folded dimeric TGF-Beta 3 (see 7(a)) whereas by day 1 there is significant increase in concentration of correctly folded TGF-Beta 3 protein (see 7(b)). The concentration of dimeric TGF-Beta 3 on day 2 is similar to day 1, indicating that refolding is complete after 24 hours (see 7(c)). The completion of refolding after 24 hours is significantly faster than prior art techniques (see Figure 6).

Table 3. Refold Optimisation Matrix and Results (Experimental Conditions 1-18)

Experimental Condition	Temp	Detergent	NaCl Conc. (M)	TGF-Beta 3 conc. (mg/mL)	GSH conc.	pH	GSSG Conc.	Presence of Correctly Refolded TGF-Beta 3 by Western Blot (MAB643) analysis
1	2-8°C	0.7M CHES	0	0.1	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
2	2-8°C	0.7M CHES	1	0.1	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
3	2-8°C	0.7M CHES	0	0.25	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
4	2-8°C	0.7M CHES	1	0.25	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
5	2-8°C	0.7M CHES	0	0.5	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
6	2-8°C	0.7M CHES	1	0.5	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
7	2-8°C	0.7M CHES	0	0.1	2mM	9.5	0.4mM	Monomer
8	2-8°C	0.7M CHES	1	0.1	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
9	2-8°C	0.7M CHES	0	0.25	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
10	2-8°C	0.7M CHES	1	0.25	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
11	2-8°C	0.7M CHES	0	0.5	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
12	2-8°C	0.7M CHES	1	0.5	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
13	RT	0.7M CHES	0	0.1	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
14	RT	0.7M CHES	1	0.1	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
15	RT	0.7M CHES	0	0.25	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
16	RT	0.7M CHES	1	0.25	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
17	RT	0.7M CHES	0	0.5	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
18	RT	0.7M CHES	1	0.5	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer

Note: RT= Room Temperature

2-8°C/RT= 3 days at 2-8°C and 3 days at room temperature.

Table 4. Refold Optimisation Matrix and Results (Experimental Conditions 19-36)

Experiment al Condition	Temp	Detergent	NaCl Conc. (M)	TGF-Beta 3 conc. (mg/mL)	GSH conc.	pH	GSSG Conc.	Presence of Correctly Refolded TGF-Beta 3 by Western-Blot (MAB643) analysis
19	RT	0.7M CHES	0	0.1	2mM	9.5	0.4mM	Monomer
20	RT	0.7M CHES	1	0.1	2mM	9.5	0.4mM	Non-detected
21	RT	0.7M CHES	0	0.25	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
22	RT	0.7M CHES	1	0.25	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
23	RT	0.7M CHES	0	0.5	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
24	RT	0.7M CHES	1	0.5	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
25	2-8°C /RT	0.7M CHES	0	0.1	2mM	8.5	0.4mM	Non-detected
26	2-8°C /RT	0.7M CHES	1	0.1	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
27	2-8°C /RT	0.7M CHES	0	0.25	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
28	2-8°C /RT	0.7M CHES	1	0.25	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
29	2-8°C /RT	0.7M CHES	0	0.5	2mM	8.5	0.4mM	Monomer
30	2-8°C /RT	0.7M CHES	1	0.5	2mM	8.5	0.4mM	Monomer + dimer
31	2-8°C /RT	0.7M CHES	0	0.1	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
32	2-8°C /RT	0.7M CHES	1	0.1	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
33	2-8°C /RT	0.7M CHES	0	0.25	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
34	2-8°C /RT	0.7M CHES	1	0.25	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
35	2-8°C /RT	0.7M CHES	0	0.5	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer
36	2-8°C /RT	0.7M CHES	1	0.5	2mM	9.5	0.4mM	Monomer + dimer

Note: RT= Room Temperature

2-8°C/RT= 3 days at 2-8°C and 3 days at room temperature.

Sections 1.14 – 1.16 describe experiments conducted to establish how TGF-Beta 3 refolded according to the first aspect of the invention may be purified.

1.14 Ultrafiltration/ Hydrophobic Interaction Chromatography.

The CHES refold solution identified as experimental condition 34 from Section 1.13 was concentrated 5 fold by ultrafiltration (the membrane was a flat-sheet Millipore Pellicon 5kDa, 0.1m², Regenerated Cellulose, screen). The pH of the concentrated re-fold material was then adjusted to a pH of 2.5-2.8 using glacial acetic acid before being diluted 1:1 in Dilution Buffer (2.72g/L sodium acetate, 264.28g/L ammonium

13/

sulfate, 100g/L acetic acid, and 210.7g/L arginine hydrochloride pH 3.3). A Butyl Sepharose 4 Fast Flow Column (Amersham, 16cm Bed Height) was equilibrated with four column volumes of Buffer A (2.72g/L sodium acetate, 132.14g/L ammonium sulfate and 100g/L acetic acid pH 3.3). The refold material was filtered through 0.22 μ m membrane (Millipore Millipak filter) before being loaded onto the Butyl Sepharose column at a flow rate of 100cm/hr (this flow rate was used throughout procedure). The column was then washed in Buffer A for four-column volumes. The TGF-Beta 3 proteins were eluted off the column using Buffer B (2.72g/L sodium acetate, 100g/L acetic acid and 300g/L ethanol pH 3.3). The first peak, which contains TGF-Beta 3 proteins in both monomeric and dimeric forms, was pooled (see Figure 8).

1.15 Cation Exchange Chromatography

Cation exchange chromatography was used to isolate the dimeric TGF-Beta 3 proteins from the monomeric proteins. The pooled TGF-Beta 3 fractions from Section 1.14 were diluted 5 fold in SP Load Dilution Buffer (2.72g/L sodium acetate, 100g/L acetic acid, 300g/L Ethanol pH 4.0). A SP Sepharose Fast Flow Column (Amersham) was equilibrated with 4 column volumes of Buffer A (2.72g/L sodium acetate, 100g/L acetic acid, 300g/L ethanol and 1.46g/L sodium chloride pH 4.0). The diluted TGF-Beta 3 material was loaded onto SP Sepharose column at a flow rate of 169cm/hr (this flow rate was used throughout procedure). The column was then washed in Buffer B (2.72g/L sodium Acetate, 100g/L acetic acid, 300g/L ethanol and 2.92g/L sodium chloride pH 4.0) for four-column volumes. The TGF-Beta 3 proteins were eluted off the column using Buffer C (2.72g/L sodium acetate, 100g/L acetic acid, 300g/L ethanol and 11.69g/L sodium chloride pH 4.0). The first peak eluted is monomeric TGF-Beta 3 followed by the dimeric TGF-Beta 3. The fractions containing the TGF-Beta 3 dimer were pooled (see Figure 9)

1.16 Ultrafiltration/Diafiltration

The fractions containing purified dimeric TGF-Beta 3 molecules from Section 1.15 underwent ultrafiltration/diafiltration to exchange the buffer to 20mM acetic acid, 20% (v/v) ethanol and concentrate the sample to ~10mg/mL (TGF-Beta 3 concentration was determined by U.V spectrometry).

1.17 Assay for Biological Activity.

The cell growth inhibition assay (A Meager, 1991 - Journal of Immunological Methods; 141; pages 1 to 14) was used as an *in vitro* biological activity test for TGF-Beta molecules. The colorimetric assay is based on the inhibitory effect of TGF-Beta molecules on the growth of Mink Lung Epithelial cells (MLEC). 50 μ L of Dilution medium (Minimum Essential Medium with Glutamax I (Invitrogen) and 0.1%(w/v) bovine serum albumin (Sigma)) was added to each well of a 96 well plate. 50 μ L serially diluted (5000pg/mL to 9.75pg/mL) of TGF-Beta 3 reference standard (National Institute of Biological Standards and Controls), 50 μ L serially diluted (5000pg/mL to 9.75pg/mL) of TGF-Beta 3 (produced by methods disclosed in patents: US 5,922,846, US 5,650,494 and EP-B-0433 225) and 50 μ L of serially diluted (5000pg/mL to 9.75pg/mL) of TGF-Beta 3 (CHES refolded growth factor purified according to section 1.17) protein were added to the plate(s). 50 μ L of cell suspension containing: 1 x10⁵ MLEC cells/mL in Complete Medium (Minimum Essential Medium with Glutamax I (Invitrogen), 0.1%(w/v) bovine serum albumin (Sigma) and 10%(v/v) foetal bovine serum (Invitrogen) was added to each well.

Plate(s) were incubated for 72 hours at 37°C in 5% CO₂. The contents of each well were aspirated and washed three times with 200µL phosphate buffered saline (Invitrogen). 100µL of substrate solution (1M sodium acetate, 104 phosphatase substrate (Sigma) and 1%(v/v) Triton X-100 (Sigma)) was added to each well and incubated at 37°C. After 2 hours the reaction was quenched using 1 N sodium hydroxide. The plate(s) were read using a multichannel reader at 405nm and a reference filter at 492nm.

IC₅₀ values of the TGF-Beta 3 reference standard (NIBSC) and TGF-Beta 3 (produced by methods disclosed in patents: US 5,922,846, US 5,650,494 and EP-B-0433 225) were 242.33pg/mL and 90pg/mL respectively, which were similar to previously assayed standards. The material refolded according to the invention was found to have an IC₅₀ of 85.573pg/mL, which indicates the TGF-Beta 3 refolded according to the invention, has at least an equivalent potency (biological activity) to TGF-Beta 3 produced by the prior art methods.

CONCLUSIONS

From the Refold screening matrix of the conditions described in tables 1 and 2, three conditions produced correctly re-folded dimeric TGF-Beta 3:

1. 0.7M 2-(cylcohexylamino) ethanesulfonic acid (CHES), 2mM reduced Glutathione (GSH), 0.4mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.
2. 30mM taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.
3. 30mM taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 2mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.

The refold experimental conditions containing CHES were further optimised to maximise yield and reduce timelines. The optimal re-fold conditions contained 0.7M CHES, 1M NaCl, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.25mg/mL TGF-Beta 3 and pH 9.5, which completed refolding between 24-48 hours. This is significantly faster than 7 days using methods disclosed in patents: US 5,922,846, US 5,650,494 and EP-B-0433 225.

The optimised CHES re-fold was further purified and found to have comparable biological activity to a TGF-Beta 3 standard (NIBSC) and TGF-Beta 3 generated using the methodology disclosed in the prior art.

EXAMPLE 2

An industrial process was developed according to the second aspect of the invention.

Figure 10 provides an overview of the process whereas Figures 11-29 provide further details, in the form of flow diagrams, of the individual steps described in Figure 10.

CLAIMS

1. A method for folding a Transforming Growth Factor Beta, or a functional analogue thereof, into a dimeric, biologically active form comprising adding solubilized, unfolded monomeric growth factor to a solution containing:

(i) 2-(cyclohexylamino)-ethanesulfonic acid (CHES) or a functional analogue thereof; and

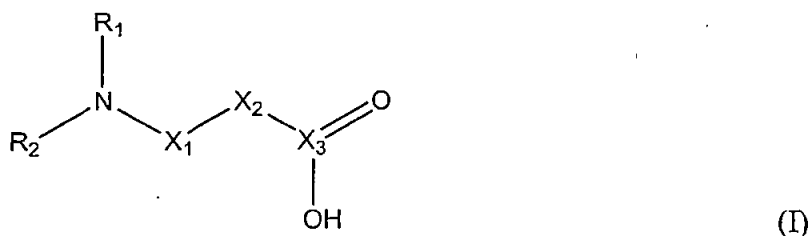
(ii) a low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system; and

incubating the growth factor in the solution until dimeric biologically active growth factor is formed.

2. The method according to claim 1 wherein CHES is used at a concentration of about 100mM–1.0M.

3. The method according to claim 2 wherein about 0.7M CHES is used.

4. The method according to any preceding claim, wherein the functional analogue of CHES is defined by the formula:



wherein:

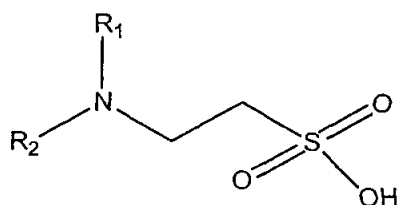
R₁ and R₂ are the same or different and are selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C₁₋₄ alkyl groups, substituted or unsubstituted C₃₋₈ cycloalkyl groups, or a substituted or unsubstituted aromatic nucleus, or R₁ and R₂ together form a ring system having up to 10 atoms;

X₁ and X₂ are independently selected from -O-, -S-, -S(O)-, -S(O₂)-, -NR₃-,

-CHR₄- and CHR₅ where R₃, R₄, and R₅ are the same or different and are independently selected from the group consisting of hydrogen, substituted or unsubstituted C₁₋₄ alkyl groups, substituted or unsubstituted C₃₋₈ cycloalkyl groups, or a substituted or unsubstituted aromatic nucleus or any two of R₃, R₄ and R₅ may together form a ring system having up to 6 carbon atoms, subject to the proviso that at least one of X₁ and X₂ is -CHR₄- or -CHR₅-; and

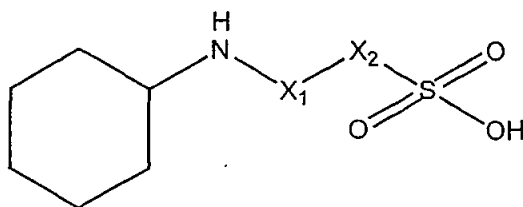
X₃ is selected from C, S, S=O, or P-OH

5. The method according to claim 4, wherein the functional analogue of CHES is defined by the formula:



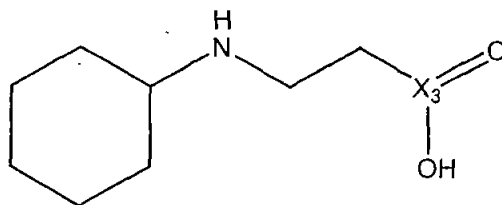
(Ia)

6. The method according to claim 4, wherein the functional analogue of CHES is defined by the formula:



(Ib)

7. The method according to claim 4, wherein the functional analogue of CHES is defined by the formula:



(Ic)

135

8. The method according to any preceding claim wherein the sulfhydryl/disulfide redox system is glutathione in its oxidised and reduced forms.

9. The method according to claim 8 wherein the sulfhydryl/disulfide redox system is about 200 μ M–20mM reduced glutathione and 40 μ M–4mM oxidised glutathione.

10. The method according to any preceding claim wherein the Transforming Growth Factor Beta is incubated at a pH of 8-10.

11. The method according to claim 10 wherein the Transforming Growth Factor Beta is incubated at a pH of between about 8.5 and 9.5.

12. The method according to any preceding claim wherein the Transforming Growth Factor Beta is incubated at temperatures of 0°C-37°C.

13. The method according to any preceding claim wherein the Transforming Growth Factor Beta is added to the solution at a concentration of between 0.1–0.5 mg/mL.

14. The method according to any preceding claim wherein the Transforming Growth Factor Beta is Transforming Growth Factor Beta 3.

15. The method according to claim 14 wherein the Transforming Growth Factor Beta 3 is added to the solution at a concentration of between about 0.12-0.25mg/mL

16. The method according to any preceding claim wherein folding is carried out under the following conditions: 0.7M 2-(cylcohexylamino) ethanesulfonic acid (CHES), 2mM reduced Glutathione (GSH), 0.4mM oxidised Glutathione (GSSG), 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.

17. The method according to any one of claims 1-16 wherein folding is carried out under the following conditions: 0.7M CHES, 1M NaCl, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.25mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C/room temperature.
18. The method according to any preceding claim wherein taurodeoxycholate is also added to the solution.
19. The method according to claim 17 wherein the Transforming Growth Factor beta is incubated with taurodeoxycholate at a concentration of between 10mM-100mM.
20. The method according to claim 19 wherein the Transforming Growth Factor beta is incubated with Taurodeoxycholate at a concentration of about 30mM.
21. The method according to any preceding claim wherein folding is carried out under the following conditions: 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 0.4mM GSSG, 0.12mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C;
22. The method according to any one of claims 1 - 21 wherein folding is carried out under the following conditions: 30mM Taurodeoxycholate, 0.7M CHES, 2mM GSH, 2mM GSSG, 0.25mg/mL TGF-Beta 3, pH 9.5 at 2-8°C.
23. The method according to any preceding claim wherein the Transforming Growth Factor Beta represents more than 50% of the protein in the solution.
24. The method according to any preceding claim wherein the a low molecular weight sulfhydryl/disulfide redox system is made up and aged for about 7 hours before the Transforming Growth Factor Beta is added to the solution containing the system.
25. A method of producing an active Transforming Growth Factor Beta from a prokaryotic host, the method comprising:

- (A) fermentation of prokaryotic organisms that have been transformed to express a member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily;
- (B) isolation of inclusion bodies and recovery of expressed protein from the inclusion bodies;
- (C) refolding of the member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily according to the first aspect of the invention; and
- (D) purification of the refolded the member of the Transforming Growth Factor Beta superfamily.

26. The method according to claim 25 wherein in step (A) the prokaryotic host is a bacterium that has been transformed with an expression vector encoding a Transforming Growth Factor Beta.

27. The method according to claim 25 or 26 wherein in step (C) the growth factor is refolded according to any one of claims 1 - 24.

28. The method according to any one of claims 25 - 27 wherein Transforming Growth Factor Beta is purified according to step (D) by ultrafiltration and ion exchange chromatography.

29. The method according to claim 28 wherein the ion exchange chromatography comprises hydrophobic interaction chromatography followed by cation exchange chromatography.

wherein the Transforming Growth Factor Beta growth factor is formulated at a desired concentration in a solution and placed in vials.

30 28. The method according to any one of claims 25 - 27 wherein the method comprises a further step (E) wherein the growth factor is formulated at a desired concentration in a solution and placed in vials.

31 29. The method according to any one of claims 25 - 28 wherein the method essentially comprises the steps (A) - (E) as defined in Figure 10.

138

P122995WO ST25 sequence listing
SEQUENCE LISTING

<110> Renovo Ltd
Ferguson, Mark
Mellors, Phil
Lavery, Hugh
Occleston, Nick
O'Kane, Sharon
Higginbottom, Simon

<120> PROTEIN FOLDING

<130> P90081PWO

<150> GB0604964.7

<151> 2006-03-11

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 336

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gctttggaca ccaattactg cttccgcaac ttggaggaga actgctgtgt gcgcccctc 60
tacattgact tccgacagga tctgggctgg aagtgggtcc atgaacctaa gggctactat 120
gccaacttct gtcaggccc ttgccatac ctccgcagtg cagacacaac ccacagcag 180
gtgctgggac tgtacaacac tctgaaccct gaagcatctg cctcgccttg ctgctgccc 240
caggacctgg agcccctgac catcctgtac tatgttggga ggacccccaa agtggagcag 300
ctctccaaca tgggtggtgaa gtcttgtaaa tgtagc 336

<210> 2

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sense primer

<400> 2

gatataccat ggctttggac accaattact actgc 35

<210> 3

<211> 37

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Sense primer

<400> 3

cagccggatc cggtcgactc agctacattt acaagac 37

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial

P122995WO ST25 sequence listing

<220>

<223> T7 promoter primer

<400> 4

taatacgact cactataggg

20

<210> 5

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> T7 terminator primer

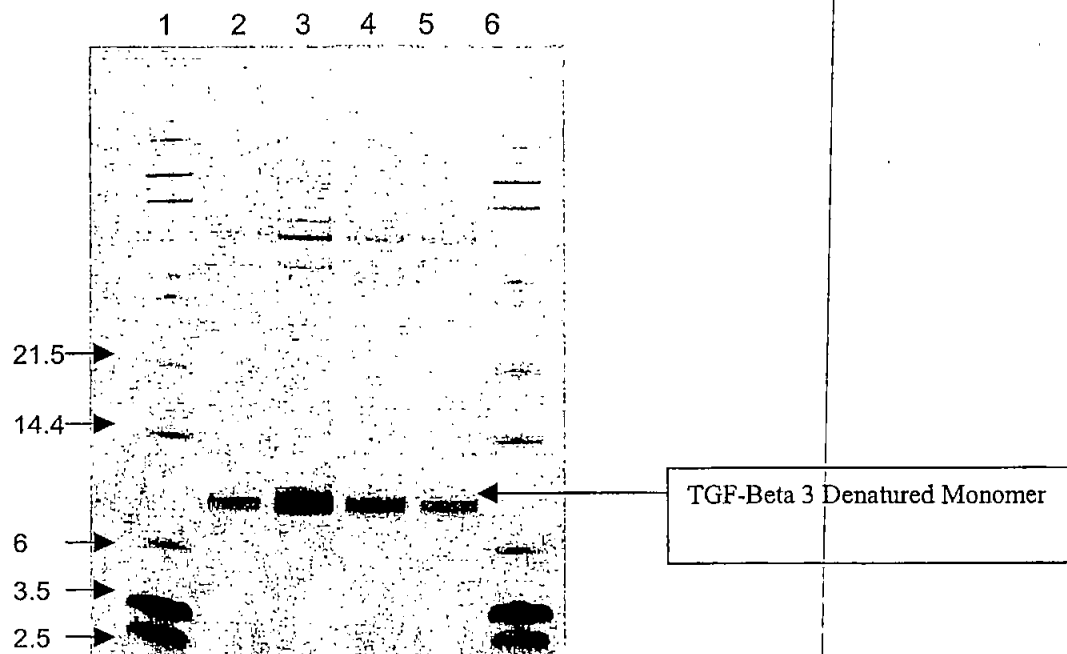
<400> 5

gctagttatt gctcagcgg

19

130

140

FIG. 1

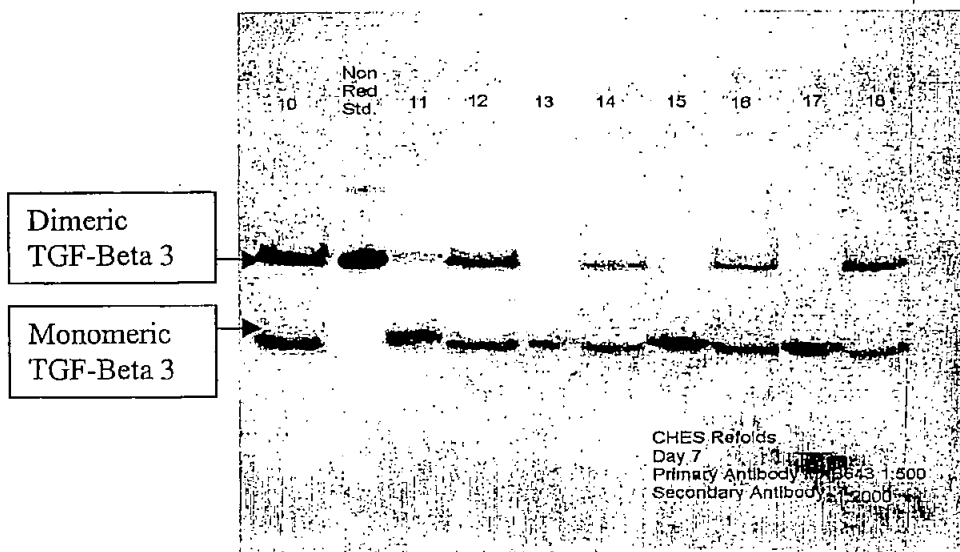
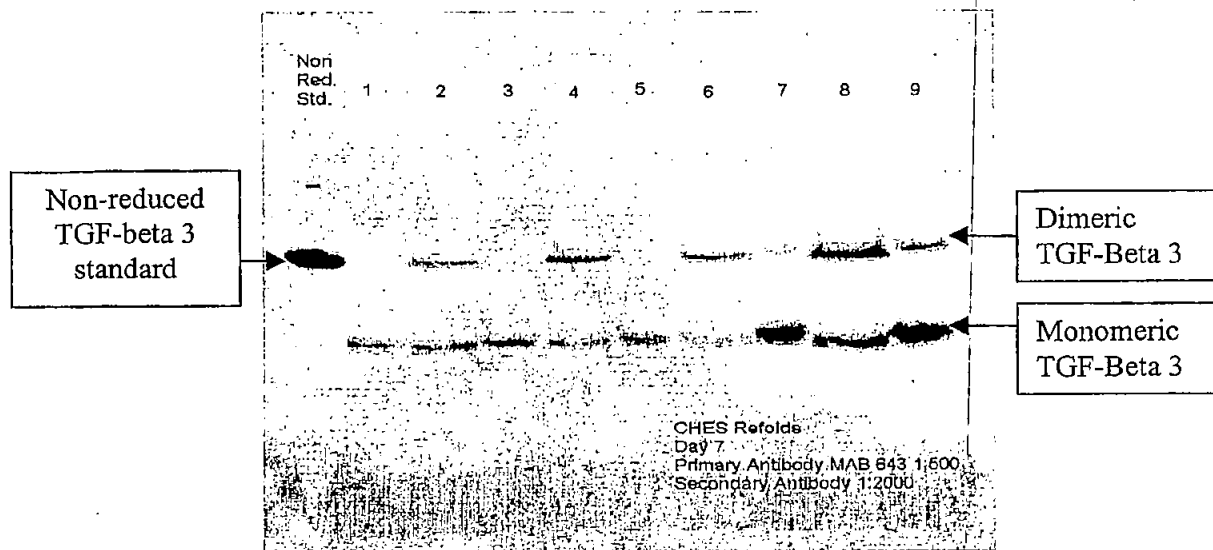
Lane	Sample
1	Mark 12 Standard
2	Clone1 3hr Post-Induction (3μL)
3	Clone 2 3hr Post-Induction (3μL)
4	Clone 3 3hr Post-Induction (3μL)
5	Clone 4 3hr Post-Induction (3μL)
6	Mark 12 standard

141

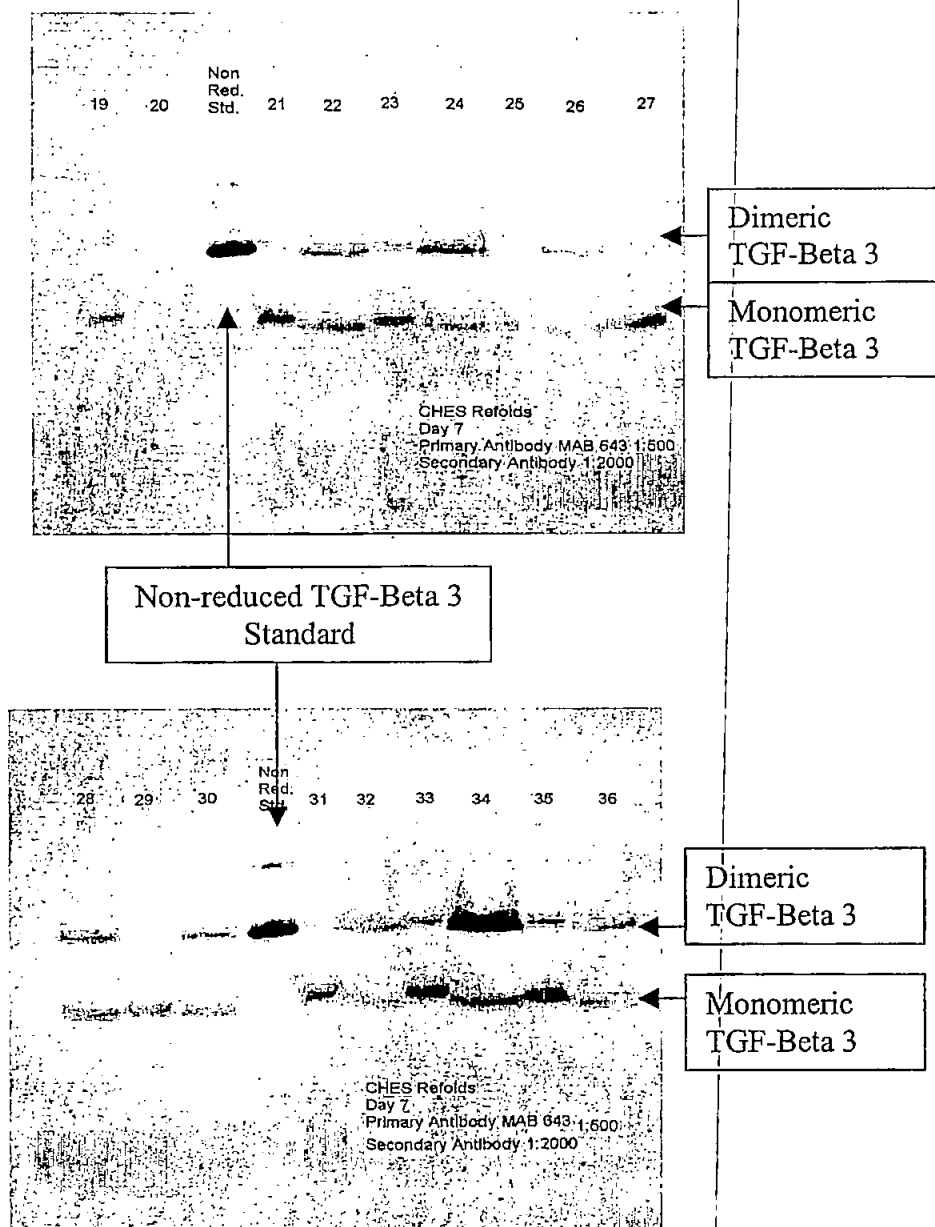
FIG. 2

142

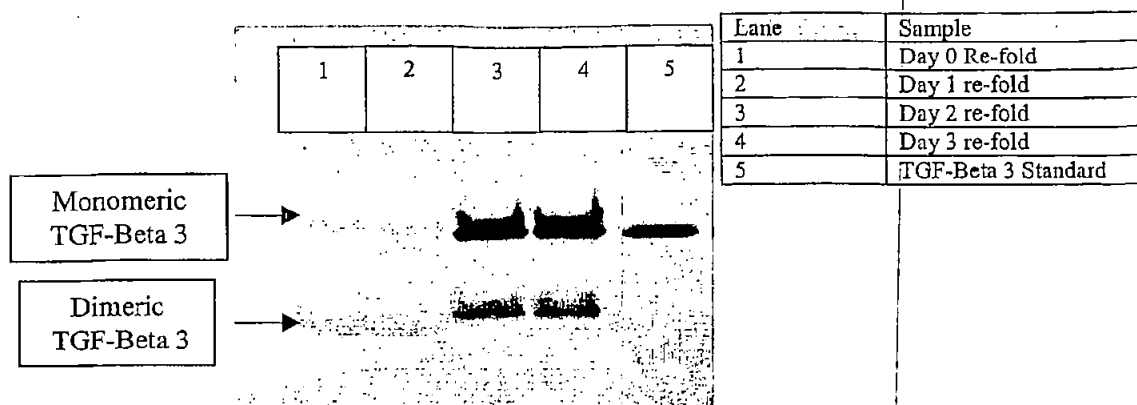
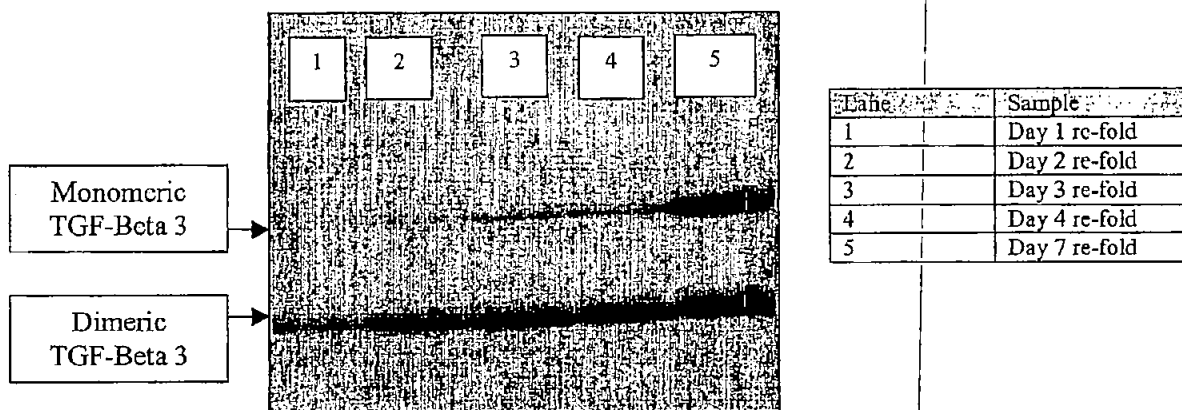
FIG. 3



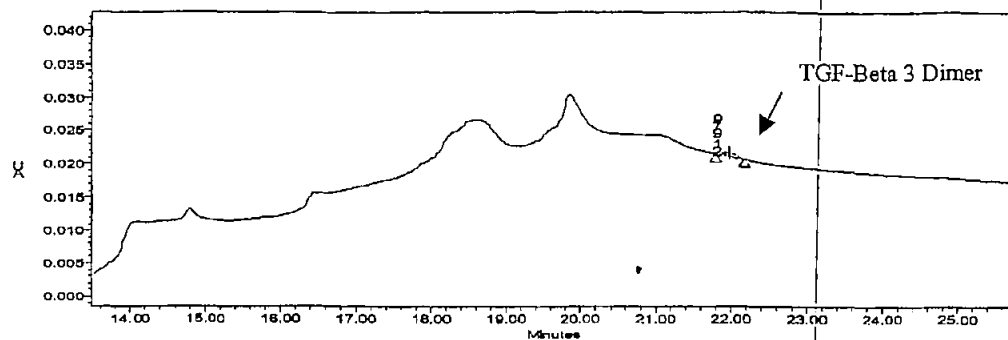
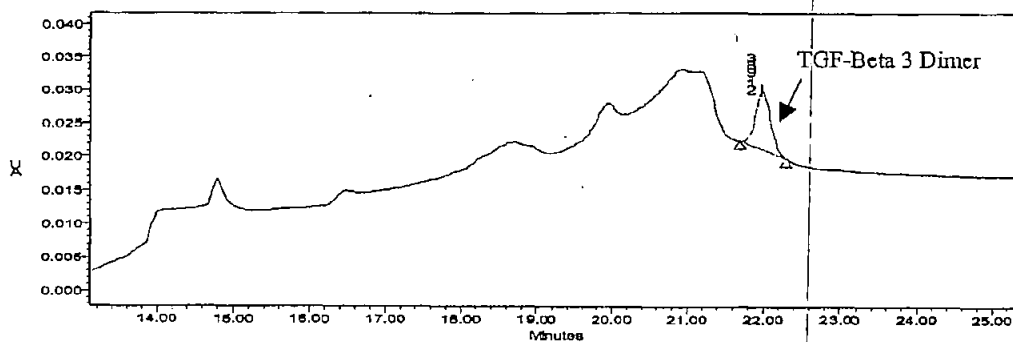
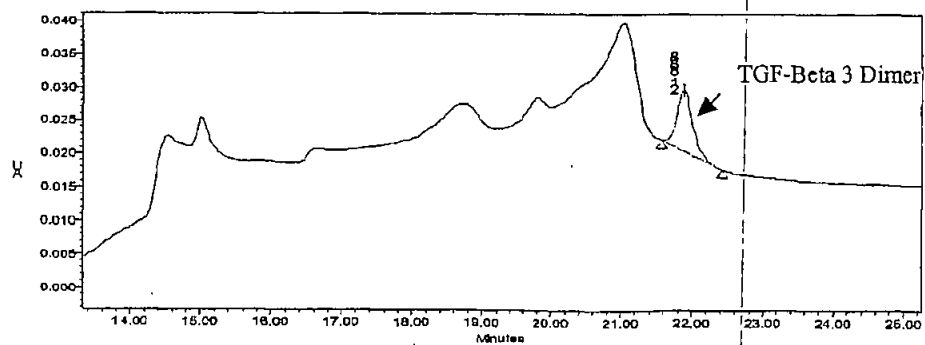
149

FIG. 4

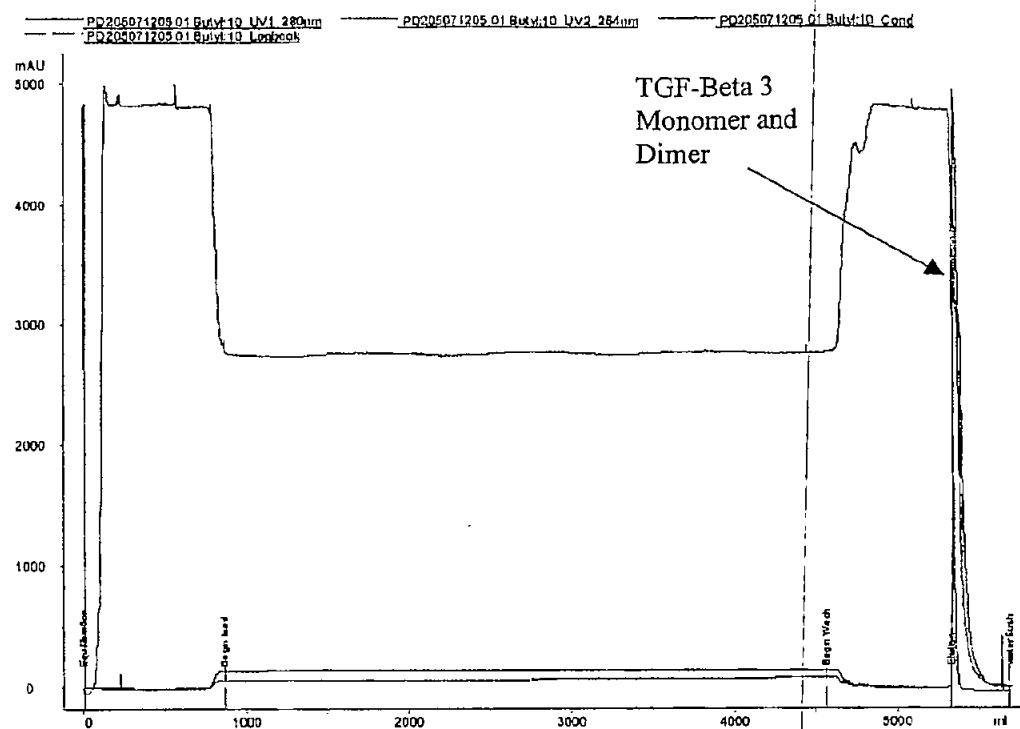
144

FIG. 5**FIG. 6**

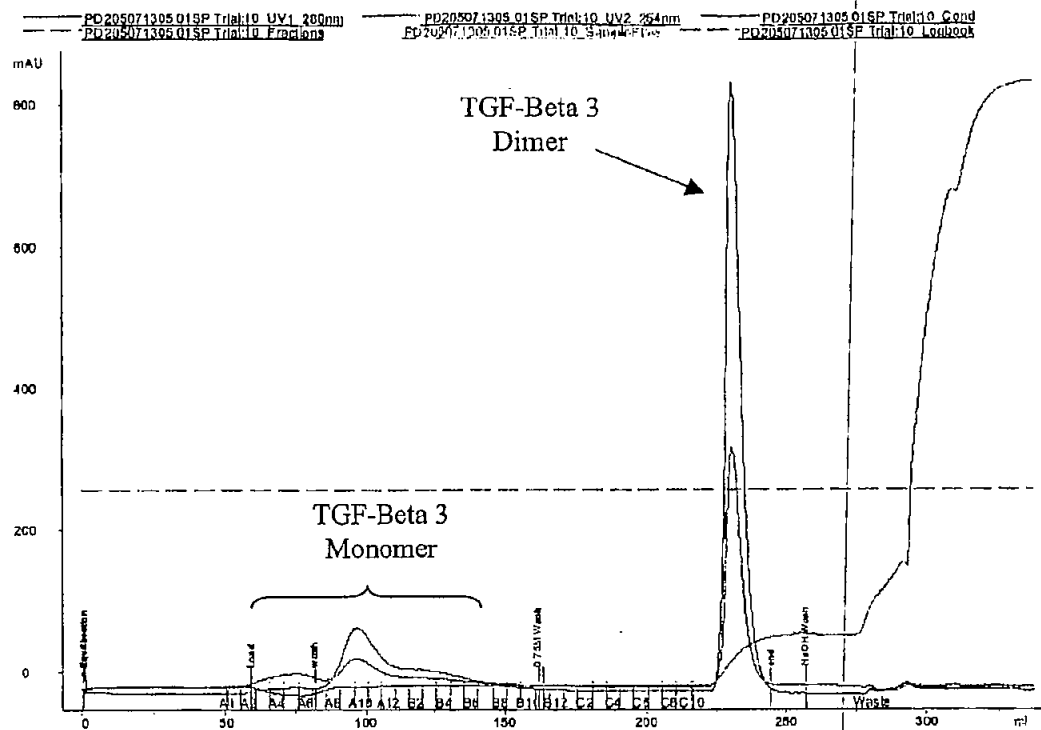
145

FIG. 7**(A)****(B)****(C)**

146

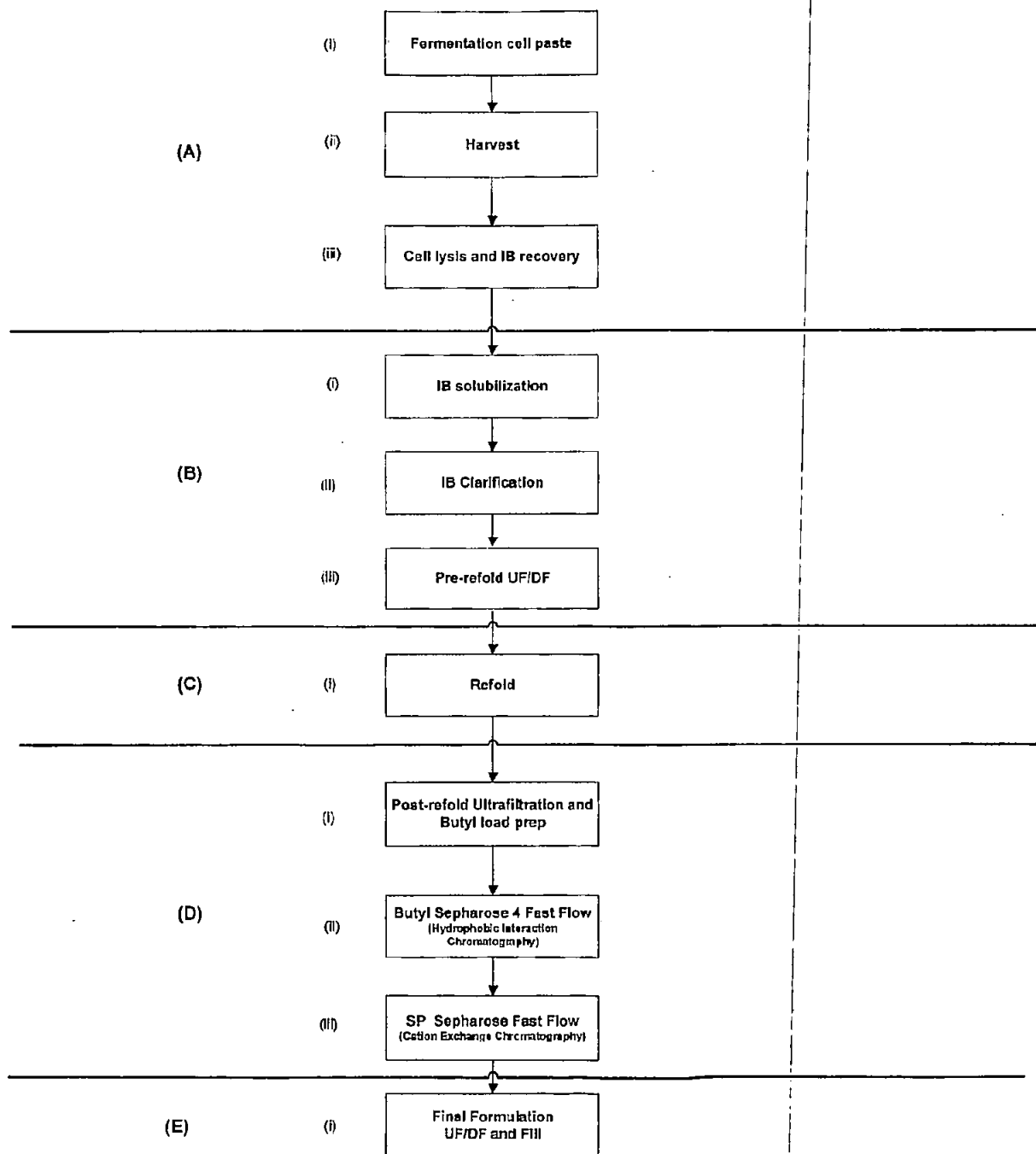
FIG. 8

147

FIG. 9

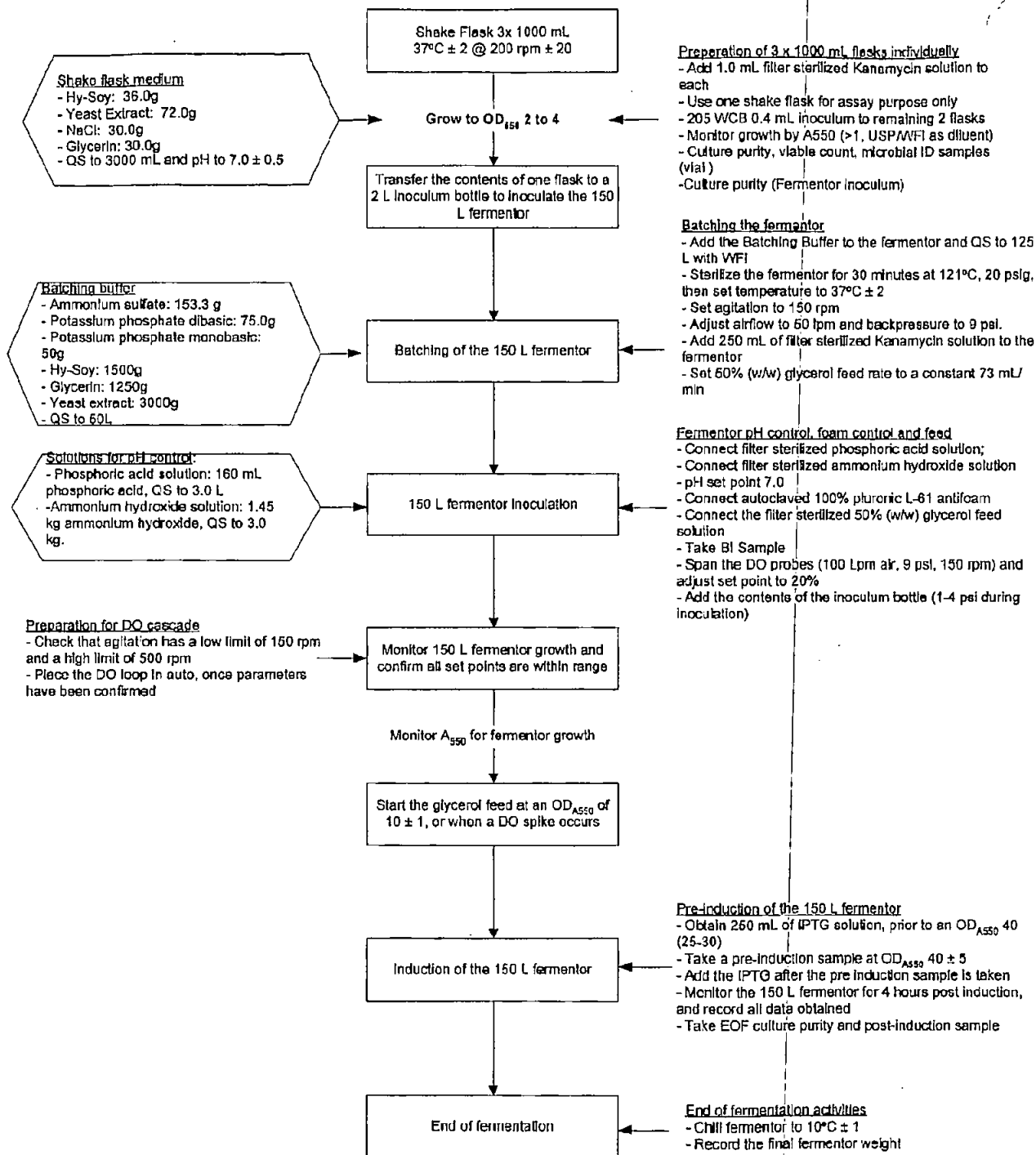
148

FIG 10



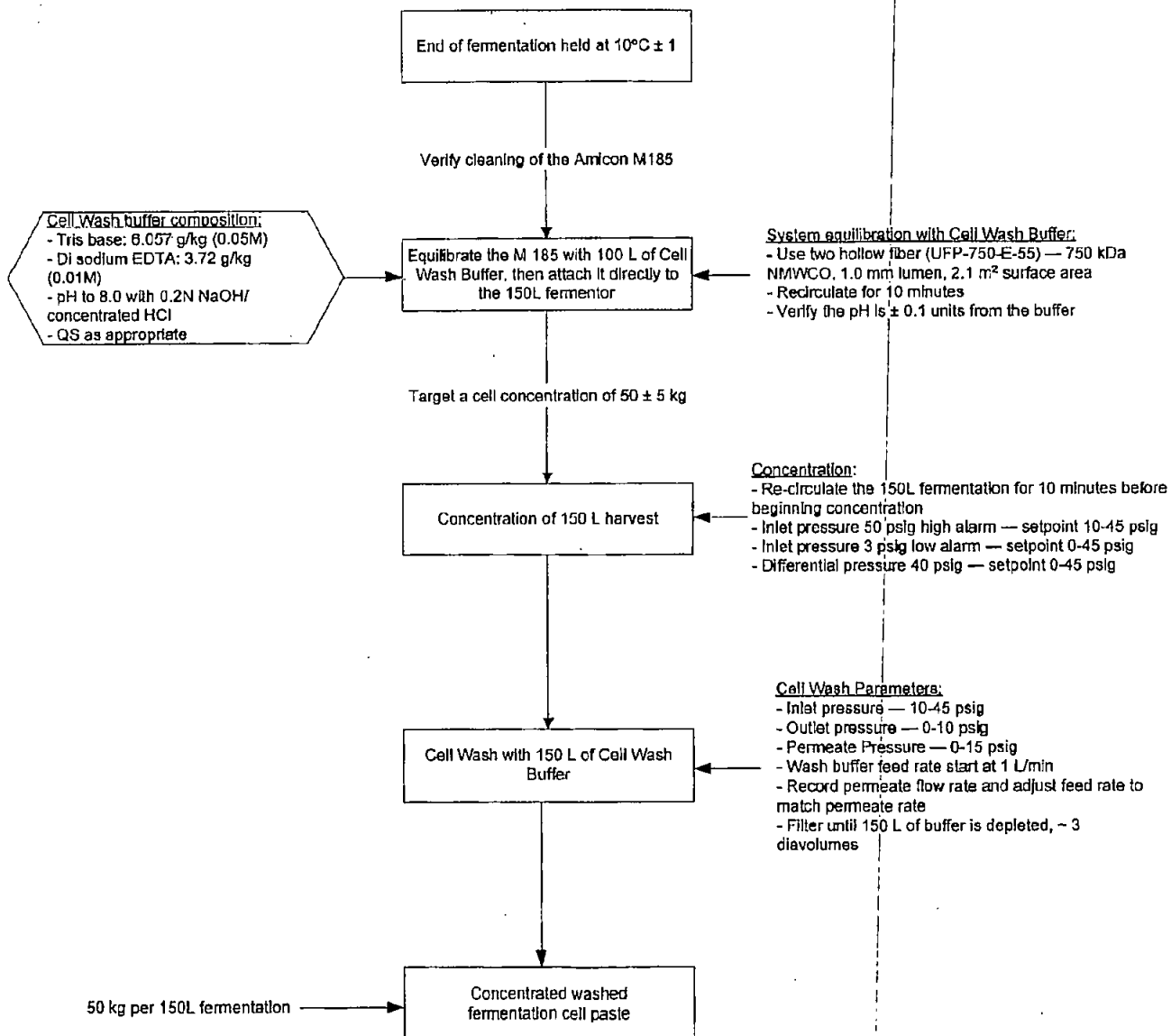
149

FIG 11



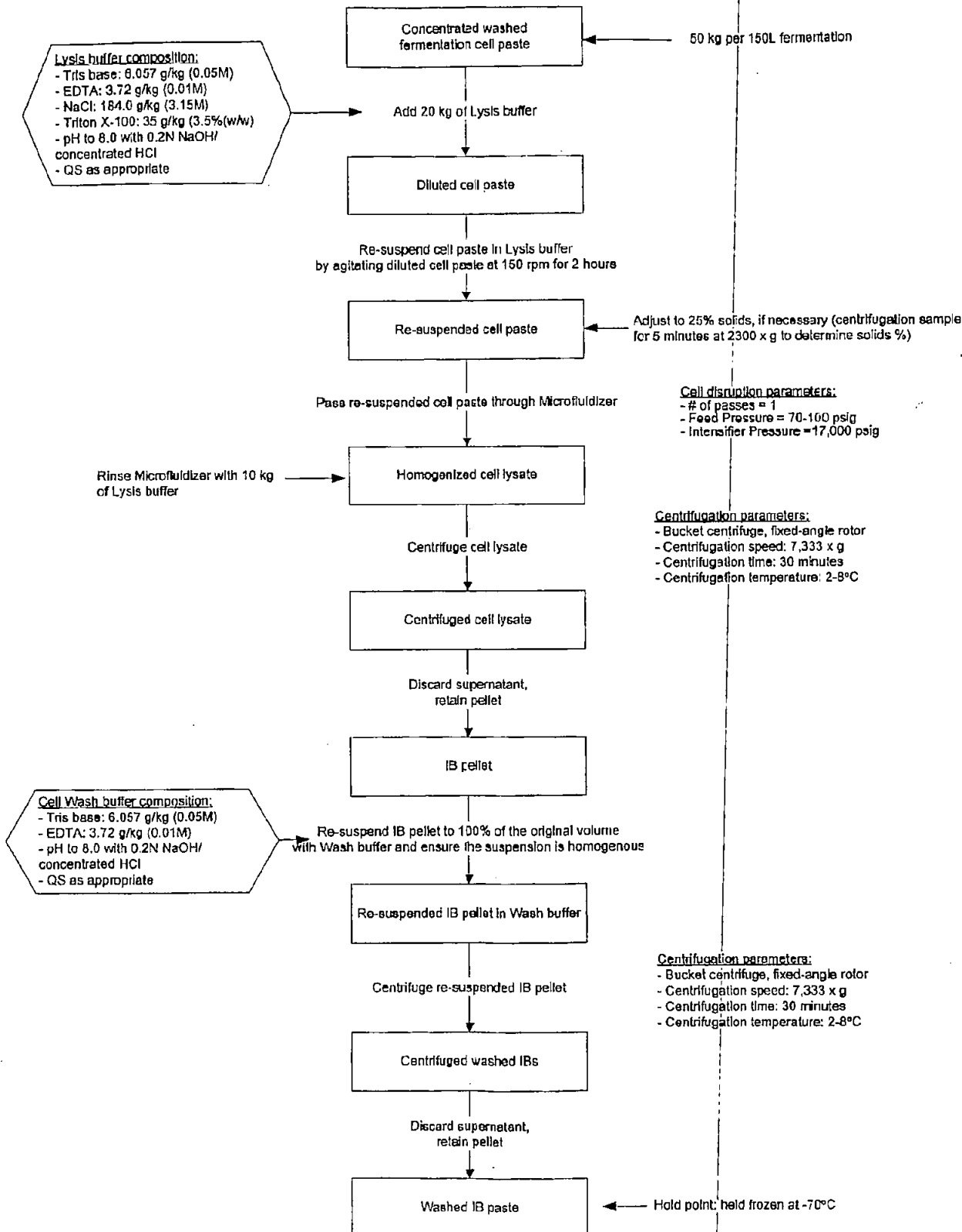
051

FIG 12



1510

FIG 13

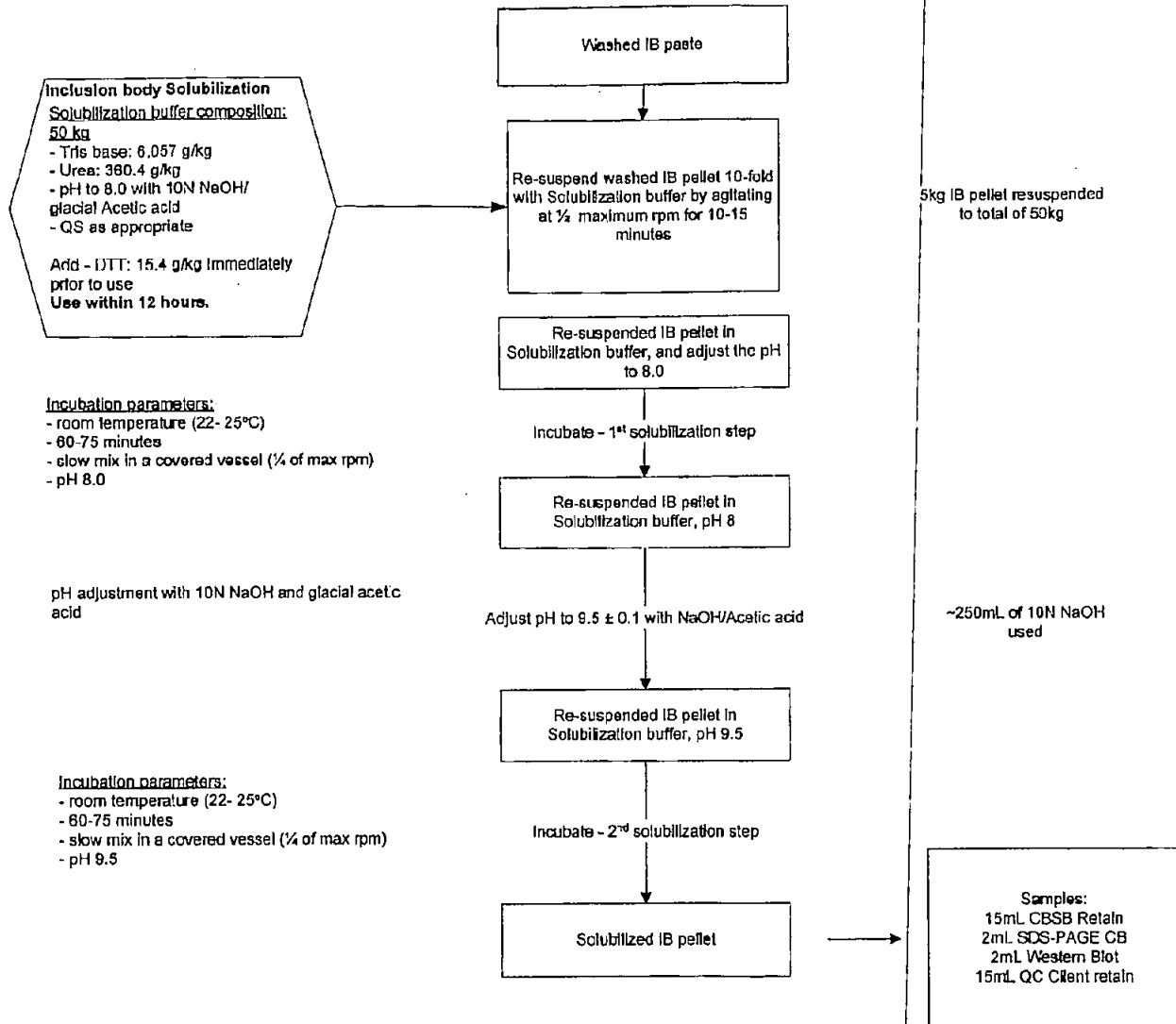


152

Input

FIG 14

Output



15

FIG 15

(A)

UF/DF membrane flush:

- Flush with USP P/W and clean per 05.116, for new filters, prior to use

Clarification TFF membrane:
8 0.5m² Millipore Pellicon 1000 kDa,
regenerated cellulose, screen V (4m²)
on Millipore Prostat system

Flush membrane with
DI water

Flushed clarification TFF membrane

(B)

UF/DF membrane flush:

- Flush with USP and clean per 05.116,
for new filters, prior to use

UF/DF membrane:
8 0.5m² Millipore Pellicon 5 kDa,
regenerated cellulose, screen C (4m²)
on Millipore Prostat system

Flush membrane with
DI water

Flushed UF/DF membrane

154

FIG 16A

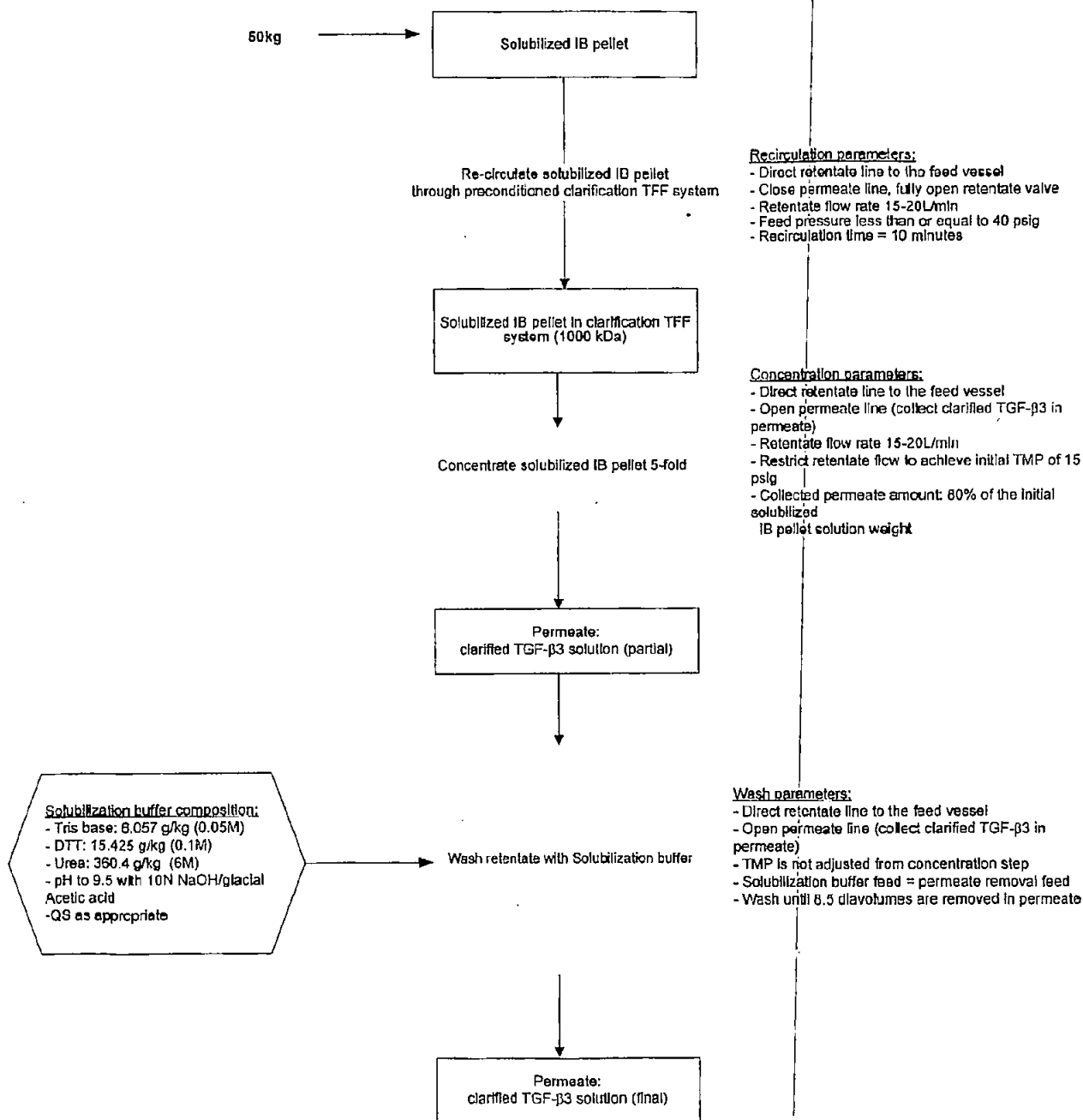
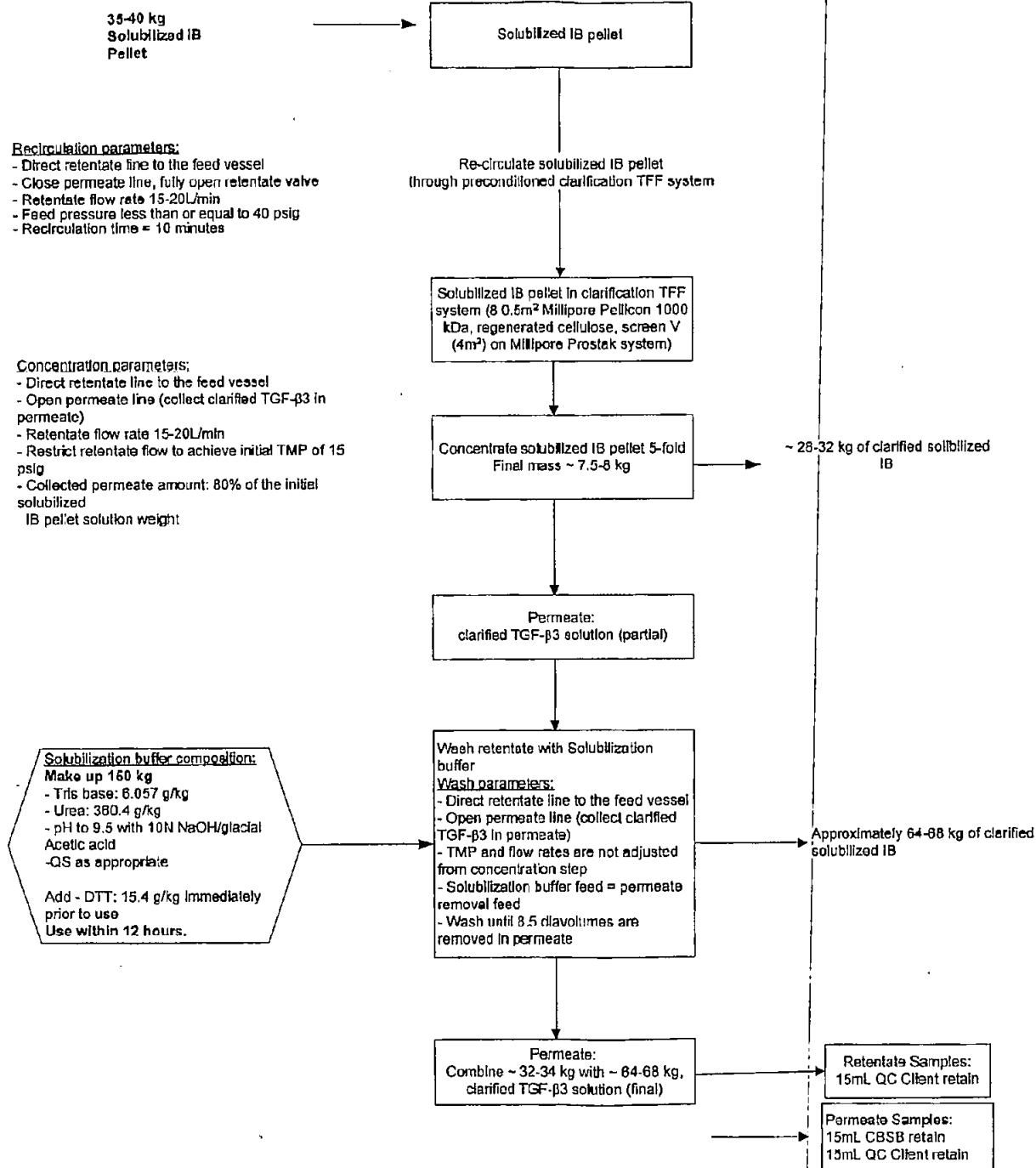


FIG 16B

Input

Output



156

FIG 17A

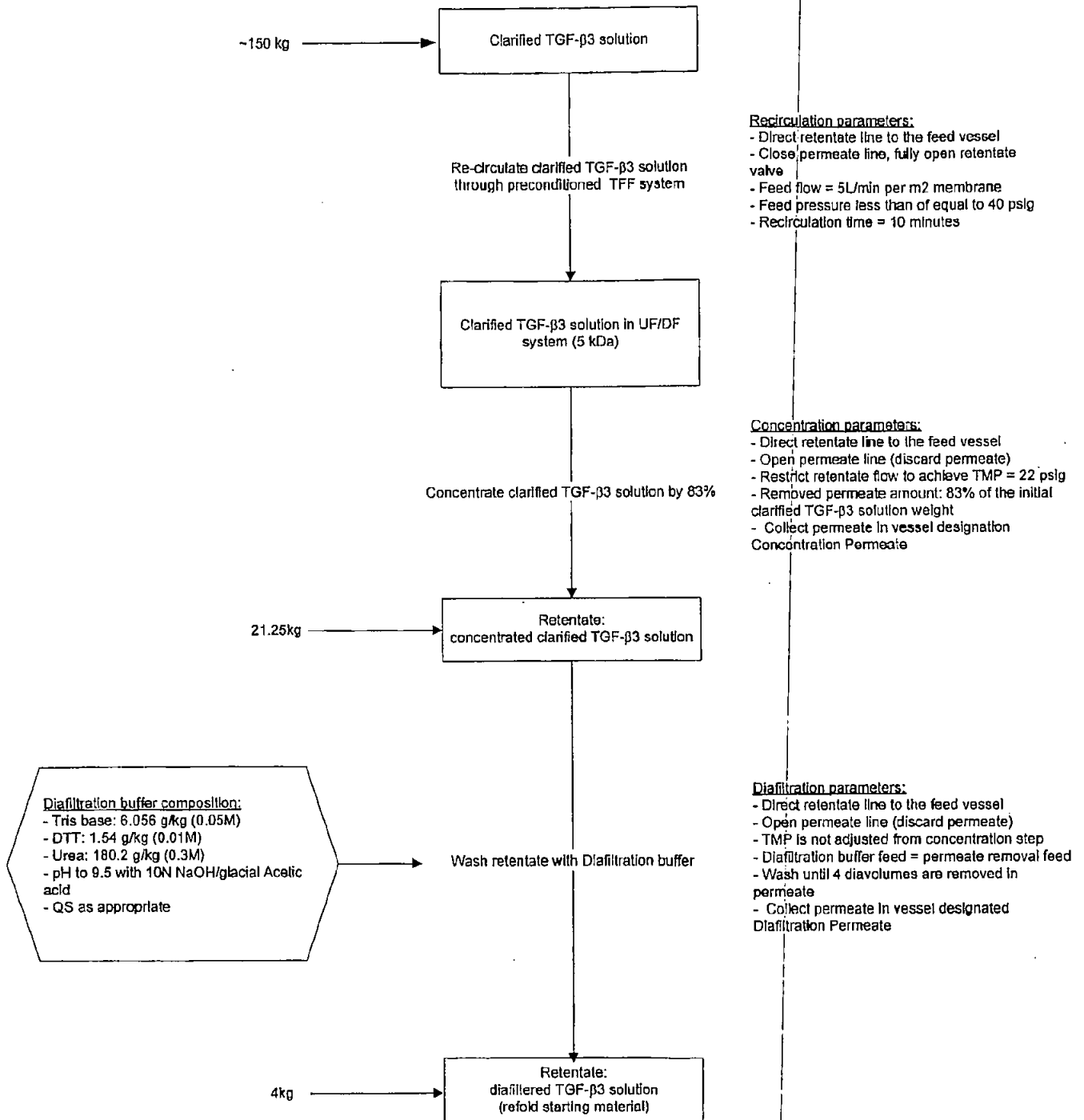


FIG 17B

Input

Output

~100 kg Clarified IB Solution

Recirculation parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
- Close permeate line, fully open retentate valve
- Feed flow = 20L/min
- Feed pressure less than or equal to 40 psig
- Recirculation time = 10 minutes

Concentration parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
 - Open permeate line (discard permeate)
 - Retentate flow rate 15-20L/min
 - Restrict retentate flow to achieve TMP = 22 psig
 - Removed permeate amount: 83% of the initial clarified TGF- β 3 solution weight
 - Collect permeate in vessel designation
- Concentration
Permeate

Diafiltration parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
 - Open permeate line (discard permeate)
 - TMP and flow rate are not adjusted from concentration step
 - Diafiltration buffer feed = permeate removal feed
 - Wash until 4 diavolumes are removed in permeate
 - Collect permeate in vessel designated
- Diafiltration
Permeate

Diafiltration buffer composition:

Make up 89 kg

- Tris base: 8.056 g/kg
- DTT: 1.54 g/kg
- Urea: 180.2 g/kg
- pH to 9.5 with 10N NaOH/glacial Acetic acid
- QS as appropriate

Initiation of the TFF Diafiltration operation must be started no earlier than 7 hours after preparation of the buffer and no later than 8 hours after preparation buffer.

Clarified TGF- β 3 solution

Re-circulate clarified TGF- β 3 solution through preconditioned TFF system.

Clarified TGF- β 3 solution in UF/DF system (8 0.5m² Millipore Pellicon 5 kDa, regenerated cellulose, screen C (4m²) on Millipore ProstaK system)

Concentrate clarified TGF- β 3 solution by 83%

~83 kg of permeate

Retentate:
concentrated clarified TGF- β 3 solutionRetentate Samples:
15mL QC Client retainPermeate Samples:
15mL QC Client retain

Diafiltration of concentrated TGF- β 3 solution
~12-17 kg

~88 kg of diafiltration permeate

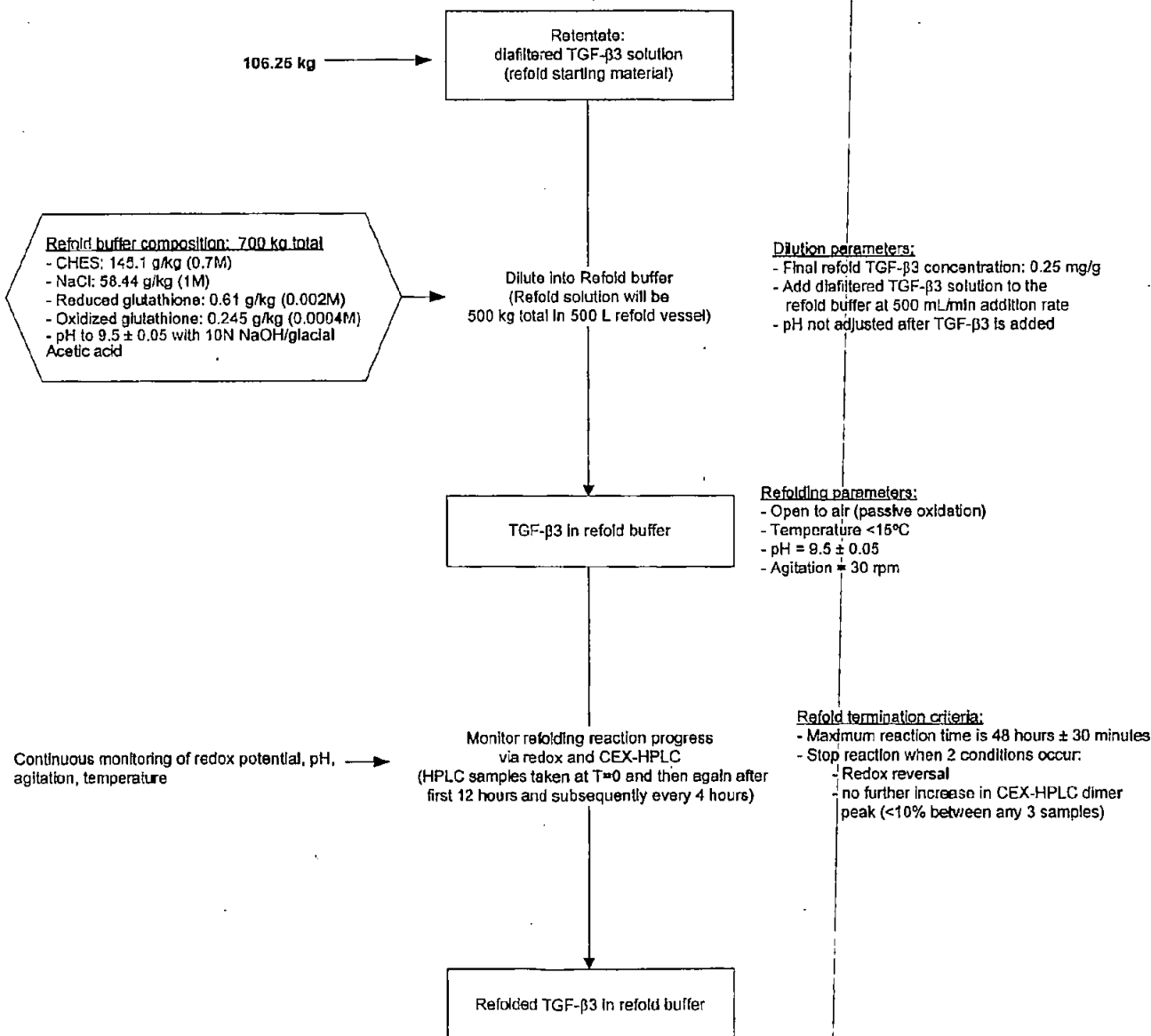
Retentate:
diafiltered TGF- β 3 solution
(refold starting material)

Retentate Samples:
15mL QC Client retain
15mL CBSB retain
10mL RC/DC assay
2mL Non red SDS-PAGE CB

Permeate Samples:
15mL QC Client retain

151

FIG 18A

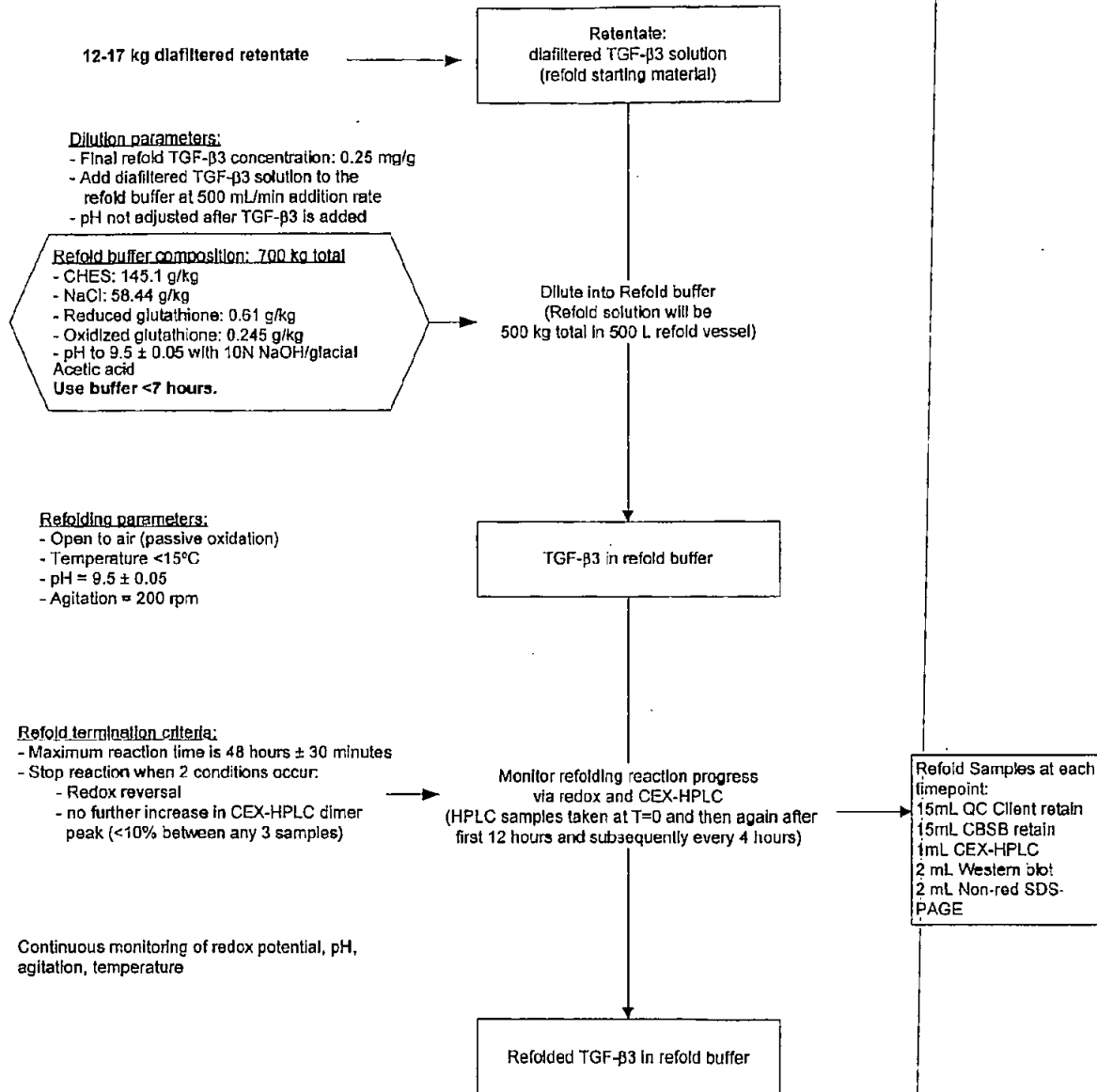


651

FIG 18B

Input

Output



160

FIG 19

Post-refold UF membrane flush:

- Direct permeate and retentate lines to waste
- Fully open retentate valve
- DI water feed at 224L/min
- Open permeate line, restrict retentate flow until transmembrane pressure is 10 psig
- Flush with DI water for 90 minutes
- Determine holdup volume by draining the system

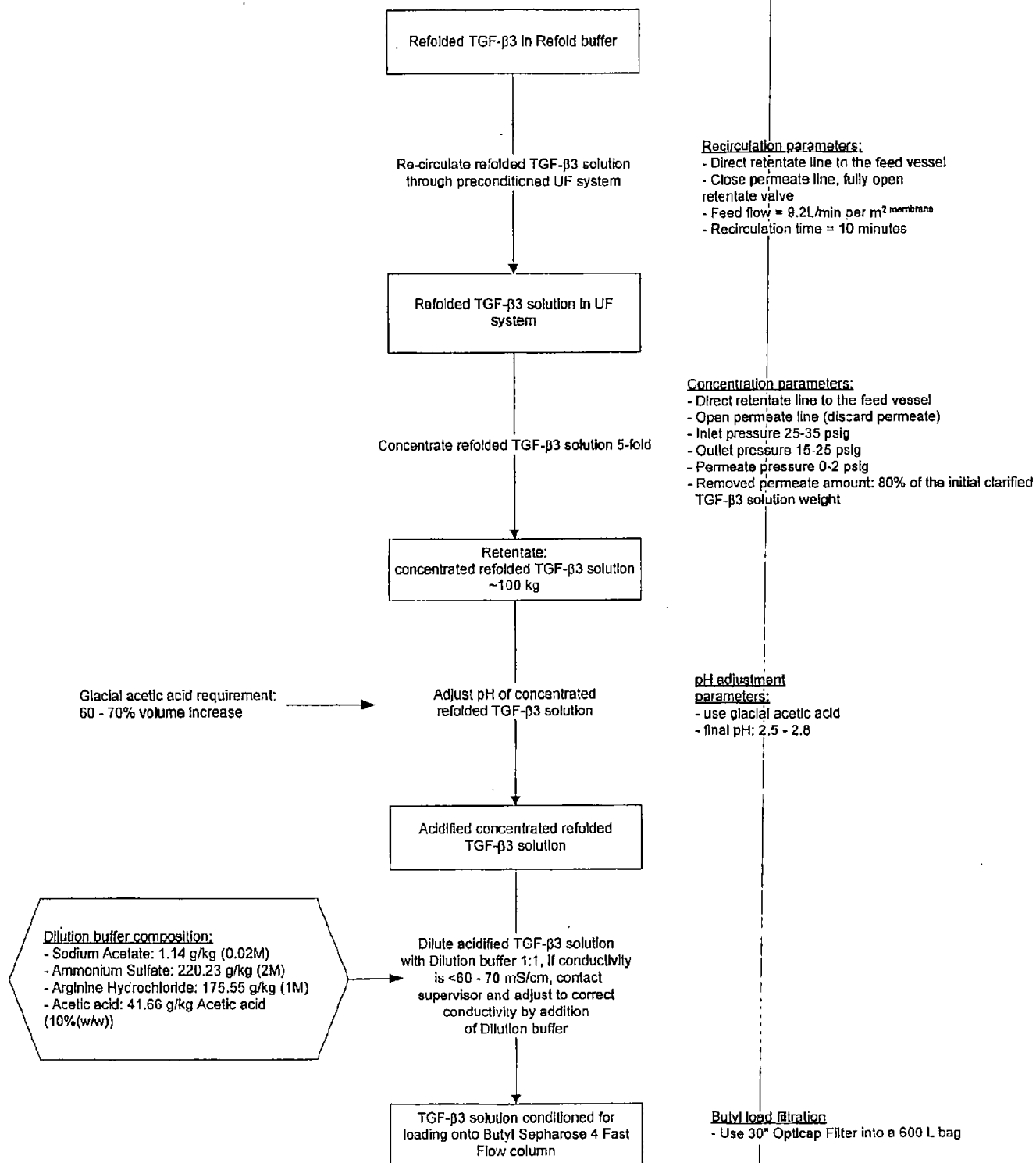
Post-refold UF membrane:
46.1m² GE Hollow Fiber 5 kDa, PES,
0.5 mm fiber ID, 60 cm nominal
flowpath (24.4m²)

Filters cleaned per 06.052

Flushed post-refold UF membrane

161

FIG 20A



162

FIG 20B

Input

Output

Recirculation parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
- Close permeate line, fully open retentate valve
- Feed flow = 224 L/min
- Recirculation time = 10 minutes

Concentration parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
- Open permeate line (discard permeate)
- Inlet pressure 25-35 psig
- Outlet pressure 15-25 psig
- Permeate pressure 0-2 psig
- Removed permeate amount: 80% of the initial clarified TGF- β 3 solution weight

pH adjustment parameters:

- use glacial acetic acid
- final pH: 2.5 - 2.8

Glacial acetic acid requirement:
60 - 70% volume increase

Dilution buffer composition:

- Make up 300 kg
- Sodium Acetate: 1.14 g/kg
 - Ammonium Sulfate: 220.23 g/kg
 - Arginine Hydrochloride: 175.55 g/kg
 - Acetic acid: 41.66 g/kg Acetic acid

Butyl load filtration

- Use 30" Opticap Filter Into a 600 L bag

~500 kg

Refolded TGF- β 3 in Refold buffer

Re-circulate refolded TGF- β 3 solution
through preconditioned UF system

Refolded TGF- β 3 solution in UF
system (4 6.1m² GE Hollow Fiber 5
kDa, PES, 0.5 mm fiber ID, 60 cm
nominal flowpath (24.4m²))

Concentrate refolded TGF- β 3 solution 5-fold

Permeate Samples:
15mL QC Client retain

Retentate:
concentrated refolded TGF- β 3 solution
~100 kg

Retentate Samples:
15mL QC Client retain
15mL CBSB retain
2 ml SDS-PAGE CB

Adjust pH of concentrated
refolded TGF- β 3 solution with acid
addition through dip tube

Acidified concentrated refolded
TGF- β 3 solution
~150-200 kg

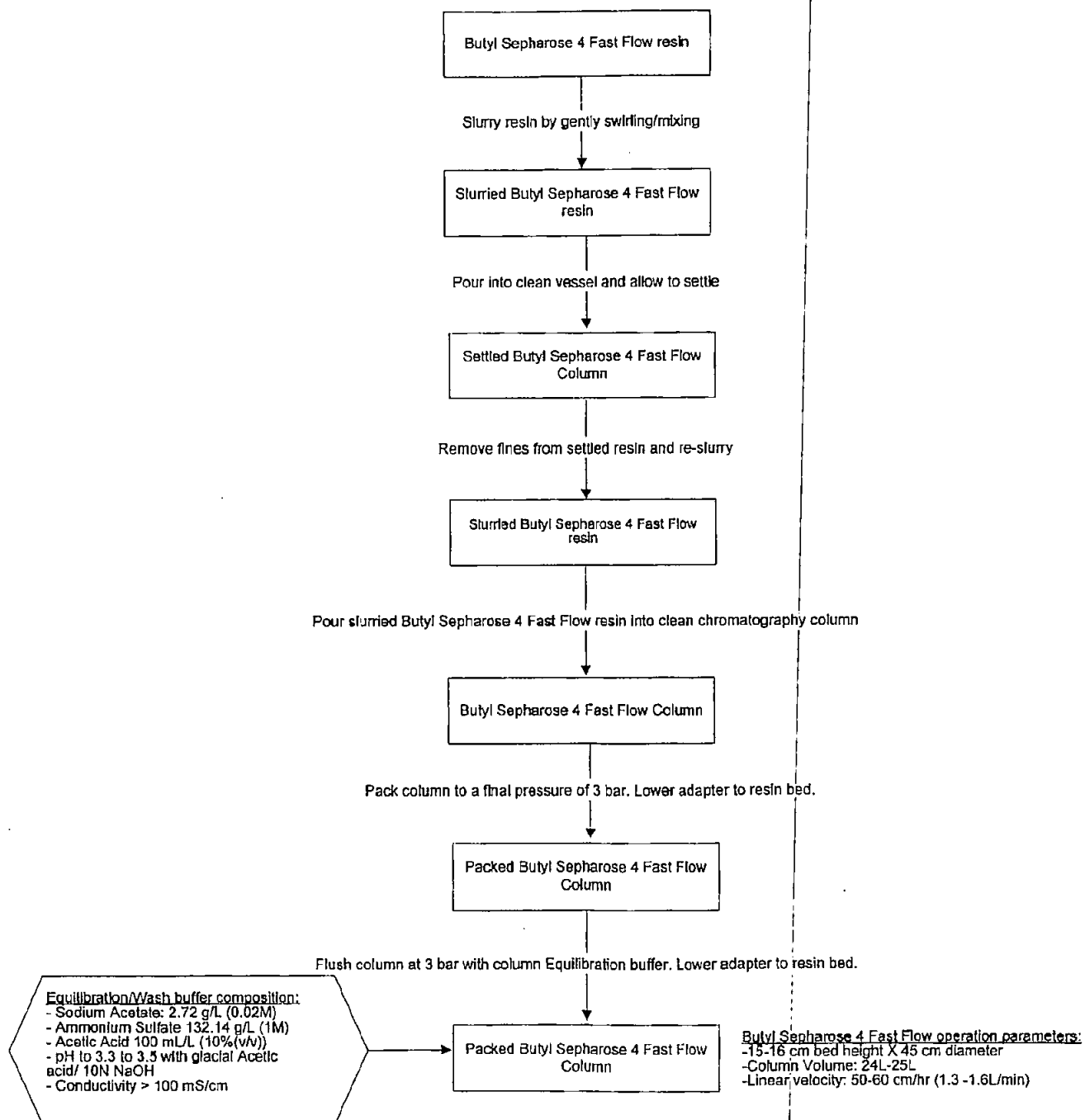
Acidified Refold
Samples:
15mL QC Client retain
15mL CBSB retain
2 ml SDS-PAGE CB

Dilute acidified TGF- β 3 solution
with Dilution buffer 1:1, if conductivity
is <60 mS/cm, contact
supervisor and adjust to correct
conductivity by addition
of Dilution buffer

TGF- β 3 solution conditioned for
loading onto Butyl Sepharose 4 Fast
Flow column
~300-400 kg

163

FIG 21A

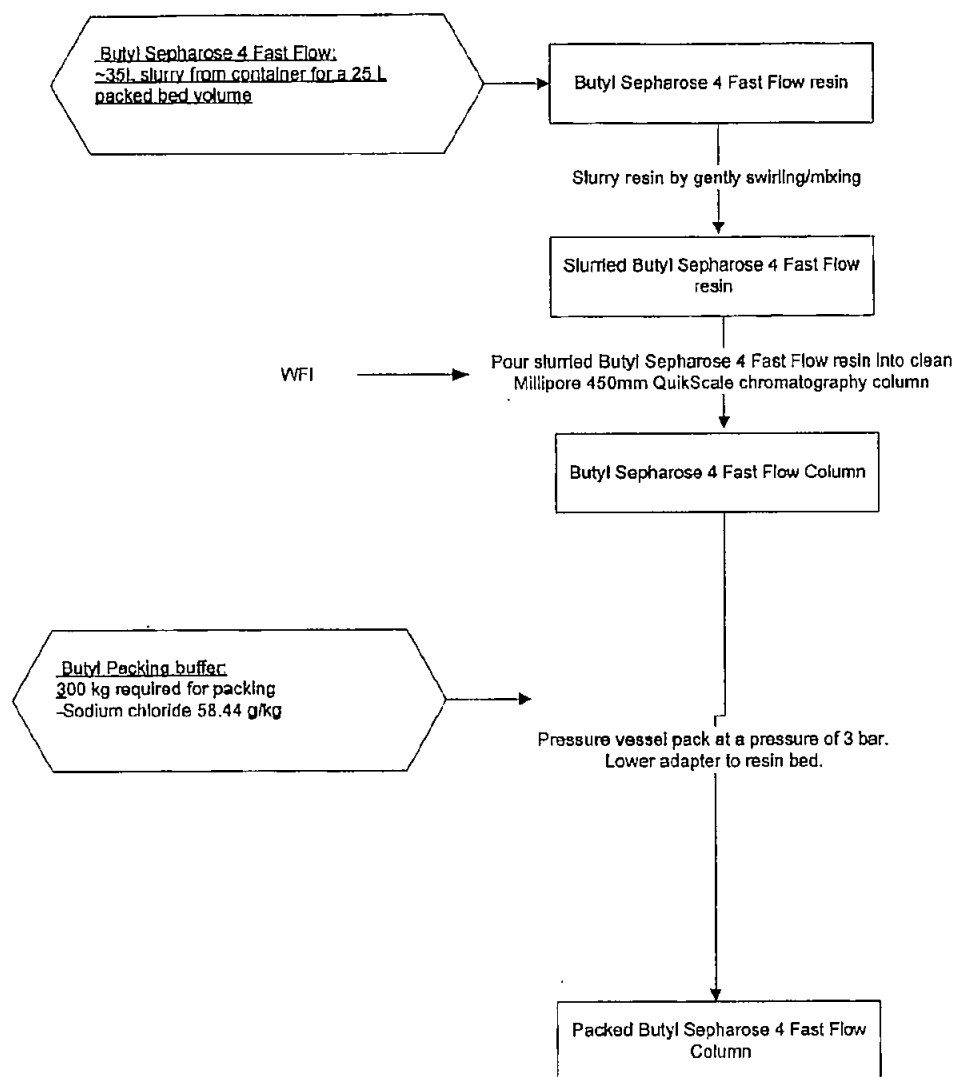


164

FIG 21B

Input

Output

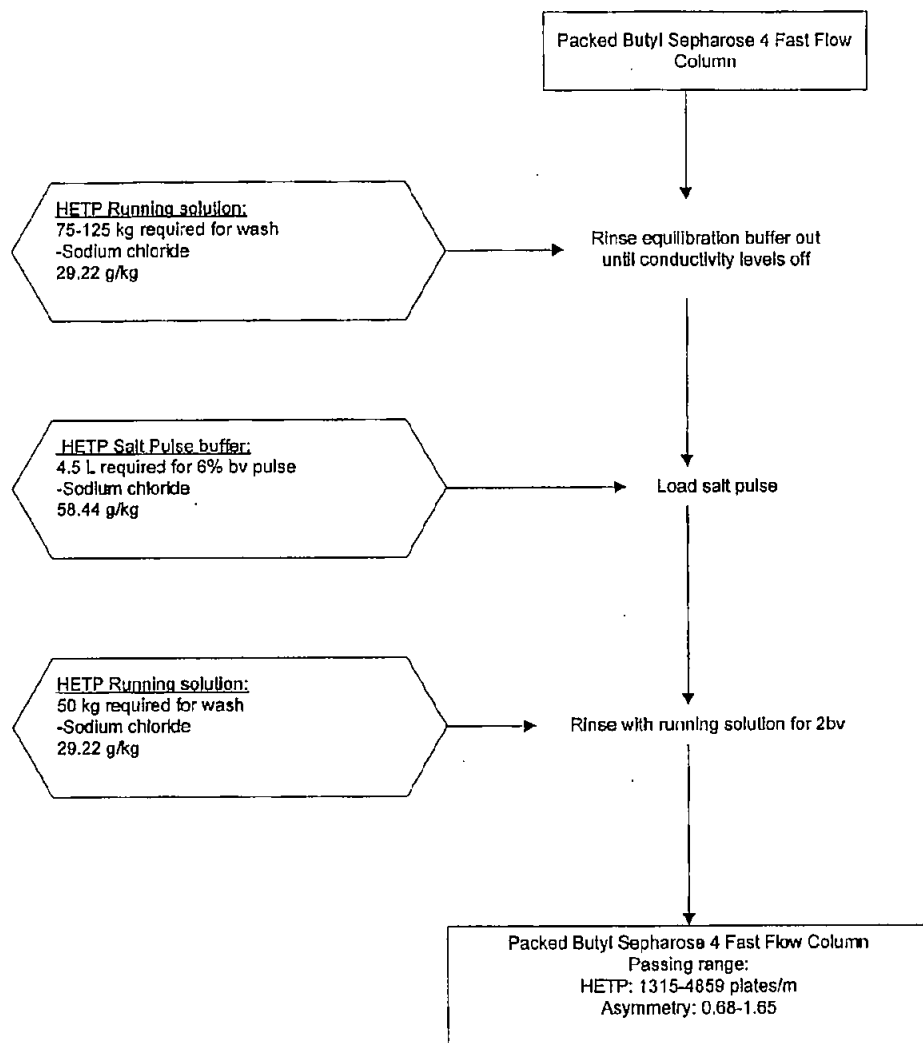


165

FIG 21B continued

Input

Output



166

FIG 22A

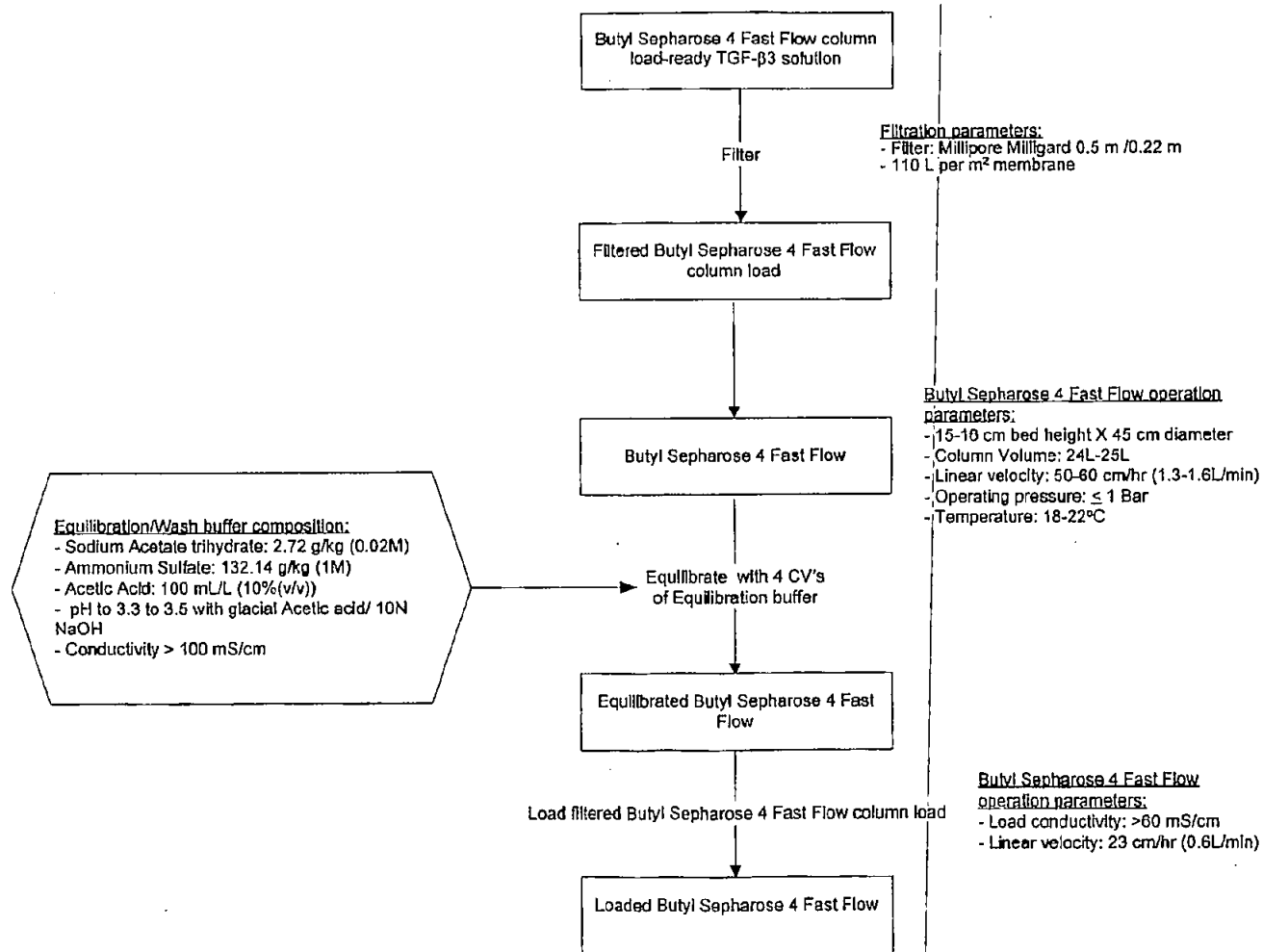
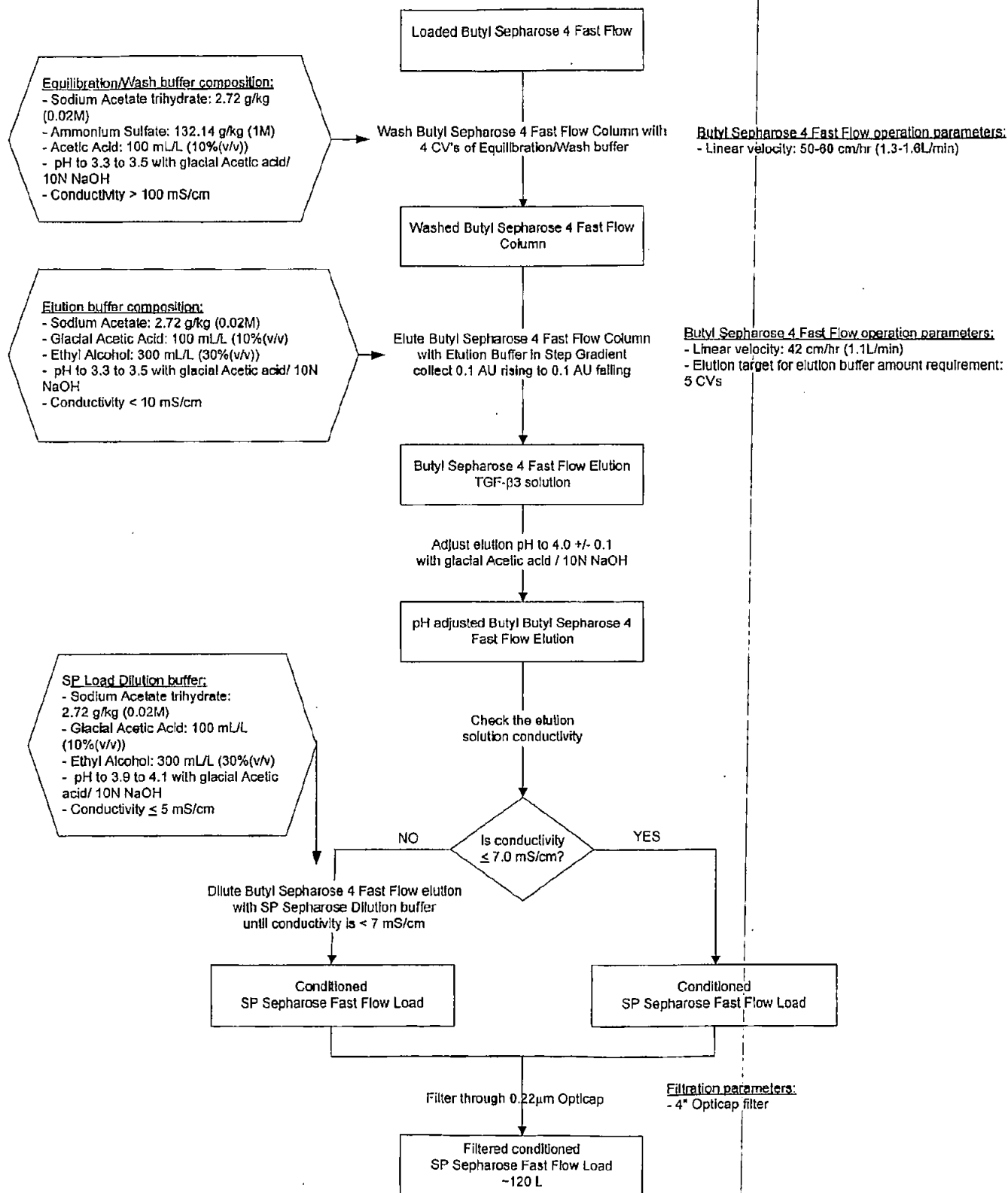


FIG 22A continued

Butyl Sepharose 4 Fast Flow (cont)

162



168

FIG 22B

Input

Output

Butyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- 15-16 cm bed height X 45 cm diameter
- Column Volume: 24L-25L
- Linear velocity: 50-60 cm/hr (1.3-1.6L/min)
- Operating pressure: ≤ 2.8 Bar
- Temperature: 18-22°C

Make up 200 kg for equilibration

Equilibration/Wash buffer composition:

- Sodium Acetate trihydrate: 2.72 g/kg
- Ammonium Sulfate: 132 g/kg
- Glacial Acetic Acid: 100 g/kg
- pH 1 to 3.3 to 3.5 with glacial Acetic acid/ 10N NaOH
- Conductivity > 100 mS/cm

Filtered Butyl Sepharose 4 Fast Flow
column load
~300-400 kg

Wash with 4 CV WFI

Butyl Sepharose 4 Fast Flow

Equilibrate with 4 CV's
of Equilibration buffer

Equilibrated Butyl Sepharose 4 Fast Flow

Load filtered Butyl Sepharose 4 Fast Flow column load

Loaded Butyl Sepharose 4 Fast Flow

Butyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- Load conductivity: >60 mS/cm
- Linear velocity: 23 cm/hr (0.6L/min)

Butyl Load Samples:
3 mL RC/DC
2 mL Reducing+
Nonreducing SDS-PAGE CB
2 mL Western blot
2 mL CEX-HPLC
5 mL Endotoxin
10 mL client retain
10 mL QC Retain
23 mL Microbial Bio burden

169

FIG 22B continued

Input

Butyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- Linear velocity: 50-60 cm/hr (1.3-1.6L/min)

Equilibration/Wash buffer composition:

Make up 200 kg for wash

- Sodium Acetate trihydrate: 2.72 g/kg
- Ammonium Sulfate: 132 g/kg
- Glacial Acetic Acid: 100 g/kg
- pH to 3.3 to 3.5 with glacial Acetic acid/ 10N NaOH
- Conductivity > 100 mS/cm

Butyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- Linear velocity: 42 cm/hr (1.1L/min)
- Elution target for elution buffer amount requirement: 5 CVs

Elution buffer composition:

Make up 200 kg

Make up 200 kg for elution

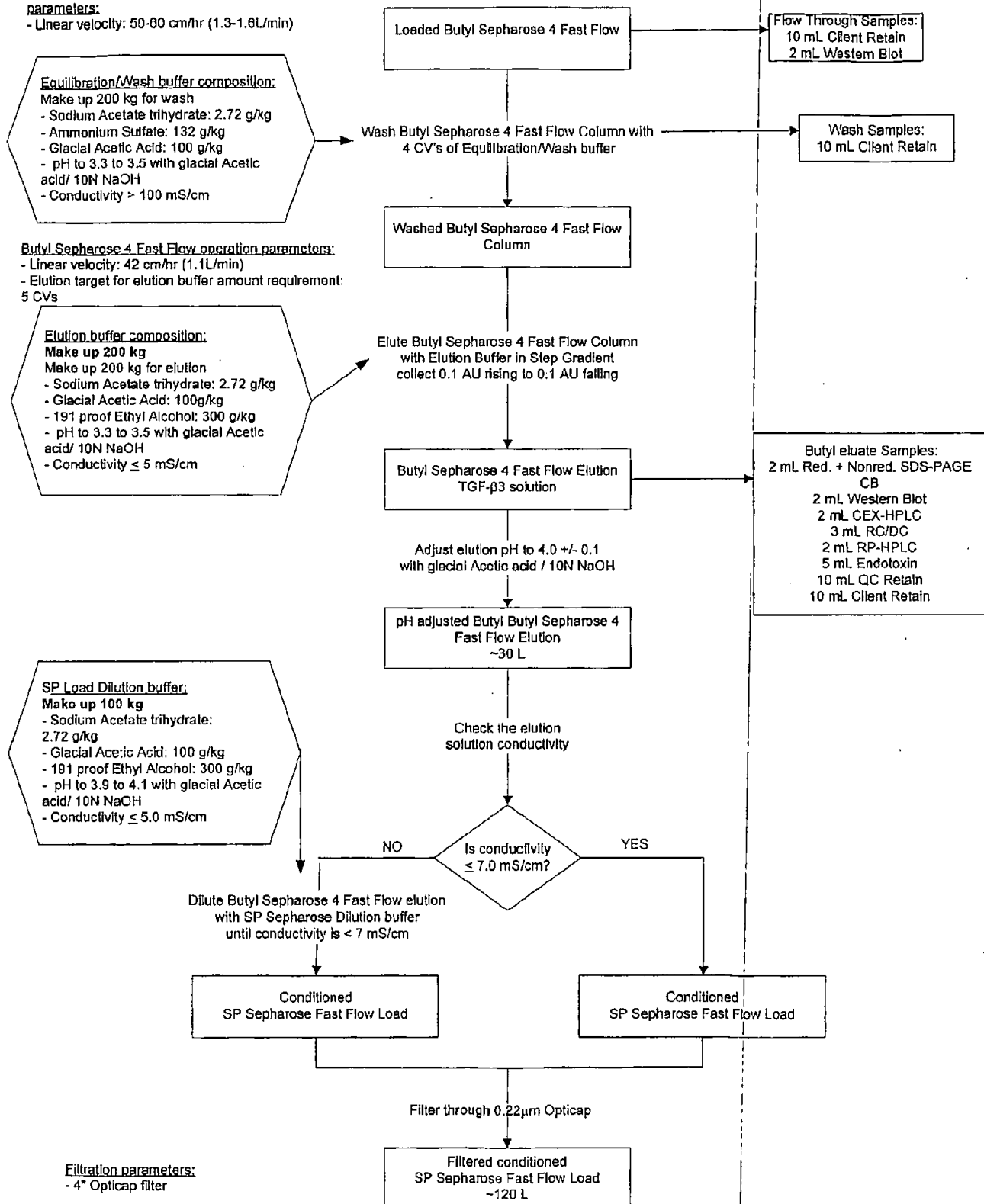
- Sodium Acetate trihydrate: 2.72 g/kg
- Glacial Acetic Acid: 100g/kg
- 191 proof Ethyl Alcohol: 300 g/kg
- pH to 3.3 to 3.5 with glacial Acetic acid/ 10N NaOH
- Conductivity $\leq$ 5 mS/cm

SP Load Dilution buffer:

Make up 100 kg

- Sodium Acetate trihydrate: 2.72 g/kg
- Glacial Acetic Acid: 100 g/kg
- 191 proof Ethyl Alcohol: 300 g/kg
- pH to 3.9 to 4.1 with glacial Acetic acid/ 10N NaOH
- Conductivity $\leq$ 5.0 mS/cm

Output

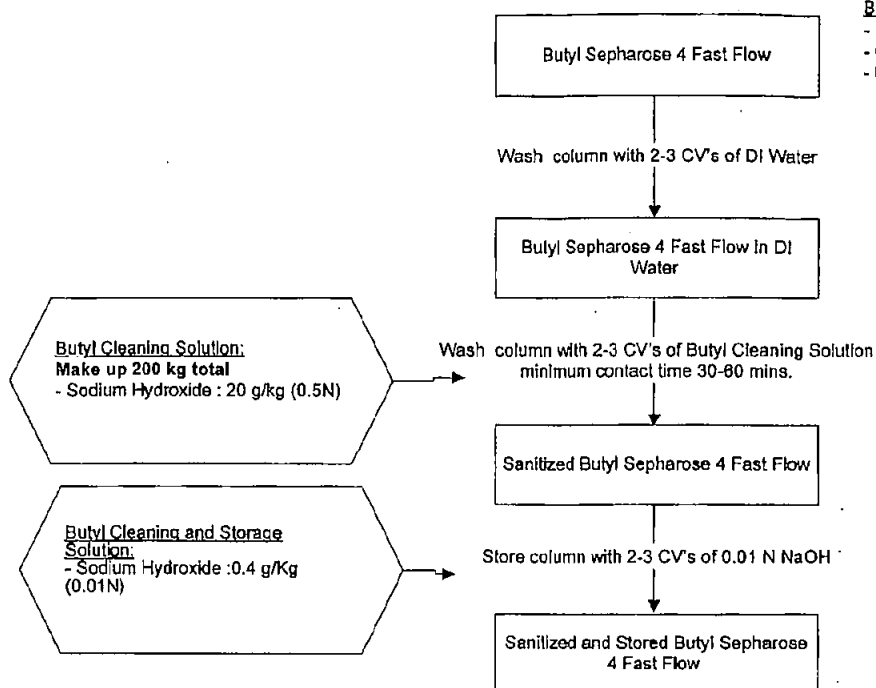
Filtration parameters:

- 4" Opticap filter

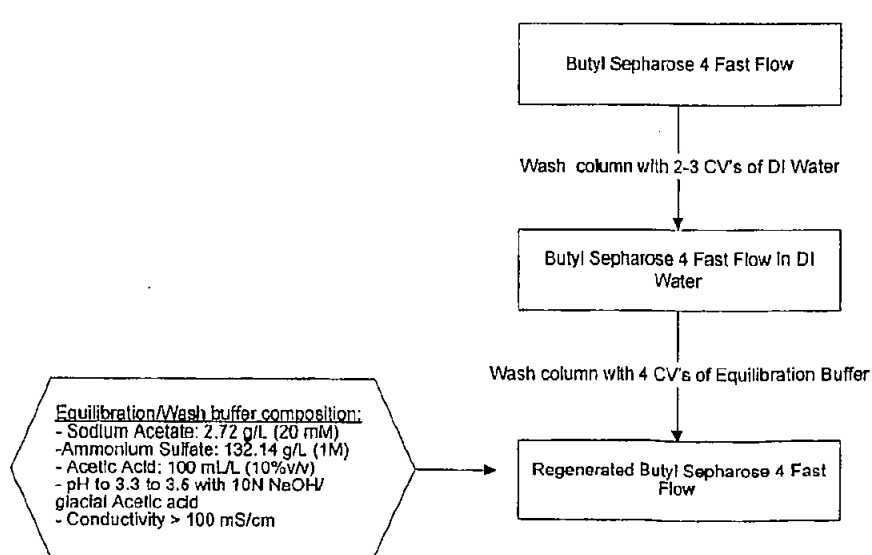
170

FIG 23A

Butyl Sepharose 4 Fast Flow Cleaning Post-Use

Butyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- 16 cm bed height X 45 cm diameter
- Column Volume: 24-25L
- Linear velocity: 40 cm/hr

Butyl Sepharose 4 Fast Flow Cleaning Pre-Use/
RegenerationButyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- 16 cm bed height X 45 cm diameter
- Column Volume: 24-25L
- Linear velocity: 50-60 cm/hr (16.4-20mL/min)

121

FIG 23B

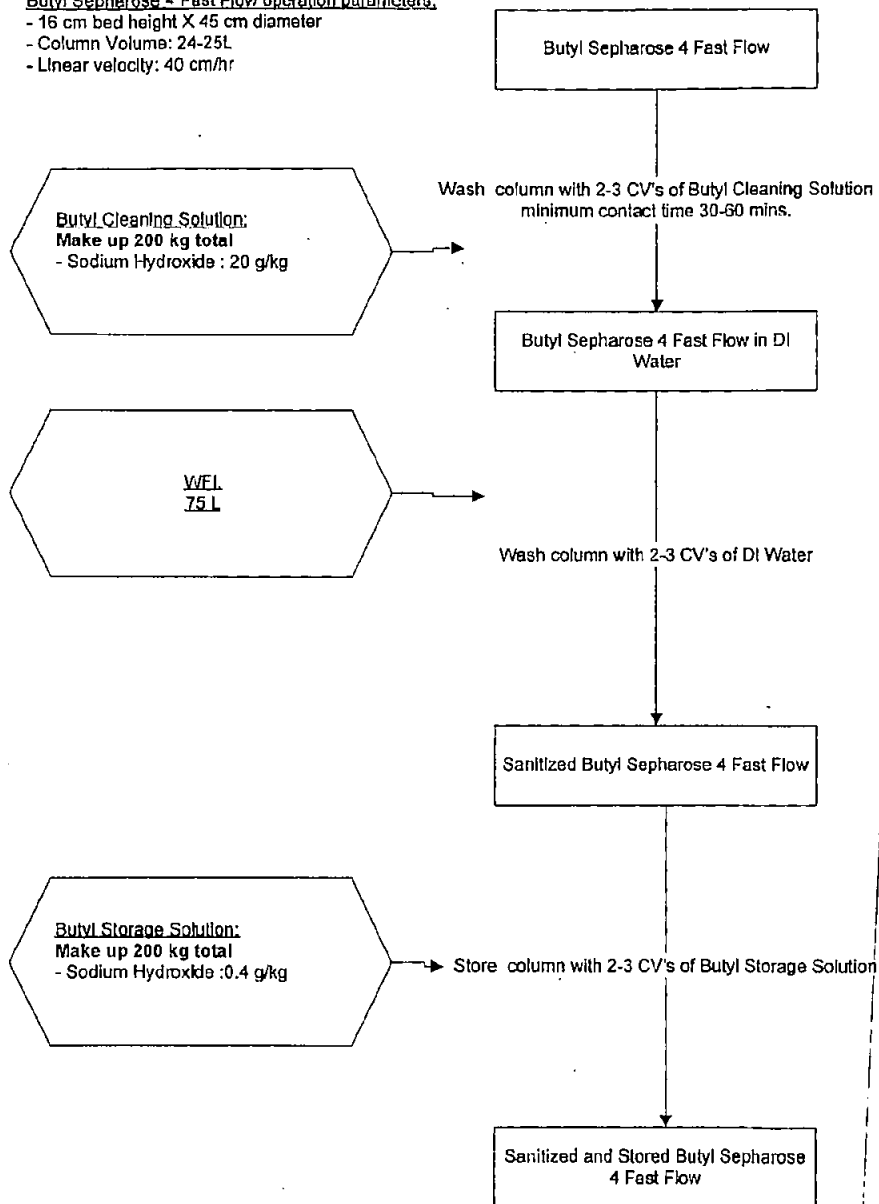
Butyl Sepharose 4 Fast Flow Cleaning Pre-Use

Input

Output

Butyl Sepharose 4 Fast Flow operation parameters:

- 16 cm bed height X 45 cm diameter
- Column Volume: 24-25L
- Linear velocity: 40 cm/hr



172

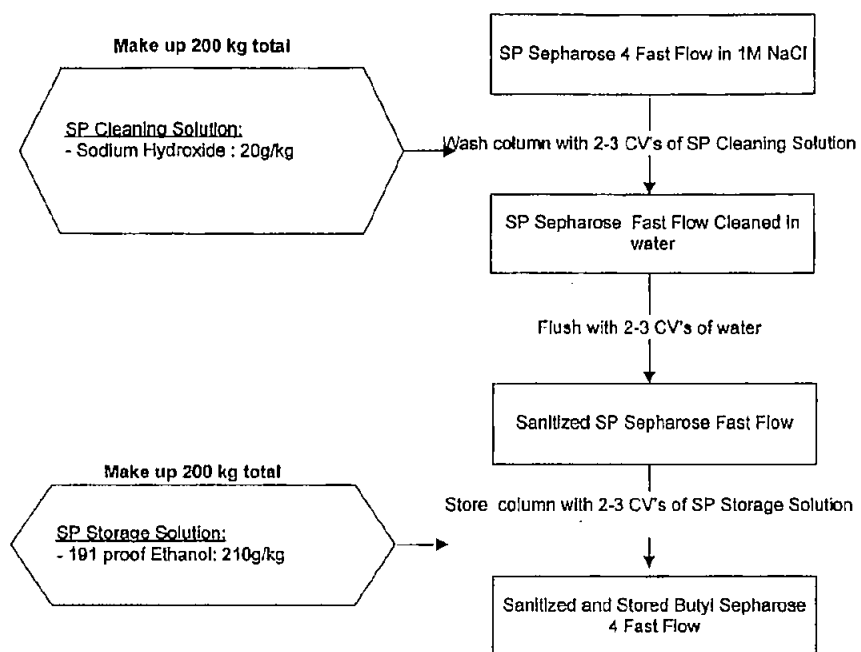
FIG 24

Input

SP Sepharose Fast Flow operation parameters:

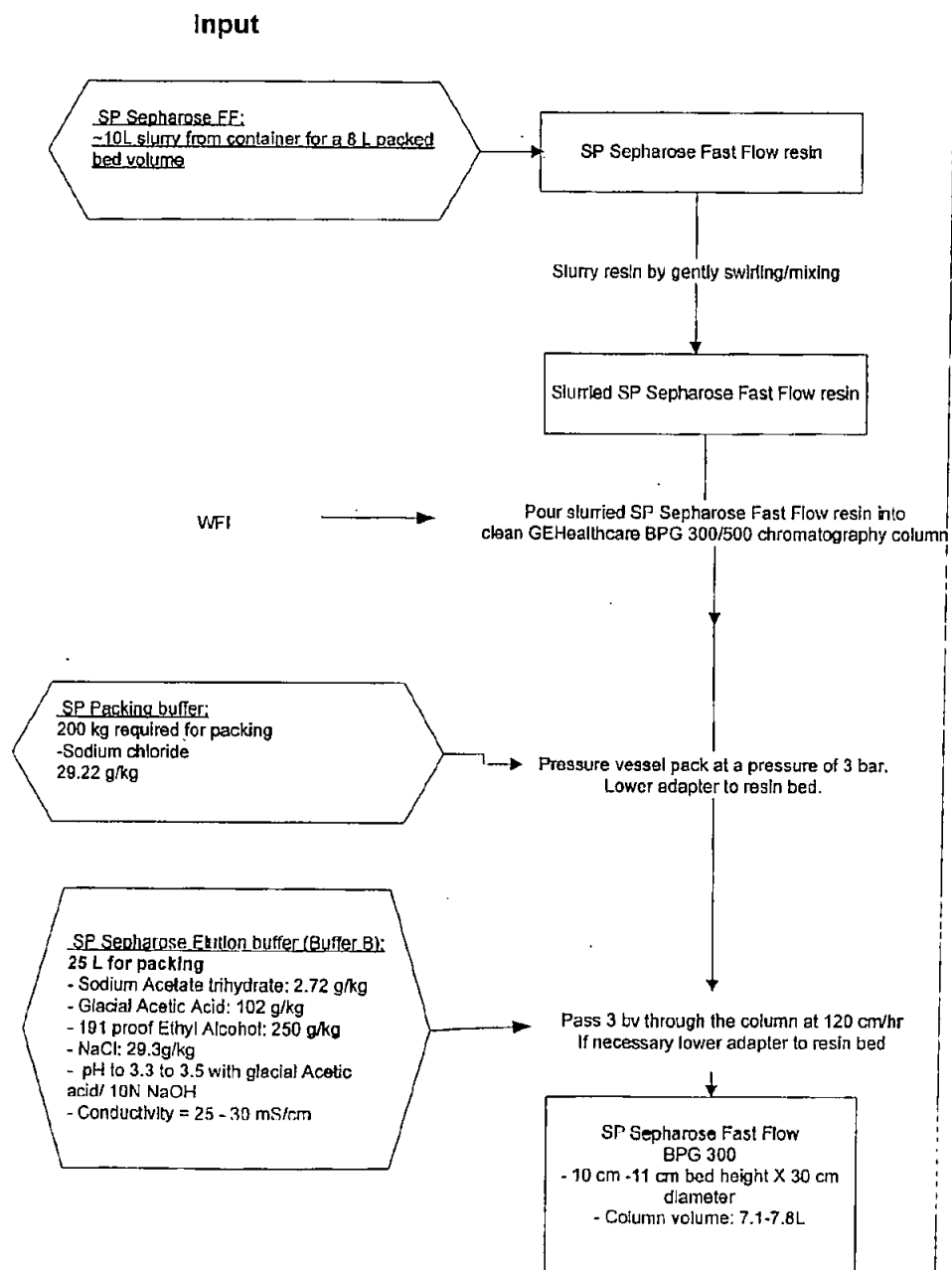
- 10 cm -11 cm bed height X 30 cm diameter
- Column volume: 7.1-7.8L
- Linear velocity: 40 cm/hr (471 mL/min)

Output



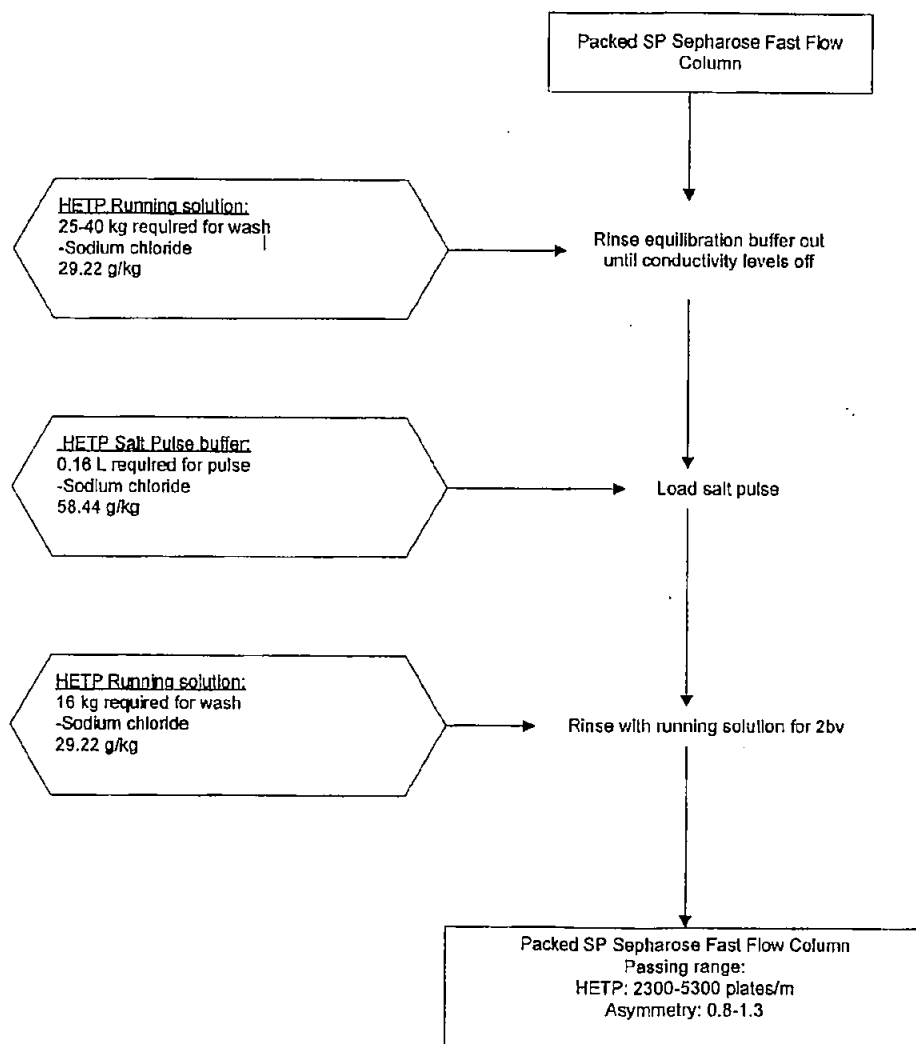
123

FIG 25



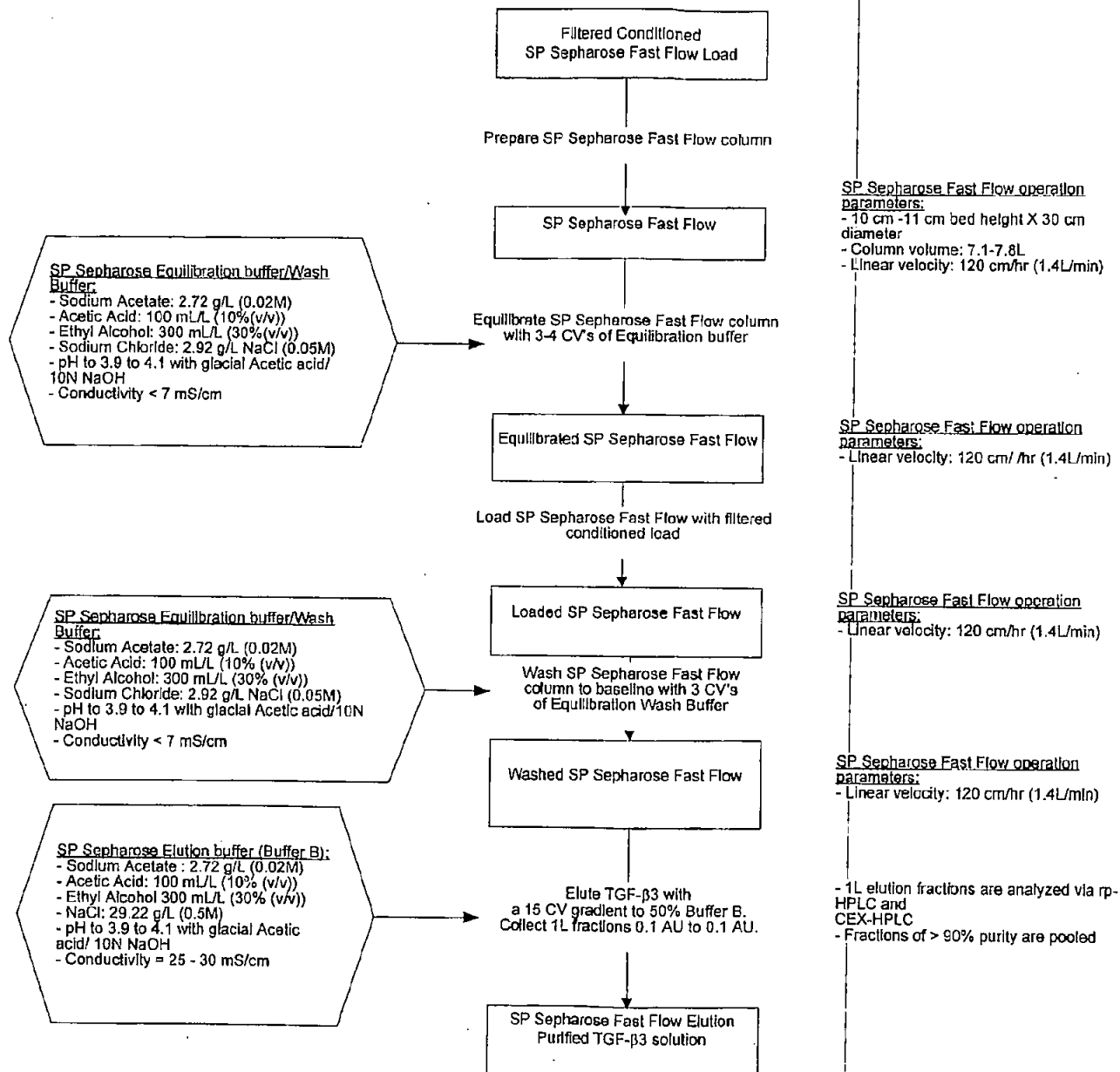
194

FIG 25 continued



125

FIG 26A

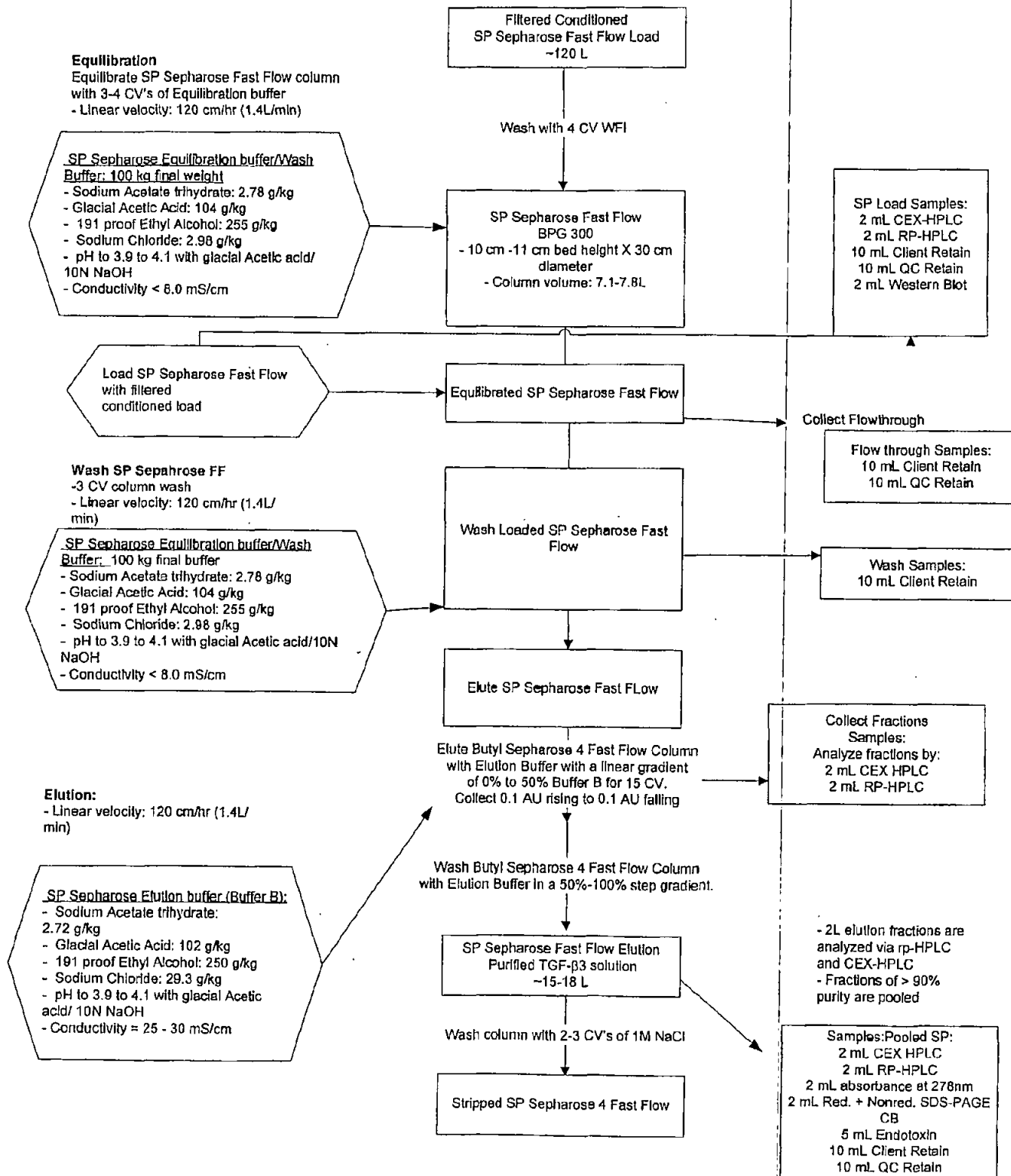


176

FIG 26B

Input

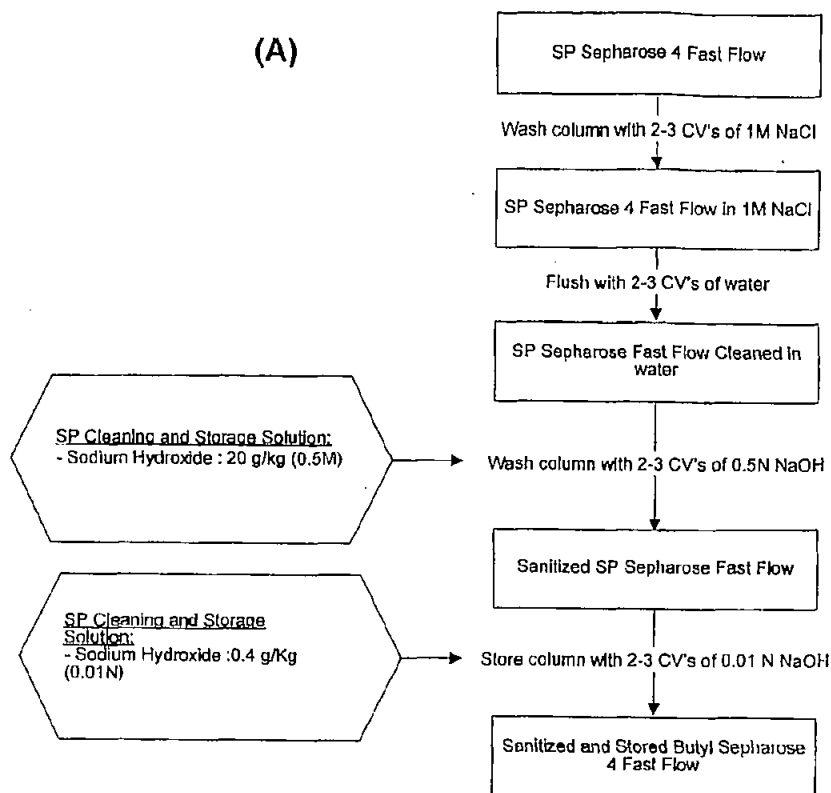
Output



172

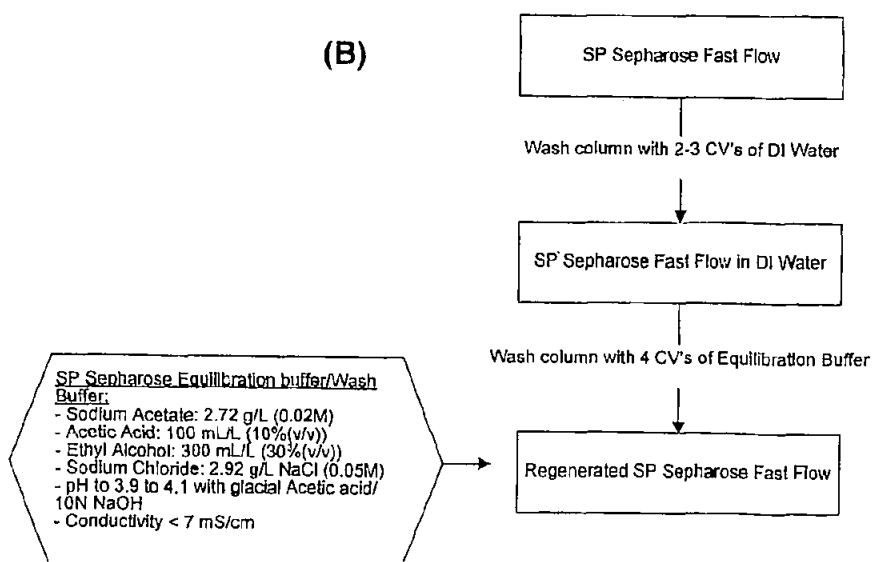
FIG 27

(A)



SP Sepharose Fast Flow operation parameters:
 - 10 cm -11 cm bed height X 30 cm diameter
 - Column volume: 7.1-7.8L
 - Linear velocity: 40 cm/hr (471 mL/min)

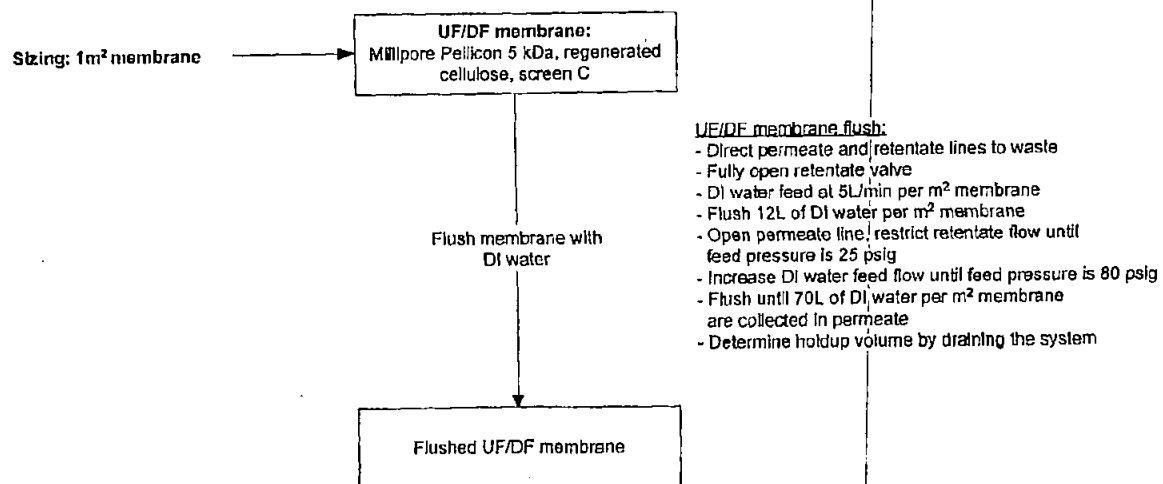
(B)



SP Sepharose Fast Flow operation parameters:
 - 10 cm -11 cm bed height X 30 cm diameter
 - Column volume: 7.1-7.8L
 - Linear velocity: 120 cm/hr (1.4L/min)

178

FIG 28A



179

FIG 28B

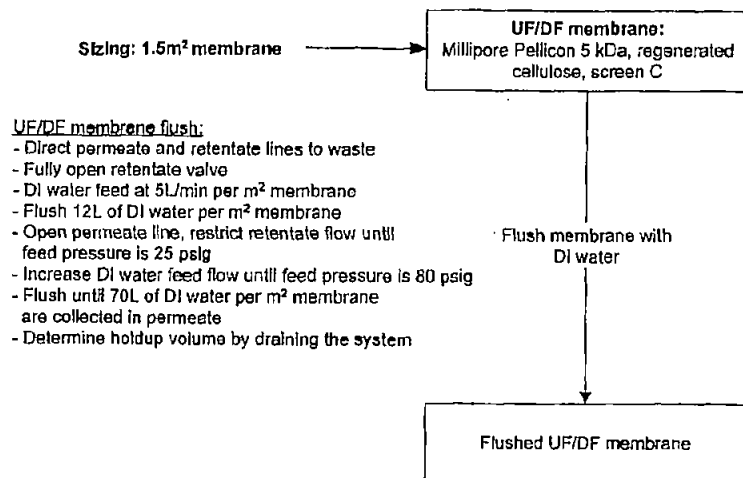


FIG 29A

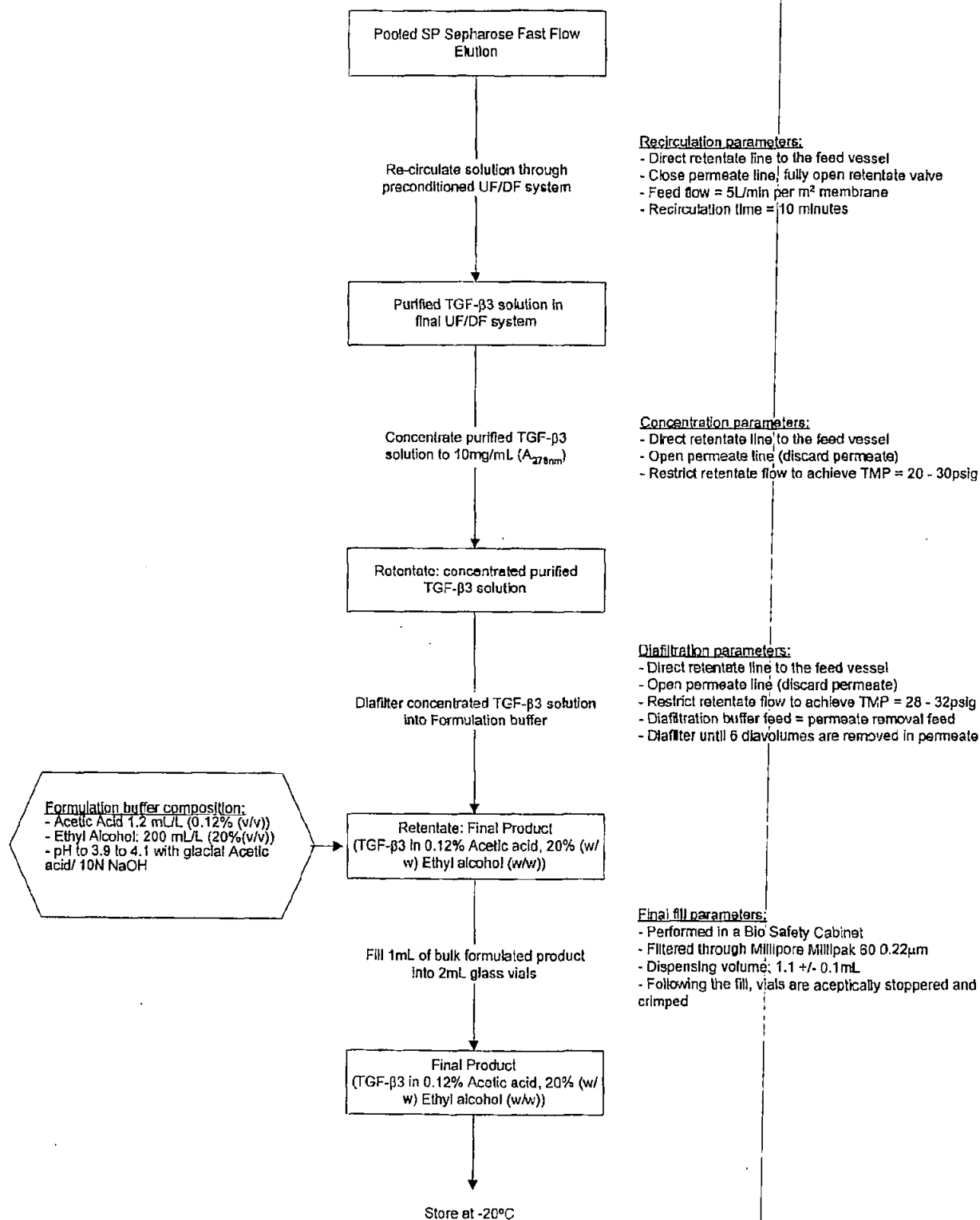


FIG 29B

181

Input

Output

Recirculation parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
- Close permeate line, fully open retentate valve
- Feed flow = 5L/min per m² membrane
- Recirculation time = 10 minutes

Concentration parameters:

- Direct retentate line to the feed vessel
- Open permeate line (discard permeate)
- Restrict retentate flow to achieve TMP = 20 - 30psig

Diafiltration parameters:

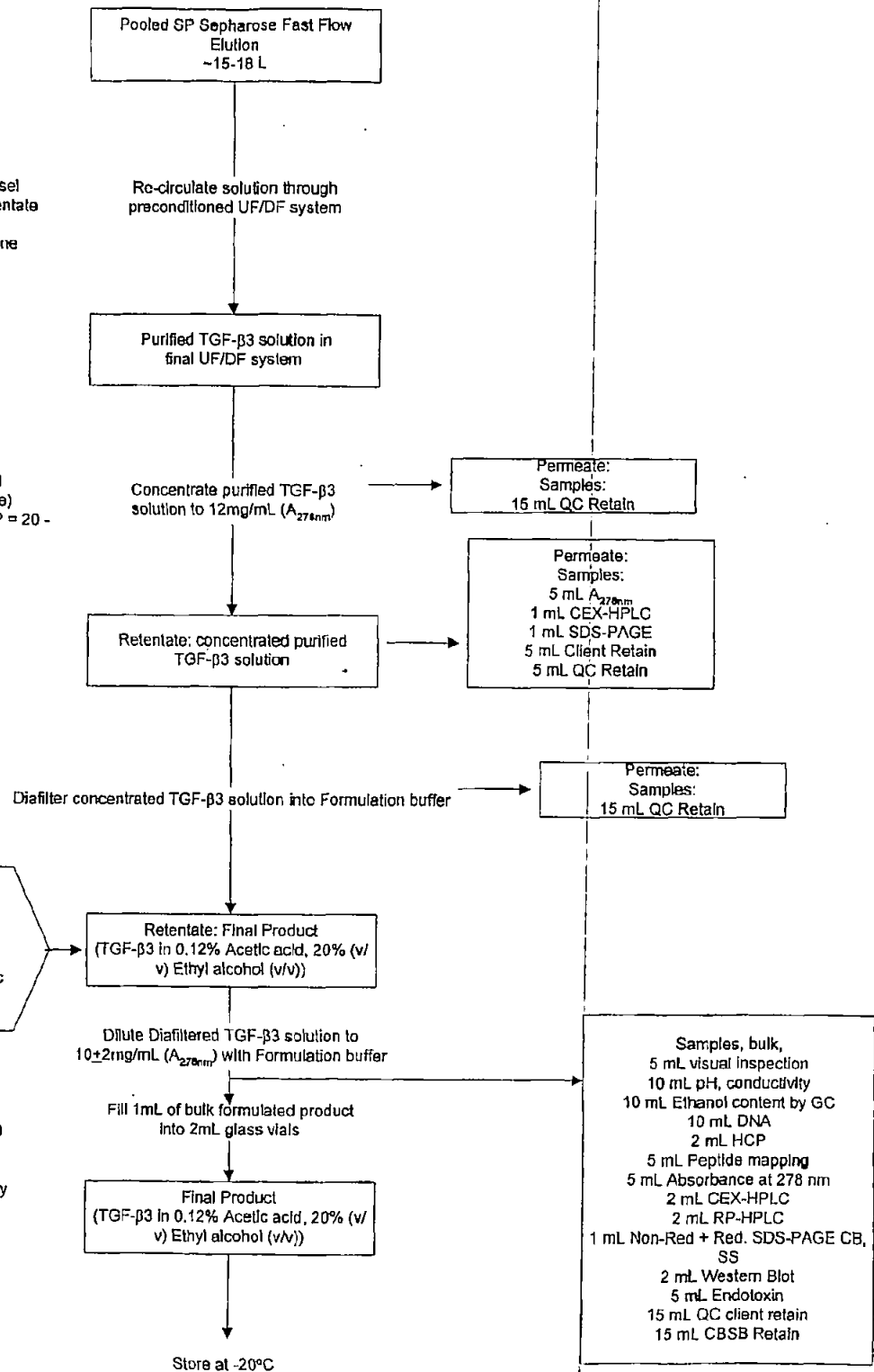
- Direct retentate line to the feed vessel
- Open permeate line (discard permeate)
- Restrict retentate flow to achieve TMP = 28 - 32psig
- Diafiltration buffer feed = permeate removal feed
- Diafilter until 6 diavolumes are removed in permeate

Formulation buffer composition:

- Acetic Acid 1.2 mL/L
- 191 proof Ethyl Alcohol: 209.4 mL/L
- pH to 3.9 to 4.1 with glacial Acetic acid/ 10N NaOH

Final fill parameters:

- Performed in a Bio Safety Cabinet
- Filtered through Millipore Milipak 60 0.22µm
- Dispensing volume: 1.1 +/- 0.1mL
- Following the fill, vials are aseptically stoppered and crimped



Store at -20°C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000814

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K1/113 C07K14/495 C07K14/51

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/18196 A (GENETICS INST [US]) 15 April 1999 (1999-04-15) cited in the application	1-17, 23-31
Y	page 3, lines 32-34; claims 18-22; example 6	18-22
X	WO 95/16034 A (GENETICS INST [US]) 15 June 1995 (1995-06-15)	1-17, 23-31
Y	examples 4,5	18-22
	----- -/-	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"8" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2007

Date of mailing of the international search report

07/11/2007

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3018

Authorized officer

Weikl, Martina

182

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000814

183

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VALLEJO L F ET AL: "Renaturation and purification of bone morphogenetic protein-2 produced as inclusion bodies in high-cell-density cultures of recombinant Escherichia coli" JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 94, no. 2, 28 March 2002 (2002-03-28), pages 185-194, XP002278281 ISSN: 0168-1656	1-17, 23-31
Y	page 188, column 1, paragraph 3; figure 4	18-22
X	VALLEJO L F ET AL: "Optimized procedure for renaturation of recombinant human bone morphogenetic protein-2 at high protein concentration" BIOTECHNOLOGY AND BIOENGINEERING, INTERSCIENCE PUBLISHERS, LONDON, GB, vol. 85, no. 6, 20 January 2004 (2004-01-20), pages 601-609, XP002278283 ISSN: 0006-3592	1-17, 23-31
Y	figure 5	18-22
X	WO 2006/023782 A (BIOGEN IDECA MA INC [US]; ROSSOMANDO ANTHONY [US]; PEPINSKY R BLAKE [U]) 2 March 2006 (2006-03-02)	1,8-15, 23-31
Y	claim 1	18-22
X	EP 0 433 225 A1 (CIBA GEIGY AG [CH] NOVARTIS AG [CH]; NOVARTIS ERFIND VERWALT GMBH [AT]) 19 June 1991 (1991-06-19) page 5, line 51; claims 1,7,14	1,4, 8-15, 23-31
Y	EP 0 943 690 A1 (AJINOMOTO KK [JP]) 22 September 1999 (1999-09-22) example 3; table 1	18-22
A	US 5 650 494 A (CERLETTI NICO [CH] ET AL) 22 July 1997 (1997-07-22) cited in the application claim 1	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2007/000814

184

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1 (partially), 2 and 3 (completely), 8-15 (partially), 16 and 17 (completely), 18-20 (partially), 21 and 22 (completely), 23-31 (partially)

Claims relating to the use of CHES for the refolding of TGF-beta proteins

2. claims: 1 (partially), 4-7 (completely), 8-15 (partially), 18-20 (partially), 23-31 (partially)

Claims relating to the use of CHES analogues for the refolding of TGF-beta proteins

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2007/000814

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9918196	A	15-04-1999	AT 258598 T AU 757692 B2 AU 9116798 A CA 2305559 A1 DE 69821376 D1 EP 1021528 A1 JP 2001519149 T US 6596511 B1 US 6593106 B1 US 6632635 B1 US 6593107 B1 US 2002052026 A1	15-02-2004 06-03-2003 27-04-1999 15-04-1999 04-03-2004 26-07-2000 23-10-2001 22-07-2003 15-07-2003 14-10-2003 15-07-2003 02-05-2002
WO 9516034	A	15-06-1995	AT 200515 T AU 682238 B2 AU 1209395 A DE 69427093 D1 DE 69427093 T2 DK 733108 T3 EP 0733108 A1 ES 2157313 T3 FI 962349 A GR 3035769 T3 JP 9506259 T JP 3704350 B2 NO 962303 A OA 10294 A PT 733108 T US 5399677 A US 5756308 A	15-04-2001 25-09-1997 27-06-1995 17-05-2001 15-11-2001 18-06-2001 25-09-1996 16-08-2001 16-07-1996 31-07-2001 24-06-1997 12-10-2005 04-06-1996 07-10-1997 30-08-2001 21-03-1995 26-05-1998
WO 2006023782	A	02-03-2006	AU 2005277227 A1 CA 2577690 A1 EP 1784203 A2 IS 8609 A KR 20070050965 A	02-03-2006 02-03-2006 16-05-2007 14-02-2007 16-05-2007
EP 0433225	A1	19-06-1991	AT 178616 T AU 638075 B2 AU 6701890 A CA 2031430 A1 DE 69033040 D1 DE 69033040 T2 DK 433225 T3 ES 2132066 T3 FI 905956 A GR 3030703 T3 HU 56880 A2 IE 904386 A1 IE 990992 A1 IL 96549 A JP 3048061 B2 JP 3191791 A MX 172600 B NO 905264 A NZ 236333 A PH 31649 A PT 96068 A	15-04-1999 17-06-1993 13-06-1991 07-06-1991 12-05-1999 09-09-1999 25-10-1999 16-08-1999 07-06-1991 30-11-1999 28-10-1991 19-06-1991 13-12-2000 31-10-2000 05-06-2000 21-08-1991 03-01-1994 07-06-1991 26-03-1992 12-01-1999 30-09-1991

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

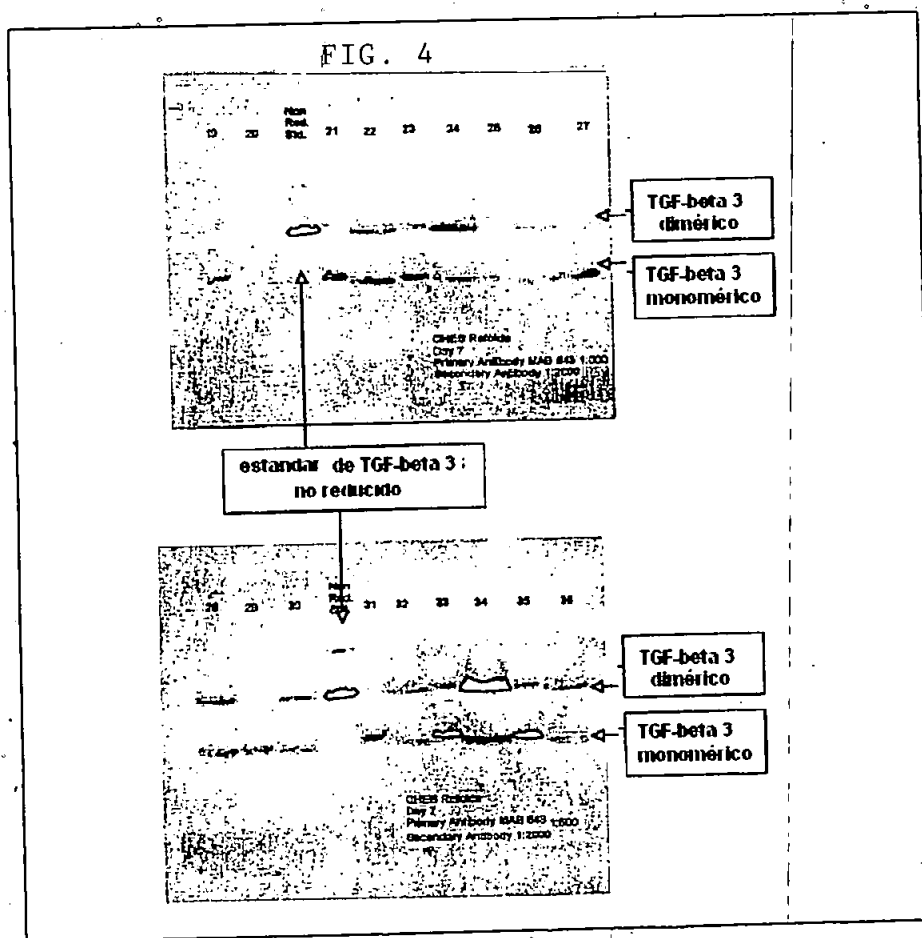
PCT/GB2007/000814

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0433225	A1	SG 52690 A1 ZA 9009762 A	28-09-1998 28-08-1991
EP 0943690	A1	22-09-1999 DE 69636739 T2 WO 9723638 A1 US 6084076 A	18-10-2007 03-07-1997 04-07-2000
US 5650494	A	22-07-1997 NONE	

187

Castillo Grau & Asociados

ABOGADOS
APARTADO AÉREO 251473
BOGOTÁ, COLOMBIA



188

FIG. 4

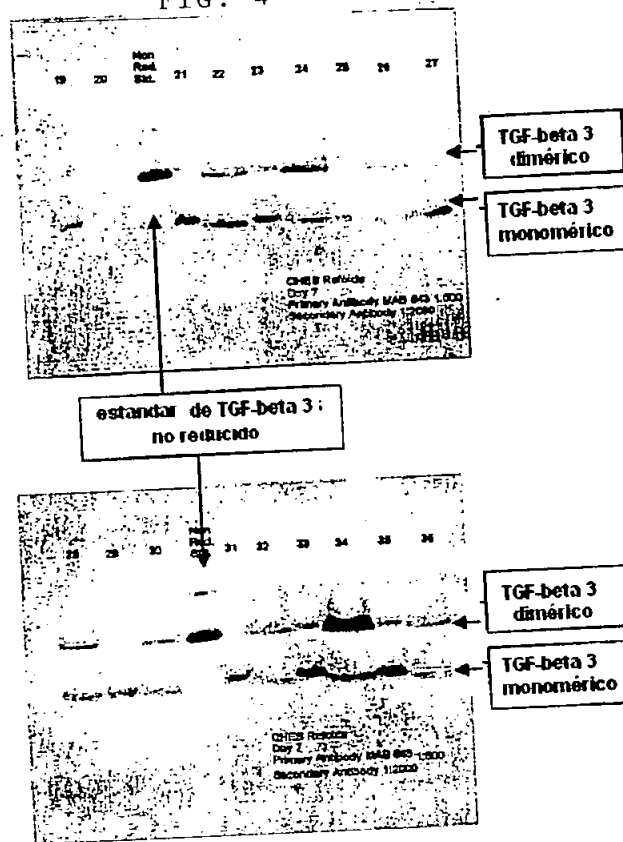
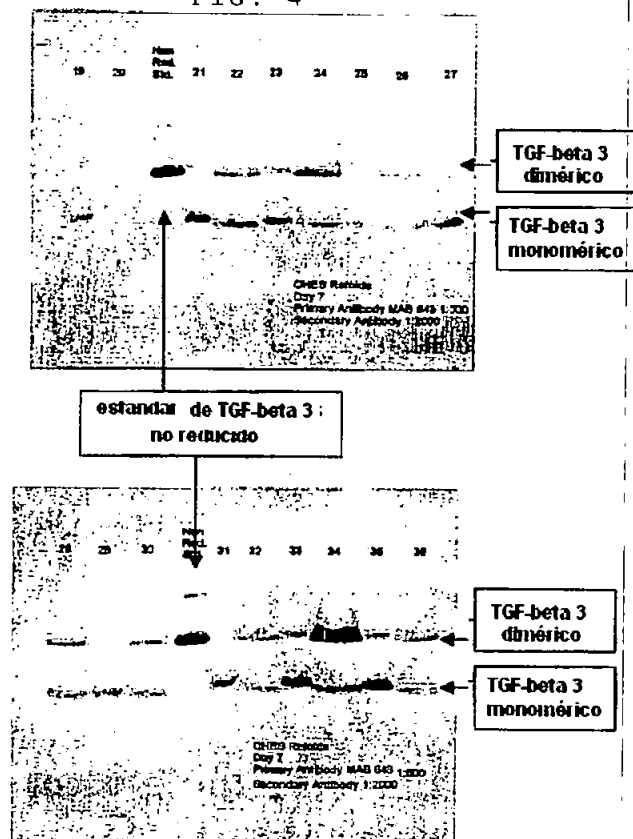


FIG. 4



Cuarta parte:

GESTIÓN Y PROGRAMACIÓN DE RECURSOS

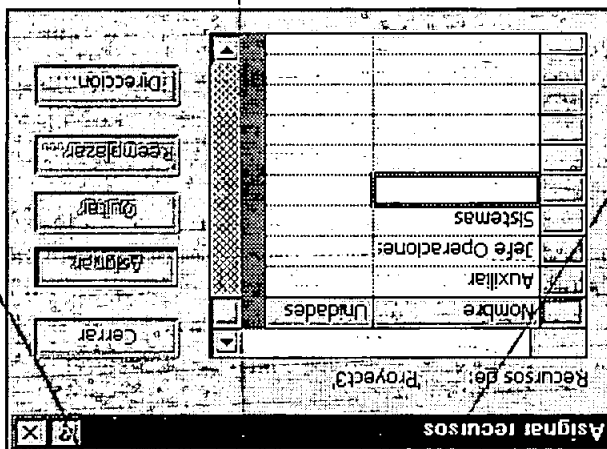
Los recursos son las personas, lugares y elementos necesarios para realizar una tarea. Si no asigna recursos a las tareas, será más difícil controlar la terminación de las mismas y habrá menos flexibilidad en la planificación.

ASIGNACION DE RECURSOS

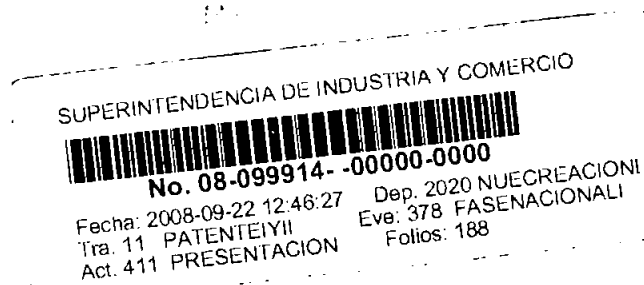
Cada tarea de un proyecto necesita tener asignados todos los recursos necesarios para llevarla a cabo. Los nombres de recursos pueden ser genéricos o específicos en sus descripciones. Un recurso que realiza labores administrativas puede llamarse <<auxiliar administrativo>> o <<Juan Pérez>>.

Cuando se incorpora un recurso en un proyecto, se introduce por omisión una unidad o 100%, en el campo Capacidad Máxima del recurso; por omisión las unidades de recursos se muestran como porcentajes; también puede mostrar las unidades de recursos en decimales.

El número máximo de unidades puede incrementarse o decrementarse. No se debe asignar a una tarea más unidades de un recurso de las disponibles en un proyecto. Pulsando el botón Asignar recursos, en la barra de herramientas estándar, nos aparecerá la siguiente ventana:



Para introducir los recursos en la hoja de recursos, en la barra de menú Ver, pulse la opción Hoja de recursos:



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE PCT

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☒
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☒

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

Sandra Rodríguez
Firma Responsable

Fecha SEP 22-08

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

190

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
CASTILLO GRAU GERMAN
Apoderado(a) y/o Representante de
RENOVO LIMITED

REFERENCIA	Radicación No.	8 99914
	Solicitud internacional	PCT/GB2007/000814
	Fecha inicio fase nacional	11/10/2008
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	Nº 13741

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 31 OCT. 2008.
jfernand

 31/08/007