



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 356 360**

51 Int. Cl.:
C12N 15/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **03727958 .5**

96 Fecha de presentación : **19.05.2003**

97 Número de publicación de la solicitud: **1506295**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **16.02.2005**

54 Título: **Muteínas del factor de crecimiento placentario de tipo 1, método de preparación y aplicación de las mismas.**

30 Prioridad: **17.05.2002 IT RM02A0277**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.04.2011

73 Titular/es: **Geymonat S.p.A.**
2 Via S. Anna
I-03012 Anagni, FR, IT

72 Inventor/es: **Maglione, Domenico;**
Battisti, Mauro;
Conti, Ettore;
Salvia, Giuseppe;
Tucci, Marina y
Mion, Alberto

74 Agente: **Isern Jara, Jorge**

ES 2 356 360 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Muteínas del factor de crecimiento placentario de tipo 1, método de preparación y aplicación de las mismas.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a muteínas estables de factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1), a su preparación, a su uso terapéutico y cosmético y a composiciones farmacéuticas y cosméticas que contienen dichos derivados. De manera similar, la invención se refiere a la producción de anticuerpos contra dichos derivados y a su utilización en el diagnóstico y tratamiento de patologías tumorales y no tumorales.

Estado de la técnica

10 El factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) es una glucoproteína homodimérica angiogénica. La actividad angiogénica se refiere a la forma dimérica, debido a que la forma monomérica es inactiva. La secuencia polinucleótida completa codificante de la proteína PLGF-1, conjuntamente con su secuencia polipeptídica, fueron descritas por Maglione y Persico en la patente EP nº B-0 550 519 (patente WO nº A-92/06194).

15 La patente anteriormente indicada describe un método para producir PLGF-1 en bacterias modificadas utilizando un sistema de expresión inducible, comprendiendo dicho método, tras la inducción, la lisis bacteriana y la extracción directa de la proteína cruda a partir de la solución de lisado. La proteína obtenida de esta manera muestra niveles bajos de actividad biológica.

20 Un método para la extracción y purificación del factor placentario crudo, obtenido mediante la expresión en bacterias, ha sido descrito por Maglione *et al.* en la solicitud de patente WO nº 2003/066676. El método comprende una serie de etapas de extracción, renaturalización y purificación, que globalmente permite obtener la proteína pura en una forma esencialmente dimérica, es decir, en su forma más activa. De hecho, es conocido que la forma dimérica de la proteína es biológicamente inactiva y sólo requiere funciones angiogénicas tras la renaturalización en la forma dimérica.

25 Sin embargo, los presentes inventores han observado que la proteína en la forma dimérica es parcialmente inestable, y da lugar, en una solución acuosa, durante el almacenamiento o el procesamiento, a formas multiméricas que muestran menos actividad biológica y por ello resultan menos adecuadas para el uso terapéutico debido a la variabilidad de las dosis y actividad biológica.

Por lo tanto, el objetivo de la presente invención es resolver el problema de la estabilidad química/biológica reducida de PLGF-1 que se observa principalmente al conservarlo en soluciones acuosas.

Descripción resumida de la invención

30 La invención se basa en el inesperado descubrimiento de que los derivados de la proteína natural PLGF-1 con modificaciones en su secuencia polipeptídica, específicamente que implican la sustitución o eliminación de por lo menos un residuo cisteína, muestran una estabilidad química muy incrementada, manteniendo simultáneamente su actividad biológica original esencialmente invariada. A la luz de este descubrimiento, un primer objetivo de la solicitud está representado por una muteína de la forma monomérica del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) humano o animal que comprende la sustitución o eliminación en la secuencia polipeptídica de la proteína de tipo salvaje de por lo menos uno de los nueve residuos cisteína (Cys) contenidos en la misma. Dicha sustitución o eliminación no afecta al proceso de dimerización esencial para obtener la proteína en su forma biológicamente activa, pero evita la multimerización de la forma monomérica.

40 Entre los diversos residuos cisteína, se ha observado que la eliminación o sustitución de un residuo presente en la parte C-terminal, y específicamente en la posición 142 de la secuencia polipeptídica completa, es decir que comprende tanto la proteína PLGF-1 madura como el péptido de señal correspondiente, resulta particularmente efectiva. En la realización preferente de la invención, el residuo Cys 142 se sustituye por un residuo de glicina (Gly). Esta sustitución produce una muteína de la forma monomérica de PLGF-1 que presenta una capacidad de dimerización no modificada, pero que es básicamente incapaz de generar productos de multimerización. Además de las modificaciones anteriormente indicadas, las muteínas según la invención pueden contener otras eliminaciones, sustituciones o adiciones de uno o más aminoácidos de la proteína de tipo salvaje, con la condición de que dichas modificaciones no alteren las características funcionales de la muteína misma.

50 Por lo tanto, un segundo objetivo de la invención está representado por una muteína del factor PLGF-1 en forma dimérica, preferentemente purificada de manera que comprenda esencialmente el dímero solo. Dicha muteína igualmente puede ser perfectamente la proteína madura o la preproteína, que comprende un péptido de señal en la parte N-terminal.

Un objetivo adicional de la invención es la secuencia de nucleótidos que comprende el ADN codificante de la muteína. La secuencia se caracteriza porque se elimina o se modifica un codón TGC o TGT codificante del aminoácido cisteína en la secuencia natural de PLGF-1. En una realización preferente, el codón correspondiente a la

cisteína se sustituye por un codón GGC, GGT, GGA o GGG, todos codificantes del aminoácido glicina (Gly). Preferentemente es la base timidina (T) en la posición 382 (codón TGC) de la secuencia SEC ID nº 1 que se sustituye por la base guanidina (G), generando el codón GGC.

5 Un objetivo adicional de la invención es un sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos indicada anteriormente, flanqueada por secuencias no traducidas que controlan y regulan la expresión. Este sistema puede inducirse en células procarióticas, preferentemente en células bacterianas.

10 La expresión se encuentra bajo el control de un promotor inducible y puede inducirse por medio de compuestos adecuados. Las células huésped modificadas utilizando el sistema de expresión indicado anteriormente también son el objetivo de la invención. Estas son células procarióticas, preferentemente células bacterianas tales como *E. coli*. La invención también cubre procedimientos para la producción de la secuencia de nucleótidos, en la que el ADN codificante de la muteína es producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como cebador oligonucleótidos que han sido convenientemente modificados con respecto a la secuencia de la proteína de tipo salvaje. Preferentemente, el oligonucleótido de secuencia SEC ID nº 3 se utiliza como cebador directo 5'-3' y el oligonucleótido de secuencia SEC ID nº 4 se utiliza como cebador inverso 5'-3'.

15 Un objetivo adicional de la invención es un procedimiento para la producción y extracción de la muteína, en el que las células huésped, preferentemente bacterianas, modificadas utilizando el sistema de expresión según la invención, se cultivan en un medio de cultivo adecuado, se induce la expresión de la proteína mediante un inductor adecuado, se aíslan las células y se lisan, y la muteína se extrae de la mezcla de lisis. Durante la etapa de fermentación y antes de la inducción de la etapa de expresión, las células se cultivan hasta alcanzar una elevada densidad óptica (D.O.) del medio de cultivo. A continuación, se induce la expresión de la proteína mediante la adición de agentes de inducción adecuados. Durante las etapas siguientes, las células se lisan, para liberar los materiales endocelulares al medio de cultivo, específicamente el material nucleico y los cuerpos de inclusión, solubilizando estos últimos, y la proteína obtenida de esta manera se renaturaliza en la forma dimérica. El procedimiento de extracción y purificación puede comprender etapas opcionales adicionales para la purificación de la proteína dimérica. En una realización preferente, el procedimiento comprende por lo menos una etapa adicional de purificación mediante cromatografía de intercambio iónico o de fase inversa. En una realización adicional, el procedimiento comprende una purificación inicial mediante cromatografía de intercambio aniónico seguido de cromatografía de fase inversa.

20 La muteína obtenida utilizando el procedimiento de producción, extracción y purificación según la invención contiene no menos de 98,5% de proteína activa y no más de 1,5% de la forma monomérica. La forma activa esencialmente consiste de la forma dimérica y contiene únicamente trazas de la forma multimérica. Los ensayos de estabilidad subrayan la elevada estabilidad durante el almacenamiento y durante el procesamiento típicos de la muteína en forma dimérica.

Descripción de las figuras

35 Figura 1: la figura muestra el perfil electroforético de SDS-PAGE de PLGF-1CG tras la resuspensión en solución fisiológica a una concentración de 20 mg/ml y el almacenamiento a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 40 días. El perfil se comparó con el perfil para la muteína inmediatamente después de la solubilización. (M) indica las referencias de peso molecular, (1) muestra PIGF-1CG (3 microgramos) solubilizado la solución fisiológica a una concentración de 20 mg/ml y congelado (control), (2) muestra PIGF-1CG (3 microgramos) solubilizado en la solución fisiológica a una concentración de 20 mg/ml y almacenado a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 40 días.

Figura 2: la figura muestra los datos de la Tabla 2 expresados en forma de gráfico.

45 Figura 3: la figura muestra el perfil electroforético de SDS-PAGE de la muteína PLGF-1CG solubilizada en gel Carbopol a una concentración de 0,2 mg/ml y almacenada a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 170 días. (M) indica las referencias de peso molecular, (1) muestra PIGF-1CG (2 microgramos) solubilizado en gel Carbopol a una concentración de 0,2 mg/ml y almacenado a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 170 días, (2) muestra PIGF-1CG (2 microgramos) solubilizado en gel Carbopol a una concentración de 0,2 mg/ml y congelado (control).

50 Figura 4: la figura muestra el perfil electroforético de SDS-PAGE de las formas nativas de PLGF-1 solubilizado en gel Carbopol a una concentración de 0,2 mg/ml y almacenado a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 150 días. (M) muestra las referencias de peso molecular, (1) muestra PLGF-1 (2 microgramos) solubilizado en gel Carbopol a una concentración de 0,2 mg/ml y almacenado a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 150 días, (2) muestra PIGF-1 (2 microgramos) solubilizado en gel Carbopol a una concentración de 0,2 mg/ml y congelado (control).

55 Figura 5: la figura es una ilustración esquemática del procedimiento para la construcción del plásmido pET3PLGF1CG, codificante de la muteína PLGF-1 denominada PLGF-1CG.

Figura 6: la figura muestra la actividad angiogénica del PLGF-1 de tipo salvaje y de la muteína PLGF-1CG a concentraciones crecientes de la sustancia. Se indica a modo de referencia la actividad del factor de crecimiento fibroblástico básico bFGF.

5 Figura 7: la figura muestra el efecto de la muteína PLGF-1CG sobre el daño isquémico inducido por isoprenalina en tejido cardíaco de conejo. El eje x indica los días de tratamiento y el valor AUC representa el área total incluida dentro de la curva identificada por las puntuaciones diarias de ECG.

Lista de secuencias:

SEC ID nº 1: secuencia de nucleótidos del PLGF-1 de tipo salvaje sin péptido de señal.

SEC ID nº 2: secuencia de nucleótidos del PLGF-1 natural.

10 SEC ID nº 3: secuencia del oligonucleótido utilizado como cebador directo en la PCR.

SEC ID nº 4: secuencia del oligonucleótido utilizado como cebador inverso en la PCR.

Descripción detallada de la invención

15 La secuencia polipeptídica completa del factor PLGF-1 humano de 149 aminoácidos, conjuntamente con un fragmento de ADNc de 1.645 nucleótidos que comprende la secuencia codificante del factor PLGF-1, se indica en la patente EP nº B-0 550 519. También se ha presentado en la ATCC un plásmido de libre acceso que contiene la secuencia de nucleótidos de 1.645 bases, con el número de presentación de la ATCC nº 40892.

La secuencia codificante de la preproteína se encuentra comprendida entre las posiciones 322 y 768 y se indica en la presente solicitud como SEC ID nº 1.

20 El PLGF-1 de tipo salvaje en forma de preproteína es un polipéptido con 149 aminoácidos que comprende un péptido de señal de 18 aminoácidos en la parte N-terminal. La secuencia de la proteína madura, delimitada por las posiciones 19 y 149, se indica en la presente solicitud como SEC ID nº 2. Dicha secuencia comprende 9 residuos de cisteína (Cys) situados en las posiciones 35, 60, 66, 69, 70, 77, 111, 113 y 125.

25 En las muteínas según la invención, se elimina o se sustituye por otro residuo por lo menos uno de dichos residuos cisteína, siendo la única condición que la mutación no afecte significativamente o elimine la capacidad de la muteína en su forma monomérica de generar la forma dimérica biológicamente activa y terapéuticamente útil. Los datos experimentales han demostrado que el residuo eliminado o sustituido deben localizarse preferentemente en la parte C-terminal de la proteína, y que el residuo óptimo para el propósito de la invención es el situado en la posición 125.

30 Las muteínas del factor de crecimiento placentario de tipo salvaje pueden producirse mediante síntesis utilizando técnicas de síntesis de polímeros conocidas de la literatura. Sin embargo, el método preferente es la expresión de la proteína en células huésped genéticamente modificadas. Para este fin, las células huésped se transforman mediante la introducción de un vector de clonación y/o un vector de expresión que comprende una inserción que corresponde al gen PLGF-1 tras modificarlo adecuadamente.

35 La preparación del ADN codificante de las muteínas según la invención se lleva a cabo mediante mutagénesis específica de sitio e implica mutaciones puntuales en codones correspondientes a cisteína, es decir, TGC o TGT. Estas mutaciones pueden ser deleciones o sustituciones de una o más bases, sin provocar un desplazamiento del marcado de lectura cadena abajo de la mutación. En el caso de una deleción, por lo tanto, debe eliminarse un codón completo. Preferentemente, la mutación específica de sitio es una sustitución puntual de una base en un codón de cisteína, con la formación consecuente de un nuevo codón. En este sentido, la mutación resultará en la sustitución de un residuo de cisteína por otro residuo aminoácido.

Pueden utilizarse diversas técnicas conocidas de mutagénesis específica de sitio para preparar el ADNc codificante de la muteína requerida.

45 Los métodos que pueden utilizarse son, por ejemplo, la mutagénesis obtenida con oligonucleótidos (Adelman *et al.*, "DNA" 2:183, 1983), mutagénesis por PCR (Leung *et al.*, Technique 1:11-15, 1989) o la mutagénesis por inserción de casete (Wells *et al.*, Gene 34:315, 1985).

50 En la realización preferente de la invención, se lleva a cabo la síntesis del ADN mutante utilizando la técnica de mutación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se utilizó como molde para la PCR el ADNc codificante del factor PLGF-1 de tipo salvaje descrito en la literatura o cualquier equivalente del mismo causado por la degeneración del código genético. Preferentemente, se utiliza únicamente la parte codificante de la proteína metionilada en la posición N-terminal con o sin péptido de señal; por ejemplo la secuencia que se informa en la presente solicitud como SEC ID nº 1, o equivalentes de la misma, comprendida en el vector de expresión pET3PIGF-1 correspondiente a la proteína sin el péptido de señal. El oligonucleótido 5'-3' (directo) complementario a la región codificante de la parte N-terminal de la proteína, y el oligonucleótido 5'-3' (inverso) complementario a la

región de la secuencia que comprende el codón de cisteína que debe mutarse se utilizaron como cebadores para la PCR. Este último oligonucleótido contiene la sustitución o sustituciones de bases necesarias para introducir la mutación requerida. Los cebadores utilizados igualmente pueden contener bases adicionales en las regiones 5' y/o 3'-terminales para introducir sitios de restricción adecuados para aislar y purificar la secuencia mutada.

5 El codón correspondiente al residuo de cisteína puede sustituirse por un codón codificante de cualquier aminoácido neutro, sea polar, tal como Ser, Thr, Gln o Asn, o no polar, tal como Gly, Ala, Val, Ile o Leu. Son aminoácidos preferentes Gly y Ala.

10 En la realización preferente, el cebador directo se encuentra representado por la secuencia identificada como SEC ID nº 3, mientras que el cebador inverso se encuentra representado por la secuencia SEC ID nº 4. Ésta última comprende una sustitución T->G en la posición 382 de la secuencia SEC ID nº 1, una sustitución que transforma el codón TGC de la cisteína en la posición 125 de la secuencia SEC ID nº 4 en un codón GGC, correspondiente a una glicina.

El ADNc convenientemente modificado seguidamente se corta y se inserta en un vector de expresión bajo el control de un sistema inducible adecuado compatible con la célula huésped.

15 Preferentemente, se utilizan sistemas de expresión inducible compatibles con las células procarióticas. Son ejemplos de estos sistemas:

el sistema de expresión pBAD (Invitrogen BV), en el que la síntesis de proteína tiene lugar bajo el control del promotor araBAD y que puede inducirse en diversas cepas de *E. coli* utilizando arabinosa,

20 *el sistema de expresión de T7* (Invitrogen BV o Promega), en el que la síntesis de proteína está controlada por el promotor de la ARN polimerasa del fago T7 y puede inducirse utilizando lactosa, isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) o un derivado, o análogos funcionalmente equivalentes del mismo. En este caso resulta necesario utilizar derivados de tipo *DE3* (*B121(DE3)* o *JM109 (DE3)*) de *E. coli*, es decir, aquellos que contienen una copia del gen para la ARN polimerasa del fago T7 bajo el control de un promotor inducible con lactosa,

25 *el sistema de expresión Trc* (Invitrogen BV), en el que la síntesis de proteínas se encuentra bajo el control del promotor híbrido trc. Este promotor ha sido obtenido mediante fusión del promotor trp y promotores *lac* y puede inducirse en diversas cepas de *E. coli* con lactosa o equivalentes similares de la misma (IPTG),

el sistema de expresión Tac (Amersham Biosciences), en el que la síntesis de proteína se encuentra bajo el control del promotor tac. En este sistema, la síntesis de proteína es inducida en cepas de *E. coli* lacIq (tipo *JM105*) por lactosa o equivalentes similares de la misma (IPTG),

30 *el sistema de expresión P_L*, en el que la síntesis de proteína se encuentra bajo el control del promotor PL y puede inducirse mediante la adición de triptófano. En este caso, resulta necesaria la utilización de derivados de *E. coli* (*G1724*) que contienen una copia del gen codificante del represor cl del fago lambda, bajo el control de un promotor inducible con triptófano.

35 Evidentemente resulta posible expresar el ADNc modificado codificante de la muteína en células huésped eucarióticas derivadas de levaduras o de organismos multicelulares. En este caso, se selecciona un sistema de expresión compatible con dichas células.

En la realización preferente de la invención, la expresión se lleva a cabo bajo el control del sistema de ARN polimerasas del fago T7 e inducida con isopropil-β-D-tiogalactopiranosido.

40 El vector de expresión también comprende secuencias adicionales codificantes de las funciones normales necesarias para la clonación, selección y expresión, tales como marcadores selectivos y/o un sitio de poliadenilación y/o una secuencia reguladora de la transcripción.

45 Por lo tanto, se transforman células huésped, utilizando técnicas estándares perfectamente conocidas por el experto en la materia, con el vector de expresión que contiene el ADNc codificante de la muteína requerida. Estas células pueden ser procarióticas, eucarióticas, animales, humanas o vegetales, en particular células bacterianas, tales como *E. coli* o *Bacillus*, células de levadura, tales como *Saccharomyces*, o células animales, tales como Vero, HeLa, CHO y COS.

El microorganismo preferente se obtiene mediante integración en la cepa comercialmente disponible [B12(DE3)pLyS] (Promega Corporation USA) del gen de una muteína PLGF-1 humana.

50 Las células modificadas utilizadas para producir las muteínas según la invención se almacenan antes de la utilización en forma liofilizada para conservar su capacidad de expresión. En el momento de la utilización, el material liofilizado se resolubiliza utilizando un tampón adecuado.

A continuación, las células huésped modificadas se cultivan en medio de cultivo líquido. Aunque se encuentra disponible comercialmente un amplio abanico de medios de cultivo conocidos que pueden utilizarse

eficazmente, la etapa de fermentación según la invención preferentemente se lleva a cabo en un medio de cultivo sin ningún material de origen animal o humano, con el fin de evitar cualquier riesgo de infección. Los extractos de levadura (Difco) añadidos con uno o más antibióticos adecuados representan el medio más adecuado para el procedimiento. Antes de la etapa de fermentación puede realizarse una etapa preinoculación en la que se suspende el microorganismo liofilizado en el medio de cultivo y se somete a etapas consecutivas de incubación y dilución, destinadas a obtener una cantidad óptima de células de microorganismo en el cultivo.

La fermentación se lleva a cabo en el medio de cultivo indicado anteriormente, a una temperatura adecuada para el microorganismo, normalmente aproximadamente 37°C, en presencia de un porcentaje de O₂ disuelto con respecto a la saturación con aire, de entre 20% y 40%, preferentemente de 30%. El pH durante el cultivo se mantiene en valores óptimos para el microorganismo que se utiliza, que normalmente será neutro o muy ligeramente ácido o alcalino (6,4 a 7,4). Además, dado que el procedimiento de fermentación tiene lugar bajo agitación, resulta ventajosa la utilización de anti-surfactantes.

A medida que avanza la fermentación, se ve acompañada por un incremento de la densidad óptica del medio de cultivo. Por lo tanto, la densidad óptica a 600 nm es el parámetro utilizado según la invención para realizar un seguimiento del progreso del procedimiento. La densidad celular y, por lo tanto, óptica alcanzada en el cultivo en el momento en que se induce la expresión debe ser suficientemente alta para garantizar un rendimiento elevado de la proteína expresada. Aunque ya pueden utilizarse densidades ópticas a 600 nm (DO⁶⁰⁰) superiores a 0,2, pueden obtenerse densidades ópticas de hasta 50 gracias a los medios de cultivo utilizados. Las densidades superiores a 18 resultan preferibles con el fin de obtener niveles de producción de muteína elevados. Las densidades de entre 16 y 20 han proporcionado resultados óptimos. Seguidamente se mantiene la fermentación bajo las condiciones indicadas anteriormente hasta alcanzar dichos valores de densidad óptica, y después se induce la expresión de la proteína.

Puede utilizarse cualquier agente o condición físico-química capaz de inducir los mecanismos de expresión heterólogos de la muteína en las células de los microorganismos que se utilizan. En el caso específico de que se utilice la cepa bacteriana BL21(DE3) pLysS modificada con un plásmido de expresión que contiene el promotor del fago T7, la expresión se induce con lactosa o derivados de la misma, tales como isopropil-β-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración adecuada, es decir, aproximadamente 1 mM. La duración de la inducción puede variar según lo requerido. Se han obtenido buenos resultados para periodos de varias horas, preferentemente de entre 3 y 4 horas; en el óptimo, se mantiene la inducción del proceso durante 3 horas y 20 minutos utilizando un porcentaje de O₂ disuelto equivalente a aproximadamente 10%.

Se obtuvieron muestras de células antes y después de la inducción y se sometieron a técnicas analíticas de control, tales como electroforesis de SDS-PAGE, para determinar los resultados de la inducción.

Tras alcanzar los niveles requeridos de expresión de la proteína, se separaron las células del medio de cultivo, por ejemplo mediante centrifugación, y se sometieron a un procedimiento de extracción.

El procedimiento de extracción prevé una etapa inicial de lisis celular. En efecto, al expresarse la muteína en bacterias, queda segregada en el interior de la célula huésped, en forma de cuerpos de inclusión. El procedimiento de lisis puede llevarse a cabo utilizando congelación/descongelación, prensa francesa, ultrasonidos (sonicación) o técnicas conocidas similares, en soluciones de lisis que contiene concentraciones adecuadas de surfactantes, preferentemente que contienen Triton X100 en concentraciones de entre 0,5% y 1%. La técnica preferente al utilizar la cepa bacteriana BL21(DE3)pLysS es la técnica de congelación/descongelación, que en una realización óptima se repite durante por lo menos dos ciclos consecutivos.

Dado que la muteína PLGF-1 se libera al medio de lisis tal como ha sido expresada por la célula huésped, es decir, en forma monomérica biológicamente inactiva, tras la lisis se realiza una etapa de renaturalización, por lo menos en parte, que consiste en la dimerización del monómero. Se consigue la renaturalización de la muteína mediante la adición de concentraciones adecuadas de parejas de oxidación-reducción a la solución diluida, seguido de un periodo de incubación de entre 10 y 30 horas, preferentemente de entre 18 y 20 horas a una temperatura de entre 10°C y 30°C, preferentemente de 20°C, bajo agitación. Son ejemplos de estas parejas: cistina/cisteína, cistamina/cisteamina, 2-hidroxietildisulfuro/2-mercaptoetanol o glutatión en forma oxidada o reducida. La última representa el agente preferente y se utiliza, en forma oxidada, a una concentración de entre 0,1 y 2,5 mM, preferentemente de 0,5 mM y, en forma reducida, de entre 0,25 y 6,25 mM, preferentemente de 1,25 mM.

En el caso de que se libere la muteína PLGF-1 expresada al medio de lisis en forma de cuerpos de inclusión, antes de la etapa de renaturalización se lleva a cabo un pase de solubilización. La fracción que contiene los cuerpos de inclusión se solubiliza en un tampón desnaturante que contiene agentes desnaturantes conocidos, tales como urea, isotiocianato de guanidina o hidrocloreto de guanidina. Preferentemente, la solución desnaturante es una solución de urea en concentración desnaturante, por ejemplo 8 M. Para acelerar el procedimiento de solubilización, puede resultar ventajoso someter la fracción que contiene los cuerpos de inclusión a homogeneización o a ultrasonidos (sonicación). La solución que contiene la proteína seguidamente se diluye con el tampón desnaturante mismo y/o con una solución diluyente hasta alcanzar una densidad óptica medida a 280 nm

de aproximadamente 0,5 DO280. Las soluciones de dilución adecuadas contienen sales y polietilenglicol (PEG) y presentan un pH alcalino (pH de aproximadamente 8).

5 La liberación de la muteína PLGF-1 al medio de lisis normalmente se ve acompañada por la liberación de los diversos componentes y sustancias endocelulares del microorganismo, principalmente todo el material nucleico, que podría afectar o interferir con el procedimiento de purificación de la proteína. Para evitar este problema, la suspensión/solución obtenida directamente de la lisis celular puede someterse a una etapa de procesamiento opcional y preliminar adicional consistente en la fragmentación de dicho material. Este resultado se obtiene por medio de agentes enzimáticos, tales como ADNasas (naturales o recombinantes, tales como benzonasa), agentes químicos, tales como ácido desoxicólico, o agentes físicos mecánicos, tales como ultrasonidos (sonicación), 10 agitación rápida con palas, por ejemplo en un mezclador. La fracción física del ADN se lleva a cabo en volúmenes adecuados de solución de lavado que contiene agentes quelantes y detergentes, por ejemplo EDTA y Triton X100, y preferentemente se repite durante varios ciclos, se alterna con dilución, centrifugación y eliminación del sobrenadante con el fin de eliminar cualquier componente celular o sustancia de la fracción que contiene los cuerpos de inclusión.

15 Aunque la muteína PLGF-1 tras la renaturalización ya puede utilizarse sin modificación, preferentemente se somete a por lo menos una etapa de purificación utilizando cualquiera de las técnicas perfectamente conocidas por el experto en la materia para la purificación de material proteico. Con este fin, la muteína puede someterse a filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de afinidad, HPLC, cromatografía de fase inversa y/o electroforesis en gel. Las técnicas preferentes son la cromatografía de intercambio aniónico y la cromatografía de fase inversa. En el caso de que resulte necesario obtener un nivel de purificación extremadamente alto, por ejemplo uno adecuado para el uso terapéutico, se combinan secuencialmente por lo menos dos de las técnicas mencionadas anteriormente. 20

25 La solución que contiene la muteína parcialmente renaturalizada, es decir, por lo menos en parte en forma dimérica, puede cargarse en una resina de intercambio aniónico con el fin de enriquecer la mezcla con la forma dimérica y liberarla de contaminantes bacterianos. Puede utilizarse cualquier matriz comercialmente disponible adecuada para la cromatografía de intercambio aniónico, en la medida en que sus características de capacidad, carga y velocidad de flujo sean compatibles con un procedimiento industrial. En una realización preferente se utiliza una resina de flujo elevado, por ejemplo sefarosa Q Fast Flow (Amersham Biosciences) o un equivalente. Las resinas utilizadas permiten cargar grandes volúmenes de solución proteica, con proporciones de volumen de carga/volumen de columna comprendidos entre 1:1 y 10:1. Resultan preferentes las proporciones vol./vol. de aproximadamente 10:1, debido a que permiten optimizar la utilización de la columna. El procedimiento cromatográfico completo puede llevarse a cabo ventajosamente de modo automático con un sistema computerizado controlado por un programa adecuado, por ejemplo el sistema de software FPCL Director Software (Amersham Biosciences). 30

35 En una variante del procedimiento indicado anteriormente, la muteína parcialmente renaturalizada puede purificarse mediante cromatografía de fase inversa.

40 En este caso, la solución convenientemente diluida que contiene la muteína parcialmente purificada, es decir, parcialmente en forma dimérica y parcialmente en forma monomérica, puede cargarse en cualquier matriz cromatográfica disponible comercialmente que resulte adecuada para la utilización indicada. Preferentemente se utiliza una resina que presente una granulometría que permita garantizar la explotación óptima de la capacidad de absorción de la matriz conjuntamente con el fácil empaquetamiento de la columna misma. Son ejemplos de estas matrices las resinas RP Source 15 ó RP Source 30 (Amersham Biosciences). Todas las soluciones de equilibrado, carga, lavado de resina y elución son soluciones hidroorgánicas que comprenden diferentes porcentajes de solvente orgánico. Son ejemplos de estas soluciones las que comprenden etanol, metanol o acetonitrilo. Preferentemente se utilizan soluciones hidroalcohólicas que comprenden porcentajes crecientes de etanol. Ventajosamente el procedimiento cromatográfico de fase inversa completo se lleva a cabo automáticamente con un sistema computerizado que funciona bajo el control de un programa adecuado, por ejemplo el sistema FPCL Directo Software (Amersham Biosciences). 45

50 En el caso de que se utilicen consecutivamente dos o más técnicas de purificación, la muteína puede obtenerse en una forma activa altamente purificada, es decir, con la proteína comprendida esencialmente en forma dimérica, y sin ninguna contaminación por la forma monomérica. El producto obtenido de esta manera comprende una proporción no inferior a 98,5% de la forma activa, preferentemente no inferior a 99,5%. La forma monomérica residual no excede el 1,5%. Dado que la muteína es químicamente estable, todos los productos de multimerización se encuentran limitados a cantidades traza. La proteína pura obtenida según el método descrito anteriormente puede someterse a etapas adicionales de procesamiento, por ejemplo ultrafiltración a través de membrana. En este caso, el producto se filtra en una membrana con un límite (valor de corte) de filtración inferior o igual a 30 kD y se somete a diafiltración frente a agua acidulada con TFA hasta alcanzar un factor de dilución de 1:10⁶. El producto final obtenido de esta manera puede formularse adecuadamente con aditivos de liofilización y liofilizarse para 55 conservar su actividad biológica en niveles óptimos. En una realización práctica de la invención, la muteína puede convenientemente extraerse, aislarse y purificarse de acuerdo con el procedimiento de purificación descrito en la 60

solicitud de patente internacional PCT n° IT02/00065 (Geymonat) para purificar la proteína PLGF-1 de tipo salvaje, adaptando las condiciones operativas en caso necesario.

La estabilidad química de las muteínas PLGF-1 según la invención se evaluó en ensayos en los que la muteína liofilizada y la proteína PLGF-1 de tipo salvaje se solubilizaron en solución salina o se formularon en un gel y se almacenaron a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante periodos de 40, 170 y 210 días. Los resultados proporcionados posteriormente indican claramente que la muteína en su forma dimérica activa es estable a todas las concentraciones analizadas (20, 5 y 1 mg/ml), ya que no tiende a precipitar o a multimerizarse; en efecto, se observa que la concentración se mantiene en los valores iniciales. Por el contrario, la concentración de la forma dimérica de la proteína de tipo salvaje se reduce drásticamente tras sólo unos cuantos días.

Las muteínas según la invención muestran, además de una estabilidad química/biológica mejorada, una actividad angiogénica comparable a la de la proteína PLGF-1 de tipo salvaje. Esta actividad provoca que las muteínas PLGF-1 según la invención resulten adecuadas para todas las aplicaciones terapéuticas y cosméticas del PLGF-1 natural actualmente conocidas a partir de la técnica anterior.

La acción angiogénica de las muteínas PLGF-1 de la invención se ha determinado utilizando técnicas conocidas, que se llevan a cabo *in vivo* o *in vitro*. En particular, se utilizó el ensayo de vascularización de la córnea del conejo o el ensayo de vascularización de la membrana corioalantoide del pollo (CAM), tal como describen Maglione *et al.*, "Il Farmaco" 55:165-167, 2000.

Un segundo método utilizado para evaluar la vascularización cutánea es el análisis morfométrico computerizado de muestras de piel animal, tal como describen Streit *et al.* (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96(26):14888-14893, 21 de diciembre de 1999). Se tiñeron inmunohistoquímicamente secciones cutáneas utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD31 para el animal utilizado. Las secciones tratadas de esta manera se analizaron bajo un microscopio electrónico con el fin de evaluar el número de vasos sanguíneos por mm², sus dimensiones medias y el área relativa ocupada por los mismos. El efecto angiogénico de las muteínas sobre el tejido miocárdico, y en particular en el caso de la isquemia o el infarto de miocardio, se evaluaron en un modelo animal de isquemia cardiaca tal como describen Maglione *et al.* (*supra*).

Se evaluó la actividad de las muteínas según la invención en el tratamiento del escleroderma en un modelo animal tal como describen Yamamoto T. *et al.*, Arch. Dermatol. Res. Nov. 299(11):535-541, 2000. Se indujo un estado de escleroderma en ratones C3H con bleomicina (100 mcg/ml) inyectados diariamente por vía subcutánea durante 3 semanas. Tras las 3 semanas, se sacrificaron los animales y muestras de piel de las áreas tratadas se sometieron a análisis histológico. El efecto del tratamiento subraya sucesos histológicos que pueden atribuirse a la esclerotización cutánea inducida por la bleomicina y, en particular, el engrosamiento de la piel y niveles elevados de hidroxiprolina.

Los resultados proporcionados posteriormente subrayan la eficacia de las muteínas PLGF-1 según la invención en el tratamiento de todos aquellos estados patológicos o degenerativos naturales que experimentan una mejoría tras un incremento de la vascularización de las áreas implicadas. Una primera aplicación es el tratamiento preventivo o curativo de la isquemia y los daños secundarios a sucesos isquémicos. Son condiciones que deben de ser adecuadas para el tratamiento, la isquemia del tejido miocárdico, el infarto miocárdico, el ictus isquémico y las enfermedades miocárdicas crónicas, la isquemia cerebral y el ictus isquémico, la isquemia intestinal y la isquemia periférica de las extremidades. Una segunda aplicación terapéutica es el tratamiento del escleroderma. Ésta es una enfermedad que implica el sistema microvascular, el tejido conectivo cutáneo y subcutáneo y el tejido conectivo de los órganos internos. La enfermedad induce la activación de los fibroblastos y la producción excesiva de tejido y el depósito perivascular de colágeno, que contribuye fuertemente a la formación de fibrosis y áreas de calcificación, y por lo tanto a la aparición de los síntomas inducidos por la enfermedad. En particular, puede observarse bajo capilaroscopia que grandes cantidades de colágeno esclerotizado circundan los vasos sanguíneos, causando una restricción de la luz de los vasos. Puede distinguirse un escleroderma circunscrito con implicación cutánea, caracterizado por endurecimiento y engrosamiento de la piel debidos a un depósito excesivo e inadecuado del colágeno, y un escleroderma sistémico progresivo en el que los vasos sanguíneos se asocian a la fibrosis cutánea, conjuntamente con una esclerosis sistémica con lesiones de las vísceras. La piel, principalmente la de dedos y manos, se observa que se endurece, se engrosa y se vuelve edematosa. La enfermedad también se encuentra presente a nivel miocárdico, con insuficiencia cardiaca, y a nivel de los sistemas pulmonar, gastrointestinal, renal y osteomuscular. Algunos pacientes también desarrollan artropatías erosivas inducidas por la fibrosis cutánea, lo que complica en gran medida la movilidad de las articulaciones. Maglione *et al.* han informado (solicitud de patente italiana RM n° 2002/A000119) con respecto al factor PLGF-1 de tipo salvaje, que la estimulación de la angiogénesis, en particular en la piel, como resultado del tratamiento con composiciones que contienen PLGF-1, presenta un efecto beneficioso sobre el estado general de la esclerosis inducida por neomicina en ratones. Se observaron los mismos resultados en animales en los que se había inducido previamente un estado de escleroderma y que habían sido tratados con muteínas según la invención.

Una tercera aplicación terapéutica es el tratamiento que apoya los procesos de cicatrización en heridas, úlceras y heridas internas o cutáneas, particularmente durante las etapas post-operatorias.

Una aplicación adicional según la invención se refiere al tratamiento de fenómenos típicos del envejecimiento de la piel. Este tratamiento, aunque considerado esencialmente cosmético, presenta implicaciones terapéuticas al considerarlo conjuntamente con el deterioro precoz del tejido cutáneo debido a la exposición prolongada a la luz solar (fotoenvejecimiento), a radiación de otros tipos o a agentes ambientales/atmosféricos agresivos.

El examen de muestras de piel fotodañada bajo un microscopio electrónico revele una morfología microvascular típica que se caracteriza, entre otras cosas, por la presencia de capilares que se encuentran patológicamente dilatadas y envueltos en elastina o circundados por un material amorfo denso. Se ha observado que la estimulación de nueva vascularización de la piel genera, en piel envejecida tanto natural como precozmente, un efecto modulador sobre la matriz extracelular responsable del tono y firmeza de la piel. La vascularización capilar incrementa se acompaña de un incremento de los fibroblastos y de la producción de colágeno nuevo, seguido de una mejora general de la apariencia de la piel.

Una aplicación adicional de los compuestos de la invención se refiere a la pérdida de pelo.

En efecto, la vascularización mejorada de la piel, específicamente en el área perifolicular, se ve acompañada por la modulación del crecimiento de los apéndices cutáneos (pelo de la cabeza, pelo corporal, etc.) en el sentido de la prevención de la pérdida de pelo y la estimulación de su regeneración. La etapa anagénica, que corresponde a la etapa de crecimiento del pelo, se ve acompañada de un incremento natural de la vascularización del folículo del pelo. La acción angiogénica local estimula este incremento vascular y en consecuencia el crecimiento del pelo. Los análisis morfométricos computerizados de sección de piel proximales a los folículos pilíferos de animales tratados con las composiciones de la invención han demostrado no sólo un incremento de las dimensiones de la luz del pelo y de la densidad del mismo, y por lo tanto un incremento general de la vascularización perifolicular, sino también un incremento de las dimensiones del bulbo del pelo y del diámetro del pelo mismo.

El efecto de impedir la pérdida del pelo en la estimulación del nuevo crecimiento puede aplicarse no sólo al caso de la pérdida natural, sino también al caso de la pérdida tras estados clínicamente significativos, tales como alopecia, trastornos hormonales, quimioterapia, radioterapia o la administración de medicamentos.

Las indicaciones terapéuticas anteriormente identificadas se refieren a la administración directa, sistémica o local de una muteína del factor PLGF-1. Sin embargo, las muteínas de la invención también pueden utilizarse para producir anticuerpos, fragmentos policlonales, monoclonales o funcionalmente activos capaces de reconocer el factor PLGF-1 endógeno, específicamente aquellas regiones de la secuencia de aminoácidos que contienen el sitio de unión para PLGF-1 y el receptor. Los anticuerpos de este tipo son capaces de neutralizar la actividad angiogénica de PLGF-1 y encuentran aplicación en el tratamiento de todas aquellas condiciones caracterizadas por angiogénesis patológica. Son ejemplos de estas condiciones los trastornos inflamatorios tales como la artritis reumatoide o el asma, el edema, la hipertensión pulmonar y la formación y desarrollo de tejido tumoral. Los anticuerpos mismos pueden utilizarse como reactivos inmunodiagnósticos en métodos para la determinación cualitativa y cuantitativa de la producción endógena de PLGF-1. Estos reactivos encuentran aplicación en el diagnóstico de todos aquellos estados patológicos acompañados por la producción anormal de PLGF-1, tales como la formación y desarrollo de tejido tumoral.

Los anticuerpos o fragmentos de los mismos capaces de reconocer las muteínas de PLGF-1 se preparan siguiendo técnicas perfectamente conocidas por el experto en la materia, por ejemplo siguiendo las técnicas descritas en la solicitud WO n° A-01/85796 para la producción de anticuerpos específicos de la proteína PLGF-1 de tipo salvaje.

Asimismo, la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen las muteínas indicadas anteriormente o los anticuerpos neutralizados correspondientes como agentes activos o como reactivos diagnósticos.

Puede utilizarse según la invención cualquier formulación adecuada para la administración sistémica o local. En particular, puede administrarse el factor PLGF-1 parenteralmente con un efecto sistémico o local, o tópicamente sobre la piel o mucosa con un efecto principalmente local. Se obtiene principalmente un efecto sistémico mediante administración intravenosa, aunque también resulta posible la administración intraperitoneal o intramuscular. Se obtiene un efecto local mediante administración tópica, o parenteral intramuscular, subcutánea o intraarticular. Las muteínas de PLGF-1 de manera similar pueden administrarse a nivel local mediante electrotransporte o ionoforesis. De manera similar, pueden utilizarse implantes subcutáneos en el caso de que se requiera la liberación retardada durante un periodo de tiempo. También resulta posible la administración oral del factor, aunque es menos recomendable en vista de la delicada naturaleza del producto activo.

Entre las composiciones para la utilización sistémica o parenteral local se incluyen soluciones, suspensiones, suspensiones de liposomas, emulsiones W/O u O/W. Entre las composiciones para la utilización tópica se incluyen soluciones, lociones, suspensiones, suspensiones de liposomas, emulsiones W/O, O/W, W/O/W y O/W/O, geles, ungüentos, cremas, pomadas y pastas. En una realización preferente, la sustancia activa se formula en forma liofilizada, mezclado con aditivos de liofilización adecuados y listo para ser resolubilizado utilizando

5 diluyentes terapéuticamente aceptables. Son aditivos de liofilización que pueden utilizarse: tampones, polisacáridos, sacarosa, manitol, inositol, polipéptidos, aminoácidos y cualquier otro aditivo compatible con la sustancia activa. En una realización preferente de la invención, se disuelve la sustancia activa en un tampón fosfato ($\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ - $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$) en una cantidad que permite alcanzar una proporción muteína/fosfato tras la liofilización comprendida entre 1:1 y 1:2. Son diluyentes adecuados para la utilización parenteral: agua, solución salina, soluciones de azúcares, soluciones hidroalcohólicas, diluyentes aceitosos, poliaceites, tales como glicerol, etilenglicol o polipropilenglicol, o cualquier otro diluyente compatible con el método de administración en términos de esterilidad, pH, fuerza iónica y viscosidad.

10 En el caso de emulsiones o suspensiones, la composición puede contener agentes surfactantes adecuados de un tipo no iónico, zwitteriónico, aniónico o catiónico utilizado comúnmente en la formulación de medicaciones. Resultan preferibles emulsiones O/W o W/O/W hidrofílicas para la utilización parenteral/sistémica, mientras que resultan preferibles emulsiones W/O u O/W/O lipofílicas para la utilización local o tópica.

15 Además, las composiciones de la invención pueden contener aditivos opcionales, tales como agentes isotónicos, tales como azúcares o polialcoholes, tampones, agentes quelantes, antioxidantes y agentes antibacterianos.

Entre las composiciones para la utilización tópica se incluyen formas líquidas o semisólidas. Las primeras comprenden soluciones o lociones. Éstas pueden ser acuosas, hidroalcohólicas, tales como etanol/agua, o alcohólicas, y se obtienen mediante solubilización de la sustancia liofilizada.

20 Alternativamente, las soluciones de la sustancia activa pueden formularse como geles mediante la adición de agentes gelificantes conocidos tales como: almidón, glicerina, polietilenglicol o polipropilenglicol, poli(met)acrilato, alcohol isopropílico, hidroxiestearato y CARBOPOL[®].

25 Otros tipos de composiciones para la utilización tópica son emulsiones o suspensiones en forma de pomadas, pastas y cremas. Resultan preferentes las emulsiones W/O, debido a que proporcionan una absorción más rápida. Son ejemplos de excipientes lipofílicos: parafina líquida, lanolina anhidra, vaselina blanca, alcohol cetílico, alcohol estearílico, aceites vegetales y aceites minerales. Pueden utilizarse ventajosamente agentes que incrementan la permeabilidad de la piel, de manera que facilitan la absorción. So ne ejemplos de estos agentes aditivos fisiológicamente aceptables tales como alcohol polivinílico, polietilenglicol o dimetilsulfóxido (DMSO).

30 Otros aditivos utilizados en las composiciones tópicas son los agentes isotónicos, tales como azúcares o polialcoholes, tampones, agentes quelantes, antioxidantes, agentes antibacterianos, agentes espesantes y agentes dispersantes.

35 Igualmente pueden utilizarse composiciones para la utilización local o sistémica con liberación retardada durante un periodo de tiempo, y entre ellas se incluyen polímeros tales como polilactato, poli(met)acrilato, polivinilpirrolidona, metilcelulosa, carboximetilcelulosa y otras sustancias conocidas de la técnica. También pueden utilizarse composiciones de liberación lenta en forma de implantes subcutáneos basadas en, por ejemplo, polilactato u otros polímeros biodegradables.

Aunque la sustancia activa ya es estable por sí misma y preferentemente se empaqueta en forma liofilizada, las composiciones farmacéuticas pueden comprender ventajosamente sustancias adicionalmente estabilizadoras para las muteínas de PLGF-1 en la forma dimérica activa. Son ejemplos de estas sustancias: cisteína, cisteamina o glutatión.

40 La dosificación de la muteína depende de la vía de administración y de la formulación seleccionada. Para la administración parenteral, las cantidades varían entre 1 mcg/kg/día y 500 mcg/kg/día, preferentemente entre 10 mcg/kg/día y 200 mcg/kg/día. Estas administraciones se obtienen con composiciones farmacéuticas que comprenden entre 50 mcg y 30 mg en cada dosis unitaria, preferentemente entre aproximadamente 500 mcg y 10 mg en cada dosis. Para la aplicación terapéutica tópica han demostrado ser eficaces cantidades que varían entre 0,1 mg y 10 mg por grao de composición. Las composiciones cosméticas locales para el tratamiento del envejecimiento de la piel o la pérdida de pelo comprenden preferentemente entre 0,01 mg y 0,09 mg de sustancia activa por gramo de composición.

50 La duración del tratamiento varía según la patología o el efecto requerido. En el caso del tratamiento del escleroderma, el periodo de aplicación varía entre 1 día y 12 meses, según la severidad de la patología. En el caso del tratamiento del envejecimiento natural o precoz de la piel, el periodo de aplicación varía entre 1 y 400 días, preferentemente durante por lo menos 30 días. En el caso del tratamiento para evitar la pérdida de pelo o para estimular el crecimiento nuevo de pelo, el periodo de aplicación de manera similar varía entre 1 y 400 días.

A continuación, se describe la invención mediante ejemplos, el fin de los cuales es únicamente ilustrativo y no limitativo.

Ejemplo 1

Síntesis del ADN codificante de la muteína

5 Se generó la muteína PIGF-1, que los presentes inventores han denominado PIGF-1CG, mediante mutación de la timidina (T) nº 382 (secuencia SEC ID nº 1) en guanidina (G). De esta manera, el codón TGC, nucleótidos 382 a 384 de la secuencia indicada anteriormente, codificante de una cisteína, se transformó en GGC codificante de un glicina.

Desde el punto de vista de los aminoácidos, la cisteína mutada en glicina en la muteína P1GF-1CG se encuentra en la posición 125 de la secuencia SEC ID nº 2.

10 Para la síntesis del ADN codificante de la muteína, se aplicó la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Se utilizó el vector de expresión pET3PLGF1 codificante de la proteína metionil-P1GF-1 sin péptido de señal (documento EP nº A-0 550 519) como molde para la PCR. En la práctica, ésta es la proteína PLGF-1 de tipo salvaje sin los primeros 18 aminoácidos (péptido de señal) y con una metionina en la posición 1 (N-terminal) (SEC ID nº 2). Los oligonucleótidos utilizados como cebadores eran los siguientes:

oligo1 (cebador directo) que presenta la secuencia 5'-CTGGC GCATATGCTGCCTGCTGTGCCC-3'. Ésta contiene un sitio NdeI (subrayado) y el codón de inicio (en negrita),

15 oligo2 (cebador inverso) que presenta la secuencia 5'-GGTTACCTCCGGGGAACAGCATCGCC**GC**CC-3'. Ésta contiene una mutación T->G (nucleótido subrayado y en negrita) que transforma el codón TGC, codificante de una cisteína, en el codón GGC (en negrita), codificante de una glicina.

20 La cadena de nucleótidos obtenidas tras la PCR llevada a cabo con un ciclador génico de BioRad se sometió a una reacción de completado (rellenado) y, posteriormente, se digirió con el enzima de restricción NdeI. El fragmento obtenido, con extremos "romos"/NdeI se clonó en extremos "romos"/NdeI correspondientes del vector de expresión procariótico pET3 según protocolos estándares. De esta manera, se creó el plásmido pET3PLGF1CG, codificante de la muteína PLGF-1 conocida como PLGF-1CG.

Dicho plásmido se utilizó según técnicas conocidas para transformar la cepa de *E. coli* [B12(DE3)pLysS] (Promega Corporation USA) y producir la cepa huésped [B12(DE3)pLysS PLGF-1CG].

25 La técnica de construcción utilizada para dicho plásmido se describe de manera general en la figura 5.

Ejemplo 2: producción, extracción y purificación de la muteína PLGF-1CG

Se cultivó el microorganismo [B121(DE3)pLysS PLGF-1CG] en un fermentador utilizando como medio de cultivo la solución SBM, que comprende:

Solución A (en 1 litro)	
Extracto de levadura Bacto (Difco)	34 g
Sulfato amónico	2,5 g
Glicerol	100 ml
H ₂ O c.s. para:	900 ml
Solución B (10X) (por cada 100 ml)	
KH ₂ PO ₄	1,7 g
K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	20 g
o	
K ₂ HPO ₄	15,26 g
H ₂ O c.s. para:	100 ml

30 Las soluciones A y B se mezclaron en forma estéril en el momento de la utilización.

Se indujo la expresión utilizando IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) 1 mM.

Antes de la fermentación se realizó una etapa de preinoculación. Se seleccionó un tubo de microorganismo liofilizado y se suspendió en 1 ml de SBM + 100 µg/ml de ampicilina + 34 µg/ml de cloranfenicol, la suspensión se

diluyó adicionalmente y se incubó a 37°C durante una noche. Tras la dilución en la misma solución SBM con adición de ampicilina y cloranfenicol, el preinoculado se dividió en 4 matraces Erlenmeyer.

Se incubó el contenido de cada matraz Erlenmeyer a 37°C durante 24 horas. Se mezcló el contenido de los 4 matraces Erlenmeyer y se leyó la DO^{600} , diluyendo 1/20 en agua (50 μ l + 950 μ l de agua).

5 A continuación, se centrifugó un volumen de preinoculación establecido durante 10 minutos a 7.500xg a 4°C en tubos estériles. Seguidamente, se resuspendieron las bacterias en 20 ml de SBM + 200 μ g/ml de ampicilina + 10 μ g/ml de cloranfenicol por cada litro de fermentación, mediante agitación a 420 rpm a temperatura ambiente durante 20 minutos.

10 Se llevó a cabo la fermentación en solución SBM que contenía 200 μ g/ml de ampicilina, 10 μ g/ml de cloranfenicol y una cantidad adecuada de agente antiespumante, a una temperatura de 37°C y en presencia de O_2 disuelto (al 30%) y a un valor de pH de entre 6,4 y 7,4.

Se inició la inducción al alcanzar el medio de cultivo una densidad óptica a 600 nm (DO^{600}) de entre 16 y 20 unidades.

15 El agente inductor utilizado era IPTG 1 mM en presencia de O_2 disuelto al 10% (con respecto a la saturación en el aire). La duración de la inducción era aproximadamente 3 horas. Se controló la inducción llevando a cabo electroforesis SDS-PAGE, con una carga de 20 μ l de solución pre-inducción y post-inducción previamente sometida a ebullición.

A continuación, se centrifugó a 7.500xg durante 10 minutos a 3.000xg durante 25 minutos a 4°C el medio de cultivo que contenía las bacterias inducidas y se descartó el sobrenadante.

20 A continuación, se sometieron a lisis las células bacterianas seguido de extracción y purificación de los cuerpos de inclusión. La lisis bacteriana se llevó a cabo por medio de 2 ciclos de congelación/descongelación a -80°C/37°C en una solución de lisis que contiene Mg_2SO_4 1 mM + Tris-HCl 20 mM, pH 8 + Triton X100 al 1%.

25 La mezcla de lisis se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos bajo agitación (250 rpm) y después se vertió en un mezclador de capacidad adecuada, diluyendo con una cantidad de solución de lavado que contenía Triton-X100 al 0,5% + EDTA 10 mM, pH 8, equivalente a 3 ml por cada 450 DO^{600} de bacterias.

En caso necesario, se añadieron 0,4 μ l de agente antiespumante no diluido por cada mililitro de muestra.

30 La solución se mezcló a una velocidad máxima durante 1 minuto, o hasta homogeneizar la muestra. A continuación, se transfirió el contenido del mezclador a un recipiente de capacidad adecuada, adecuadamente diluido con 6,5 ml de solución de lavado por cada 450 DO^{600} de bacterias, la suspensión obtenida de esta manera se centrifugó a 13.000xg durante 45 minutos a 25°C y se descartó el sobrenadante.

Se repitió el procedimiento de lavado completo durante un número de ciclos hasta obtener un pellet final que contenía los cuerpos de inclusión de la proteína expresada.

35 A continuación, el pellet que contenía los cuerpos de inclusión se solubilizó en 7 ml de tampón desnaturante BD (urea 8 M, Tris 50 mM, pH 8, etilendiamina 20 mM), la solución se diluyó hasta que la concentración final de urea hasta 5 M. Se llevó a cabo la renaturalización de la proteína en la solución obtenida de esta manera, mediante la adición de glutatión reducido (concentración final equivalente a 1,25 mM) y glutatión oxidado (concentración final equivalente a 0,5 mM) e incubación a 20°C durante 18 a 20 horas bajo agitación.

Al final del periodo de incubación se centrifugó durante 10 minutos a 20°C, 10.000xg, y se filtró a través de filtros de 0,45 μ m y 0,8 μ m.

40 La muteína en forma renaturalizada, es decir en forma dimérica, se sometió a purificación mediante cromatografía de intercambio aniónico.

Se cargó la solución de muteína en resina de sefarosa Q FAsT Flow (Amersham Biosciences) equilibrada con tampón A (HCl de etanolamina 20 mM, pH 8,5) y se eluyó, tras el lavado, con tampón B al 20% (tampón A + NaCl 1 M), correspondiente a una concentración de NaCl de 200 mM.

45 La muteína parcialmente purificada se llevó a un grado más alto de pureza mediante cromatografía de fase inversa. Para este fin se diluyó el pico de elución de cromatografía de intercambio iónico con una solución que contenía TFA y etanol, de manera que la muestra se diluyese 1,5 veces y contuviese 15% de etanol y 0,3% de TFA. La adición de estas sustancias incrementa la unión de la muteína a la resina de fase inversa.

50 Se cargó la solución en resina RP Source (Amersham Biosciences) con un diámetro medio de 15 ó 30 micrómetros equilibrada con una solución que contenía 40% de etanol y 0,1% de TFA. La solución de lavado elimina la forma monomérica de la muteína, mientras que la forma dimérica se eluye en un gradiente creciente de etanol hasta alcanzar un porcentaje de 70% de etanol.

Se realizó un seguimiento del procedimiento cromatográfico de purificación, controlando la absorbancia a 280 nm de las fracciones eluidas.

La solución de dímero obtenida de esta manera se diluyó a -20°C y después se ultradiafiltró y se liofilizó según técnicas conocidas.

5 Ejemplo 3: estudio de estabilidad de la muteína PLGF-1CG que porta la sustitución Cys 125 Gly.

Se solubilizó la muteína P1GF-1CG en solución salina a concentraciones teóricas de 20, 5 y 1 mg/ml. Simultáneamente, también se solubilizó la proteína P1GF-1 (sin mutación) en solución salina a una concentración de 20 mg/ml. Todas las muestras se almacenaron en la nevera (4°C a 8°C) durante 40 días como máximo.

10 Se determinó la concentración real mediante el cálculo del promedio de los valores obtenidos de 3 diluciones independientes adecuadas. El método utilizado fue la espectrofotometría utilizando una longitud de onda de 280 nm y conociendo que la absorbancia de 1 DO (densidad óptica), medida con una cubeta con un camino óptico estándar de 1 cm, corresponde a una concentración de P1GF-1 y de P1GF-1CG equivalente a 1 mg/ml. Durante los días siguientes al inicio del experimento (tiempo 0 en la Tabla 1), antes de llevar a cabo las diluciones adecuadas para determinar la concentración, se centrifugó una alícuota de cada muestra a 13.000 rpm en una microcentrífuga ALC 4212 durante 10 minutos y se utilizó el sobrenadante para el análisis posterior. De esta manera, se eliminaron los posibles precipitantes y, en consecuencia, los resultados se refieren a la proteína remanente en la solución únicamente.

20 Los resultados del presente estudio se ilustran en la Tabla 1, y muestran claramente que la muteína, a todas las concentraciones analizadas (20, 5 y 1 mg/ml), y por lo menos hasta los 40 días, es estable, ya que no tiende a precipitar, incluso en la medida de que se observó que la concentración se mantenía en los valores iniciales. A la inversa, tras sólo 4 días de almacenamiento, sólo 7,8% de la proteína sin mutación, almacenada a una concentración de 20 mg/ml bajo las mismas condiciones que la muteína, seguía en la solución. Este valor cayó todavía más (5,5%) tras 12 días. Resulta importante indicar que incluso tras 24 horas de almacenamiento a una temperatura de entre 4°C y 8°C, ya se observó abundante precipitación de la proteína P1GF-1 sin mutación.

25

Tabla 1.

Tiempo almacenado a 4-8°C (días)	Concentración media (mg/ml)							
	P1GF-1CG		PIG-1CG		PIGF-1CG		PIGF-1	
	20 mg/ml	S.D.	5 mg/ml	S.D.	1 mg/ml	S.D.	20 mg/ml	S.D.
0	20,38	1,00	5,43	0,04	1,07	0,02	20,14	0,18
4	19,69	0,57	5,25	0,27	0,98	0,08	1,57	0,10
12	20,46	0,54	5,28	0,19	1,00	0,01	1,11	0,01
26	20,72	0,33	N.A.		N.A.		N.A.	
40	20,32	0,75	N.A.		N.A.		N.A.	

S.D.=Desviación estándar
N.A.=No analizado

30 El perfil electroforético (composición de monómero-dímero-polímero) de la muteína P1GF-1CG (figura 1) también era sustancialmente estable bajo las condiciones anteriormente indicadas. En efecto, la electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras de la proteína P1GF-1CG, solubilizada en solución salina a una concentración de 20 mg/ml y congelada (control, línea 1 de la figura 1) o almacenada a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 40 días (muestra, línea 2 de la figura 1) revela sustancialmente sólo alteraciones mínimas, representadas por la desaparición de la minúscula parte monomérica y por la formación de una cantidad extremadamente reducida de trímero (<0,5% del dímero).

Ejemplo 4: Estudio II de estabilidad de la muteína PLGF-1CG formulada en gel.

35 La muteína P1GF-1CG y la proteína P1GF-1 no mutada se solubilizaron a una concentración de 0,2 mg/ml en un gel compuesto de:

CARBOPOL 940=

1% P/V

Acetato sódico pH 4,4=	15 mM
EDTA sal disódica sin control de pH=	0,04% P/V
Metilparabén=	0,05% P/V

5 Se llevó el pH a un valor entre 5,5 y 6 utilizando NaOH/ácido acético.

Los 2 geles se almacenaron a una temperatura de entre 4°C y 8°C. En diversos tiempos se extrajo una parte, por duplicado, de los 2 geles (aproximadamente 0,2 ml) y se pesó en balanzas analíticas.

Las muestras pesadas se añadieron con un volumen, expresado en microlitros, de 2x tampón no reductor para muestras equivalente al peso, expresado en miligramos, de la parte de gel.

10 Tras agitar con vórtex durante 10 minutos y centrifugar a 13.000 rpm (microcentrífuga ALC 4214) durante 10 minutos adicionales, se separó el sobrenadante. Se centrifugó nuevamente y se separó el nuevo sobrenadante. Una parte de éste último, conjuntamente con estándares de cantidad, se analizó mediante electroforesis SDS-PAGE no reductora. Tras la tinción, se analizaron los geles de electroforesis utilizando un densiómetro para encontrar la concentración de la forma dimerica de las muestras analizadas.

15 Los resultados obtenidos en diversos tiempos y expresados como porcentaje de dímero con respecto a lo presente en el tiempo cero, se indican en la Tabla 2 y expresan en forma de gráfico en la figura 2. A partir de estos datos puede observarse que, mientras que la cantidad de dímero P1GF-1CG se mantiene constante hasta el final de los 170 días analizados, la de P1GF-1 cae al 71% de su valor inicial tras 150 días, y al 55% tras 210 días.

20 El perfil de la electroforesis (composición de monómero-dímero-polímero) también muestra que la muteína PIGF-1C es sustancialmente estable bajo las condiciones anteriormente indicadas (figura 3). En efecto, la electroforesis SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras de la proteína PIG1-1CG, solubilizada en gel carbopol a una concentración de 0,20 mg/ml y congelada (control, línea 2 de la figura 3) o almacenada a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 170 días (muestra, línea 1 de la figura 3), no revela ningún fenómeno de polimerización. A la inversa, estos fenómenos de multimerización resultan claramente evidentes para la proteína PIGF-1 no mutada, tal como se ilustra en la figura 4 (comparar la línea 1 - proteína almacenada a una temperatura de entre 4°C y 8°C durante 150 días, línea 2 - proteína congelada).

Tabla 2.

Tiempo almacenado a 4-8°C (días)	% de dímero	
	PIGF-1CG (muteína) en gel	PIGF-1 en gel
0	100,00	100,00
30	108,00	N.A.
57	N.A.	83,40
119	N.A.	72,70
133	98,70	N.A.
150	N.A.	71,10
170	101,50	N.A.
210	N.A.	54,90

N.A.=no analizado

Ejemplo 5: evaluación de la actividad angiogénica de la muteína PLGF-1CG

30 Se comparó la actividad angiogénica de la muteína PLGF-1CG, del factor PLGF-1 de tipo salvaje y, a modo de referencia positiva, del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) utilizando el ensayo de vascularización de membrana corioalantoide de pollo (CAM) ya descrito por Maglione *et al.* ("Il Farmaco", *supra*). Se absorbieron en esponjas de gelatina de 1 mm³ diversas cantidades de muteína y de factor de tipo salvaje (entre 0 y 3 mcg/esponja), después se implantaron sobre la superficie de CAMs. Tras 12 días, las regiones CAM en contacto con las muestras se seccionaron, se tiñeron y se cuantificó el efecto angiogénico utilizando la técnica morfométrica denominada

"recuento de puntos". Específicamente, se analizaron las secciones de CAM bajo un microscopio sobre una rejilla con 144 puntos de intersección y se expresaron los resultados en porcentaje de puntos de intersección ocupados por los capilares en una sección transversal (porcentaje del área que se había vascularizado). Los resultados, ilustrados en la figura 6, muestran una actividad angiogénica esencialmente equivalente para muteína y factor de tipo salvaje.

Ejemplo 6: evaluación del efecto de la muteína PLGF-1CG sobre la isquemia cardiaca inducida por isoprenalina

Se evaluó el efecto de la muteína PLGF-1CG sobre la isquemia cardiaca y se evaluó el infarto en isquemia inducida en un modelo animal por medio de isoprenalina, tal como describen Maglione *et al.* (*supra*) en comparación con el factor de tipo salvaje. El experimento se llevó a cabo en conejos, que se trataron con una única dosis diaria de 160 mcg/kg de muteína o con volúmenes equivalentes de excipiente solo, administrados intravenosamente los días 1 a 5. Se administró la isoprenalina subcutáneamente los días 1 y 2. Las características típicas del electrocardiograma (ECG) que indican el daño isquémico principal, tal como la inversión de la onda T, el ensanchamiento de la onda S y la prominencia de la onda Q, son claramente más marcados en animales tratados con excipiente solo, en comparación con animales tratados con la muteína a examen. Se evaluaron las variaciones en la CG de animales tratados y no tratados en una escala de puntos comprendida entre cero y seis, tal como se indica a continuación: 0, sin lesión; 1, prominencia de la onda S; 2, prominencia de la onda T; 3, depresión del brazo descendiente de la onda T; 4, ensanchamiento de la onda S; 5, inversión de la onda T; 6, prominencia de la onda Q. De la misma manera, se calculó el área total bajo la curva definida por los puntos ECG durante los 5 días del ensayo para animales tratados y no tratados. Se ilustran los resultados en la figura 7 y muestran una reducción significativa del daño isquémico en animales tratados con la muteína PLGF-1CG. Los resultados subrayados por el perfil electrocardiográfico se confirmaron mediante observación macroscópica y microscópica de los tejidos isquémicos. Dicho examen muestra la presencia de lesiones isquémicas y alteraciones histológicas de severidad moderada con respecto a las observadas en el tejido cardiaco de animales tratados con excipiente solo.

Ejemplo 7: evaluación del efecto de la muteína PLGF-1CG sobre el escleroderma inducido con neomicina

En el presente estudio, se utilizó el modelo de escleroderma animal descrito por Yamamoto *et al.* (*supra*).

Se trató un primer grupo de ratones C3H con bleomicina (100 mcg/ml) inyectada diariamente por vía subcutánea durante 3 semanas. Tres otros grupos de ratones C3H se trataron de manera similar a la indicada anteriormente, aunque se añadieron 0,1, 1 y 10 mcg/ml de la muteína PLGF-1CG a la inyección diaria, respectivamente. Tras 3 semanas de tratamiento, se sacrificaron los animales y se obtuvieron muestras de piel de las áreas tratadas y se sometieron a análisis histológico. El efecto del tratamiento con PLGF-1CG a las concentraciones de 1 y 10 mcg/ml, pero no a 0,1 mcg/ml, pone de manifiesto una reducción significativa de los sucesos histológicos que pueden atribuirse a la esclerotización cutánea inducida por la bleomicina. En particular, se redujeron significativamente el engrosamiento de la piel y los niveles de hidroxiprolina con respecto a los ratones tratados con bleomicina sola.

Ejemplo 8: composiciones farmacéuticas

i) Solución para la utilización por vía parenteral

Se introdujeron 58 miligramos de muteína liofilizada, que contenía 25 mg de PLGF-1CG pura y 33 mg de tampón fosfato (10 mg de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{H}_2\text{O}$ y 23 mg $\text{Na}_2\text{HPO}_4/2\text{H}_2\text{O}$) y aproximadamente 125 ml de solución salina para la utilización parenteral, separadamente en viales preparados para permitir la mezcla del producto liofilizado con el diluyente inmediatamente antes de la utilización. La concentración de sustancia activa resultante tras la solubilización era aproximadamente de 0,2 mg/ml.

ii) Composición tópica en forma de gel:

Se introdujo una cantidad de sustancia liofilizada que contenía 10 mg de sustancia activa en 20 ml de solución hidroalcohólica de etanol al 10% que contenía 20% de DMSO. A continuación, se añadió la solución a un excipiente gel adecuado que contenía los ingredientes siguientes: Carbopol 940 al 1%, acetato sódico 15 mM (pH 4,4), solución de EDTA disódico al 0,04% p/v, metilparabén al 0,05% p/v con un pH final comprendido entre 5,5 y 6.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Geymonat S.r.L.

<120> Muteína PLGF-1

<130> BW285R

<160> 4

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

<211> 418

<212> ADN

<213> Homo sapiens

5

<220>

<221> CDS

<222> (10)..(408)

10

<223> Secuencia sin el ADN codificante del péptido de nucleótidos 10 a 408 codifican los aminoácidos 19 a 149 de la patente EP nº 0 550 519. señal de la proteína de tipo salvaje. Los aminoácidos 19 a 149 de la proteína indicada en la reivindicación 1 de la patente EP nº 0 550 519.

<400> 1

ctggcgcac atg ctg cct gct gtg ccc ccc cag cag tgg gcc ttg tct gct 51

Met Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala

1

5

10

ggg aac ggc tcg tca gag gtg gaa gtg gta ccc ttc cag gaa gtg tgg 99

Gly Asn Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp

15

20

25

30

ggc cgc agc tac tgc cgg gcg ctg gag agg ctg gtg gac gtc gtg tcc 147

Gly Arg Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser

35

40

45

gag tac ccc agc gag gtg gag cac atg ttc agc cca tcc tgt gtc tcc 195

Glu Tyr Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser

50

55

60

ctg ctg cgc tgc acc ggc tgc tgc ggc gat gag aat ctg cac tgt gtg 243

Leu Leu Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val

65

70

75

ES 2 356 360 T3

ccg gtg gag acg gcc aat gtc acc atg cag ctc cta aag atc cgt tct 291
 Pro Val Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser
 80 85 90

ggg gac cgg ccc tcc tac gtg gag ctg acg ttc tct cag cac gtt cgc 339
 Gly Asp Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg
 95 100 105 110

tgc gaa tgc cgg cct ctg cgg gag aag atg aag ccg gaa agg tgc ggc 387
 Cys Glu Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly
 115 120 125

gat gct gtt ccc cgg agg taa ccaggatcc 418
 Asp Ala Val Pro Arg Arg
 130

<210> 2

<211> 132

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Leu Pro Ala Val Pro Pro Gln Gln Trp Ala Leu Ser Ala Gly Asn
 1 5 10 15

Gly Ser Ser Glu Val Glu Val Val Pro Phe Gln Glu Val Trp Gly Arg
 20 25 30

Ser Tyr Cys Arg Ala Leu Glu Arg Leu Val Asp Val Val Ser Glu Tyr
 35 40 45

Pro Ser Glu Val Glu His Met Phe Ser Pro Ser Cys Val Ser Leu Leu
 50 55 60

Arg Cys Thr Gly Cys Cys Gly Asp Glu Asn Leu His Cys Val Pro Val
 65 70 75 80

ES 2 356 360 T3

Glu Thr Ala Asn Val Thr Met Gln Leu Leu Lys Ile Arg Ser Gly Asp
85 90 95

Arg Pro Ser Tyr Val Glu Leu Thr Phe Ser Gln His Val Arg Cys Glu
100 105 110

Cys Arg Pro Leu Arg Glu Lys Met Lys Pro Glu Arg Cys Gly Asp Ala
115 120 125

Val Pro Arg Arg
130

<210> 3

<211> 27

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Cebador directo para la amplificación de la proteína PLGF-1 humana

<400> 3

ctggcgcata tgctgcctgc tgtgcc 27

10

<210> 4

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

15

<220>

<223> Cebador inverso para la amplificación de la proteína PLGF-1 humana

<400> 4

20

ggtacctcc ggggaacagc atcgccgcc c 31

REIVINDICACIONES

1. Muteína de la forma monomérica del factor de crecimiento placentario de tipo 1 (PLGF-1) humano o animal, que implica la sustitución o la eliminación en la secuencia polipeptídica de la proteína de tipo salvaje de por lo menos el residuo cisteína (Cys) situado en la posición 142 de la secuencia polipeptídica de la preproteína, correspondiente a la cisteína situada en la posición 125 de la secuencia SEC ID nº 2, y que dicha sustitución o eliminación no afecta a la formación del dímero biológicamente activo aunque impide la multimerización de dicha forma monomérica.
2. Muteína según la reivindicación 1, en la que el residuo Cys situado en la posición 142 se ha sustituido por un residuo de glicina (Gly).
3. Muteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en forma de una preproteína o proteína madura.
4. Muteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que uno o más aminoácidos adicionales de la proteína de tipo salvaje se eliminan, sustituyen o añaden sin alterar la actividad angiogénica de la muteína.
5. Muteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en forma dimérica.
6. Muteína según la reivindicación 5, que comprende por lo menos 98,5% de la forma dimérica.
7. Secuencia de nucleótidos que comprende el ADN codificante de la muteína según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4.
8. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 7, en la que un codón TGC o TGT en la secuencia codificante del PLGF-1 de tipo salvaje se ha eliminado o modificado.
9. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 8 en la que se ha sustituido un codón TGC o TGT por un codón GGC, GGT, GGA o GGG.
10. Secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9, en la que la base timidina situada en la posición 382 de la secuencia SEC ID nº 1, o derivados de la misma causados por la degeneración del ADN, se ha sustituido por la base guanidina.
11. Sistema de expresión que comprende la secuencia de nucleótidos reivindicada según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, flanqueada por secuencias no traducidas para el control y la regulación de la expresión.
12. Sistema de expresión según la reivindicación 11, que es un sistema de expresión inducible en células bacterianas.
13. Sistema de expresión según la reivindicación 11 ó 12, en el que la expresión se encuentra bajo el control de un promotor inducible.
14. Sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 13, que es el sistema de expresión de la ARN polimerasa del fago T7, y que la expresión resulta inducida mediante lactosa, isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) o análogo funcionalmente equivalente.
15. Célula huésped transformada por medio del sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 14.
16. Célula según la reivindicación 15, que es una célula bacteriana.
17. Célula bacteriana según la reivindicación 16, que se deriva de una cepa de *E. coli*.
18. Procedimiento para la producción de la secuencia de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, en el que el ADN codificante de la muteína es producido por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores oligonucleótidos que han sido convenientemente modificados con respecto a la secuencia de nucleótidos de tipo salvaje.
19. Procedimiento según la reivindicación 18 en el que el oligonucleótido de secuencia SEC ID nº 3 se utiliza como cebador 5'-3' (directo) y el oligonucleótido de secuencia SEC ID nº 4 se utiliza como cebador 5'-3' (inverso).
20. Procedimiento según la reivindicación 19, en el que la secuencia de ADN codificante de la proteína PLGF-1 sin la proteína de señal se utiliza como molde en la reacción en cadena de la polimerasa.
21. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, en el que la secuencia de ADN obtenida en la reacción en cadena de la polimerasa se somete a una reacción de completado, después se digiere con enzimas de restricción adecuados y se clona en un vector adecuado.

22. Procedimiento para la producción y extracción de una muteína del factor PLGF-1, en el que las células huésped según cualquiera de las reivindicaciones 15 a 17 se cultivan en un medio de cultivo adecuado, la expresión de la proteína se induce utilizando un inductor adecuado, las células se aíslan y se lisan, y la muteína se extrae de la mezcla de lisis.
- 5 23. Procedimiento según la reivindicación 22, en el que el medio de cultivo comprende uno o más agentes de selección, extracto de levadura, glicerol y sales amónicas, y se encuentra libre de material de origen animal o humano.
24. Procedimiento según la reivindicación 22 ó 23, en el que las células se cultivan, antes de la etapa de inducción de la expresión, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.) del medio de cultivo de entre 0,2 y 50 unidades, a 600 nm.
- 10 25. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 24, en el que la expresión se induce utilizando lactosa o isopropil- β -tiogalactopiranosido (IPTG).
26. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, en el que la lisis celulares se lleva a cabo por medio de congelación/descongelación, prensa francesa u otras técnicas equivalentes.
- 15 27. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 26, en el que los cuerpos de inclusión liberados durante la lisis se aíslan por medio de por lo menos dos ciclos de centrifugación y lavado en un tampón adecuado.
28. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 27, en el que los cuerpos de inclusión se solubilizan en un tampón desnaturizante que contiene urea, isotiocianato de guanidina, hidrocloreuro de guanidina u otro agente desnaturizante, y opcionalmente se homogeneizan o se sonicán.
- 20 29. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 28, en el que, tras la solubilización de los cuerpos de inclusión, la solución se diluye y el material proteico se renaturaliza en forma dimérica mediante la adición a la solución de agentes oxidorreductores y la incubación durante 10 a 30 horas, durante 18 a 20 horas a una temperatura de entre 10°C y 30°C, bajo agitación.
- 25 30. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 29, que comprende por lo menos una etapa de purificación de proteína dimérica.
31. Procedimiento según la reivindicación 30, en el que la etapa de purificación consiste de una cromatografía de intercambio iónico.
- 30 32. Procedimiento según la reivindicación 30 ó 31, en el que la solución procedente de la etapa de renaturalización se carga en una columna de intercambio aniónico con una proporción de volumen de carga/volumen de columna de entre 1:1 y 10:1.
33. Procedimiento según la reivindicación 30 ó 31, que comprende una etapa de purificación en columna mediante cromatografía de fase inversa.
- 35 34. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 22 a 33, que comprende un pase adicional de ultrafiltración seguido de liofilización en presencia o en ausencia de aditivos adecuados.
35. Muteína según la reivindicación 5 ó 6, para la utilización en un método de tratamiento terapéutico.
36. Muteína según la reivindicación 35, en el tratamiento de enfermedades isquémicas.
37. Muteína según la reivindicación 36, en el tratamiento de la isquemia del tejido miocárdico, el infarto miocárdico, el ictus isquémico y enfermedades miocárdicas isquémicas crónicas tales como la isquemia cerebral y el ictus isquémico, la isquemia intestinal y la isquemia periférica de las extremidades.
- 40 38. Muteína según la reivindicación 35, en el tratamiento del escleroderma.
39. Muteína según la reivindicación 35, en el tratamiento de úlceras en la piel, heridas, quemaduras y tratamiento post-operatorio.
- 40 40. Muteína según la reivindicación 35, en el tratamiento del envejecimiento natural o precoz de los tejidos cutáneos.
41. Muteína según la reivindicación 35, en el tratamiento de la pérdida natural o patológica de pelo.
42. Composición farmacéutica que contiene la muteína según la reivindicación 5 ó 6, y un excipiente farmacológicamente aceptable.

43. Composición farmacéutica según la reivindicación 42, adecuada para la utilización parenteral, tópica, oral, nasal o en implante.
44. Composición cosmética que contiene la muteína según la reivindicación 5 ó 6, y un excipiente cosméticamente aceptable.
- 5 45. Método para la preparación de una composición farmacéutica según la reivindicación 42 o de la composición cosmética según la reivindicación 44, en el que la muteína PLGF-1 se asocia a un excipiente farmacológica o cosméticamente aceptable y con otros aditivos habituales.

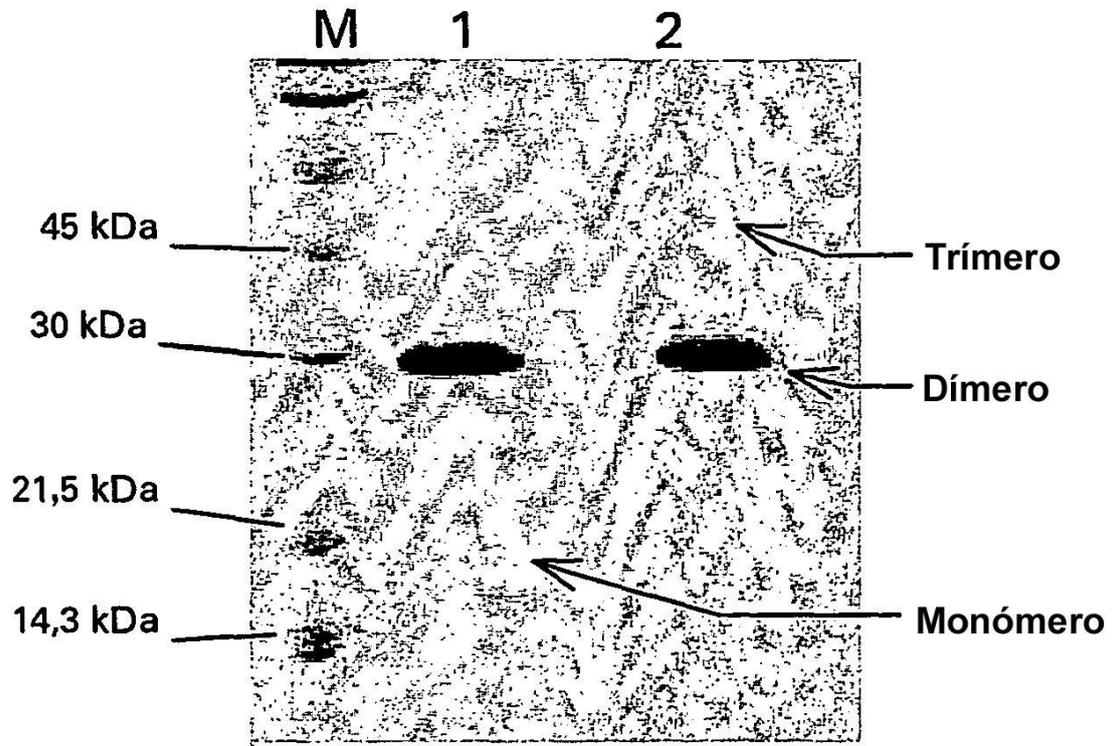


Fig. 1

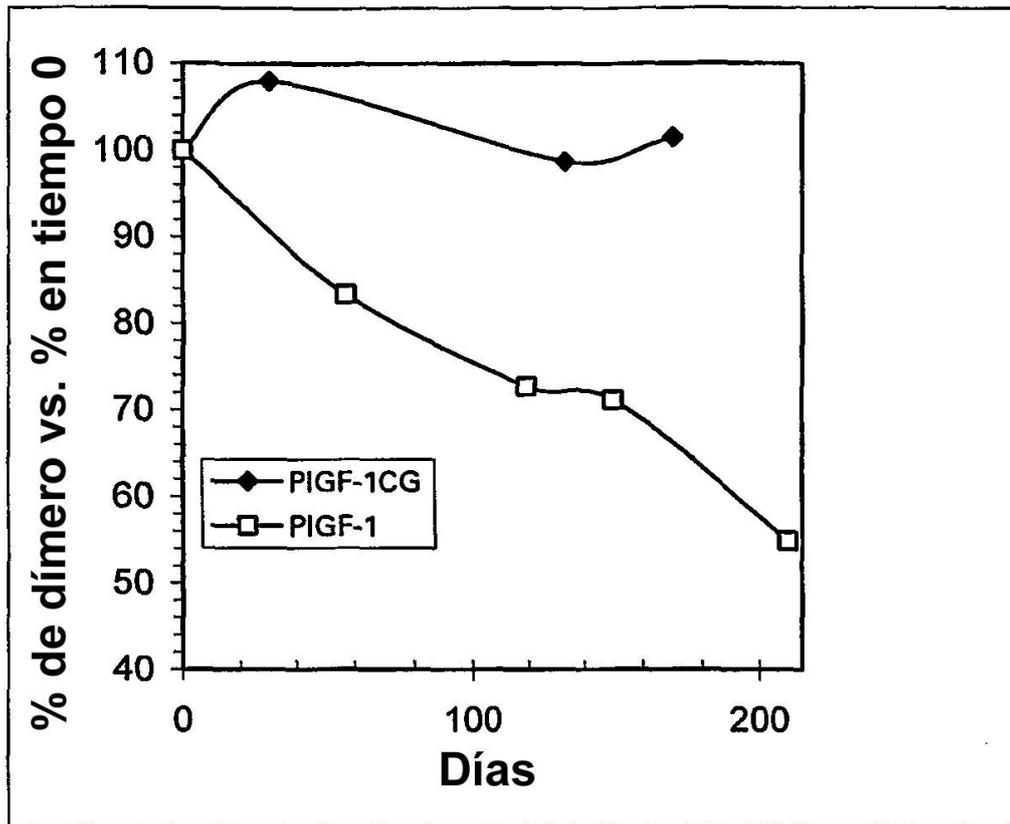


Fig. 2

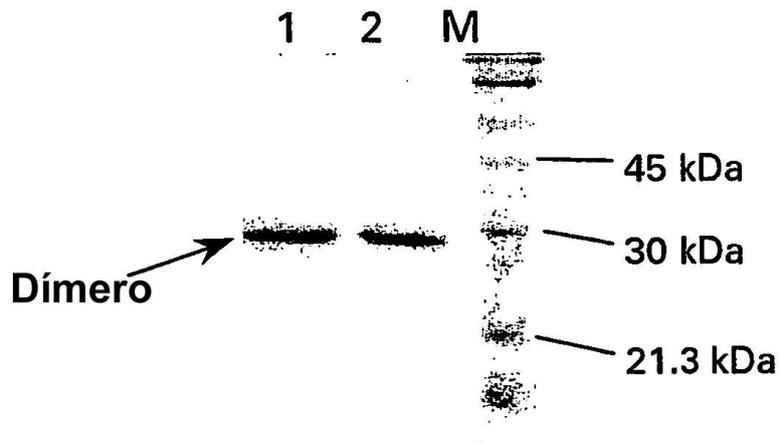


Fig. 3

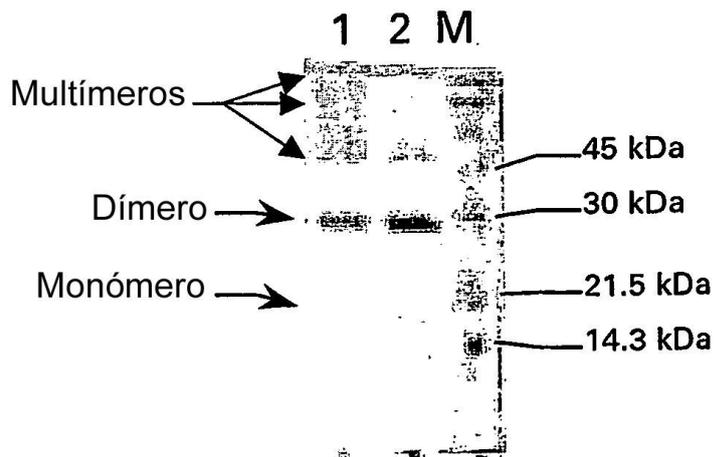


Fig. 4

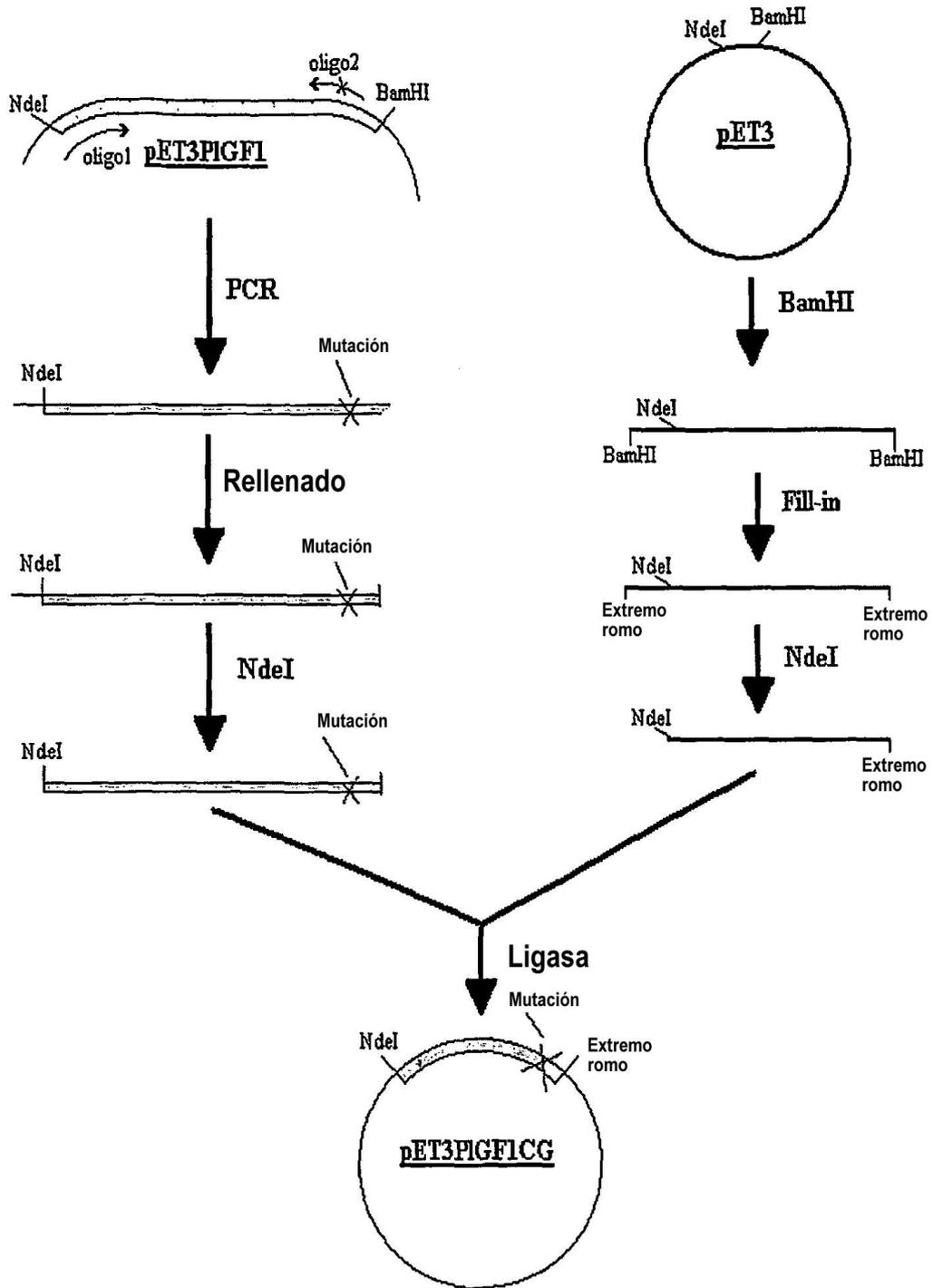


Fig. 5