

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 393 373**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/65** (2006.01)

**C12N 15/62** (2006.01)

**C12N 15/12** (2006.01)

**C12N 9/52** (2006.01)

**A61K 38/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07801960 .1**

96 Fecha de presentación: **29.08.2007**

97 Número de publicación de la solicitud: **2059530**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **20.05.2009**

54 Título: **Método para la producción de factor-I de crecimiento similar a la insulina**

30 Prioridad:

**31.08.2006 EP 06018171**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:

**20.12.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**20.12.2012**

73 Titular/es:

**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)  
GRENZACHERSTRASSE 124  
4070 BASEL, CH**

72 Inventor/es:

**FISCHER, STEPHAN;  
HESSE, FRIEDERIKE;  
KNOETGEN, HENDRIK;  
LANG, KURT;  
REGULA, JOERG, THOMAS;  
SCHANTZ, CHRISTIAN y  
SCHAUBMAR, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 393 373 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

Método para la producción de factor-I de crecimiento similar a la insulina

- 5 La presente invención se refiere a un método para la producción de factor-I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I), a composiciones farmacéuticas y a métodos de utilización.

Antecedentes de la invención

- 10 El factor-I de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) humano es una hormona circulante estructuralmente relacionada con la insulina. IGF-I ha sido considerado tradicionalmente como el principal mediador de las acciones de la hormona del crecimiento sobre los tejidos periféricos. IGF-I consiste de 70 aminoácidos y también se denomina somatomedina C y ha sido definido como SwissProt nº P01343. El uso, actividad y producción se mencionan en, por ejemplo, le Bouc Y. *et al.*, FEBS Lett. 196:108-112, 1986; de Pagter-Holthuisen P. *et al.*, FEBS Lett. 195:179-184, 1986; Sandberg Nordqvist A.C. *et al.*, Brain Res. Mol. Brain Res. 12:275-277, 1992; Steenbergh P.H. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 175:507-514, 1991; Tanner J.M. *et al.*, Acta Endocrinol. (Copenh.) 84:681-696, 1977; Uthne K. *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:548-554, 1974; patentes EP nº 0 123 228 y nº 0 128 733, US nº 5.861.373, US nº 5.714.460, EP nº 0 597 033, WO 02/32449 y WO nº 93/02695.

- 20 La regulación de la función del IGF-I es bastante compleja. En circulación, sólo el 0,2% de IGF-I existe en forma libre, mientras que la mayor parte se encuentra unida a proteínas de unión a IGF (IGFBP), que presentan afinidades muy elevadas para los IGF y que modulan la función del IGF-I. El factor puede ser liberado localmente mediante mecanismos que liberan IGF-I, tales como la proteólisis de las IGFBP por proteasas.

- 25 El IGF-I desempeña un papel paracrino en el cerebro en desarrollo y maduro (Werther G.A. *et al.*, Mol. Endocrinol. 4:773-778, 1990). Los estudios *in vitro* indican que IGF-I es un potente agente trófico no selectivo para varios tipos de neuronas en el SNC (Knusel B. *et al.*, J. Neurosci. 10:558-570, 1990; Svrzic D. y Schubert D., Biochem. Biophys. Res. Commun. 172:54-60, 1990), incluyendo las neuronas dopaminérgicas (Knusel B. *et al.*, J. Neurosci. 10:558-570, 1990) y los oligodendrocitos (McMorris F.A. y Dubois-Dalcq M., J. Neurosci. Res. 21:199-209, 1988; McMorris F.A. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:822-826, 1986; Mozell R.L. y McMorris F.A., J. Neurosci. Res. 30:382-390, 1991). La patente US nº 5.093.317 menciona que la supervivencia de las células neuronales colinérgicas resulta incrementada por la administración de IGF-I. Es conocido además que IGF-I estimula la regeneración de los nervios periféricos (Kanje M. *et al.*, Brain Res. 486:396-398, 1989) y que incrementa la actividad de la ornitina descarboxilasa (patente US nº 5.093.317). Las patentes US nº 5.861.373 y WO nº 93/02695 mencionan un método para tratar lesiones o enfermedades del sistema nervioso central que afectan predominantemente a las células gliales y/o células neuronales no colinérgicas mediante el incremento de la concentración o concentraciones activas de IGF-I y/o análogos del mismo en el sistema nervioso central del paciente. La patente WO nº 02/32449 se refiere a métodos para reducir o prevenir el daño isquémico en el sistema nervioso central de un mamífero mediante la administración en la cavidad nasal del mamífero de una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de IGF-I o de un derivado biológicamente activo del mismo. IGF-I resulta absorbido en la cavidad nasal y transportado al sistema nervioso central del mamífero en una cantidad efectiva para reducir o prevenir el daño isquémico asociado a un suceso isquémico. La patente EP nº 0874641 reivindica la utilización de un IGF-I o un IGF-II para la preparación de un medicamento destinado al tratamiento o prevención del daño neuronal en el sistema nervioso central, debido a demencia relacionada con el SIDA, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick, enfermedad de Huntington, encefalopatía hepática, síndromes ganglionares corticales-basales, demencia progresiva, demencia familiar con paraparesia espástica, parálisis supranuclear progresiva, esclerosis múltiple, esclerosis cerebral de Schilder o encefalomiелitis hemorrágica necrotizante, en las que el medicamento se encuentra en una forma destinada a la administración parenteral de una cantidad efectiva de dicho IGF fuera de la barrera hematocefálica o la barrera hematomedular.

- 50 La reducción de los niveles cerebrales y séricos de IGF-I libre se ha relacionado con la patogénesis de las formas esporádicas y hereditarias de EA. Además, IGF-I protege a las neuronas frente a la neurotoxicidad inducida por A $\beta$  (Niikura T. *et al.*, J. Neurosci. 21:1902-1910, 2001; Dore S. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:4772-4777, 1997; Dore S. *et al.*, Ann. NY Acad. Sci. 890:356-364, 1999). Recientemente se ha demostrado que el IGF-I administrado periféricamente es capaz de reducir los niveles cerebrales de A $\beta$  en ratas y ratones (Carro E. *et al.*, Nat. Med. 8:1390-1397, 2002). Además, el estudio ha demostrado que en un modelo de ratón transgénico de la EA, el tratamiento prolongado de IGF-I redujo significativamente la carga de placas amiloides en el cerebro. Estos datos proporcionan fuerte soporte a la idea de que el IGF-I es capaz de reducir los niveles cerebrales de A $\beta$  y la demencia cerebral asociada a las placas mediante la eliminación de A $\beta$  en el cerebro.

- 60 La patente WO nº 91/0287 da a conocer un método para la producción de IGF-I, en el que una proteína de fusión que comprende IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un péptido se corta con una diaminopeptidasa.

- 65 El sitio de reconocimiento de la IgA proteasa se describe como Yaa-Pro.!Xaa-Pro. Yaa se refiere a Pro (o raramente a Pro en combinación con Ala, Gly o Thr: Pro-Ala, Pro-Gly o Pro-Thr. Xaa se refiere a Thr, Ser o Ala (Pohlner J. *et*

al., Bio/Technology 10:799-804, 1992; Pohlner J. *et al.*, Nature 325:458-462, 1987, y la patente US nº 5.427.927). Se han identificado sitios de corte naturales (Wood S.G. y Burton J., Infect. Immun. 59:1818-1822, 1991). Los sustratos peptídicos sintéticos para la inmunoglobulina A1 proteasa de *Neisseria gonorrhoeae* (tipo 2) son los sitios autoproteolíticos Lys-Pro-Ala-Pro-!.Ser-Pro, Val-Ala-Pro-Pro-!.Ser-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro-!.Ala-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro-!.Ser-Pro, Pro-Arg-Pro-Pro-!.Thr-Pro y los sitios de corte de IgA1 Pro-Pro-Thr-Pro-!.Ser-Pro y Ser-Thr-Pro-Pro-!.Thr-Pro.

La patente WO nº 2006/066891 da a conocer conjugados que consisten de un factor-1 de crecimiento similar a la insulina (IGF-I) y uno o dos grupos poli(etilenglicol), caracterizados porque dicho IGF-I presenta una alteración de aminoácido en como máximo tres posiciones aminoácidas de entre las posiciones 27, 37, 65 y 68 de la secuencia de aminoácidos del IGF-I de tipo salvaje, de manera que uno o dos de dichos aminoácidos es lisina y el aminoácido 27 es un aminoácido polar, aunque no la lisina, por que se encuentran conjugados mediante el grupo o grupos amino primarios de dicha lisina o lisinas y porque dicho grupo o grupos poli(etilenglicol) presentan un peso molecular global de entre 20 y 100 kDa. Dichos conjugados resultan útiles para el tratamiento de trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Alzheimer.

La patente WO nº 2006/074390 se refiere a variantes de IGF-I y proteínas de fusión que comprenden variantes de IGF-I y determinados componentes de fusión. La patente WO nº 2006/074390 se refiere a determinadas variantes de IGF-1.

Los métodos para la producción recombinante de IGF-I mediante una proteína de fusión son conocidos de, por ejemplo, la patente EP nº 0155655 y la patente US nº 5.158.875. Sin embargo, con frecuencia se observa microheterogeneidad del IGF-I producido recombinantemente (Forsberg G. *et al.*, Biochem. J. 271:357-363, 1990).

Descripción resumida de la invención

La invención proporciona un método para la producción recombinante de IGF-I sin metionina unida en el extremo N-terminal en procariontes con alta pureza y elevado rendimiento.

La invención comprende un método para la producción de IGF-I, caracterizado por:

- a) el cultivo de una célula huésped procariótica que comprende un vector de expresión que comprende un ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los dos primeros aminoácidos de IGF-I,
- b) en el que dicho propéptido termina C-terminalmente con aminoácidos-Y-Pro, en donde Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro,
- c) recuperación y corte de dicha proteína de fusión con IgA proteasa, en donde dicha IgA proteasa presenta la secuencia SEC ID nº 21, y
- d) recuperación de dicho IGF-1.

El IGF-I recuperado no comprende ningún residuo de metionina unido en el extremo N-terminal.

Una realización preferente de la invención es un propéptido seleccionado de entre el grupo que consiste de péptidos mostrados en SEC ID nº 2-5.

Una realización adicional de la invención es una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I, caracterizado porque dicho propéptido finaliza C-terminalmente con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Gracias a la secuencia -Y-Pro, el propéptido puede separarse mediante tratamiento con una IgA proteasa de dicho IGF-I.

Preferentemente la proteína de fusión según la invención se caracteriza por la fórmula Met-X<sub>1</sub>-His-X<sub>2</sub>-Y-nPro-[IGF-I], en la que:

- Met se refiere a metionina,
- X<sub>1</sub> es un enlace, serina o asparagina,
- His es histidina,
- n es un número entre 0 y 6,
- X<sub>2</sub> es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo de péptidos SEC ID nº 6-10,
- Pro es prolina, y
- Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

Preferentemente el propéptido se muestra mediante la fórmula Met-X<sub>1</sub>-HiSn-X<sub>2</sub>-Y-Pro, en la que:

- Met se refiere a metionina,
- X<sub>1</sub> es un enlace, serina o asparagina,
- His es histidina,

- n es un número entre 0 y 6,
- X<sub>2</sub> es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo que consiste de los péptidos SEC ID nº 6-10,
- Pro es prolina, y
- Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

5 El propéptido se encuentra unido C-terminalmente al extremo N-terminal (glicina) de IGF-I. El propéptido preferentemente presenta una longitud de hasta 30 aminoácidos. Preferentemente X<sub>1</sub> es un enlace. Preferentemente n es 0 ó 6. Preferentemente X<sub>2</sub> es el péptido SEC ID nº 7. Preferentemente Y es Pro-Arg-Pro.

#### 10 Descripción detallada de la invención

15 Inesperadamente se ha encontrado que la IgA proteasa, preferentemente la IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*, es capaz de cortar la secuencia de aminoácidos Y-Pro-!.Gly-Pro. Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Pro-Gly, Pro-Thr, Ala-Pro, Gly-Pro, Thr-Pro, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Preferentemente útil como sitio de corte es Pro-Pro-!.Gly-Pro o Pro-ArgPro-Pro-!.Gly-Pro (SEC ID nº 11) (!. : posición del corte). El sitio de corte de la IgA proteasa para el procedimiento según la presente invención presenta la secuencia de consenso de aminoácidos Y-Pro-!.Gly-Pro, en la que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I. Y preferentemente representa una secuencia de aminoácidos que finaliza con el aminoácido o aminoácidos Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro. Dichas secuencias de aminoácidos Y, especialmente Pro-Arg-Pro pueden prolongarse mediante un grupo adicional Ala o Pro-Ala, tal como en, por ejemplo, Ala-Pro-Arg-Pro (SEC ID nº 12) o Pro-Ala-Pro-Arg-Pro (SEC ID nº 13). Resultan particularmente preferentes las secuencias de aminoácidos de corte Pro-Arg-Pro-Pro-!.Gly-Pro (SEC ID nº 11), Pro-Ala-Pro-!.Gly-Pro (SEC ID nº 14), Pro-Pro-!.Gly-Pro (SEC ID nº 15), Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-!.Gly-Pro (SEC ID nº 16) o Pro-Ala-Pro-Arg-Pro-Pro-!.Gly-Pro (SEC ID nº 17).

25 Según la presente invención la expresión "IgA proteasa" incluye las proteasas que cortan específicamente IgA y que describen, por ejemplo, Kornfeld S.J. y Plaut A.G., Rev. Infekt. Dis. 3:521-534, 1981, tal como, por ejemplo, la IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2). Las IgA proteasas recombinantes, tales como la descritas en la patente DE nº A 36 22 221; Koomey J.M. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:7881-7885, 1982; Bricker J. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2681-2685, 1983; Pohner J., Nature 325:458-462, 1987; y Halter R. *et al.*, EMBO J. 3:1595-1601, 1984, resultan igualmente adecuadas. Preferentemente dicha IgA proteasa es una IgA proteasa de *Neisseria gonorrhoeae*. Preferentemente dicha IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) presenta la secuencia SEC ID nº 21.

35 IGF-I según la invención se refiere a una proteína humana que consiste de 70 aminoácidos y que también se denomina somatomedina C y ha sido definida como SwissProt nº P01343. El uso, actividad y producción se mencionan en, por ejemplo, le Bouc Y. *et al.*, FEBS Lett. 196:108-112, 1986; de Pagter-Holthuisen P. *et al.*, FEBS Lett. 195:179-184, 1986; Sandberg Nordqvist A.C. *et al.*, Brain Res. Mol. Brain Res. 12:275-277, 1992; Steenbergh P.H. *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 175:507-514, 1991; Tanner J.M. *et al.*, Acta Endocrinol. (Copenh.) 84:681-696, 1977; Uthne K. *et al.*, J. Clin. Endocrinol. Metab. 39:548-554, 1974; patentes EP nº 0123 228 y nº 0 128 733, US nº 5.861.373, US nº 5.714.460, EP nº 0 597 033, WO nº 02/32449 y WO nº 93/02695.

40 IGF-I según la invención comprende un IGF-I seleccionado de entre el grupo que consiste de IGF-I, IGF-I truncado C-terminalmente (delección de 3 a 6 aminoácidos), R36A (sustitución de arginina en la posición 36 por alanina), R37A. Preferentemente dicho IGF-I se encuentra unido C-terminalmente a Fc humano de IgG, preferentemente de IgG1 ó de IgG4.

45 IGF-I truncado C-terminalmente (delección de 3 a 6 aminoácidos), un IGF-I de SEC ID nº 1, en el que los 3 a 6 aminoácidos C-terminales han sido deleccionados.

50 R36A se refiere a IGF-I de SEC ID nº 1, en el que en la posición aminoácida 36 la arginina ha sido sustituida por alanina.

55 R37A se refiere a IGF-I de SEC ID nº 1, en el que en la posición aminoácida 37 la arginina ha sido sustituida por alanina.

60 El gen codificante de la proteína de fusión preferentemente se sitúa bajo el control de señales de expresión adecuadas (preferentemente inducibles) de manera que las proteínas de fusión pueden producirse según las necesidades. Pueden utilizarse células procarióticas o eucarióticas (vegetales así como animales) adecuadas como células huésped para la producción de fusiones de proteínas; sin embargo, también resultan posibles los sistemas sin células.

65 Una realización preferente del procedimiento según la presente invención se caracteriza porque una célula huésped se transforma con un ADN recombinante o con un vector recombinante, en el que el ADN o el vector contiene por lo menos una copia de un gen que codifica una proteína de fusión según la invención y la célula transformada se cultiva en un medio adecuado, se hace que el gen codificante de la proteína de fusión se exprese en la célula transformada, la proteína de fusión se corta con la IgA proteasa y se aísla el IGF-I.

La expresión de la proteína de fusión según la invención puede mejorarse, por ejemplo, al nivel del ADN mediante fusión con fragmentos de gen  $\beta$ -galactosidasa sin lisina, es decir, Y contiene una parte de una proteína  $\beta$ -galactosidasa sin lisina. El experto conoce medios alternativos para incrementar la expresión de la proteína de fusión. La purificación y la separación del producto de expresión puede facilitarse mediante fusión con otros polipéptidos, en particular con polipéptidos o proteínas altamente cargadas (por ejemplo poli(Lis, Arg)) o que pueden unirse a sustancias particulares con elevada afinidad (por ejemplo estreptavidina) (ver, por ejemplo, las solicitudes de patente EP n° A 0 089 626 y EP n° A 0 306 610). Son péptidos conectores especialmente preferentes los péptidos SEC ID n° 6 a 10, preferentemente precedidos N-terminalmente por SHHHHHH (SEC ID n° 18, NHHHHHH (SEC ID n° 19) o HHHHHH (SEC ID n° 20).

La presente invención proporciona además un ácido nucleico (recombinante) que codifica una proteína de fusión según la presente invención y en el que se incorpora un sitio de corte de IgA proteasa en la región de unión entre el propéptido y el IGF-I.

Puede obtenerse un ADN recombinante según la presente invención de una manera conocida por el experto en el campo de la biología molecular. Para ello, un vector que contiene una secuencia de ADN codificante de la secuencia de aminoácidos de IGF-I habitualmente se corta con una o más endonucleasas de restricción en la región del extremo 5' de dicho gen y se liga nuevamente con oligonucleótidos que contienen la secuencia deseada.

Además, la invención proporciona además un vector recombinante que contiene por lo menos una copia de un ADN recombinante según la presente invención. Los vectores que resultan adecuados como base para la expresión de proteínas en los organismos procarióticos son conocidos por el experto. Este vector preferentemente es uno que permite un nivel elevado de expresión del ADN recombinante según la presente invención. El ADN recombinante en el vector preferentemente se encuentra bajo el control de una señal de expresión inducible (por ejemplo un promotor  $\lambda$ , tac, lac o trp).

El vector según la presente invención puede encontrarse presente extracromosómicamente (por ejemplo como plásmido), así como integrado en el genoma del organismo huésped (por ejemplo el bacteriófago  $\lambda$ ). El vector según la presente invención preferentemente es un plásmido. Los vectores que resultan adecuados en cada caso para la expresión génica en un organismo huésped particular son conocidos por el experto en el campo de la biología molecular. Puede ser un vector eucariótico, aunque preferentemente es un vector procariótico. Los ejemplos de vectores adecuados para la expresión del ADN según la presente invención en los procariotas son, por ejemplo, vectores pUC y pUR disponibles comercialmente.

La invención proporciona además una célula, preferentemente una célula procariótica, particularmente una célula de *E. coli* preferentemente, que se transforma con el ADN recombinante según la presente invención y/o con un vector recombinante según la presente invención.

En el caso de que la proteína de fusión se exprese en procariotas, se forman agregados poco solubles (cuerpos refractarios, cuerpos de inclusión) que son inactivos. Por lo tanto, la proteína de fusión debe transformarse en su forma activa. Utilizando los procedimientos que resultan familiares para el experto en la materia (ver, por ejemplo, las solicitudes de patente EP n° A 0 219 874, n° A 0 114 506 y WO n° 84/03711), en primer se lleva a cabo una solubilización mediante la adición de agentes desnaturalizantes seguida de la renaturalización y, si se desea, etapas de purificación adicionales.

Las condiciones necesarias para el tratamiento de una proteína de fusión de IGF-I que debe ser cortada con las IgA proteasas no son críticas. Sin embargo, en dicho procedimiento, resulta preferente que la proporción en peso de proteína de fusión de IGF-I a IgA proteasa es de entre 1:1 y 100:1. La reacción preferentemente tiene lugar en una solución acuosa tamponada de pH entre 6,5 y 8,5. La concentración de tampón preferentemente se encuentra comprendida en el intervalo de entre 50 y 500 mmoles/l si se desea, con la adición de entre 0 y 100 mmoles/l de cloruro sódico. El corte preferentemente se lleva a cabo a temperatura ambiente durante por lo menos 60 minutos y hasta 5 días, preferentemente durante 24 a 72 horas.

Tras la solubilización, renaturalización y corte con IgA proteasa, el producto de corte obtenido de esta manera preferentemente se purifica mediante cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio iónico y/o fraccionamiento según tamaño. El IGF-I producido de esta manera no presenta metionina en la posición -1.

#### Formulaciones farmacéuticas

Los IGF-I pueden administrarse en forma de una mezcla, o separarse diferentes especies mediante, por ejemplo, cromatografía de interacción hidrofóbica, cromatografía de intercambio iónico o cromatografía de exclusión por tamaño (CET). Los compuestos de la presente invención pueden formularse según métodos para la preparación de composiciones farmacéuticas, siendo los métodos conocidos del experto en la materia. Para la producción de dichas composiciones, se combina un IGF-I según la invención en una mezcla con un portador farmacéuticamente aceptable, preferentemente mediante diálisis o diafiltración frente a una solución acuosa que contiene los

ingredientes deseados de las composiciones farmacéuticas. Dichos portadores aceptables se describen en, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18a edición, 1990, Mack Publishing Company, editada por Oslo *et al.* (por ejemplo en las páginas 1435 a 1712). Las composiciones típicas contienen una cantidad efectiva de la sustancia según la invención, por ejemplo de entre aproximadamente 0,1 y 100 mg/ml, conjuntamente con una cantidad adecuada de un portador. Las composiciones pueden administrarse por vía parenteral. El IGF-I según la invención se administra preferentemente por vía intraperitoneal, subcutánea o intravenosa, o mediante aplicación intranasal.

Las formulaciones farmacéuticas según la invención pueden prepararse según métodos conocidos de la técnica. Habitualmente, las soluciones de IGF-I se dializan o se diafiltran frente al tampón destinado a la utilización en la composición farmacéutica y la concentración final deseada de proteína se ajusta mediante concentración o dilución. Los ejemplos y secuencias siguientes se proporcionan con el fin de ayudar a la comprensión de la presente invención, el alcance real de la cual se proporciona en las reivindicaciones adjuntas.

Los nombres de los aminoácidos se abrevian utilizando el código de una letra (por ejemplo R) o el código de tres letras (por ejemplo Arg). R36A se refiere a un mutante de IGF-I en el que el aminoácido arginina 36 se sustituye por alanina.

#### Listado de secuencias

SEC ID nº 1	Secuencia de aminoácidos del IGF-I humano (aminoácidos 49 a 118 de SwissProt P01343).
SEC ID nº 2	Secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente.
SEC ID nº 3	Secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente.
SEC ID nº 4	Secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente.
SEC ID nº 5	Secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente.
SEC ID nº 6-10	Conector.
SEC ID nº 11-17	Secuencias de corte.
SEC ID nº 18-20	Otros.
SEC ID nº 21	Secuencia de aminoácidos de una IgA1 proteasa de <i>Neisseria gonorrhoea</i> (tipo 2).

#### Ejemplos

##### Ejemplo 1

El vector de expresión y la cepa de *E. coli* que resultan útiles se describen en la patente EP nº 0 972 838. Se cultiva un clon de *E. coli* que expresa la proteína de fusión en una placa de agar selectivo, transfiriendo un asa de inoculación a medio selectivo (100 ml) y cultivando durante 13 horas a 37°C hasta una densidad óptica (578 nm) de 2 a 4. Este cultivo se almacena sobre hielo durante las siguientes 6 horas previamente a la inoculación automática del cultivo principal, que se lleva a cabo a 37°C. La expresión del mutante de IGF-I se inicia a una densidad óptica (578 nm) de 50 con la adición de IPTG 1,0 mM. La fermentación global se prolonga durante hasta 16 horas. La cantidad de proteína se determina densitométricamente mediante comparación de la intensidad volumétrica de la banda de proteína del producto con la banda de un estándar de IGF en un gel de SDS-PAGE. El caldo de cultivo se recolecta mediante centrifugación.

Con el fin de obtener el material purificado de cuerpos de inclusión (CI), la biomasa recolectada de la fermentación estándar se trata siguiendo el procedimiento siguiente: se incuban durante 20 minutos 0,3 g/100 g de biomasa seca de lisozima y 5 U/l g de biomasa seca de benzonasa y se homogeneizan. Se añadieron 30 U/l de biomasa seca de benzonasa y se incubaron durante 60 minutos a 37°C. Se añadieron 0,5 litros de tampón Brij/litro y se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Tras la centrifugación se resuspendió el pellet en 300 ml de tampón Tris-EDTA/100 g de biomasa seca (peso húmedo de CI purificado), se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó. Se solubilizó 1 g de CI/litro a temperatura ambiente en guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, DTT 0,1 M, pH 8,5, durante la noche. La solución turbia se dializó a 4°C frente a guanidina-HCl 6,8 M, TrisHCl 0,1 M, pH 8,0. Tras la diálisis se eliminaron los componentes insolubles mediante centrifugación. Se llevó a cabo el plegamiento mediante dilución 50 veces de la solución pro-IGF-I en arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, GSH 1 mM, GSSH 1 mM, pH 8,5 a temperatura ambiente. Tras dos horas, la solución se suplementó con cloruro sódico 2 M, se filtró y se aplicó a un caudal de 10 ml/minuto a una columna HIC (butilsefariosa 4 Fast Flow, GE, Amersham Biosciences), equilibrada a temperatura ambiente con tampón que contenía NaCl 2 M, arginina 0,8 M, TrisHCl 0,1 M, guanidina-HCl 0,1 M, pH 8,5. La columna se lavó con tampón de equilibrado hasta alcanzar la línea base y después se eluyó con diez volúmenes de columna de un gradiente lineal que partía de tampón de equilibrado y finalizada en tampón que contenía TrisHCl 0,1 M, etilenglicol al 5%, pH 8,5. Las fracciones eluidas se analizaron mediante cromatografía de alto rendimiento de fase inversa (rpHPLC). Se agruparon las fracciones que contenían proteína con puentes SS correctamente formados. La mezcla de reacción se suplementó con IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2) (proporción p/p 1:50) y se incubó durante la noche a temperatura ambiente (ver la figura 2). La mezcla de reacción se diluyó 1:2 con ácido acético 50 mM, pH 4,5, y después se aplicó a una columna IEC catiónica (con MacroCap SP; GE, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), equilibrada con ácido acético 50

5 mM o se aplicó a una columna de CET Superdex™ 200 (General Electric). Se lavó la columna hasta alcanzar la línea base y después se eluyó con 20 volúmenes de columna de un gradiente lineal desde ácido acético 50 mM hasta finalizar con ácido acético 50 mM suplementado con cloruro sódico 1 M. Las fracciones eluidas se analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contenían una única banda con el tamaño molecular de IGF-I se agruparon como IGF-I. Se verificó la identidad de IGF-I mediante cromatografía analítica de exclusión por tamaño (CET) con detección de la dispersión lumínica estática, análisis de EM de las digestiones con tripsina, análisis de EM de las digestiones con Asp-N y cromatografías CII catiónica o CET analíticas.

LISTADO DE SECUENCIAS

10

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> Método para la producción de factor-I de crecimiento similar a la insulina

15

<130> 23908

<150> EP06018171

<151> 2006-08-31

20

<160> 21

<170> Patent In versión 3.2

<210> 1

25

<211> 70

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

30

<221> misc\_feature

<223> secuencia de aminoácidos de IGF-I humano (aminoácidos 49 a 118 de SwissProt P01343).

<400> 1

**Gly Pro Glu Thr Leu Cys Gly Ala Glu Leu Val Asp Ala Leu Gln Phe**  
**1 5 10 15**

**Val Cys Gly Asp Arg Gly Phe Tyr Phe Asn Lys Pro Thr Gly Tyr Gly**  
**20 25 30**

**Ser Ser Ser Arg Arg Ala Pro Gln Thr Gly Ile Val Asp Glu Cys Cys**  
**35 40 45**

**Phe Arg Ser Cys Asp Leu Arg Arg Leu Glu Met Tyr Cys Ala Pro Leu**  
**50 55 60**

35

**Lys Pro Ala Lys Ser Ala**  
**65 70**

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

40

<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente

45

<400> 2

ES 2 393 373 T3

**Met His His His His His His Arg Ala Arg Arg Phe Arg Arg His Pro**  
**1 5 10 15**

**Arg Pro Pro**

5 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

10 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente

<400> 3  
**Met Ser His His His His His His Asn His Asn Arg Glu His Pro Arg**  
**1 5 10 15**

**Pro Pro**

15 <210> 4  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente

<400> 4  
**Met Asn His His His His His His Ile Glu Gly Arg His Pro Arg Pro**  
**1 5 10 15**

**Pro**

25 <210> 5  
 <211> 20  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

30 <220>  
 <223> secuencia de aminoácidos de un propéptido preferente

<400> 5  
**Met Asn His His His His His His Thr Glu Phe Glu Asn Ile Glu His**  
**1 5 10 15**

**Pro Arg Pro Pro**

35 **20**

<210> 6  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> conector

<400> 6  
**Lys Ala Lys Arg Phe Lys Lys His**  
**1 5**

45



<213> Artificial

<220>

<223> secuencia de corte

5

<400> 12

**Ala Pro Arg Pro**  
**1**

<210> 13

10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

15

<223> secuencia de corte

<400> 13

**Pro Ala Pro Arg Pro**  
**1 5**

20

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

25

<220>

<223> secuencia de corte

<400> 14

30

**Pro Ala Pro Gly Pro**  
**1 5**

<210> 15

35

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

40

<223> secuencia de corte

<400> 15

**Pro Pro Gly Pro**  
**1**

<210> 16

45

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

50

<223> secuencia de corte

<400> 16

**Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro**  
**1 5**

55

<210> 17

<211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

5 <220>  
 <223> secuencia de corte  
 <400> 17

**Pro Ala Pro Arg Pro Pro Gly Pro**  
**1 5**

10  
 <210> 18  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 15 <213> Artificial

<220>  
 <223> otro  
 20 <400> 18

**Ser His His His His His His**  
**1 5**

25 <210> 19  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 30 <223> otro  
 <400> 19

**Asn His His His His His His**  
**1 5**

35 <210> 20  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

40 <220>  
 <223> otro  
 <400> 20

**His His His His His His**  
**1 5**

45  
 <210> 21  
 <211> 960  
 <212> PRT  
 50 <213> *Neisseria gonorrhoeae*

<220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 55 <223> secuencia de aminoácidos de una IgA1 proteasa de *Neisseria gonorrhoea* (tipo 2)

ES 2 393 373 T3

<400> 21

Met Ala Leu Val Arg Asp Asp Val Asp Tyr Gln Ile Phe Arg Asp Phe  
1 5 10 15

Ala Glu Asn Lys Gly Lys Phe Phe Val Gly Ala Thr Asp Leu Ser Val  
20 25 30

Lys Asn Lys Arg Gly Gln Asn Ile Gly Asn Ala Leu Ser Asn Val Pro  
35 40 45

ES 2 393 373 T3

Met Ile Asp Phe Ser Val Ala Asp Val Asn Lys Arg Ile Ala Thr Val  
50 55 60

Val Asp Pro Gln Tyr Ala Val Ser Val Lys His Ala Lys Ala Glu Val  
65 70 75 80

His Thr Phe Tyr Tyr Gly Gln Tyr Asn Gly His Asn Asp Val Ala Asp  
85 90 95

Lys Glu Asn Glu Tyr Arg Val Val Glu Gln Asn Asn Tyr Glu Pro His  
100 105 110

Lys Ala Trp Gly Ala Ser Asn Leu Gly Arg Leu Glu Asp Tyr Asn Met  
115 120 125

Ala Arg Phe Asn Lys Phe Val Thr Glu Val Ala Pro Ile Ala Pro Thr  
130 135 140

Asp Ala Gly Gly Gly Leu Asp Thr Tyr Lys Asp Lys Asn Arg Phe Ser  
145 150 155 160

Ser Phe Val Arg Ile Gly Ala Gly Arg Gln Leu Val Tyr Glu Lys Gly  
165 170 175

Val Tyr His Gln Glu Gly Asn Glu Lys Gly Tyr Asp Leu Arg Asp Leu  
180 185 190

Ser Gln Ala Tyr Arg Tyr Ala Ile Ala Gly Thr Pro Tyr Lys Asp Ile  
195 200 205

Asn Ile Asp Gln Thr Met Asn Thr Glu Gly Leu Ile Gly Phe Gly Asn  
210 215 220

His Asn Lys Gln Tyr Ser Ala Glu Glu Leu Lys Gln Ala Leu Ser Gln  
225 230 235 240

Asp Ala Leu Thr Asn Tyr Gly Val Leu Gly Asp Ser Gly Ser Pro Leu  
245 250 255

Phe Ala Phe Asp Lys Gln Lys Asn Gln Trp Val Phe Leu Gly Thr Tyr  
260 265 270

Asp Tyr Trp Ala Gly Tyr Gly Lys Lys Ser Trp Gln Glu Trp Asn Ile  
275 280 285

ES 2 393 373 T3

Tyr Lys Lys Glu Phe Ala Asp Lys Ile Lys Gln His Asp Asn Ala Gly  
 290 295 300

Thr Val Lys Gly Asn Gly Glu His His Trp Lys Thr Thr Gly Thr Asn  
 305 310 315 320

Ser His Ile Gly Ser Thr Ala Val Arg Leu Ala Asn Asn Glu Gly Asp  
 325 330 335

Ala Asn Asn Gly Gln Asn Val Thr Phe Glu Asp Asn Gly Thr Leu Val  
 340 345 350

Leu Asn Gln Asn Ile Asn Gln Gly Ala Gly Gly Leu Phe Phe Lys Gly  
 355 360 365

Asp Tyr Thr Val Lys Gly Ala Asn Asn Asp Ile Thr Trp Leu Gly Ala  
 370 375 380

Gly Ile Asp Val Ala Asp Gly Lys Lys Val Val Trp Gln Val Lys Asn  
 385 390 395 400

Pro Asn Gly Asp Arg Leu Ala Lys Ile Gly Lys Gly Thr Leu Glu Ile  
 405 410 415

Asn Gly Thr Gly Val Asn Gln Gly Gln Leu Lys Val Gly Asp Gly Thr  
 420 425 430

Val Ile Leu Asn Gln Lys Ala Asp Ala Asp Lys Lys Val Gln Ala Phe  
 435 440 445

Ser Gln Val Gly Ile Val Ser Gly Arg Gly Thr Leu Val Leu Asn Ser  
 450 455 460

Ser Asn Gln Ile Asn Pro Asp Asn Leu Tyr Phe Gly Phe Arg Gly Gly  
 465 470 475 480

Arg Leu Asp Ala Asn Gly Asn Asp Leu Thr Phe Glu His Ile Arg Asn  
 485 490 495

Val Asp Glu Gly Ala Arg Ile Val Asn His Asn Thr Asp His Ala Ser  
 500 505 510

Thr Ile Thr Leu Thr Gly Lys Ser Leu Ile Thr Asn Pro Asn Ser Leu

ES 2 393 373 T3

515		520		525											
Ser	Val	His	Ser	Ile	Gln	Asn	Asp	Tyr	Asp	Glu	Asp	Asp	Tyr	Ser	Tyr
	530					535					540				
Tyr	Tyr	Arg	Pro	Arg	Arg	Pro	Ile	Pro	Gln	Gly	Lys	Asp	Leu	Tyr	Tyr
545					550					555					560
Lys	Asn	Tyr	Arg	Tyr	Tyr	Ala	Leu	Lys	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Asn	Ala
				565					570					575	
Pro	Met	Pro	Glu	Asn	Gly	Val	Ala	Glu	Asn	Asn	Asp	Trp	Ile	Phe	Met
			580					585					590		
Gly	Tyr	Thr	Gln	Glu	Glu	Ala	Arg	Lys	Asn	Ala	Met	Asn	His	Lys	Asn
		595					600						605		
Asn	Arg	Arg	Ile	Gly	Asp	Phe	Gly	Gly	Phe	Phe	Asp	Glu	Glu	Asn	Gly
	610					615					620				
Lys	Gly	His	Asn	Gly	Ala	Leu	Asn	Leu	Asn	Phe	Asn	Gly	Lys	Ser	Ala
625					630					635					640
Gln	Asn	Arg	Phe	Leu	Leu	Thr	Gly	Gly	Ala	Asn	Leu	Asn	Gly	Lys	Ile
				645					650						655
Ser	Val	Thr	Gln	Gly	Asn	Val	Leu	Leu	Ser	Gly	Arg	Pro	Thr	Pro	His
			660					665					670		
Ala	Arg	Asp	Phe	Val	Asn	Lys	Ser	Ser	Ala	Arg	Lys	Asp	Ala	His	Phe
		675					680					685			
Ser	Lys	Asn	Asn	Glu	Val	Val	Phe	Glu	Asp	Asp	Trp	Ile	Asn	Arg	Thr
	690					695					700				
Phe	Lys	Ala	Ala	Glu	Ile	Ala	Val	Asn	Gln	Ser	Ala	Ser	Phe	Ser	Ser
705					710				715						720
Gly	Arg	Asn	Val	Ser	Asp	Ile	Thr	Ala	Asn	Ile	Thr	Ala	Thr	Asp	Asn
				725					730					735	
Ala	Lys	Val	Asn	Leu	Gly	Tyr	Lys	Asn	Gly	Asp	Glu	Val	Cys	Val	Arg
			740					745					750		

ES 2 393 373 T3

Ser Asp Tyr Thr Gly Tyr Val Thr Cys Asn Thr Gly Asn Leu Ser Asp  
755 760 765

Lys Ala Leu Asn Ser Phe Asp Ala Thr Arg Ile Asn Gly Asn Val Asn  
770 775 780

Leu Asn Gln Asn Ala Ala Leu Val Leu Gly Lys Ala Ala Leu Trp Gly  
785 790 795 800

Lys Ile Gln Gly Gln Gly Asn Ser Arg Val Ser Leu Asn Gln His Ser  
805 810 815

Lys Trp His Leu Thr Gly Asp Ser Gln Val His Asn Leu Ser Leu Ala  
820 825 830

Asp Ser His Ile His Leu Asn Asn Ala Ser Asp Ala Gln Ser Ala Asn  
835 840 845

Lys Tyr His Thr Ile Lys Ile Asn His Leu Ser Gly Asn Gly His Phe  
850 855 860

His Tyr Leu Thr Asp Leu Ala Lys Asn Leu Gly Asp Lys Val Leu Val  
865 870 875 880

Lys Glu Ser Ala Ser Gly His Tyr Gln Leu His Val Gln Asn Lys Thr  
885 890 895

Gly Glu Pro Asn Gln Glu Gly Leu Asp Leu Phe Asp Ala Ser Ser Val  
900 905 910

Gln Asp Arg Ser Arg Leu Phe Val Ser Leu Ala Asn His Tyr Val Asp  
915 920 925

Leu Gly Ala Leu Arg Tyr Thr Ile Lys Thr Glu Asn Gly Ile Thr Arg  
930 935 940

Leu Tyr Asn Pro Tyr Ala Gly Asn Arg Arg Pro Val Lys Pro Ala Pro  
945 950 955 960

## REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de IGF-I, caracterizado por:

- 5 a) el cultivo de una célula huésped procariótica que comprende un vector de expresión que contiene un ácido nucleico codificante de una proteína de fusión que comprende dicho IGF-I unido N-terminalmente al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I,  
 b) en el que dicho propéptido termina C-terminalmente con aminoácidos-Y-Pro, en donde Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro,  
 10 c) recuperación y corte de dicha proteína de fusión con IgA proteasa, en donde dicha IgA proteasa presenta la secuencia SEC ID nº 21, y  
 d) recuperación de dicho IGF-I.

15 2. Método según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho IGF-I se selecciona de entre el grupo de IGF-I (SEC ID nº 1), un IGF-I de SEC ID nº 1 en el que en el extremo C-terminal se han deletado 3 a 6 aminoácidos, IGF-I de SEC ID nº 1 en el que en la posición aminoácida 36 la arginina ha sido sustituida por alanina e IGF-I de SEC ID nº 1 en la que en la posición aminoácida 37 la arginina ha sido sustituida por alanina.

20 3. Método según la reivindicación 1 ó 2, caracterizado porque dicho IGF-I se encuentra unido C-terminalmente a Fc humano de IgG.

4. Método según las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el propéptido está representado por la fórmula:

25 
$$\text{Met-X}_1\text{-His}_n\text{-X}_2\text{-Y-Pro-},$$
 en la que:

- 30 • Met es metionina,  
 •  $X_1$  es un enlace, serina o asparagina,  
 • His es histidina,  
 • n es un número entre 0 y 6,  
 •  $X_2$  es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo que consiste de los péptidos SEC ID nº 6-10,  
 35 • Pro es prolina, y  
 • Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

40 5. Proteína de fusión que comprende IGF-I unido al extremo C-terminal de un propéptido, en el que Gly-Pro son los primeros dos aminoácidos de IGF-I, caracterizado porque dicho propéptido finaliza C-terminalmente con los aminoácidos -Y-Pro, en el que Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

45 6. Proteína de fusión según la reivindicación 5, caracterizada porque dicho propéptido presenta una longitud de hasta 30 aminoácidos.

7. Proteína de fusión según la reivindicación 5 ó 6, caracterizada por la fórmula:

50 
$$\text{Met-X}_1\text{-His}_n\text{-X}_2\text{-Y-Pro-[IGF-I]},$$
 en la que:

- 55 • Met es metionina,  
 •  $X_1$  es un enlace, serina o asparagina,  
 • His es histidina,  
 • n es un número entre 0 y 6,  
 •  $X_2$  es un péptido conector, seleccionado de entre el grupo que consiste de los péptidos SEC ID nº 6-10,  
 • Pro es prolina, y  
 • Y se selecciona de entre el grupo que consiste de Pro, Pro-Ala, Arg-Pro o Pro-Arg-Pro.

60