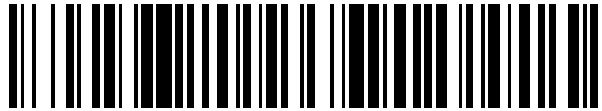


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 545 701**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

C07K 14/48 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2012 E 12805695 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2015 EP 2672984**

54 Título: **Nuevos mutantes de proNGF y usos de los mismos en la producción de beta-NGF**

30 Prioridad:

19.12.2011 EP 11194208

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.09.2015

73 Titular/es:

**WACKER CHEMIE AG (100.0%)
Hanns-Seidel-Platz 4
81737 München, DE**

72 Inventor/es:

**LOREY, SUSAN;
JANOWSKI, BERNHARD;
PULTKE, HEIKO;
KATHMANN, DANIELA;
PARTHIER, ANTJE y
ANTON, ANDREAS**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 545 701 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

Nuevos mutantes de proNGF y usos de los mismos en la producción de beta-NGF

CAMPO DEL INVENTO

5 El presente invento se refiere a unos nuevos mutantes de proNGF que tienen sustituciones en el sitio de disociación con proteasas nativo. El presente invento describe además un método de producir un beta-NGF humano biológicamente activo a partir de un mutante de proNGF insoluble inactivo y al uso de un mutante de proNGF para producir un beta-NGF humano.

ANTECEDENTES DEL INVENTO

10 Un factor de crecimiento de nervios (beta-NGF) es un factor neurotrófico que tiene una importancia crucial en el crecimiento y la supervivencia de neuronas (sensoriales y simpáticas) (Levi-Montalcini, R., Science 237 (1987) 1154; Thoenen, H., y colaboradores, Physiol. Rev. 60 (1980) 1284; Yankner, B. A., y colaboradores, Annu. Rev. Biochem. 51 (1982) 845). El beta-NGF pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento con nudo de cisteína suponiendo una estructura proteínica dimérica estable. Por lo demás, el beta-NGF favorece el crecimiento, la
15 diferenciación y la vitalidad de las neuronas colinérgicas del sistema nervioso central (Hefti, F. J., J. Neurobiol. 25 (1994) 1418). Unas posibles indicaciones terapéuticas para un factor de crecimiento de nervios humano recombinante incluyen unas neuropatías sensoriales periféricas, que p.ej. están asociadas con una diabetes, o como un posible efecto colateral en la terapia del SIDA. Otras indicaciones para un beta-NGF son unas neuropatías centrales, p.ej. una enfermedad de Alzheimer. En este caso, la pérdida de memoria es el resultado de una pérdida
20 de neuronas colinérgicas. Se ha encontrado también que un beta-NGF es efectivo en el tratamiento de úlceras cutáneas y córneas humanas (Bernabei y colaboradores, Lancet 1999; Lambiase y colaboradores, NEJM 1998). Más aún, se ha mostrado también que un beta-NGF protege a las células retinales con respecto de una degeneración y una apoptosis en un modelo experimental de glaucoma en animales y mejora la función visual en unos pocos pacientes que están afectados por un glaucoma (Lambiase A, y colaboradores, PNAS 2009).

25 Un beta-NGF maduro humano es una proteína con 118 aminoácidos que traduce como una preproteína que se compone de 241 aminoácidos. El péptido de señal (prepéptido) de 18 aminoácidos es disociado durante una translocación dentro del retículo endoplasmático (ER). La resultante proproteína (proNGF) es procesada en su extremo terminal de N por eliminación de la pro-secuencia mediante una disociación con proteasas. Un NGF humano maduro muestra un alto grado de identidad (aproximadamente un 90 %) con un beta-NGF de un roedor (múrdos y ratas). Para estudios clínicos o usos terapéuticos, un beta-NGF ha de ser proporcionado en altas
30 concentraciones. Las glándulas submaxilares de ratones son una fuente natural de beta-NGF. Sin embargo, estas preparaciones de beta-NGF son unas mezclas homogéneas de diferentes dímeros y, por consiguiente, no son apropiadas para usos terapéuticos. Por lo demás es deseable administrar la forma humana de esta proteína a los pacientes. En un tejido humano, sin embargo, los factores neurotróficos están presentes solamente en bajas
35 concentraciones.

La prosecuencia es un dominio separado a partir de la proteína madura (véanse los datos de secuencias en la Figura 1, en donde la prosecuencia se indica en letras negritas). Estos dos dominios están separados por un sitio de disociación con proteasas expuesto con una secuencia diana de aminoácidos de carácter básico del tipo Arg-Ser-Lys-Arg que está situada en las posiciones 101 hasta 104 de la secuencia de un proNGF humano (SEQ ID NO: 1). Este motivo es de modo natural un sitio de disociación con la serina endoproteasa furina. Adicionalmente, el sitio de disociación puede ser procesado específicamente por otras apropiadas proteasas, de manera preferible por unas proteasas que tienen una especificidad para substratos de disociación detrás del aminoácido Arginina (Arg, R). Por ejemplo, la proteasa tripsina disocia detrás de unos aminoácidos de carácter básico tales como Lisina (Lys, K) o arginina (Arg, R).
45

Se conocen bien en el campo de la técnica unos métodos para la preparación de un beta-NGF biológicamente activo a partir de su proforma inactiva. Por ejemplo, el documento de patente europea EP 0 994 188 B1 describe un método para la preparación de un beta-NGF biológicamente activo a partir de su pro-forma inactiva que tiene una mala solubilidad. De acuerdo con este método, un beta-NGF es obtenible a partir de un proNGF inactivo insoluble
50 recombinante, que se había solubilizado en una solución desnaturalizante. Después de ello, el proNGF es transferido a una solución no o débilmente desnaturalizante. El proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa, tal como se determina por medio de los enlaces de disulfuro que están presentes en un beta-NGF nativo. Subsiguientemente, la prosecuencia de un proNGF es separada por disociación, con lo que se obtiene un beta-NGF activo.

55 Un proNGF humano contiene un sitio de disociación con proteasas (furina) nativo Arg-Ser-Lys-Arg, teniendo por lo tanto el siguiente motivo de secuencia: R¹SK³R⁴. Para unos procesos específicos de producción, tales como los que requieren unos niveles de calidad de "Good Manufacturing Practice" (GMP = buena práctica de producción), unos

materiales tales como unas enzimas se han de proporcionar en una alta calidad. La proteasa furina no está actualmente disponible como una proteasa de calidad para GMP.

Por lo tanto, se escogió una proteasa alternativa, Tripsina (EC 3.4.21.4), para disociar a una proNGF dando como resultado una proteína beta-NGF madura. La serina proteasa Tripsina disocia a unas cadenas de péptidos por el lado de carboxilo de los aminoácidos de carácter básico Arginina o Lisina. En un proNGF humano, el sitio de disociación que se presenta de modo natural en un proNGF humano contiene tres posiciones con aminoácidos de carácter básico (posiciones 101, 103 y 104 de SEQ ID NO: 1; alternativamente citadas en el presente contexto como R¹, K³ y R⁴). Por lo tanto, la disociación de un proNGF con Tripsina puede conducir a numerosos productos disociados diferentes dependiendo del sitio donde se realiza exactamente la disociación. Unos típicos productos de disociación son SK²R⁴-beta-NGF y R⁴-beta-NGF y beta-NGF maduro. Este problema es exacerbado puesto que una dimerización de la proteína beta-NGF conducirá a un número incluso más alto (hasta seis) de productos heterogéneos, que han de ser purificados en unas subsiguientes etapas (véase la Figura 2a).

El documento de solicitud de patente de los EE.UU. US2008050776 describe unas moléculas de proNGF que se han preparado con múltiples mutaciones en los tres principales sitios dibásicos sensibles a proteasas del dominio pro del proNGF natural. Una forma de realización preferida es la sustitución de K3 con alanina. Los mutantes de proNGF que se divulgan son estables frente a la proteólisis por medio de proteasas.

PROBLEMAS TÉCNICOS QUE SUBYACEN AL PRESENTE INVENTO Y SU SOLUCIÓN

Se han descrito en la técnica anterior unos métodos para producir un beta-NGF. Sin embargo, los procesos de producción actualmente disponibles tienen varias desventajas, tales como unos productos de beta-NGF heterogéneos y unos bajos rendimientos de beta-NGF.

Una disociación del proNGF del tipo silvestre con tripsina para producir un beta-NGF ha mostrado una baja eficiencia que obliga a usar unas cantidades muy altas de la enzima con el fin de obtener un rendimiento suficiente del beta-NGF disociado. Esto tiene varias desventajas, que impactan sobre el subsiguiente proceso de purificación. Antes de todo, ella disminuye aún más la selectividad de la disociación, lo que conduce a varios productos de digestión. En segundo lugar, es necesaria la purificación de un beta-NGF con respecto de la enzima, puesto que esta enzima ha de estar ausente en la muestra final de la proteína. Esto implica varios procesos de purificación con el fin de eliminar a la tripsina abundante. Por lo tanto, el uso de tripsina como una enzima de disociación en el proceso de la técnica anterior conduce ya sea a unos rendimientos muy bajos del beta-NGF o a unos problemas de purificación de la proteína.

Es innecesario decir que subsiste en la técnica especializada una necesidad de un método de producir un beta-NGF que carezca de las desventajas que se han descrito con anterioridad. Es por lo tanto un problema que subyace al presente invento proporcionar un nuevo método de producir un beta-NGF que se ha de obtener en una alta calidad, una alta eficiencia y en unos altos rendimientos. Por lo demás, un problema que subyace al invento es proporcionar un proceso de producción para un beta-NGF que dé como resultado unos altos rendimientos del beta-NGF, sea eficiente, robusto, escalable y reproducible.

Una ventaja del invento es la producción de un beta-NGF a partir de un nuevo mutante de proNGF. El nuevo mutante da como resultado unos productos homogéneos de beta-NGF con un buen rendimiento, puesto que el nuevo mutante de proNGF impide una digestión heterogénea por proteasas y por lo tanto unos productos de beta-NGF heterogéneos. El problema del invento se resuelve proporcionando el mutante de proNGF del invento y el método de producir un beta-NGF a partir del mutante de proNGF tal como se describe por el presente invento.

El nuevo mutante da como resultado un aumento inesperado y llamativo en la eficiencia de la disociación por tripsina junto al sitio relevante en el proNGF mutado del invento, en comparación con el tipo silvestre. Esto permite usar unas cantidades extremadamente bajas de la proteasa tripsina en comparación con la cantidad que se ha de usar en el tipo silvestre y, como consecuencia, da como resultado unos problemas reducidos de purificación del beta NGF con respecto de la enzima propiamente dicha y con respecto de los productos secundarios de la disociación.

Los problemas más arriba descritos se resuelven y las ventajas se alcanzan mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes. Unas formas de realización preferidas del invento se incluyen en las reivindicaciones dependientes, así como en la descripción, los ejemplos y las figuras siguientes.

La anterior recopilación no ha de describir necesariamente todos los problemas que se resuelven por medio del presente invento. Otros problemas y el modo de cómo ellos se resuelven puede resultar evidente para una persona experta después de haber estudiado la presente solicitud.

RESUMEN DEL INVENTO

En un primer aspecto, el presente invento se refiere a un mutante de proNGF, en donde el sitio de disociación con proteasas R¹SK³R⁴ está sustituido en las posiciones R¹ y K³ correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de un proNGF de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 1) por valina en posición 101 y por alanina en posición 103.

5 En un segundo aspecto, el presente invento se refiere a un método de preparar un beta-NGF humano biológicamente activo a partir de un mutante de proNGF insoluble inactivo que está sustituido junto al sitio de disociación con proteasas nativo R¹SK³R⁴ en las posiciones R¹ y K³ correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de un proNGF de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 1) por valina en la posición 101 y por alanina en la posición 103, que comprende (i) proporcionar un mutante de proNGF de acuerdo con este invento y (ii) disociar el mutante de proNGF con el fin de obtener un beta-NGF humano activo.

10

En particular, el invento se refiere al siguiente procedimiento:

- a. disolver el mutante de proNGF de acuerdo con el invento en una solución desnaturalizante;
- b. transferir el mutante de proNGF a una solución de replegamiento en donde el proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa;
- 15 c. purificar el mutante de proNGF con respecto a la solución de replegamiento;
- d. disociar la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.

15

Un tercer aspecto del invento se refiere al uso de un mutante de proNGF de acuerdo con el invento para la preparación de un beta-NGF humano.

20 El resumen del invento no describe necesariamente todas las particularidades del presente invento. Otras formas de realización resultarán evidentes a partir de una revisión de la descripción detallada siguiente.

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL INVENTO

Definiciones

25 Antes de que el presente invento se describa con detalle más adelante, ha de entenderse que este invento no está limitado a la metodología, a los protocolos ni a los reactivos particulares que se describen en el presente texto, puesto que éstas y éstos pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología que aquí se usa está dada solamente con el fin de describir unas formas de realización particulares, y no se pretende que limite el alcance del presente invento, que será limitado solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina de otro modo distinto, todos los términos técnicos y científicos que aquí se usan han de tener los mismos significados que corrientemente se entienden por una persona con experiencia ordinaria en la especialidad a la que este invento pertenece.

25

30

A lo largo de esta memoria descriptiva y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera otra cosa distinta, se habrá de entender que la palabra "comprende" y unas variaciones tales como "que comprende" y "comprendiendo" implican la inclusión de un elemento integrante especificado o etapa o grupo de elementos integrantes o etapas pero no la exclusión de cualquier otro elemento integrante o etapa o grupo de elementos integrantes o etapas.

35

Varios documentos (por ejemplo: patentes, solicitudes de patentes, publicaciones científicas, instrucciones, etc) se citan a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Ningún detalle en este contexto ha de ser interpretado como una admisión de que el invento no está autorizado a anticipar a dicha divulgación en virtud de un invento.

40 Secuencias: Todas las secuencias que se citan en el presente texto se divulgan en la lista de secuencias adjunta que, con su completo contenido y la divulgación es una parte de esta memoria descriptiva.

40

El término "aproximadamente", cuando se usa en conexión con un valor numérico, se entiende que abarca unos valores numéricos situados dentro de un intervalo que tiene un límite inferior que es un 5 % más pequeño que el valor numérico indicado y que tiene un límite superior que es un 5 % más grande que el valor numérico indicado.

45 El término "proNGF" o "pro-NGF" se refiere a la pro-forma de un beta-NGF humano. La secuencia entera de un proNGF humano se define en SEQ ID NO: 1 (Figura 1a). Con el fin de obtener un beta-NGF maduro, el propéptido proNGF ha de ser disociado por unas proteasas. La prosecuencia del beta-NGF es un dominio que está separado con respecto del beta-NGF maduro. Entre estos dos dominios hay un nuevo sitio de disociación con proteasas nativo Arg-Ser-Lys-Arg (citado en el presente contexto como R¹SK³R⁴, SEQ ID NO: 9) en las posiciones 101 y 104 de SEQ ID NO: 1. El sitio de disociación puede ser procesado específicamente por unas proteasas apropiadas, en particular por la proteasa furina.

45

50

El término “mutante de proNGF” o “muteína de proNGF” se refiere a unas modificaciones de la pro-forma de un beta-NGF humano mediante sustituciones de aminoácidos. La muteína de proNGF del presente invento está sustituida en el sitio de disociación con proteasas nativo R¹SK³R⁴ (SEQ ID NO: 9) en las posiciones R¹ y K³ que corresponden a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de un proNGF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) por valina en la posición 101 y por alanina en la posición 103.

Tabla 1. Sitios de disociación con proteasas de proNGF y de muteínas de proNGF (X se refiere a cualquier aminoácido pero no a Arg o Lys)

SEQ ID NO:	Sitio de disociación con proteasas (pos. 101-104 de SEQ ID NO: 1)
1	RSKR (tipo silvestre)
2	VSXR
3	XSXR
4	XSAR
3	XSXR
4	XSAR
5	VSAR
6	XXXR
7	VXAR

El término “proNGF biológicamente activo” o “proNGF con una conformación biológicamente activa” se refiere, como tal concepto, a la actividad biológica de un proNGF. Una conformación biológicamente activa de un proNGF es determinada por la presencia de unos puentes de disulfuro que aparecen en un beta-NGF natural. La actividad puede ser determinada, por ejemplo, de acuerdo con un sistema de ensayo que se ha sido descrito por Chevalier y colaboradores, 1994, Blood 83: 1479-1485, 1994, que es incorporado a la presente por su referencia. El Ejemplo 11 describe un sistema de ensayo para describir la actividad biológica de un proNGF por medio de una estimulación de la proliferación de células TF1.

El término “beta-NGF” se refiere a un factor de crecimiento de nervios beta maduro, preferiblemente procedente de un ser humano. La secuencia para el factor de crecimiento de nervios beta maduro se muestra en la Figura 1 (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, y SEQ ID NO: 8), comenzando en la posición 105.

El término “actividad de beta-NGF” o “beta-NGF biológicamente activo” como tal concepto significa la actividad biológica de un beta-NGF. Un beta-NGF biológicamente activo existe en la forma de un dímero. Un beta-NGF debe de estar presente en una forma dimérica para tener una conformación biológicamente activa. El requisito previo de una conformación biológicamente activa de beta-NGF es la formación correcta de los puentes de disulfuro junto a un nudo de cistina. La actividad puede ser determinada, por ejemplo, de acuerdo con el sistema de ensayo DRG (acrónimo de “dorsal root ganglion assay” = sistema de ensayo de ganglio radicular dorsal), véase por ejemplo las citas de Levi-Montalcini, R. y colaboradores, Cancer Res. 14 (1954) 49, y de Varon, S. y colaboradores, Meth.en Neurochemistry 3 (1972) 203. En este sistema de ensayo, la estimulación de neuronas sensoriales procedentes de ganglios radiculares dorsales disociados de embriones de pollos es vigilada por medio de la formación de neuritas.

El término “sustitución” o “sustituciones” se refiere a unas modificaciones de la pro-forma de un beta-NGF humano por reemplazo de aminoácidos. El término comprende la modificación química de unos aminoácidos p.ej. sustituyendo o añadiendo grupos o residuos químicos en el aminoácido original. La etapa de modificación de los aminoácidos seleccionados se realiza de manera preferible por una mutagénesis en el nivel genético. Preferiblemente, la modificación de un proNGF se lleva a cabo por medio de unos métodos de ingeniería genética para la alteración de un ADN que pertenece a un proNGF. Las modificaciones son unas mutaciones que causan el reemplazo de un único nucleótido de base por otro nucleótido del material genético. Unas mutaciones puntuales dan como resultado la codificación de diferentes aminoácidos en comparación con la secuencia de tipo silvestre. Preferiblemente, la expresión de la proteína proNGF modificada se lleva a cabo luego en unos organismos procarrióticos o eucarióticos, de manera sumamente preferible en unos organismos procarrióticos.

El término “desnaturalizante” o “desnaturalización” se refiere a un procedimiento en el que es alterada la estructura de plegamiento de una proteína. El término se refiere al hecho de desplegar la estructura terciaria de un proNGF o de una muteína de proNGF. La alteración de la estructura de plegamiento es debida a una exposición a ciertos factores químicos o físicos. Como resultado de ello, se disminuyen o eliminan algunas propiedades originales de la proteína, especialmente su actividad biológica. Debido al proceso de desnaturalización, las proteínas se vuelven inactivas biológicamente. Además, unas proteínas desnaturalizadas pueden exhibir una amplia gama de características, incluyendo una pérdida de función biológica, una pérdida de solubilidad y/o una conglomeración.

El término “replegamiento” o “renaturalizante” o “renaturalización” se refiere a un proceso mediante el cual la estructura proteínica adopta su plegamiento o conformación funcional nativo/a. Debido a los procesos de renaturalización o replegamiento, la proteína se vuelve biológicamente activa.

5 El término “recombinante” se refiere a la clonación de un ADN dentro de unos vectores para la expresión de la proteína que es codificada por el ADN en un anfitrión apropiado. El anfitrión es preferiblemente un procarionta, la mayor parte de las veces una bacteria. Una “expresión recombinante” tal como se usa en el presente contexto se refiere a la expresión de un proNGF o de la muteína de proNGF en células anfitrionas procarióticas, por ejemplo se podrían usar unas cepas de *E. coli* que son apropiadas para la expresión de proteínas recombinantes.

El término “soluble” se refiere a una proteína que es susceptible de ser disuelta en algún disolvente.

10 El término “insoluble” se refiere a una proteína que es susceptible de ser disuelta en algún disolvente.

Descripción del invento

Mutantes de proNGF del invento

15 En una primera forma de realización del invento, el presente invento proporciona un mutante de proNGF en el que el sitio de disociación con proteasas R¹SK²R⁴ está sustituido por lo menos en las posiciones R¹ y K³ correspondiendo a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de un proNGF de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 1) por valina en la posición 101 y por alanina en la posición 103.

20 La serina (Ser) está apareciendo de modo natural en la posición 102 de la secuencia de un proNGF humano de tipo silvestre. X en la posición 102 (SEQ ID NO: 8) se selecciona de manera preferible entre serina (Ser), que está apareciendo de modo natural en la posición 102 de la secuencia de un proNGF humano, pero también se puede seleccionar entre cualquier otro aminoácido, en donde el aminoácido debe de ser un aminoácido de carácter no básico (es decir no es arginina ni lisina). Es importante que el aminoácido en la posición 102 sea un aminoácido de carácter no básico (es decir que no sea Arg o Lys).

El aminoácido en la posición 104 de la secuencia de un proNGF humano de tipo silvestre es arginina (Arg) que está apareciendo de modo natural en la posición 104 de la secuencia de un proNGF humano.

25 El presente invento está dirigido también a unos ácidos nucleicos que codifican los mutantes de proNGF que describen aquí de igual manera.

Método de preparar un beta-NGF humano a partir de un mutante de proNGF del invento

En un segundo aspecto, el presente invento se dirige a un método de preparar un beta-NGF humano biológicamente activo a partir de un mutante de proNGF insoluble inactivo de acuerdo con el invento.

30 Preferiblemente, el mutante de proNGF se obtiene mediante una expresión recombinante en células procarióticas. Unas apropiadas cepas bacterianas son bien conocidas en la especialidad, p.ej. las de *E. coli*, *Bacillus sp.*, y *Salmonella*, y están disponibles comercialmente unos estuches para estos sistemas de expresión. Las células anfitrionas preferidas para la expresión recombinante, son *E. coli*, por ejemplo *E. coli* BL21, JM 108/109 (K12), JM106, JM83 y TB1 y derivados de las mismas. Se podría usar cualquier otra cepa de *E. coli* que fuese apropiada para la expresión de proteínas recombinantes.

35 Unos polinucleótidos son engarzados operativamente a unas secuencias de control de la expresión que permiten la expresión de las proteínas de fusión del invento en unas células anfitrionas procarióticas. Dichas secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a, promotores inducibles y no inducibles, operadores, represores y otros elementos que son conocidos por los expertos en la especialidad y que impulsan o regulan de otro modo la expresión de genes. Dichos elementos reguladores incluyen, por ejemplo, los promotores de T7, TAC, PBAD, LAC, LacI y los represores, LacI^Q

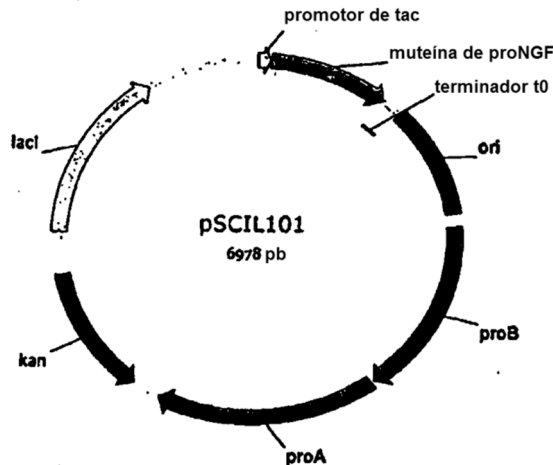
40 La secuencia del mutante de proNGF es introducida en la célula anfitriona procariótica por medio de un apropiado vector. Unos apropiados vectores podrían ser por ejemplo, pero sin limitarse a: pBR322, pMAL, pUC19 y todos los derivados. La célula anfitriona procariótica incluye, pero no está limitada a, unas células procarióticas, tales como unas bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*), que pueden ser transformadas, por ejemplo, con un ADN plasmídico, un ADN recombinante o unos vectores de expresión de DNA cósmidos que contienen las moléculas de polinucleótidos del presente invento. En una forma de realización del invento, se usan unos vectores plasmídicos. Por ejemplo, pero sin quedar limitado de ninguna de las maneras a ellos, se pueden usar unos vectores plasmídicos que se describen en el documento de patente europea EP1697523B1.

Con el fin de expresar unas muteínas de proNGF, se usa un vector de expresión que contiene

- a. un promotor fuerte para una transcripción directa (p.ej. un promotor de tac o T7)
- b. una secuencia de codificación para un proNGF o una muteína de proNGF
- c. un terminador de la transcripción/traducción (p.ej. el terminador t0 del bacteriófago lambda)
- 5 d. un primer gen marcador seleccionable, p.ej. un gen que codifica una resistencia a antibióticos (p.ej. una resistencia a kanamicina, kan)
- e. un segundo gen marcador seleccionable, p.ej. un gen que codifica proB y/o proA
- f. un gen represor (p.ej. un gen de lacI)
- g. un origen de replicación con alto número de copias.

10 En una forma de realización del invento, se pueden usar para la clonación unos vectores de expresión de propietario ((Scil Proteins GmbH, véase el documento EP1697523B1 acerca de la estructura de un apropiado vector de expresión o unos vectores comercialmente disponibles. En lo que se refiere a una información general acerca de los vectores que se pueden usar en el método del presente invento se hace referencia a los detalles más arriba mencionados. No obstante, se pueden usar cualesquiera vectores apropiados que sean conocidos en la especialidad.

15 La estructura del vector de expresión de propietario pSCIL101, como un ejemplo de un apropiado vector para la transformación de unas células anfitrionas procarióticas, se describe seguidamente:



- 20 El método para la preparación de un mutante de proNGF de acuerdo con el presente invento comprende las siguientes etapas iniciales:
- i. preparar un ácido nucleico que codifica una muteína de proNGF de acuerdo con el presente invento
 - ii. introducir dicho ácido nucleico en un vector de expresión procariótico;
 - 25 iii. introducir dicho vector de expresión en una célula anfitriona;
 - iv. cultivar la célula anfitriona;
 - v. someter a la célula anfitriona a unas apropiadas condiciones de cultivación.

Debido a su expresión en unas células anfitrionas procarióticas, la muteína de proNGF está en la forma de su forma insoluble inactiva.

30 En una forma de realización preferida, el método de producción de un beta-NGF a partir de un mutante de proNGF de acuerdo con el invento comprende las etapas de:

- a. disolver el mutante de proNGF de acuerdo con el presente invento por solubilización de unos cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante;
- b. transferir el mutante de proNGF a una solución de replegamiento en donde el proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa;
- 35 c. purificar el mutante de proNGF con respecto de la solución de replegamiento;
- d. disociar la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.

En lo sucesivo, se describen las etapas sucesivas de un método para producir un beta-NGF a partir de un mutante de proNGF de acuerdo con el presente invento.

Etapa a: Solubilización de un mutante de proNGF

La Etapa a) corresponde a la disolución del mutante de proNGF que está sustituido junto al sitio de disociación con proteasas nativo R¹SK³R⁴ en las posiciones R¹ y K³ que corresponden a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de un proNGF de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 1) por valina en la posición 101 y por alanina en la posición 103 mediante la solubilización de unos cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante. Se hace observar que el mutante de proNGF del invento en la etapa a) está usualmente en la forma de su forma insoluble inactiva debido a su expresión en células anfitrionas procarióticas. Un proNGF inactivo que muestra una mala solubilidad, se forma durante una sobreexpresión de la proteína en el citosol de procariotas. En este caso, el proNGF que ha sido preparado por recombinación permanece en el citoplasma en una forma insoluble y conglomerada. Estos conglomerados de proteínas, el aislamiento de los mismos, así como su purificación, se describen por ejemplo en la cita de Marston, F. A., Biochem. J. 240 (1986).

Para aislar estos conglomerados proteínicos inactivos (cuerpos de inclusión), las células procarióticas son rotas mediante una fermentación. Una rotura de las células se puede realizar mediante unos métodos convencionales, p.ej. por medio de una homogeneización a alta presión, una sonificación (= tratamiento con ultrasonidos) o un tratamiento con una lisozima (véase la cita de Rudolph, R., y colaboradores (1997); Folding proteins (proteínas de plegamiento). En: Creighton, T. E. (coordinador de edición): Protein Function: A Practical Approach [Función de proteínas, un enfoque práctico]. Oxford University Press, páginas 57-99).

Además, los cuerpos de inclusión son solubilizados. Los cuerpos de inclusión (IB = acrónimo de inclusion bodies) son unas acumulaciones de proteínas usualmente defectuosas o plegadas incompletamente. Ellos se forman en el interior de células, por ejemplo de una células bacterianas, tales como *E. coli*, en el caso de una excesiva expresión de proteínas recombinantes. Los cuerpos de inclusión que se emplean de acuerdo con el invento comprenden preferiblemente la muteína de proNGF de acuerdo con el invento. Esto significa que ellas contienen por lo menos 60, por lo menos 70, por lo menos 80 o por lo menos 90 % en peso de un proNGF (basado en la cantidad total de proteína).

El invento proporciona un método para la producción de una muteína de proNGF del mismo, en el que unos cuerpos de inclusión que no están plegados, una muteína de proNGF insoluble inactiva, o uno de sus derivados, se solubilizan en un tampón de desnaturalización.

La solución de desnaturalización de la etapa a) comprende de manera preferible una solución que contiene (i) un agente caotrópico, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón y (iv) un agente reductor.

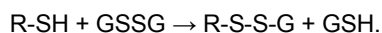
El tampón de desnaturalización comprende por lo menos una sustancia (agente) caotrópica(o). Unas sustancias químicas que disuelven a unos enlaces de puentes de hidrógeno ordenados en agua son denominadas caotrópicas. Puesto que los enlaces de puentes de hidrógeno se rompen y abren, las sustancias caotrópicas interfieren con la estructura del agua y aseguran un desorden (un aumento de la entropía). La razón de esto es que se impide la formación de las estructuras de jaulas con H₂O, que son necesarias para la solvatación. En el caso de los aminoácidos, ellos reducen los efectos hidrófobos y tienen una acción desnaturalizante sobre las proteínas, puesto que una fuerza impulsora del plegamiento de proteínas la constituye el montaje conjunto de unos aminoácidos hidrófobos en agua. Generalmente, se puede emplear como una sustancia caotrópica cualquier sustancia que ejerza el efecto hidrófobo en el tampón de solubilización y por lo tanto tenga una acción desnaturalizante sobre las proteínas. Las sustancias caotrópicas son por lo general unas sales o unos compuestos de bajo peso molecular, tales como la urea. Las sustancias caotrópicas se distinguen con claridad de los detergentes, puesto que ellas no contienen ningún radical hidrófobo, tal como un radical alquilo, en la molécula. Generalmente, la acción caotrópica está acompañada por una mejoría en la solubilidad de la proteína, en este caso la pretrombina.

En una forma de realización preferida del invento, el compuesto caotrópico se escoge entre unas sales de guanidinio, en particular el hidrocloreuro de guanidinio y el tiocianato de guanidinio, unos yoduros, unas sales de bario, unos tiocianatos, la urea y unos percloratos.

Los compuestos caotrópicos se emplean en unas cantidades convencionales. Por ejemplo, se pueden emplear 4 - 8 M de hidrocloreuro de guanidinio o 4 - 9 M de urea.

El tampón de desnaturalización comprende un compuesto que es un agente reductor, por ejemplo un compuesto de disulfuro tal como glutatión (GSH). El compuesto de disulfuro es capaz de formar unos disulfuros mixtos con unos grupos de tiol (-SH) de cisteínas de los polipéptidos en los cuerpos de inclusión. El sulfuro es añadido a la solución. El disulfuro no designa a unas proteínas que los cuerpos de inclusión comprenden, y que posiblemente comprenden unos puentes de disulfuro. De manera preferible, el disulfuro no es un péptido verdadero. Preferiblemente el disulfuro es un compuesto con un bajo peso molecular. El peso molecular es, por ejemplo, más bajo que 2.000 g/mol o que 1.000 g/mol. El disulfuro se emplea, por ejemplo, en una concentración de desde 5 mM hasta 1 M, en particular de desde 10 mM hasta 0,5 M.

En una forma de realización preferida del invento, el compuesto de disulfuro es el disulfuro de glutatión. El glutatión (GSH), también denominado γ -L-glutamyl-L-cisteinilglicina, es un pseudo-tripéptido que se forma a partir de los tres aminoácidos ácido glutámico, cisteína y glicina. El GSH está presente en el citoplasma tanto de procariotas como de eucariotas y está implicado en la formación de puentes de disulfuro. Él se presenta en equilibrio con el dímero GSSG, que contiene un puente de disulfuro. El glutatión reacciona con unas cisteínas R-SH y R'-SH procedentes de dos polipéptidos o procedentes de un único polipéptido en una reacción de intercambio de disulfuro:



El RSSG es denominado un disulfuro mixto. Él se hace reaccionar con otra cisteína de un polipéptido, de manera tal que como resultado se obtiene un puente de disulfuro entre dos cisteínas.



El glutatión es mantenido por medios enzimáticos en la forma reducida (GSH) en el citosol. Por lo tanto se hace referencia a unas "condiciones reductoras" en el citosol. Las condiciones son establecidas en el tampón de solubilización de manera tal que el compuesto de disulfuro que éste comprende cataliza la formación de puentes de disulfuro de acuerdo con las reacciones más arriba descritas. El GSSG se emplea, por ejemplo, en una concentración de desde 10 mM hasta 0,5 M.

Alternativamente, como agente de reducción (reductor) se puede usar cisteína.

En una forma preferida de realización del invento, la solución de desnaturalización es un tampón Tris.

La solución de desnaturalización puede comprender otros aditivos convencionales, por ejemplo el EDTA o unas sales del mismo. El pH del tampón de solubilización está situado, por ejemplo, entre 7 y 10, preferiblemente es un pH de 8. La solubilización es ayudada preferiblemente por medios mecánicos, por ejemplo con unos convencionales aparatos de homogeneización o por medio de ultrasonidos. Después de la solubilización, los materiales sólidos que quedan son preferiblemente separados. El material sobrenadante comprende el pro-NGF solubilizado.

En una forma de realización del invento, la solución de desnaturalización comprende

- 25 i. guanidinio-HCl, 1 - 8 M, de manera preferible 4-6 M, de manera sumamente preferida 4 M, GSH o cisteína, 1 - 100 mM, de manera preferible 5 mM
- ii. Tris, 0,01 - 1 M, de manera preferible 0,1 M,
- iii. EDTA, 1 - 50 mM, de manera preferible 10 mM
- iv. un pH de 7,0 - 10,0, de manera preferible un pH de 8,0

Una concentración de 4 M de guanidinio-HCl es suficiente en la mayor parte de los casos para obtener una desnaturalización completa de una muteína de proNGF.

Etapas b: Replegamiento del mutante de proNGF

Después de la solubilización del mutante de proNGF a partir de unos cuerpos de inclusión, es necesario replegar a la proteína en su conformación nativa. Para el proceso de replegamiento es importante reducir al mínimo las reacciones competitivas de plegamiento erróneo y conglomeración. Para evitar una conglomeración, el replegamiento se efectúa en unas concentraciones muy bajas de la proteína, puesto que una conglomeración de la proteína es predominante en unas altas concentraciones de la proteína. En la etapa b) se produce una transferencia del mutante de proNGF dentro de un tampón de replegamiento cuando el proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa. Una conformación biológicamente activa puede ser determinada por la presencia de unos puentes de disulfuro que aparecen en un beta-NGF natural.

En una forma de realización preferida, el mutante de proNGF solubilizado es renaturalizado en una solución de replegamiento que contiene por lo menos una chaperona, por lo menos un agente quelante de metales y un sistema de barajadura redox.

En una forma de realización preferida el método de acuerdo con el presente invento usa una solución de replegamiento en la etapa b) que comprende

- 45 i. una chaperona, de manera preferible arginina 0,5-1,0 M, de manera preferible 0,75 M,
- ii. un agente quelante de metales, preferiblemente EDTA, 1-10 mM, de manera preferible 5 mM,
- iii. un sistema de barajadura redox, con 0,1-10 mM, de manera preferible 1 mM de L-cistina y 5 mM de L-cisteína, o 1 mM de GSSG (glutatión oxidado) y un GSH 5 mM (glutatión reducido).
- iv. un pH 8,0 - pH de 11,0, de manera preferible un pH de 9,5

Se podrían usar unos alternativos sistemas de barajadura redox tales como el de cistamina y cisteamina.

5 En una forma de realización preferida, el agente asistente del plegamiento es arginina. Unos compuestos que favorecen el plegamiento de las proteínas se pueden emplear generalmente como “agentes auxiliares del plegamiento”. Tales compuestos son conocidos por una persona experta en la especialidad. Ellos pueden ayudar al plegamiento de diversas maneras. Se supone que la arginina desestabiliza a unos compuestos que están incorrectamente plegados, de manera tal que éstos son desplegados de nuevo por lo menos parcialmente (desde un extremo inactivo termodinámicamente) y por lo tanto pueden ser plegados de nuevo correctamente. Por otro lado, el glicerol estabiliza usualmente a las proteínas. Unos compuestos que aumentan el rendimiento absoluto de una muteína de proNGF plegada en el método de acuerdo con el invento en más de un 5 %, en particular en más de un 10 % o más de un 20 % (basado en la cantidad total de proNGF que se emplea para el plegamiento) en comparación con un método sin el uso del agente auxiliar del plegamiento, son apropiados en particular como agentes auxiliares del plegamiento.

El replegamiento se lleva a cabo de manera preferible a un pH comprendido entre 8 y 11, en particular a un pH de 9,5.

15 Para aumentar la concentración de la proteína en el recipiente de replegamiento, se llevó a cabo una renaturalización por impulsos. Es limitativa para el número de impulsos la concentración de guanidinio HCl, que no debería superar el valor de 0.3 M. La concentración de la proteína por cada impulso no debería superar el valor de 50 µg/ml en relación con el volumen de replegamiento final.

20 En una forma de realización preferida del invento, el material solubilizado es añadido a la tanda de plegamiento en varias fracciones o de una manera continua a lo largo de varios días. Preferiblemente, el material solubilizado es añadido en una “renaturalización por impulsos” mediante una dilución rápida en el material solubilizado. En este contexto, por ejemplo pero sin quedar limitado de ninguna manera a ello, se podrían ejecutar por lo menos 6 impulsos en un intervalo de, por ejemplo, 24 horas. El número de impulsos es ajustado de una manera tal que, después de la adición de la tanda de solubilización, la concentración de la proteína que todavía no ha sido plegada no es demasiado alta, puesto que en caso contrario se obtienen unos conglomerados. Por ejemplo, con cada impulso se transfieren de nuevas a la tanda de plegamiento con cada impulso de 0,05 g/l a 0,2 g/l, de manera preferible 0,1 g/l de proteína (basado en la concentración de proteína en la tanda de plegamiento después de la adición del material solubilizado). Por ejemplo cada etapa de replegamiento dura por lo menos 1-2 h.

30 Después de un replegamiento, la tanda de reacción de replegamiento necesita ser clarificada antes de cargarla sobre una columna. Esto puede hacerse por cualesquiera métodos conocidos en la especialidad, por ejemplo por filtración.

35 En una forma de realización preferida, el método para producir un mutante de proNGF correctamente plegado incluye las siguientes etapas: a) unos cuerpos de inclusión, que comprenden un mutante de proNGF insoluble de acuerdo con el invento, son solubilizados en una solución desnaturalizante, tal como se ha descrito más arriba, y b) el proNGF solubilizado es luego renaturalizado en un tampón de solución de replegamiento, tal como se ha descrito más arriba.

40 En una forma de realización preferida del invento, la solución de desnaturalización y/o la solución de replegamiento no contienen por consiguiente ningún detergente. Se ha encontrado que el uso de detergentes no es necesario para la solubilización y/o el plegamiento de una muteína de proNGF. Esto es ventajoso, puesto que ciertos detergentes son unas sustancias químicas comparativamente agresivas, que los productos farmacéuticos no deberían comprender o las deberían comprender solamente en pequeñas cantidades, y por lo tanto se deben de eliminar de una manera costosa. El método de acuerdo con el invento es por lo tanto ventajoso en comparación con el método de Soejima y colaboradores, 2001, en el que dichos agresivos detergentes (Triton X-100 o Brij-58) se emplean para plegar a la proteína. Con otras palabras, no se usan detergentes en todo el método de producción de acuerdo con el invento y por lo tanto el método de producción está libre de detergentes.

Etapas c: Purificación del mutante de proNGF por cromatografía

50 Llevando a cabo el método de acuerdo con el invento con la desnaturalización y el subsiguiente replegamiento, se obtiene una solución acuosa de una muteína de proNGF plegada de acuerdo con el invento. La muteína de proNGF plegada de acuerdo con el invento puede subsiguientemente ser purificada adicionalmente mediante unos métodos conocidos.

En una forma de realización preferida, el mutante de proNGF de acuerdo con el invento es purificado a partir de la solución de replegamiento (p.ej. mediante una desnaturalización ausente o débil) a través de una purificación por cromatografía, en particular por medio de una cromatografía de modalidad mixta (etapa c) del método de producción de beta-NGF a partir de un mutante de proNGF del invento). La columna más preferida para la cromatografía es una

columna con un ligando de afinidad sintético, de manera preferible con la 4-mercapto-etil-piridina (MEP Hypercell; de Pall). Las ventajas de este medio consisten en que la fijación es independiente de la fuerza iónica, no es necesario un apilamiento de sales, y son posibles unos caudales más altos para acelerar el proceso. Por lo demás, la elución se efectúa mediante un desplazamiento del pH.

5 Se conocen, y se podrían usar, otras columnas de materiales de modalidad mixta. Por ejemplo, pero sin limitarse a ellas, se citan las columnas con MEP (de Pall; en donde el ligando de afinidad es 4-mercapto etil piridina), HEA (de Pall; en donde el ligando de afinidad es hexilamino), PPA (de Pall, en donde el ligando de afinidad: es fenilpropilamino), MBI (de Pall; en donde el ligando de afinidad es 2-mercapto-5-bencimidazol sulfo ácido), Capto MMC (GEHC), Capto adhere (GEHC; en donde el ligando de afinidad es N-bencil-N-metil etanolamina), CHT hidroxapatito (de BioRad) y CHT fluoroapatito). Las columnas con MEP, HEA, PPA y MBI tienen una fijación hidrófoba, en donde el Capto MMC es un intercambiador de cationes con una funcionalidad de modalidad mixta y el Capto adhere es un intercambiador de aniones con una funcionalidad de modalidad mixta. Las columnas de BioRad son unas columnas de intercambio de iones con unos componentes hidrófobos. Cualquier otra columna con un material de modalidad mixta, que aquí no se haya enumerado, se podría usar para purificar el mutante de proNGF de acuerdo con el invento.

Etapa d: Disociación del proNGF para dar un beta-NGF

Un proNGF es el precursor de un beta-NGF. Por lo tanto en la etapa d) del método de producción de un beta-NGF a partir de un mutante de proNGF del invento, la pro-secuencia del mutante de proNGF es disociada con el fin de obtener un beta-NGF activo.

20 Unas proteasas que tienen un substrato similar a la tripsina disocian con especificidad a la proteína sin digerir la porción activa de la molécula de proteína. Unas proteasas similares a tripsina disocian a unos enlaces peptídicos a continuación de un aminoácido cargado positivamente tal como arginina o lisina. Igual a como las proteasas similares a tripsina, varias serina proteasas (serina endopeptidasas) son tomadas en consideración para que el procesamiento del proNGF dé como resultado un beta-NGF. De manera preferible, la serina proteasa tripsina es usada para la disociación de la pro-secuencia pero se podrían usar en vez de ella otras proteasas.

30 Se hace observar que la disociación no está restringida a la efectuada con tripsina propiamente dicha, sino que puede implicar asimismo a otras proteasas que tienen unos substratos que son similares a la tripsina. Generalmente, si la relación del proNGF a la tripsina (o a otra proteasa) es ajustada de una manera apropiada, el beta-NGF maduro, correctamente plegado, no será disociado por esta proteasa. En contraste con ello, unas proteínas desnaturalizadas así como unos compuestos intermedios de plegamiento dejan expuestas a unas secuencias que son susceptibles a un ataque por la proteasa.

35 De manera preferible para la disociación de un mutante de proNGF para dar un beta-NGF, la relación de la tripsina (o de otra proteasa) al mutante de proNGF es de 1 : 200 - 1 : 100.000, más preferiblemente de 1 : 5.000 - 1 : 20.000, y es sumamente preferida una relación de 1 : 10.000 (p/p = peso/peso). En una forma de realización sumamente preferida, la disociación se realiza durante 8-23 horas a la temperatura ambiente, de modo sumamente preferido durante 18 horas. En las condiciones que se usan en este invento, el mutante de proNGF es disociado completamente y casi no se forman productos secundarios. No se observó ninguna conglomeración.

40 Tal como se describirá claramente en los Ejemplos, los autores del presente invento han encontrado que las modificaciones de aminoácidos que se han introducido en el mutante de proNGF del invento no solamente evitan una disociación de la proteína en unos sitios de disociación no deseados, sino que también dan como resultado inesperadamente un aumento en la eficiencia de la disociación con tripsina en comparación con la del proNGF del tipo silvestre, lo que permite llevar a cabo la disociación en unas condiciones muy selectivas para obtener un producto muy puro.

45 Con detalles, los datos experimentales muestran con claridad que ya en una relación muy baja de tripsina/proteína tal como la de 1:100.000, el mutante de proNGF del invento (SEQ ID NO: 5) da como resultado un beta-NGF humano recombinante en una pureza muy alta con un alto rendimiento de disociación (aproximadamente de 85 %). Por lo demás, el proNGF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) con la misma relación de tripsina a proteína muestra un bajo rendimiento de disociación (aproximadamente de 5 %). Un rendimiento satisfactorio se obtiene solamente con unas relaciones de tripsina a proteína mucho más altas (1/250), pero esto está acompañado por una baja selectividad y una alta degradación de los productos debido a una digestión excesiva.

Etapa e: Purificación adicional del beta-NGF

El beta-NGF producido a partir de un mutante de proNGF del invento es purificado adicionalmente, por ejemplo, por diversos métodos cromatográficos. Se requieren unas adicionales etapas de purificación para separar a la tripsina y a las impurezas relacionadas con el producto de la digestión triptica a partir del beta-NGF. Unas etapas de

purificación deberían reducir los HCPs, las endotoxinas y el ADN. Se pueden usar cualesquiera métodos conocidos en la especialidad realizados para la purificación de proteínas. Son sumamente preferidas unas purificaciones por cromatografía, por ejemplo con unas columnas de Sepharose (p.ej. SP Sepharose HP, Q Sepharose FF).

5 El producto final beta-NGF que se había producido a partir de un proNGF se analizó en lo que se refería a su pureza mediante una SDS-PAGE, una rp-HPLC, una SE-HPLC y una IEX-HPLC. Unos análisis por HPLC (cromatografía de fase líquida de alto rendimiento) revelaron una pureza del beta-NGF de por lo menos un 97 %.

En una forma de realización preferida del invento, el método para la producción de una muteína de proNGF que es apropiada para obtener un beta-NGF, incluye las siguientes etapas:

- 10 a) una expresión de un mutante de proNGF recombinante con un sitio de disociación con proteasas sustituido en células procarióticas
- b) un aislamiento de los cuerpos de inclusión que contienen una muteína de proNGF,
- c) una mezcladura de los cuerpos de inclusión con un apropiado tampón de desnaturalización que comprende por lo menos (i) una sustancia caotrópica, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón y (iv) un agente de reducción
- 15 d) un replegamiento en una solución de replegamiento que comprende por lo menos una chaperona, un agente quelante de metales y una solución de barajadura redox,
- e) una purificación del mutante del proNGF replegado,
- f) una disociación en la forma activa del beta-NGF con unas proteasas tales como la tripsina,
- g) un aislamiento y una purificación del beta-NGF.

20 *Uso de un proNGF para la producción de un beta-NGF*

En un tercer aspecto, el invento está dirigido al uso del mutante de proNGF del presente invento para producir un beta-NGF humano.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 La **Figura 1** muestra la secuencia de un proNGF y del mutante de proNGF del invento. Se muestra en letras negritas la secuencia de la pro-forma de un beta-NGF humano. Se muestra en letra negrita y subrayado el sitio de disociación con proteasas (tripsina) (aminoácidos 101-104 de SEQ ID NO: 1; los sitios de disociación con tripsina están situados entre los aminoácidos 101-102 (R¹), 103-104 (K³) y 104-105 (R⁴)). X en la secuencia puede ser cualquier aminoácido.

30 La **Figura 1a** muestra una secuencia de un proNGF humano (SEQ ID NO: 1) con el sitio de disociación con proteasas RSKR (SEQ:ID NO: 9).

La **Figura 1b** muestra una secuencia de un mutante de proNGF del invento (SEQ ID NO: 5) con el sitio de disociación con proteasas mutado a VSAR (SEQ ID NO: 13).

La **Figura 1c** muestra una secuencia de un mutante de proNGF del invento (SEQ ID NO: 8) con el sitio con disociación con proteasas mutado a VXAR (SEQ ID NO: 15).

35 La **Figura 2** muestra el procesamiento de un proNGF o de unos mutantes de proNGF para dar un beta-NGF.

La **Figura 2a** muestra seis productos de disociación del beta NGF después de una disociación con tripsina usando un proNGF de tipo silvestre que tiene un sitio de disociación con furina nativo RSKR. El dibujo muestra con claridad que una disociación de un proNGF de tipo silvestre para dar un beta-NGF da como resultado una mezcla heterogénea de muchos diferentes productos de disociación.

40 La **Figura 2b** muestra unos productos de disociación de beta NGF nativo después de una disociación con tripsina usando un mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) con supresión (delección) del sitio de disociación con furina nativo. El sitio de disociación con proteasas RSKR (SEQ ID NO: 9) fue sustituido por dos aminoácidos para dar como resultado un sitio VSAR (SEQ ID NO: 13). Este sitio puede solamente ser disociado por una proteasa después del aminoácido arginina en la posición 104; la tripsina puede solamente disociar en un sitio de disociación en vez de tres). El dibujo muestra con claridad que una disociación del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) para dar un beta-NGF da como resultado solamente un producto de disociación homogéneo (beta-NGF).

45

La **Figura 3** muestra el replegamiento del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) en comparación con un proNGF del tipo silvestre. Esta figura compara el rendimiento de replegamiento del proNGF de tipo silvestre

(representado con línea continua) y del mutante de proNGF (representado con línea interrumpida) con el sitio de disociación con proteasas mutado a VSAR. Se puede ver con claridad a partir de la figura que son idénticas las eficiencias de replegamiento del proNGF de tipo silvestre y del mutante.

5 La **Figura 4** muestra la purificación de un mutante de proNGF SP174-101 con el sitio de disociación con proteasas mutado a VSAR (SEQ ID NO: 5) mediante una columna de MEP HyperCel. La figura muestra un perfil de elución de una purificación con MEP HyperCel de un mutante de proNGF replegado y filtrado.

10 La **Figura 5** muestra la disociación de un mutante de proNGF SP174-101 con el sitio de disociación con proteasas mutado a VSAR (SEQ ID NO: 5) mediante tripsina. La figura muestra un gel de SDS-PAGE teñido con Coomassie de fracciones de la disociación triptica. El producto de la disociación triptica del mutante de proNGF se puede ver en las pistas 4-7. Las figuras muestran con claridad que el mutante de proNGF purificado da como resultado solamente un producto de disociación (un beta-NGF).

15 La **Figura 6** muestra la purificación de un beta-NGF. La figura muestra un perfil de una columna de SP Sepharose HP después de la disociación triptica. La tanda de reacción de digestión triptica fue cargada sobre una columna de SP Sepharose HP. La elución se hizo en tres etapas (a. con 25 % de fosfato de sodio 25 mM, NaCl 1 M, de pH 6,5 (tampón B), b. en un gradiente lineal de 25-50 % del tampón B, y c. 100 % del tampón B (caudal 60 cm/h)).

EJEMPLOS

20 Los siguientes Ejemplos se exponen para proporcionar a las personas que tienen una experiencia ordinaria en la especialidad, una divulgación y una descripción completas de cómo realizar y usar los métodos y las composiciones del invento, y no están destinados a limitar el alcance de lo que los autores del invento consideran como su invento. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los valores numéricos usados pero se deberían tener en cuenta algunos errores experimentales y algunas desviaciones. A menos que se indique otra cosa distinta, el peso molecular es un peso molecular medio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es la atmosférica o está cerca de ella.

25 **Ejemplo 1. Sustitución de un proNGF de tipo silvestre junto al sitio de disociación con proteasas en las posiciones 101 a 104 (R¹SK³R⁴)**

30 La sustitución de arginina R¹ y lisina K³ correspondientes a las posiciones 101 y 103 de un proNGF humano (SEQ ID NO: 1) se realizó al nivel del ADN usando un gen sintetizado por unos métodos que son conocidos por cualquier persona experta en la especialidad. La serina situada en la posición 102 o bien permaneció inalterada o se realizó también una sustitución de la posición 102 de un proNGF humano (SEQ ID NO: 1) al nivel del ADN usando un gen sintetizado unos por métodos que son conocidos por cualquier persona experta en la especialidad. La lisina K⁴ correspondiente a la posición 104 no fue sustituida. Las secuencias se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 2. Expresión recombinante del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) en células procarióticas

35 El anfitrión bacteriano *E. coli* JM108 que se usó para la expresión de *rh*-proNGF (DSMZ 5585; *F thi Δ (lac-proAB) en Al gyrA96 relA1 phx hsdR17 supE44 recA*) es auxótrofo para prolina, que fue neutralizado por el uso de plásmido que tiene la designación pSCIL101. El plásmido pSCIL101 está basado en el plásmido pSCIL008 (véase el documento de solicitud de patente internacional WO05061716). La cepa no puede sintetizar tiamina (Vieira & Messing, 1982 Gene. Oct;19(3): 259-68). El mutante de proNGF que se muestra en SEQ ID NO: 5 es expresado
40 bajo el control del promotor de *tac* situado en el pSCIL101. El vector pSCIL101 que aquí se usa es un plásmido con un alto número de copias que tiene una resistencia a kanamicina. La expresión se lleva a cabo en un medio definido de sal mineral y es inducida por medio de la adición de IPTG. El mutante dproNGF es depositado en el citosol en la forma de cuerpos de inclusión (IBs).

45 *Linaje celular:*

- una cepa anfitriona, p.ej. . *E. coli* HMS174 (K12) o JM108 (K12)
- un mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5)
- un promotor de Tac (inducción por IPTG)
- un replicón ColE1
- 50 ▪ resistencia a kanamicina
- selección con proBA
- sistema de vector de propietario pSCIL 101 (véase el documento WO05/061716)

Ejemplo 3. Fermentación

La meta de esta fermentación fue obtener un producto y una biomasa para unas subsiguientes etapas del proceso. Para vigilar la sobreexpresión de la proteína diana durante el proceso de fermentación, las muestras fueron analizadas por medio de una SDS-PAGE antes y después de una inducción.

- 5
- Un medio de sal mineral sin antibióticos
 - Fase μ de la tanda $\approx 0,25 \text{ h}^{-1}$ ($\text{OD}_{\text{final}} = 18$)
 - Fase de afluencia (fed batch) I: alimentación exponencial con $\mu_{\text{set}} = 0,18 \text{ h}^{-1}$
 - Fase de afluencia (fed batch) II: caudal de alimentación constante

10

 - Punto de inducción de $\text{OD}_{\text{ind}} = 60 \pm 5$
 - IPTG 1,0 mM
 - Tiempo de inducción 5 h
 - OD Final = 82 ± 4
 - Período de tiempo de procesamiento $28,5 \text{ h} \pm 1,25$

15

 - Estabilidad del plásmido 100 %
 - Rendimiento: 40 mg/g de proNGF; $1,2 \text{ g/l} \pm 0,2 \text{ g/l}$ de proNGF

Ejemplo 4. Recuperación primaria de cuerpos de inclusión que contienen el SP174-101

En unas células bacterianas la proteína recombinante está presente en la forma de unos conglomerados. La expresión de la muteína de proNGF tuvo lugar en la forma de IBs. La descomposición de las células y la preparación de los IB se llevaron a cabo de acuerdo con unos protocolos clásicos y se pueden realizar a la escala de laboratorio hasta realizar un tratamiento de aproximadamente 200 g de la biomasa. La preparación de estos “cuerpos de inclusión” que contenían la muteína de proNGF se llevó a cabo de acuerdo con Rudolph, R., y colaboradores, (1987); Folding proteins. In: Creighton, T. E. (coordinador de edición): Protein Function: A Practical Approach. Oxford University Press, páginas 57-99, y de acuerdo con el documento EP0994188B1. Para la rotura de las células, los sedimentos celulares fueron suspendidos de nuevo en un tampón apropiado y subsiguientemente las células fueron rotas usando una homogenización en fosfato de sodio 50 mM de pH 7,0, EDTA 1 mM.

Ejemplo 5. Disolución del mutante de proNGF SP174-101 en una solución desnaturalizante (solubilización de cuerpos de inclusión)

Los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en una solución desnaturalizante que comprendía una solución de (i) un agente caotrópico, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón y (iv) un agente de reducción. Para la solubilización, se ensayó el guanidinio HCl (GuaHCl) en un intervalo de concentraciones de 4,0-6,0 M. El tampón de solubilización se mezcló en diferentes relaciones con una suspensión de cuerpos de inclusión (suspensión de IB). Todos los experimentos tenían una concentración final de cisteína de 5 mM y se llevaron a cabo a la temperatura ambiente. Los resultados fueron analizados mediante una SDS-PAGE (datos no mostrados). Los experimentos revelaron que una concentración de 4 M de GuaHCL era suficiente para una solubilización completa de los cuerpos de inclusión. La relación de la suspensión de cuerpos de inclusión al tampón (suspensión de IB: tampón).es de $1 + 1,25$ (v/v = volumen/volumen) Las condiciones finales de la solución de desnaturalización para la solubilización de los cuerpos de inclusión fueron:

- 40
- i. 4 M de guanidinio-HCl,
 - ii. 0,1 M de Tris,
 - iii. 10 mM de EDTA
 - iv. 5 mM de cisteína
 - v. pH 8,0

45 El material solubilizado es clarificado mediante una filtración profunda de acuerdo con procesos clásicos.

La concentración de la proteína se determinó luego usando el método de Bradford (Bradford, M. M., Anal. Biochem. 72 (1976) 248). La concentración de la proteína de muteína de proNGF estaba situada entre 10 y 20 mg/ml.

Ejemplo 6. Transferencia del mutante de proNGF SP174-101 a un tampón de replegamiento en donde el proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa

50 Después de una solubilización, es necesario replegar la proteína en su conformación nativa y de esta manera reducir al mínimo el plegamiento erróneo y la conglomeración. Para preparar la muteína de proNGF biológicamente activa de acuerdo con el invento a partir de unos materiales solubilizados, éstos fueron diluidos en una solución de replegamiento, en la que el proNGF adopta una conformación biológicamente activa.

La solución de replegamiento final para el material solubilizado basado en suspensión de IB comprendía

- i. 0,75 M de arginina
- ii. 5 mM de EDTA
- iii. 1 mM de L-cistina y 5 mM de L-cisteína
- iv. pH 9,5

La obtención de NGF en la conformación activa se confirmó mediante la presencia de los puentes de disulfuro que aparecían en un beta-NGF humano maduro.

Con el fin de aumentar la concentración de la proteína en el proceso de replegamiento, se llevó a cabo una renaturalización por impulsos. Un impulso se emitió cada hora por 50 µg/ml de proteína mutante de proNGF. La concentración de guanidinio - HCl en la solución no debería superar el valor de 0,3 M. Con el fin de conseguir esto, se requirieron 15 impulsos. La fracción replegada clarificada fue filtrada antes de cargarla en otras columnas adicionales.

El rendimiento de la reacción de replegamiento se analizó después de cada impulso mediante una rp-HPLC. La resultante área de pico fue sometida a una transferencia de borrón frente al número de impulsos. Para la rp-HPLC, se usó una columna de fase inversa (p.ej. 214MS54, 4,6 x 250 mm; 300 Å, 5 µm, de Vydac) con una columna de vigilancia (p.ej. 214GK54; 300 Å; de Vydac). Los tampones de elución fueron H₂O con 0,05 % de ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo con 0,05 % de TFA. El caudal fue de 1 ml/min. Los resultados se muestran en la Figura 3. Puede observarse a partir de la **Figura 3** que son idénticas las eficiencias de replegamiento del proNGF de tipo silvestre y del mutante.

Ejemplo 7. Purificación del mutante de proNGF SP174-101 con respecto de la solución de replegamiento por medio de una columna de material de modalidad mixta

Se usó una columna con un ligando de afinidad sintético, 4-mercapto-etil-piridina (MEP). La elución se realizó por desplazamiento del valor del pH. Además, se llevó a cabo una elución con una baja concentración de sal, que es beneficiosa para un diseño eficiente del procesamiento.

La columna fue equilibrada con 0,75 M de arginina, 5 mM de EDTA, a un pH de 9,5. La tanda de reacción de replegamiento clarificada fue cargada sobre una columna de MEP HyperCel (de Pall) con una capacidad de carga máxima de 5 g de mutante de proNGF por litro (l) de medio de columna. En la etapa de lavado, la mayor parte de las impurezas y la proteína no fijada se separaron hasta agotamiento usando un tampón con 2 M de GuaHCl, 0,1 M de Tris-HCl, de pH 8,0 y 10 mM de Tris-HCl, de pH 8,0. La elución se realizó en un gradiente lineal de 0 a 70 % de acetato 50 mM de pH 4,0 (caudal 120 cm/h). La **Figura 4** muestra un perfil de elución de una purificación con MEP HyperCel de un mutante de proNGF replegado y filtrado con el sitio de disociación con proteasas mutado a VSAR (SEQ ID NO: 5) del invento. En la "etapa de lavado con GuaHCL" se eliminaron muchas impurezas, en la etapa de "agrupamiento (pool)" se recuperó aproximadamente un 60-70 % del mutante de proNGF.

Ejemplo 8. Disociación del mutante de proNGF SP174-101 para obtener un beta-NGF activo

Para la digestión trípica de un mutante de proNGF para dar un beta-NGF, se usó un tampón de fosfato que no inhibía la actividad de la proteasa. El tampón de fosfato de sodio se añadió al material eluido con MEP hasta llegar a una concentración final de 25 mM de fosfato de sodio. El valor del pH se ajustó a un pH de 6,5. Para una proteólisis, se añadió tripsina (de Roche, en la calidad GMP) en una relación de 1:10.000 (p/p) (de tripsina : proNGF). La proteólisis se llevó a cabo usando un período de tiempo de incubación de 18 h a la temperatura ambiente. La realización y el rendimiento de la digestión trípica se analizaron mediante un SDS-PAGE, una rp-HPLC y un UV/VIS280 nm. La **Figura 5** muestra un SDS-PAGE de varias fracciones de la disociación trípica. Se usó un gel de 4-12 % de Bis/Tris, 1 mm, 1x MES como tampón de elución (de Invitrogen). Las pistas 5-7 muestran los productos de disociación trípica en comparación con el mutante de proNGF no disociado (rhproNGF*, véase la pista 3) y el beta-NGF maduro (NGF; véase la pista 8). Las figuras muestran con claridad que el mutante de proNGF purificado da como resultado solamente un producto de disociación (beta-NGF). Se podría observar una digestión completa de un mutante de proNGF para dar un beta-NGF.

Ejemplo 9. Purificación de un beta NGF activo

Después de la digestión trípica, un beta-NGF se cargó sobre una columna de SP Sepharose HP para agotar las cantidades de tripsina, los productos secundarios de la disociación y otras impurezas adicionales. La purificación con SP Sepharose HP se muestra en la **Figura 6**.

La columna se equilibró con 25 mM de un tampón de fosfato de Na (de pH 6,5). La tanda de reacción de digestión trípica se cargó sobre una columna de SP Sepharose HP (2 g de beta-NGF/l de medio) y la proteína no fijada se lavó con el tampón de equilibrado. La elución se realizó en tres etapas (3 cv con 25 % de fosfato de Na 25 mM de

pH 6,5 / 1 M de NaCl (tampón B), 10 cv en un gradiente lineal de desde 25 a 50 % del tampón B, y 3 cv con 100 % del tampón B (caudal 60 cm/h).

5 La **Figura 6** muestra la purificación de un beta-NGF. La Figura muestra un perfil de una columna con SP Sepharose HP después de la disociación trípica. El rendimiento de beta-NGF fue de 85-95 % (pico de “elución de la muestra”).

Ejemplo 10. Eficiencia de la disociación con tripsina sobre el mutante SP174-101 y el proNGF de tipo silvestre

10 Este proceso se aplicó en paralelo tanto para el mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) como para el proNGF de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 1; rhProNGF).

5 ml de rhProNGF purificado se dializaron frente a un tampón de fosfato 25 mM de pH 6,5. Después de una diálisis, se midió una concentración de la proteína de 0,08 mg/ml mediante una HPLC-UV. Por cada muestra de digestión se emplearon 80 µg de un proNGF. Después de una proteólisis, todas las muestras se analizaron mediante HPLC-UV.

15 Se usó una relación de masas de 1/10.000 p/p de tripsina/mutante de rhProNGF, mientras que se usaron diferentes relaciones de masas de tripsina/rhProNGF de tipo silvestre (véase la Tabla 3). En lo referente a la solución de tripsina se usaron 1,0 µg/mol y 10 µg/ml. Después de una incubación durante una noche (aproximadamente durante 17 horas) a la temperatura ambiente, se analizaron todas las muestras. Con finalidades de control se incubó el mutante de rhProNGF sin ninguna proteasa añadida.

20

Tabla 3

Relación de tripsina/rhProNGF	Volumen de tripsina (µl)	Cantidad de tripsina (µg)	Tipo de rhProNGF	Volumen de rhProNGF (µl)	Cantidad de rhProNGF (µg)
Testigo		-	Mutante	1.000	80
1/10.000	8 (1 µg/ml)	0,008	Mutante	1.000	80
1/10.000	8 (1 µg/ml)	0,008	Tipo silvestre	1.000	80
1/5.000	16 (1 µg/ml)	0,016	Tipo silvestre	1.000	80
1/1.000	8 (10 µg/ml)	0,08	Tipo silvestre	1.000	80
1/250	32 (10 µg/ml)	0,32	Tipo silvestre	1.000	80

Las realizaciones y los rendimientos de todas las digestiones trípicas se analizaron mediante HPLC-UV usando una columna de Vydac 214MS C4.

25 La Tabla 4 muestra los rendimientos de disociación que se obtuvieron después de una digestión trípica. Los datos experimentales muestran con claridad que la disociación con tripsina del mutante de proNGF de SEQ ID NO: 5 da como resultado solamente un producto (beta-NGF) con un alto rendimiento de disociación (de aproximadamente 85 %) usando una baja relación de tripsina a proteína (1/10.000). Esto puede ser comparado con la disociación del proNGF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) que muestra un bajo rendimiento de disociación (solamente de alrededor de 5 %) con una baja relación de tripsina a proteína (1/10.000) y una alta degradación del producto (excesivamente digerido) con una alta relación de tripsina a proteína (1/250).

30

Tabla 4

		Cantidad µg	Relación de tripsina/ProNGF	% de ProNGF	% de betaNGF	% de betaNGF <i>Formas excesivamente digeridas</i>
ProNGF	Patrón	80	-	100		
NGF	Patrón	42			100,0	
ProNGF	SEQ ID NO: 5	80	1/10.000	1,9	84,5	
ProNGF	Tipo silvestre	80	1/10.000	67,1	4,6	-
ProNGF	Tipo silvestre	80	1/5.000	21,5	18,6	6,6
ProNGF	Tipo silvestre	80	1/1.000	0,0	77,9	12,9
ProNGF	Tipo silvestre	80	1/250	0,0	67,9	25,7

Ejemplo 11. Ensayo acerca de la actividad biológica de un proNGF mediante estimulación de la proliferación de células TF1

- 5 Unas células TF1 (ATCC, nº de catálogo CRL2003) se cultivaron de acuerdo con unos procesos clásicos. Un medio de ensayo (90 % del medio RPMI 1640, 10 % de un suero de bovino fetal FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin) se añadió a las células y se centrifugó. El sedimento se suspendió de nuevo con una densidad de $1,5 \cdot 10^5$ células/ml en un medio de ensayo a 37 °C. La suspensión de células se mezcló con diferentes
- 10 concentraciones de la proteína proNGF (10^{-10} M, $3 \cdot 10^{-10}$ M, 10^{-9} M, $3 \cdot 10^{-9}$ M, 10^{-8} M, $3 \cdot 10^{-8}$ M, 10^{-7} M, $3 \cdot 10^{-7}$ M, 10^{-6} M, $3 \cdot 10^{-6}$ M, 10^{-5} M y $3 \cdot 10^{-5}$ M) y se analizó en unas placas de 96 pocillos. Después de una incubación durante 48 h a 37 °C, se añadió un reactivo para la proliferación de células (p.ej. el WST-1, de Roche Applied Science, nº de catálogo 1644807) y las placas se incubaron de nuevo durante 4 h a 37 °C. La absorción se midió a 450 nm y el valor de la EC_{50} se determinó usando unos programas apropiados (p.ej. el Sigma-Plot 2000)..

REIVINDICACIONES

1. Un mutante de proNGF en el que el sitio de disociación con proteasas R¹SK³R⁴ está sustituido en las posiciones R¹ y K³, correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de un proNGF de tipo silvestre humano (SEQ ID NO: 1), por valina en la posición 101 y por alanina en la posición 103.
- 5 2. El mutante de proNGF de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el mutante se obtiene por una expresión recombinante en células procarióticas, de manera preferible por una expresión recombinante en *E. coli*.
3. Un método de preparar un beta-NGF humano biológicamente activo que comprende
 (i) proporcionar un mutante de proNGF de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2, y
 (ii) disociar el mutante de proNGF con el fin de obtener un beta-NGF humano activo.
- 10 4. El método de la reivindicación 3, que comprende las etapas de;
- a. disolver el mutante de proNGF de acuerdo con las reivindicaciones 1 ó 2 por solubilización de unos cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante;
 b. transferir el mutante de proNGF a una solución de replegamiento en donde el proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa;
 15 c. purificar la proteína de proNGF replegada;
 d. disociar la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.
5. El método de la reivindicación 4,
 - en el que la solución desnaturalizante comprende una solución que contiene (i) una sustancia caotrópica, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón, y (iv) un agente reductor,
 20 preferiblemente en el que la solución desnaturalizante comprende
 i. 1 - 8 M, de guanidinio-HCl preferiblemente 4-6 M,
 ii. 0,01 - 1 M de Tris,
 iii. 1 - 50 mM de EDTA,
 25 iv. 1 - 100 mM seleccionados entre glutatión (GSH) o cisteína
 v. pH 7,0 - 10,0.
 y más preferiblemente comprende
 i. 4 M de guanidinio-HCl,
 ii. 0,1 M de Tris,
 iii. 10 mM de EDTA
 30 iv. 5 mM de GSH o cisteína
 v. pH 8,0, o
 en el que la solución de replegamiento comprende
 i. 0,5-1,0 M de una chaperona,
 ii. 1- 10 mM de un agente quelante de metales,
 35 iii. 0,1 - 10 mM de una solución de un sistema de barajadura redox,
 iv. pH de 8,0 - pH 11,0,
 preferiblemente en que la solución de replegamiento comprende
 i. 0,75 M de arginina,
 ii. 5 mM de EDTA
 40 iii. 1 mM de L-cistina y 5 mM de L-cisteína, o 1 mM de GSSG (glutatión oxidado) y 5 mM de GSH (glutatión reducido),
 iv. pH de 9,5.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 4 ó 5 en el que el replegamiento se lleva a cabo como una renaturalización por impulsos, preferiblemente en el que en relación con el volumen de replegamiento final durante la renaturalización por impulsos, la concentración de guanidinio HCl no excede de 0,3 M y la concentración de proteína por impulsos no deberá exceder de 50 µg/ml.
7. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4-6, en el que el mutante de proNGF es purificado mediante una cromatografía de modalidad mixta,
 en el que la columna cromatográfica es preferiblemente una columna de un material de modalidad mixta con un ligando de afinidad sintético, más preferiblemente una columna con 4-mercapto-etil-piridina (MEP), hexilamino (HEA), fenilpropilamino (PPA), ácido 2-mercapto-5-bencimidazol sulfónico (MBI), Capto MMC (GEHC), N-bencil-N-metil etanolamina (GEHC), CHT hidroxipatito o CHT fluoroapatito, de manera sumamente preferida 4-mercapto-etil-piridina (MEP).
8. El método de acuerdo con las reivindicaciones 4-7, en el que la pro-forma del mutante de proNGF es disociada por una proteasa, de manera preferible por una serina proteasa, de manera más preferible por tripsina.
- 55

9. El método de la reivindicación 8, en el que la relación de la tripsina al mutante de proNGF es de 1 : 200 - 1 : 100.000, de manera preferible es de 1 : 5.000 - 1 : 20.000, y de manera más preferible es de 1 : 10.000 (p/p).
- 5 10. El método de las reivindicaciones 4 hasta 9 que comprende además una etapa adicional de purificar un beta-NGF, de manera preferible por cromatografía en columna, de manera más preferible por medio de una columna con SP Sepharose HP.
11. El uso de un mutante de proNGF de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2 para producir un beta-NGF humano.

Figura 1

Figura 1a: Secuencia del proNGF humano (SEQ ID NO: 1)

MEPHSESNPAGHTIPQVHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST
 QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKRSSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN
 NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAVR

Figura 1b: Secuencia del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO:5)

MEPHSESNPAGHTIPQVHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST
 QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHVSARSSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN
 NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAVR

Figura 1c: Secuencia de un mutante de proNGF del invento (SEQ ID NO:8)

MEPHSESNPAGHTIPQVHWTKLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST
 QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHVXARSSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNI
 NNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCVLSRKAVR

Figura 2: Procesamiento de un proNGF o de unos mutantes de proNGF para dar un beta-NGF

Figura 2a: Procesamiento de un proNGF de tipo silvestre

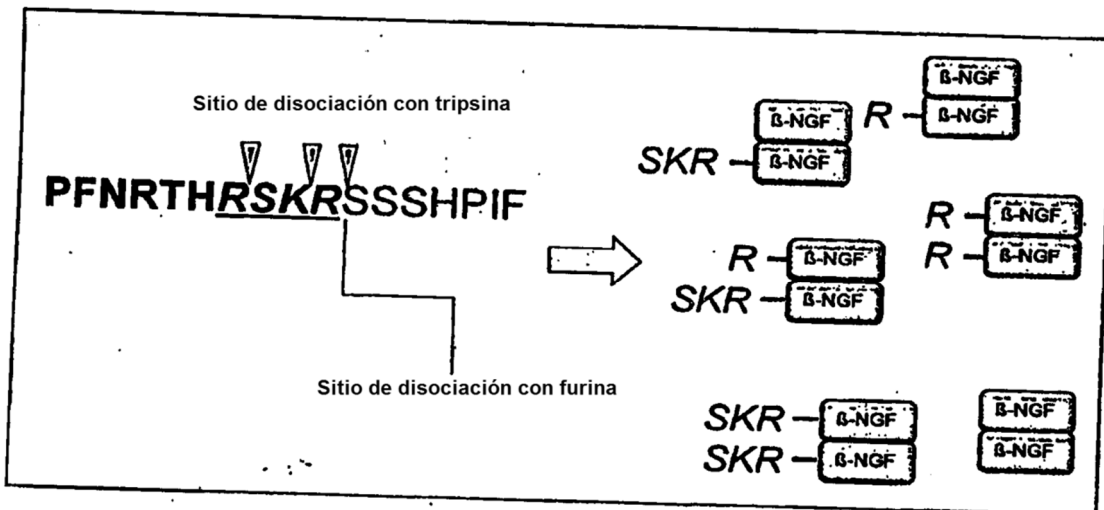


Figura 2b: Procesamiento del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5)

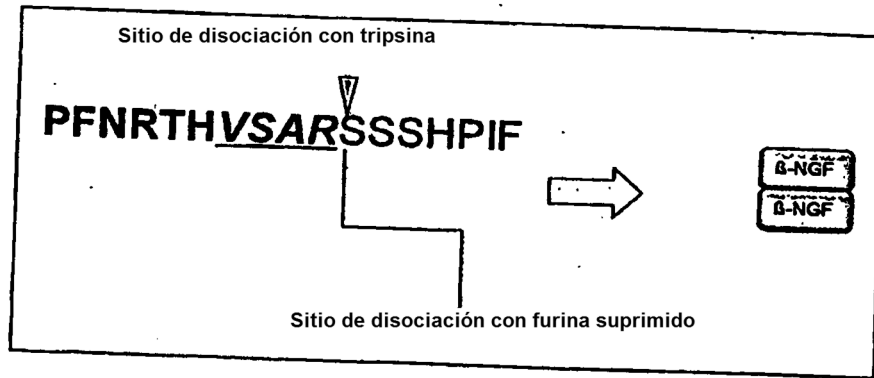


Figura 3: Repliegamiento del mutante de proNGF SP174-101

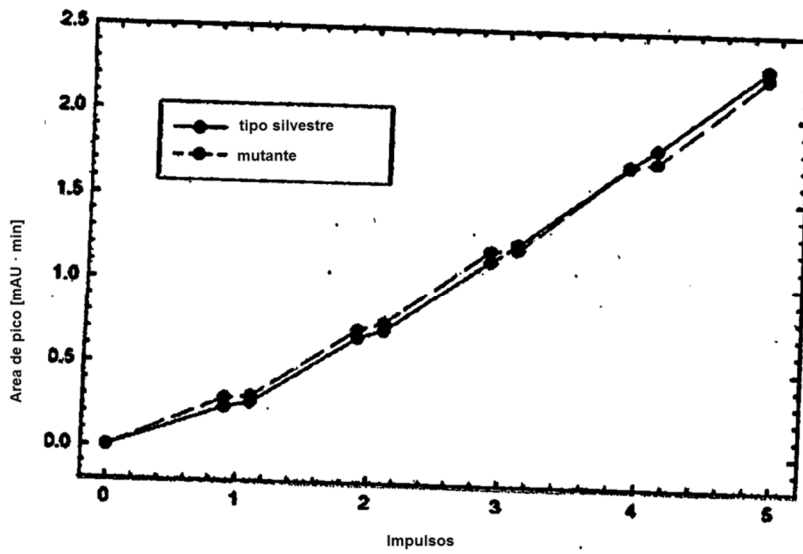


Figura 4: Purificación del proNGF SP174-101 mediante una columna con MEP

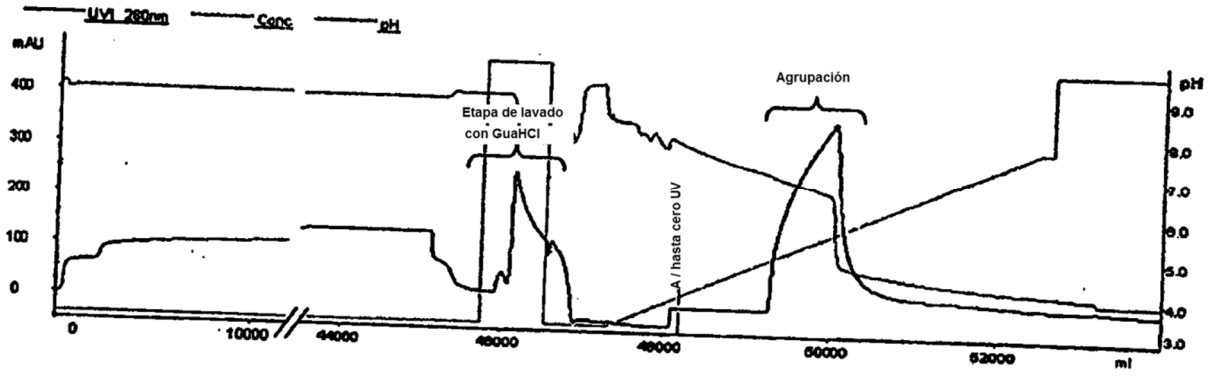


Figura 5: Disociación del mutante de proNGF SP174-101 para obtener un beta-NGF activo

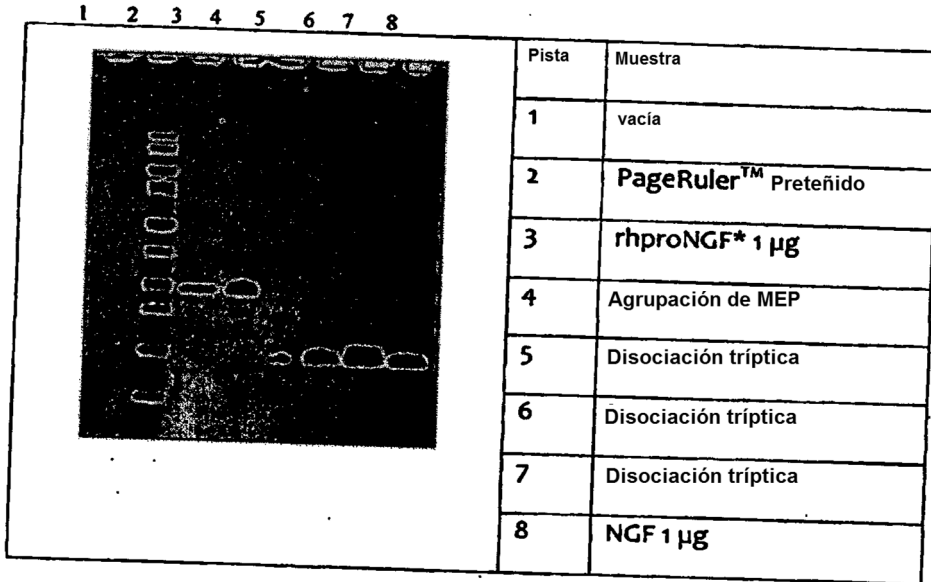


Figura 6: Purificación de un beta-NGF mediante una cromatografía con SP Sepharose HP.

