

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 657 344**

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 15157320 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.11.2017 EP 2907521**

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:

**02.03.2018**

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:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 657 344 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 de la invención**

5 La presente invención se refiere a nuevos mutantes de proNGF que tienen sustituciones en el sitio de escisión natural de la proteasa. La presente invención describe adicionalmente un método para producir un beta-NGF humano biológicamente activo a partir de un mutante de proNGF insoluble e inactivo, y el uso de un mutante de proNGF para producir beta-NGF humano.

**Antecedentes de la invención**

10 El factor de crecimiento nervioso (beta-NGF) es un factor neurotrófico que tiene un papel crucial en el crecimiento y la supervivencia de las neuronas (sensoriales y simpáticas) (Levi-Montalcini, R., Science 237 (1987) 1154; Thoenen, H., et al., Physiol. Rev. 60 (1980) 1284; Yankner, B. A., et al., Annu. Rev. Biochem. 51 (1982) 845). El beta-NGF pertenece a una superfamilia de nudos de cisteína de factores de crecimiento, que asumen una estructura de proteína dimérica estable. Además, el beta-NGF favorece el crecimiento, la diferenciación y la vitalidad de las neuronas colinérgicas del sistema nervioso central (Hefti, F. J., J. Neurobiol. 25 (1994) 1418). Posibles indicaciones terapéu-  
15 cas para el factor de crecimiento nervioso humano recombinante incluyen neuropatías sensoriales periféricas, por ejemplo, asociadas con la diabetes o como un posible efecto secundario en la terapia del SIDA. Otras indicaciones para el beta-NGF son neuropatías centrales, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer. En este caso, la pérdida de memoria es el resultado de una pérdida de neuronas colinérgicas. También, se ha encontrado que el beta-NGF es eficaz en el tratamiento de úlceras cutáneas y de la córnea humana (Bernabei et al. Lancet 1999; Lambiase et al. NEJM 1998). Además, se ha mostrado que el beta-NGF protege las células de la retina de la degeneración y la apoptosis en un modelo animal experimental de glaucoma y mejora la función visual en unos pocos pacientes afectados por el glaucoma (Lambiase A, et al. PNAS 2009).

25 El beta-NGF humano maduro es una proteína de 118 aminoácidos que se traduce como una preproteína que consiste en 241 aminoácidos. El péptido señal (prepéptido) de 18 aminoácidos se escinde durante la translocación en el retículo endoplasmático (RE). La proproteína resultante (proNGF) se procesa en su extremo N-terminal mediante la eliminación de la pro-secuencia por medio de una escisión con proteasa. El NGF humano maduro muestra un alto grado de identidad (aproximadamente el 90%) con el beta-NGF de roedor (murino y rata). Para estudios clínicos o usos terapéuticos, el beta-NGF se tiene que proporcionar en altas concentraciones. Las glándulas submaxilares de ratones son una fuente natural de beta-NGF. Sin embargo, esas preparaciones de beta-NGF son mezclas heterogé-  
30 neas de distintos dímeros y, por lo tanto, no son adecuadas para usos terapéuticos. Además, es deseable administrar a los pacientes la forma humana de la proteína. En los tejidos humanos, sin embargo, los factores neurotróficos están presentes solo en concentraciones bajas.

35 La prosecuencia es un dominio distinto del de la proteína madura (véanse los datos de la secuencia en la Figura 1, en donde la prosecuencia se indica en negrita). Estos dos dominios están separados por un sitio de escisión de la proteasa expuesto con una secuencia diana de aminoácidos básicos del tipo Arg-Ser-Lys-Arg localizados en las posiciones 101 a 104 de la secuencia de proNGF humano (SEQ ID NO: 1). Este motivo es naturalmente un sitio de escisión para la endoproteasa de serina, furina. Además, el sitio de escisión puede ser procesado específicamente por otras proteasas adecuadas, preferiblemente por proteasas con especificidad de sustrato para la escisión después del aminoácido arginina (Arg, R). Por ejemplo, la proteasa tripsina escinde después de aminoácidos básicos  
40 tales como lisina (Lys, K) o arginina (Arg, R).

45 Los métodos para la preparación de beta-NGF biológicamente activo a partir de su proforma inactiva son bien conocidos en el campo de la técnica. Por ejemplo, el documento EP 0 994 188 B1 describe un método para la preparación de beta-NGF biológicamente activo a partir de su proforma inactiva, que tiene poca solubilidad. Según este método, el beta-NGF se puede obtener a partir de proNGF inactivo insoluble recombinante que se solubiliza en una solución desnaturalizante. Posteriormente, el proNGF solubilizado se transfiere a una solución no desnaturalizante o débilmente desnaturalizante. El proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa, tal como se determina por los enlaces disulfuro presentes en el beta-NGF natural. Posteriormente, la prosecuencia de proNGF se escinde mediante lo cual se obtiene el beta-NGF activo.

50 El proNGF humano contiene un sitio de escisión para una proteasa natural (furina) Arg-Ser-Lys-Arg, por lo que tiene el siguiente motivo de secuencia: R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup>. Para los procesos de producción específicos, tales como los que requieren niveles de calidad de "Buena Práctica de Fabricación" (GMP), los materiales tales como enzimas, tienen que ser proporcionados en alta calidad. La proteasa furina no está actualmente disponible como proteasa de grado GMP.

55 Por lo tanto, una proteasa alternativa, tripsina (EC 3.4.21.4), fue elegida para escindir el proNGF, para dar lugar a una proteína beta-NGF madura. La proteasa de serina tripsina escinde cadenas de péptidos en el lado carboxilo de los aminoácidos básicos arginina o lisina. En el proNGF humano, el sitio de escisión de origen natural en el proNGF humano contiene tres posiciones con aminoácidos básicos (posiciones 101, 103 y 104 de SEQ ID NO: 1; a las que se hace referencia alternativamente como R<sup>1</sup>, K<sup>3</sup> y R<sup>4</sup> en este documento). De este modo, la escisión de proNGF mediante tripsina puede dar lugar a numerosos productos escindidos diferentes, dependiendo del lugar exacto en el

que se produce la escisión. Productos de escisión típicos son SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup>-beta-NGF y R<sup>4</sup>-beta-NGF y beta-NGF maduro. Este problema se agrava ya que la dimerización de la proteína beta-NGF conducirá a una mayor cantidad (hasta seis) de productos no homogéneos que se tienen que purificar en las siguientes etapas (véase la Figura 2a).

#### Problemas técnicos subyacentes a la presente invención y su solución

5 Los métodos para producir beta-NGF se han descrito en la técnica anterior. Sin embargo, los procesos de producción disponibles en la actualidad tienen diversos inconvenientes, tales como productos de beta-NGF no homogéneos y bajos rendimientos de beta-NGF.

La escisión del pro-NGF de tipo silvestre con tripsina para producir beta-NGF ha mostrado una eficacia baja lo que obliga a utilizar cantidades muy altas de la enzima con el fin de obtener un rendimiento suficiente de beta-NGF escindido. Esto tiene varios inconvenientes que tienen un impacto sobre el proceso posterior de purificación. En primer lugar, se disminuye aún más la selectividad de la escisión lo que conduce a diversos productos de la digestión. En segundo lugar, la purificación de beta-NGF sin la enzima es necesaria, ya que la enzima tiene que estar ausente en la muestra final de la proteína. Esto implica varios procedimientos de purificación para eliminar la tripsina abundante. Por lo tanto, el uso de tripsina como enzima de escisión en el procedimiento de la técnica anterior conduce o bien a rendimientos muy bajos de beta-NGF o a problemas de purificación de la proteína.

No hace falta decir que sigue habiendo en la técnica una necesidad de un método para producir beta-NGF sin los inconvenientes descritos anteriormente. Por tanto, un problema subyacente a la presente invención es proporcionar un nuevo método para producir beta-NGF que se consiga con alta calidad, alta eficacia y altos rendimientos. Además, un problema subyacente de la invención es proporcionar un procedimiento para la producción de beta-NGF que dé lugar a rendimientos altos de beta-NGF, sea eficaz, resistente, graduable y reproducible.

Una ventaja de la invención es la producción de un beta-NGF a partir de un nuevo mutante de proNGF. El nuevo mutante da lugar a productos homogéneos de beta-NGF con un buen rendimiento, debido a que el nuevo mutante de proNGF impide la digestión no homogénea con proteasas y, por lo tanto, productos no homogéneos de beta-NGF. El problema de la invención se resuelve proporcionando el mutante de proNGF de la invención y el método para producir beta-NGF a partir del mutante de proNGF como se describe en la presente invención.

El nuevo mutante da lugar a un aumento inesperado y sorprendente de la eficacia de la escisión con tripsina en el sitio relevante en el proNGF mutado de la invención, en comparación con el tipo silvestre. Esto permite utilizar cantidades extremadamente bajas de la proteasa tripsina, en comparación con la cantidad que se utiliza con el tipo silvestre y, como consecuencia, da como resultado una reducción de los problemas de la purificación de beta-NGF sin la propia enzima y a partir de los productos de la escisión.

Los problemas descritos anteriormente se resuelven y las ventajas se consiguen por el contenido de las reivindicaciones independientes. Las realizaciones preferidas de la invención se incluyen en las reivindicaciones dependientes, así como en la siguiente descripción, los ejemplos y las figuras.

El resumen anterior no describe necesariamente todos los problemas resueltos por la presente invención. Otros problemas y cómo hay que resolverlos puede ser evidente para el experto en la materia después de haber estudiado la presente solicitud.

#### Compendio de la invención

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un mutante de proNGF, en el que el sitio de escisión de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> está sustituido al menos en las posiciones R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup> que se corresponden a las posiciones 101 y 103 secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), por un aminoácido seleccionado a partir de aminoácidos no básicos e histidina.

En un segundo aspecto, la presente invención se refiere a un método para preparar un beta-NGF humano biológicamente activo a partir de un mutante de proNGF insoluble inactivo, sustituido en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, al menos en las posiciones R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup> correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), que comprende: (i) proporcionar un mutante de proNGF de acuerdo con esta invención, y (ii) escindir el mutante de proNGF con el fin de obtener beta-NGF humano activo.

En particular, la invención se refiere al siguiente procedimiento:

- a. disolver el mutante de proNGF en una solución desnaturalizante;
- b. transferir el mutante de proNGF a una solución de renaturalización, en donde el proNGF desnaturalizado asume una conformación biológicamente activa;
- c. purificar el mutante de proNGF a partir de la solución de renaturalización;
- d. escindir la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.

Un tercer aspecto de la invención se refiere al uso de un mutante de proNGF, en donde al menos la arginina en la posición 101 y la lisina en la posición 103 del sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones 101 a 104 del proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), están sustituidas por aminoácidos no básicos para la preparación de beta-NGF humano.

- 5 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas que comprenden beta-NGF producido a partir del mutante de proNGF, en donde al menos la arginina en la posición 101 y la lisina en la posición 103 del sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones 101 a 104 del proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), están sustituidas por un aminoácido seleccionado a partir de aminoácidos no básicos e histidina y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 Este compendio de la invención no describe necesariamente todas las características de la presente invención. Otras realizaciones serán evidentes a partir de una revisión de la siguiente descripción detallada.

### Descripción detallada de la invención

#### Definiciones

- 15 Antes de que se describa la presente invención con detalle a continuación, ha de entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares descritos en el presente documento, ya que pueden variar. Ha de entenderse también que la terminología usada en este documento es con el fin de describir solamente realizaciones particulares, y no pretende limitar el alcance de la presente invención, el cual se limitará solamente por las reivindicaciones adjuntas. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen los mismos significados que entiendo comúnmente un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.
- 20

A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprenden", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero indicado o una etapa o un grupo de números enteros o etapas, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas.

- 25 Diversos documentos (por ejemplo: patentes, solicitudes de patente, publicaciones científicas, instrucciones, etc.) se citan a lo largo del texto de esta memoria descriptiva. Nada en este documento debe interpretarse como una admisión de que la invención no tiene derecho a preceder tal descripción en virtud de una invención previa.

Secuencias: Todas las secuencias a las que se hace referencia en el presente documento se describen en la lista de secuencias adjunta que, con todo su contenido y descripción, forma parte de esta memoria descriptiva.

- 30 El término "aproximadamente" cuando se usa en relación con un valor numérico, se entiende que incluye valores numéricos dentro de un intervalo que tiene un límite inferior que es un 5% menor que el valor numérico indicado y que tiene un límite superior que es un 5% mayor que el valor numérico indicado.

- 35 El término "proNGF" o "pro-NGF" se refiere a la pro-forma de beta-NGF humano. La secuencia completa de proNGF humano se define en SEQ ID NO: 1 (Figura 1a). Con el fin de obtener beta-NGF maduro, el proNGF propéptido tiene que ser escindido con proteasas. La prosecuencia de beta-NGF es un dominio distinto del beta-NGF maduro. Entre estos dos dominios, hay un sitio de escisión natural de la proteasa Arg-Ser-Lys-Arg (denominado en la presente memoria R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup>, SEQ ID NO: 9) en las posiciones 101 a 104 de SEQ ID NO: 1. El sitio de escisión se puede procesar específicamente con proteasas adecuadas, en particular la proteasa furina.

- 40 La expresión "mutante de proNGF" o "muteína de proNGF" se refiere a modificaciones de la pro-forma de beta-NGF humano mediante sustituciones de aminoácidos. La muteína de proNGF de la presente invención está sustituida en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> (SEQ ID NO: 9) al menos en ambas posiciones K<sup>3</sup> y R<sup>1</sup>, correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), por un aminoácido seleccionado a partir de aminoácidos no básicos e histidina.

- 45 En una realización preferida de la invención, el aminoácido lisina en la posición K<sup>3</sup> (correspondiente a la posición 103) está sustituido con alanina (véase la Figura 1d, SEQ ID NO: 4, la Figura 1e, SEQ ID NO: 5, la Figura 1g, SEQ ID NO: 8).

En otra realización preferida de la invención, el aminoácido arginina en la posición R<sup>1</sup> (correspondiente a la posición 101) se sustituye con valina (véase la Figura 1b, SEQ ID NO: 2, la Figura 1e, SEQ ID NO: 5, la Figura 1g, SEQ ID NO: 8).

- 50 En otra realización de la invención, el aminoácido arginina R<sup>4</sup> correspondiente a la posición 104 de la secuencia de proNGF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) también puede estar sustituido por cualquier aminoácido que permita el procesamiento del proNGF mediante escisión proteolítica para obtener beta NGF, preferiblemente un aminoácido básico, tal como arginina o lisina. Por ejemplo, la presencia de alanina en la posición R<sup>4</sup> evita el procesamiento de proNGF a beta NGF. Por lo tanto, el mutante de la invención no puede contener alanina en la posición 104.

Tabla 1. Sitios de escisión de la proteasa de proNGF y muteínas de proNGF

(X se refiere a cualquier aminoácido pero no Arg o Lys)

SEQ ID NO:	Sitio de escisión de la proteasa (pos 101-104 de SEQ ID NO: 1)
1	RSKR (tipo silvestre) (SEQ ID NO: 9)
2	VSXR (SEQ ID NO: 10)
3	XSXR (SEQ ID NO: 11)
4	XSAR (SEQ ID NO: 12)
5	VSAR (SEQ ID NO: 13)
6	RXKR
7	XXXR (SEQ ID NO: 14)
8	VXAR (SEQ ID NO: 15)

5 La expresión "aminoácido no básico" se refiere a cualquier aminoácido que no está cargado positivamente. La expresión se refiere a un residuo de aminoácido distinto de un aminoácido básico. La expresión excluye los aminoácidos lisina o arginina, que son aminoácidos con cadenas laterales positivas. Los aminoácidos no básicos son los aminoácidos cargados negativamente ácido glutámico y ácido aspártico, los aminoácidos con cadenas laterales no cargadas polares (serina, treonina, asparagina, glutamina), los aminoácidos con cadenas laterales hidrófobas (alаниna, valina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, tirosina, triptófano) y los aminoácidos cisteína, glicina y prolina.

10 La expresión "proNGF biológicamente activo" o "proNGF con conformación biológicamente activa", como tal, se refiere a la actividad biológica del pro-NGF. Una conformación biológicamente activa de proNGF se determina por la presencia de puentes disulfuro que se producen en el beta-NGF natural. La actividad se puede determinar, por ejemplo, de acuerdo con un ensayo tal y como se describe en Chevalier et al. 1994, Blood 83: 1479-1485, 1994, que se incorpora en esta memoria como referencia. El Ejemplo 11 describe un ensayo para la actividad biológica del proNGF, a través de la estimulación de la proliferación de células TF1.

15 El término "beta-NGF" se refiere a un factor de crecimiento nervioso beta maduro, preferiblemente procedente de ser humano. La secuencia para el factor de crecimiento nervioso 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.

20 La expresión "actividad de beta-NGF" o "beta-NGF biológicamente activo" como tal significa la actividad biológica del beta-NGF. El beta-NGF biológicamente activo existe en forma de un dímero. El beta-NGF debe estar presente en una forma dimérica para tener una conformación biológicamente activa. El requisito previo para una conformación biológicamente activa de beta-NGF es la correcta formación de los puentes disulfuro de un nudo de cistina. La actividad se puede determinar, por ejemplo, de acuerdo con el ensayo DRG (ensayo de ganglio de raíz dorsal), véase por ejemplo, Levi-Montalcini, R. et al., Cancer Res. 14 (1954) 49, y Varon, S. et al., Meth. in Neurochemistry 3 (1972) 203. En este ensayo, la estimulación y la supervivencia de las neuronas sensoriales procedentes de ganglios disociados de la raíz dorsal de embriones de pollo, se controlan por medio de la formación de neuritas.

25 El término "sustitución" o "sustituciones" se refiere a modificaciones de la pro-forma de beta-NGF humano mediante una sustitución de aminoácidos. El término comprende la modificación química de aminoácidos, por ejemplo, sustituyendo o añadiendo grupos químicos o residuos al aminoácido original. La etapa de modificación de los aminoácidos seleccionados se realiza preferiblemente mediante mutagénesis a nivel genético. Preferiblemente, la modificación de proNGF se lleva a cabo por medio de métodos de ingeniería genética para la alteración de un ADN que pertenece a proNGF. Las modificaciones son mutaciones que causan la sustitución de un solo nucleótido base por otro nucleótido del material genético. Las mutaciones puntuales dan lugar a la codificación de diferentes aminoácidos, en comparación con la secuencia de tipo silvestre. Preferiblemente, la expresión de la proteína proNGF modificada se realiza entonces en organismos procariotas o eucariotas, lo más preferible en organismos procariotas.

30 El término "desnaturalizante" o "desnaturalización" se refiere a un procedimiento en el que se altera la estructura del plegamiento de una proteína. El término se refiere a la desnaturalización de la estructura terciaria de proNGF o de la muteína de proNGF. La alteración de la estructura del plegamiento es debida a una exposición a ciertos factores químicos o físicos. Como resultado, algunas de las propiedades originales de la proteína, especialmente su actividad biológica, se encuentra disminuida o eliminada. Debido al proceso de desnaturalización, las proteínas se vuelven biológicamente inactivas. Además, las proteínas desnaturalizadas pueden presentar una amplia gama de características, incluyendo una pérdida de la función biológica, pérdida de solubilidad y/o agregación.

35 El término "replegamiento" o "renaturalizante" o "renaturalización" se refiere a un procedimiento por el que la estructura de una proteína asume su plegamiento o conformación funcional natural. Debido a los procesos de renaturalización o de replegamiento, la proteína se vuelve biológicamente activa.

El término "recombinante" se refiere a la clonación de ADN en vectores para la expresión de la proteína codificada por el ADN en un hospedador adecuado. El hospedador es preferiblemente un procariota, más preferiblemente una bacteria. Una "expresión recombinante" tal y como se emplea en esta memoria, se refiere a la expresión de proNGF o de una muteína de proNGF en células hospedadoras procariotas, por ejemplo, se podrían emplear cepas de *E. coli* adecuadas para la expresión de proteínas recombinantes.

El término "soluble" se refiere a una proteína que es susceptible de ser disuelta en un poco de disolvente.

El término "insoluble" se refiere a una proteína que no es susceptible de ser disuelta en un poco de disolvente.

## Descripción de la invención

### *Mutantes de proNGF de la invención*

En una primera realización de la invención, la presente invención proporciona un mutante de proNGF en el que el sitio de escisión de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> está sustituido al menos en las posiciones R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup> correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), por un aminoácido seleccionado a partir de aminoácidos no básicos e histidina. En otras palabras, al menos la arginina R<sup>1</sup> en la posición 101 y la lisina K<sup>3</sup> en la posición 103 del sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones 101 a 104 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), están sustituidas por cualquier aminoácido pero no por arginina o lisina.

En el proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), el sitio de escisión natural de la proteasa se refiere a las posiciones de aminoácidos 101 a 104 (ArgSerLysArg, RSKR, SEQ ID NO: 9). El aminoácido lisina K<sup>3</sup> en la posición 103 de la secuencia de proNGF de tipo silvestre y el aminoácido arginina R<sup>1</sup> en la posición 101, se reemplazan por cualquier aminoácido, pero no por Arg o Lys, para dar como resultado un proNGF con propiedades mejoradas, en particular para producir beta-NGF. Con el fin de conseguir el objeto anteriormente identificado, es decir, generar una muteína con características mejoradas para producir beta-NGF, la arginina (R<sup>1</sup>) o la lisina (K<sup>3</sup>) se pueden sustituir por todos los aminoácidos de origen natural, o también aminoácidos artificiales, siempre que no constituyan un sitio de escisión para la tripsina.

De acuerdo con la invención, las modificaciones de aminoácidos en una o varias posiciones correspondientes a los residuos 101-103, pueden ser sustituciones que sustituyen aminoácidos básicos por aminoácidos no básicos. Estas sustituciones se pueden utilizar para crear mutantes de proNGF de acuerdo con la invención, en particular, para la producción de beta-NGF. Los mutantes comprenden sustituciones en al menos las posiciones Arg101 y Lys103. Los residuos de aminoácidos se sustituyen por un aminoácido no básico o histidina. En particular, los mutantes de la invención tienen las sustituciones Arg101Val y Lys103Ala. Por ejemplo, dichos aminoácidos no básicos naturales se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en los residuos de aminoácidos de origen natural alanina, asparagina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, ácido glutámico, glicina, isoleucina, leucina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, treonina, triptófano, tirosina, valina.

Los aminoácidos para las sustituciones en las posiciones 101 y 103 **no** se seleccionan a partir de los aminoácidos básicos (cargados positivamente) arginina (Arg) y lisina (Lys). También son menos preferidos los aminoácidos isoleucina (Ile), leucina (Leu) o fenilalanina (Phe), cisteína (Cys), prolina (Pro) o triptófano (Trp). La serina (Ser) es de origen natural en la posición 102 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre. X en la posición 102 (SEQ ID NO: 7 y SEQ ID NO: 8) se selecciona preferiblemente a partir de serina (Ser), que es de origen natural en la posición 102 de la secuencia de proNGF humano, pero también se puede seleccionar a partir de cualquier otro aminoácido, en donde el aminoácido debe ser un aminoácido no básico (es decir, no ser arginina ni lisina). Es importante que el aminoácido en la posición 102 sea un aminoácido no básico (es decir, no ser Arg ni Lys).

El aminoácido en la posición 104 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre es preferentemente arginina (Arg), que es de origen natural en la posición 104 de la secuencia de proNGF humano, pero también puede estar sustituido por cualquier otro aminoácido, preferiblemente un aminoácido básico, más preferiblemente lisina, que permite un procesamiento del proNGF mediante escisión proteolítica para obtener beta NGF.

Por ejemplo, la presencia de alanina en la posición 104 de proNGF humano de tipo silvestre evita un procesamiento de proNGF a beta NGF. Por lo tanto, Ala en la posición 104 está excluida.

La Tabla 2 resume las sustituciones preferidas en el sitio de escisión de la proteasa de proNGF.

Tabla 2A. Aminoácidos preferidos en las posiciones 101-104 de proNGF de tipo silvestre

El asterisco (\*) muestra el aminoácido que se produce naturalmente en el sitio de escisión de la proteasa (proNGF de tipo silvestre, SEQ ID NO: 1).

101 Val, Ala, Asn, Asp, Glu, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr, Met, His, Cys, Pro, Phe, Trp, Ile, Leu

102 Ser\*, Gly, Asp, Tyr, Thr, Asn, Glu, Ala, Val, Gln, His, Met, Cys, Pro, Phe, Trp, Ile, Leu

103 Ala, Val, Asp, Asn, Glu, Gln, Gly, Ser, Thr, Tyr, Met, His, Cys, Pro, Phe, Trp, Ile, Leu

104 Arg\*, Lys

Los aminoácidos Cys, Pro, Phe, Trp, Ile y Leu son sustituciones menos preferidas en las posiciones 101, 102 y 103.

Tabla 2B. Aminoácidos más preferidos en las posiciones 101-104 de proNGF de tipo silvestre

101 Val, Ala, Gly, Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, Gln, Tyr, Met, His

102 Ser\*, Val, Ala, Gly, Thr, Asn, Asp, Glu, Gln, Tyr, Met, His

103 Ala, Val, Gly, Ser, Thr, Asn, Asp, Glu, Gln, Tyr, Met, His

104 Arg\*, Lys

5 Es esencial que puede haber cualquier aminoácido pero no Arg o Lys en las posiciones 101, 102 y 103 de la muteína de proNGF y que hay un aminoácido básico (Arg o Lys) en la posición 104 de la muteína de proNGF. Se ha observado sorprendentemente que las sustituciones de específicamente dos aminoácidos en las posiciones 101 y 103, dan lugar a eficacias elevadas de la producción de beta-NGF.

10 En la secuencia del mutante de proNGF más preferido de la invención (SEQ ID NO: 5), el aminoácido sustituido preferido en la posición 101 de proNGF humano de tipo silvestre es valina, en la posición 103 de proNGF humano de tipo silvestre es alanina, en la posición 102 de proNGF humano de tipo silvestre es serina y en la posición 104 de proNGF humano de tipo silvestre es arginina. En una realización particularmente preferida de la invención, el mutante de proNGF de la invención presente tiene una secuencia correspondiente a la de SEQ ID NO: 5.

La presente invención también se dirige a ácidos nucleicos que codifican los mutantes de proNGF descritos en este documento.

*Método de preparación de un beta-NGF humano a partir de un mutante de proNGF de la invención*

15 En un segundo aspecto, la presente invención se dirige a un método para preparar un beta-NGF humano biológicamente activo a partir de un mutante de proNGF inactivo insoluble, sustituido en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> (SEQ ID NO: 9) en las posiciones 101 y 103 (R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup>) de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1), que comprende proporcionar un mutante de proNGF sustituido en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones 101 y 103 (R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup>) de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre, y escindir el mutante de proNGF con el fin de obtener beta-NGF humano activo.

20 Preferiblemente, el mutante de proNGF se obtiene mediante expresión recombinante en células procariotas. Cepas bacterianas adecuadas son bien conocidas en la técnica, por ejemplo, *E. coli*, *Bacillus sp.* y *Salmonella*, y kits para tales sistemas de expresión están disponibles comercialmente. Las células hospedadoras preferidas para la expresión recombinante son *E. coli*, por ejemplo, *E. coli* BL21, JM 108/109 (K12), JM106, JM83 y TB1 o derivados de las mismas. Se podría emplear cualquier otra cepa de *E. coli* adecuada para la expresión de proteínas recombinantes.

30 Los polinucleótidos están ligados funcionalmente a secuencias de control de la expresión que permiten una expresión de las proteínas de fusión de la invención en células hospedadoras procariotas. Tales secuencias de control de la expresión incluyen, pero no se limitan a promotores, operadores, represores inducibles y no inducibles y otros elementos que son conocidos por los expertos en la técnica y que dirigen o regulan de otra manera la expresión génica. Tales elementos reguladores incluyen, por ejemplo, promotores T7, TAC, PBAD, LAC, represores LacI, LacI<sup>Q</sup>.

35 La secuencia del mutante de proNGF se introduce en la célula hospedadora procariota mediante un vector adecuado. Los vectores adecuados pueden ser, por ejemplo, pero no limitados a: pBR322, pMAL, pUC19 y todos los derivados. La célula hospedadora procariota incluye pero no se limita a células procariotas tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* o *B. subtilis*), que se pueden transformar, por ejemplo, con ADN plasmídico, ADN de bacteriófago recombinante o vectores de expresión de ADN de cósmido que contienen las moléculas de polinucleótido de la invención. En una realización de la invención, se emplean vectores plasmídicos. Por ejemplo, pero sin estar limitados de ninguna manera a los mismos, se pueden emplear vectores de plásmidos descritos en el documento EP1697523B1 (que se incorpora como referencia en este documento).

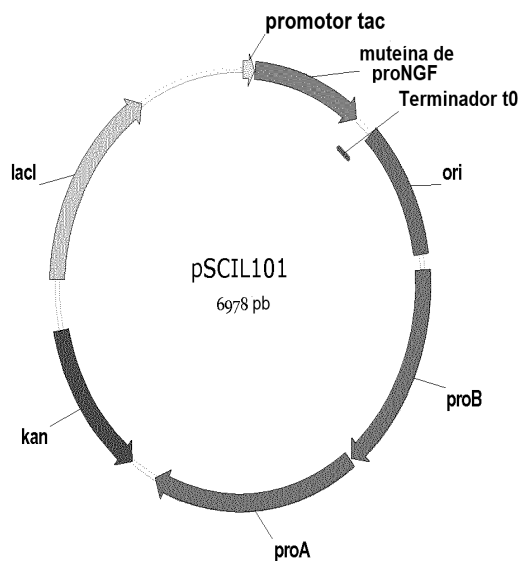
40 Con el fin de expresar las muteínas de proNGF, se emplea un vector de expresión que contiene

- a. un promotor fuerte para dirigir la transcripción (por ejemplo, un promotor tac o T7),
- b. una secuencia que codifica proNGF o una muteína de proNGF
- c. un terminador de la transcripción/traducción (por ejemplo, terminador t0 del bacteriófago lambda)

- d. un primer gen marcador seleccionable, por ejemplo, un gen que codifica resistencia a antibióticos (por ejemplo, resistencia a kanamicina, kan),
- e. un segundo gen marcador seleccionable, por ejemplo, un gen que codifica proB y/o proA.
- f. un gen represor (por ejemplo, un gen lacI)
- 5 g. un origen de replicación con número elevado de copias

En una realización de la invención, los vectores de expresión patentados (Scil Proteins GmbH, véase el documento EP1697523B1 para la estructura de un vector de expresión adecuado) o vectores comercialmente disponibles, se pueden usar para la clonación. Con respecto a la información general sobre los vectores que se podrían utilizar en el método de la presente invención, se hace referencia a los detalles mencionados anteriormente. Sin embargo, se puede emplear cualquier vector adecuado, tal y como se conoce en la técnica.

La estructura del vector de expresión patentado pSCIL101 a modo de ejemplo para un vector adecuado para la transformación de células hospedadoras procariotas, se representa a continuación:



El método de preparación de un mutante de proNGF comprende las siguientes etapas iniciales:

- 15 i. preparación de un ácido nucleico que codifica una muteína de proNGF
- ii. introducir dicho ácido nucleico en un vector de expresión procariota;
- iii. introducir dicho vector de expresión en una célula hospedadora;
- iv. cultivar la célula hospedadora;
- v. someter la célula hospedadora a condiciones de cultivo adecuadas.

Debido a su expresión en células hospedadoras procariotas, la muteína de proNGF está en forma de su forma inactiva, insoluble.

En una realización preferida, el método de producción de beta-NGF a partir de un mutante de proNGF de acuerdo con la presente invención, comprende las etapas de:

- 25 a. disolver el mutante de proNGF sustituido en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup> correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF de tipo silvestre humana (SEQ ID NO: 1) mediante solubilización de cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante;
- b. transferir el mutante de proNGF a una solución de renaturalización, en donde el proNGF desnaturalizado asume una conformación biológicamente activa;
- c. purificar el mutante de proNGF desde la solución de renaturalización;
- 30 d. escindir la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.



A continuación, se describen las etapas preferidas de un método para producir beta-NGF a partir de un mutante de proNGF de acuerdo con la presente invención.

*Etapas a: Solubilización de un mutante de proNGF*

5 La etapa a) se corresponde con la disolución del mutante de proNGF sustituido en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup> correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) mediante la solubilización de cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante. Se observa que el mutante de proNGF de la invención en la etapa a) por lo general se encuentra en la forma de su forma inactiva, insoluble debido a su expresión en células hospedadoras procariontas. El proNGF inactivo que muestra una solubilidad deficiente se forma durante la sobreexpresión de la proteína en el citosol de los procariontas. En ese caso, el proNGF preparado mediante recombinación permanece en el citoplasma en forma insoluble y agregada. Estos agregados proteicos, su aislamiento, así como su purificación, se describen, por ejemplo, en Marston, F. A., *Biochem. J.* 240 (1986).

15 Para aislar estos agregados proteicos inactivos (cuerpos de inclusión), las células procariontas se destruyen después de la fermentación. La destrucción celular puede llevarse a cabo por métodos convencionales, por ejemplo, por medio de una homogeneización a alta presión, tratamiento con ultrasonidos o lisozimas (Rudolph, R., et al. (1997); *Folding proteins*. En: Creighton, T. E. (compilador): *Protein Function: A Practical Approach*. Oxford University Press, p. 57-99).

20 Además, los cuerpos de inclusión se solubilizan. Los cuerpos de inclusión (IB) son acumulaciones de proteínas por lo general defectuosas o plegadas de forma incompleta. Se forman dentro de las células, por ejemplo, células bacterianas, tales como *E. coli*, en el caso de una expresión excesiva de proteínas recombinantes. Los cuerpos de inclusión empleados según la invención comprenden preferiblemente la muteína de proNGF. Esto significa que contienen al menos 60, al menos 70, al menos 80 o al menos 90% en peso de pro-NGF (basado en la cantidad total de proteína).

25 La invención proporciona un método para la producción de muteína de proNGF, en donde los cuerpos de inclusión los cuales son una muteína de proNGF no plegada, inactiva, insoluble o un derivado de la misma, se solubilizan en un tampón de desnaturalización (solución).

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

30 El tampón de desnaturalización comprende al menos una sustancia caotrópica (agente). Las sustancias químicas que disuelven enlaces de puentes de hidrógeno ordenados en el agua se llaman caotrópicas. Puesto que los enlaces de puentes de hidrógeno se rompen, las sustancias caotrópicas interfieren con la estructura del agua y aseguran el desorden (aumento de la entropía). La razón de esto es que se evita la formación de estructuras de jaula de H<sub>2</sub>O necesarias para la solvatación. En el caso de aminoácidos, estos reducen los efectos hidrófobos y tienen una acción desnaturalizante sobre las proteínas, ya que una fuerza motora para el plegamiento de proteínas es ensamblar aminoácidos hidrófobos entre sí en el agua. En general, cualquier sustancia que ejerce el efecto hidrófobo en el tampón de solubilización y que, por lo tanto, tiene una acción desnaturalizante sobre las proteínas, se puede emplear como una sustancia caotrópica. Las sustancias caotrópicas son en general sales o compuestos de bajo peso molecular, tales como urea. Las sustancias caotrópicas se distinguen claramente de los detergentes, ya que no contienen ningún radical hidrófobo, tal como un radical alquilo, en la molécula. En general, la acción caotrópica está acompañada por una mejora de la solubilidad de la proteína, en este caso la pretrombina.

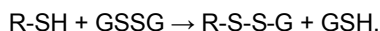
En una realización preferida de la invención, el compuesto caotrópico se selecciona a partir de sales de guanidinio, en particular clorhidrato de guanidinio y tiocianato de guanidinio, yoduros, sales de bario, tiocianatos, urea y percloratos.

45 Los compuestos caotrópicos se emplean en cantidades convencionales. Por ejemplo, se puede emplear clorhidrato de guanidinio 4 - 8 M o urea 4 - 9 M.

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

55 En una realización preferida de la invención, el compuesto de disulfuro es disulfuro de glutatión. El glutatión (GSH), también  $\gamma$ -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 procariontas como de eucariotas, y está implicado en la formación de puentes disulfuro. Está en equilibrio con el dímero GSSG que contiene un puente disulfuro. El glutatión reacciona con cisteínas R-SH y R'-SH procedentes de dos polipéptidos o de un solo polipéptido en

una reacción de intercambio de disulfuro:



RSSG se denomina a un disulfuro mixto. Se hace reaccionar con una cisteína adicional de un polipéptido, de modo que como resultado se obtiene un puente 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 descritas más arriba. El GSSG se emplea, por ejemplo, en una concentración desde 10 mM hasta 0,5 M.

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

En una realización preferida de la invención, la solución de desnaturalización es un tampón Tris.

15 La solución de desnaturalización puede comprender además aditivos convencionales, por ejemplo, EDTA o sales. El pH del tampón de solubilización está, por ejemplo, entre 7 y 10, preferiblemente es un pH 8. La solubilización es ayudada preferiblemente por medios mecánicos, por ejemplo, con aparatos de homogeneización convencionales o por medio de ultrasonidos. Después de la solubilización, los sólidos que permanecen se separan preferiblemente. El material sobrenadante comprende el pro-NGF solubilizado.

En una realización de la invención, la solución desnaturalizante comprende

- 20
- i. Guanidinio-HCl, 1 - 8 M, preferentemente 4-6 M, lo más preferiblemente 4 M, GSH o cisteína 1 - 100 mM, preferiblemente 5 mM
  - ii. Tris 0,01 - 1 M, preferiblemente 0,1 M,
  - iii. EDTA 1 - 50 mM, preferiblemente 10 mM
  - iv. pH 7,0 - 10,0, preferiblemente pH 8,0

25 Una concentración de guanidinio-HCl 4 M es en la mayoría de los casos suficiente para una desnaturalización completa de la proteína de proNGF.

*Etapas b: Renaturalización del mutante de proNGF*

30 Después de la solubilización del mutante de proNGF desde los cuerpos de inclusión, es necesario renaturalizar la proteína en su conformación natural. Para el proceso de renaturalización es importante minimizar las reacciones competitivas de plegamiento erróneo y agregación. Para evitar la agregación, la renaturalización se lleva a cabo a concentraciones muy bajas de proteína porque la agregación de la proteína es predominante a concentraciones elevadas de proteína. En la etapa b), la transferencia del mutante de proNGF a un tampón de renaturalización se produce cuando el proNGF desnaturalizado adopta una conformación biológicamente activa. Una conformación biológicamente activa se puede determinar por la presencia de puentes disulfuro que se producen en beta-NGF natural.

35 En una realización preferida de la invención, el mutante de proNGF solubilizado se renaturaliza en una solución de renaturalización que contiene al menos una chaperona, al menos un agente quelante de metales y un sistema de barajado redox.

En una realización preferida, el método de acuerdo con la presente invención utiliza una solución de renaturalización en la etapa b) que comprende

- 40
- i. una chaperona, preferentemente arginina, 0,5-1,0 M, preferiblemente 0,75 M,
  - ii. un agente quelante de metales, preferiblemente EDTA, 1-10 mM, preferiblemente 5 mM,
  - iii. un sistema de barajado redox, a 0,1-10 mM, preferiblemente L-cistina 1 mM y L-cisteína 5 mM, o GSSG 1 mM (glutatión oxidado) y GSH 5 mM (glutatión reducido).
  - iv. pH 8,0 - pH 11,0, preferiblemente pH 9,5

45 Los sistemas de barajado redox alternativos tales como cistamina/cisteamina se podrían utilizar.

En una realización preferida de la invención, el agente auxiliar del plegamiento es arginina. Los compuestos que favorecen el plegamiento de proteínas, en general se pueden emplear como "agentes auxiliares del plegamiento".

Tales compuestos son conocidos por una persona experta en la técnica. Pueden ayudar al plegamiento de varias maneras. Se supone que la arginina desestabiliza productos intermedios plegados incorrectamente, de modo que estos, al menos parcialmente, están de nuevo desnaturalizados (desde un extremo termodinámicamente inactivo) y por lo tanto pueden ser plegados de nuevo correctamente. Por otro lado, el glicerol estabiliza usualmente a las pro-

5 teínas. Unos compuestos que aumentan el rendimiento absoluto de una muteína de proNGF plegada en el método de acuerdo con la invención, 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.

La renaturalización se lleva a cabo preferiblemente a un pH de entre 8 y 11, en particular pH 9,5.

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

15 En una realización preferida de la invención, el material solubilizado se añade al lote de plegamiento en varias fracciones o continuamente, durante varios días. Preferiblemente, el material solubilizado se añade 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 se ajusta de una manera tal que, después de la adición del lote de solubilización, la concentración de proteína que todavía no ha sido plegada no es demasiado alta, puesto que en caso contrario se obtienen unos agregados. Por ejemplo, con cada impulso se transfieren de nuevas al lote de plegamiento de

20 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 el lote de plegamiento después de la adición del material solubilizado). Por ejemplo cada etapa de renaturalización dura por lo menos 1-2 h.

25 Después de la renaturalización, la reacción de renaturalización se tiene que clarificar antes de cargarla sobre una columna. Esto puede hacerse por cualesquiera métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, por filtración.

En una realización preferida, el método para producir un mutante de proNGF correctamente plegado incluye las etapas siguientes: a) los cuerpos de inclusión que comprenden el mutante de proNGF insoluble se solubilizan en una solución desnaturalizante como se ha descrito anteriormente, y b) el pro-NGF solubilizado se renaturaliza a continuación en un tampón de solución de renaturalización como se ha descrito anteriormente.

30 En una realización preferida de la invención, la solución desnaturalizante y/o la solución de renaturalización, por consiguiente, no contienen detergentes. Se ha encontrado que el uso de detergentes no es necesario para la solubilización y/o el plegamiento de la muteína de pro-NGF. 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 eliminar de una manera costosa.

35 El método de acuerdo con la invención es por lo tanto ventajoso en comparación con el método de Soejima et al., 2001, en el que tales detergentes agresivos (Triton X-100 o Brij-58) se emplean para el plegamiento de la proteína. En otras palabras, no se emplean detergentes en todo el método de producción de acuerdo con la invención, y por lo tanto el método de producción está exento de detergentes

#### *Etapas c: Purificación del mutante de proNGF mediante cromatografía*

40 Llevando a cabo el método de acuerdo con la invención con la desnaturalización y la subsiguiente renaturalización, se obtiene una solución acuosa de una muteína de proNGF plegada. La muteína de proNGF plegada se puede purificar subsiguientemente de forma adicional mediante unos métodos conocidos.

45 En una realización preferida, el mutante de proNGF se purifica a partir de la solución de renaturalización (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 de la invención). La columna más preferida para la cromatografía es una columna con un ligando por afinidad sintético, de manera preferible 4-mercapto-etil-piridina (MEP Hypercell; Pall). Las ventajas de este medio consisten en que la unión 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

50 del pH.

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 (Pall; en donde el ligando de afinidad es 4-mercapto etil piridina), HEA (Pall; en donde el ligando de afinidad es hexilamino), PPA (Pall, en donde el ligando de afinidad: es fenilpropilamino), MBI (Pall; en donde el ligando de afinidad es 2-mercapto-5-bencimidazol en ácido sulfúrico), Capto MMC (GEHC), Capto adhere (GEHC; en donde el ligando de afinidad es N-bencil-N-metil etanolamina), CHT hidroxapatito (BioRad) y CHT fluoroapatito). Las columnas con MEP, HEA, PPA y MBI tienen una unión 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 componentes hidrófobos. Cualquier otra columna con un material de modalidad mixta, que aquí no se haya enumerado, se podría usar también para purificar el mutante de proNGF.

*Etapa d: Escisión de proNGF a beta-NGF*

5 El proNGF es el precursor del beta-NGF. Por lo tanto en la etapa d) del método de producción de un beta-NGF a partir de un mutante de proNGF de la invención, la pro-secuencia del mutante de proNGF se escinde con el fin de obtener un beta-NGF activo.

10 Las proteasas que tienen un sustrato similar a la tripsina escinden con especificidad la proteína sin digerir la porción activa de la molécula de proteína. Las proteasas similares a tripsina escinden los enlaces peptídicos a continuación de un aminoácido cargado positivamente, tal como arginina o lisina. Igual que las proteasas similares a tripsina, varias proteasas de serina (endopeptidasas de serina) se toman en consideración para que el procesamiento del proNGF dé como resultado beta-NGF. De manera preferible, la proteasa de serina tripsina se emplea para la escisión de la pro-secuencia, pero se podrían usar otras proteasas en su lugar.

15 Se hace observar que la escisión no está restringida a la efectuada con tripsina propiamente dicha, sino que puede implicar otras proteasas que tienen sustratos que son similares a la tripsina. Generalmente, si la relación del proNGF a la tripsina (o a otra proteasa) se ajusta de una manera apropiada, el beta-NGF maduro, correctamente plegado, no se escindirá con esta proteasa. Por el contrario, unas proteínas desnaturizadas así como unos compuestos intermedios de plegamiento dejan expuestas secuencias que son susceptibles a un ataque por la proteasa.

20 De manera preferible para la escisión de un mutante de proNGF para proporcionar un beta-NGF, la relación de 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 en peso, y es sumamente preferida una relación de 1 : 10.000 (p/p). En una realización sumamente preferida, la escisión se realiza durante 8-23 horas a temperatura ambiente, de modo sumamente preferido durante 18 horas. En las condiciones que se usan en esta invención, el mutante de proNGF se escinde completamente y casi no se forman productos secundarios. No se observó ninguna agregación.

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

30 Detalladamente, 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 de la invención (SEQ ID NO: 5) da como resultado un beta-NGF humano recombinante de una pureza muy alta, con un alto rendimiento de escisión (aproximadamente del 85%). Por lo demás, el proNGF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) con la misma relación de tripsina a proteína muestra un rendimiento bajo de la escisión (aproximadamente del 5%). Un rendimiento satisfactorio se obtiene solamente con unas relaciones entre tripsina/proteína mucho más altas (1/250), pero esto está acompañado por una selectividad baja y una degradación elevada de los productos debido a una digestión excesiva.

*Etapa e: Purificación adicional de beta-NGF*

40 El beta-NGF producido a partir de un mutante de proNGF de la invención se purifica adicionalmente, por ejemplo, por diversos métodos cromatográficos. Se requieren unas etapas adicionales de purificación para separar la tripsina y las impurezas relacionadas con el producto de la digestión con tripsina a partir del beta-NGF. Las etapas de purificación deberían reducir los HCPs, las endotoxinas y el ADN. Se pueden usar cualesquiera métodos conocidos en la técnica de purificación de proteínas. Son sumamente preferidas las purificaciones mediante cromatografía, por ejemplo, con columnas de Sefarosa (p. ej. SP Sefarosa HP, Q Sefarosa FF).

45 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 SDS-PAGE, rp-HPLC, SE-HPLC y IEX-HPLC. Unos análisis por HPLC revelaron una pureza del beta-NGF de al menos un 97%.

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

- a) expresión de un mutante de proNGF recombinante con un sitio de escisión de la proteasa sustituido en células procariontas
- 50 b) aislamiento de los cuerpos de inclusión que contienen muteína de proNGF,
- c) mezclar los cuerpos de inclusión con un tampón de desnaturización apropiado que comprende por lo menos (i) una sustancia caotrópica, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón y (iv) un agente de reducción
- d) renaturalizar en una solución de renaturalización que comprende por lo menos una chaperona, un agente quelante de metales y una solución de barajado redox,

- e) purificar el mutante de proNGF renaturalizado,
- f) escindir en la forma activa del beta-NGF con unas proteasas tales como la tripsina,
- g) aislar y purificar el beta-NGF.

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

- 5 En un tercer aspecto, la invención está dirigida a la utilización del mutante de proNGF de la presente invención para producir beta-NGF humano.

*Composición farmacéutica de beta-NGF obtenido a partir de mutantes de proNGF de la invención*

- 10 En un aspecto adicional, la invención está dirigida a una composición farmacéutica que comprende betaNGF obtenido a partir de un mutante de proNGF que está sustituido en el sitio de escisión natural de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>2</sup>R<sup>4</sup> en las posiciones 101 y 103 (K<sup>3</sup> y R<sup>1</sup>) de la secuencia de tipo silvestre de proNGF humano (SEQ ID NO: 1), como se ha descrito anteriormente y a un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En una realización de la invención, el beta-NGF farmacéuticamente activo se administra al paciente por métodos de terapia génica. En la terapia génica hay dos métodos básicos disponibles, adecuados para la introducción de un gen, en el presente caso un gen que codifica un beta-NGF, en el paciente.

- 15 En la aplicación *ex vivo*, el gen farmacéuticamente activo que codifica beta-NGF se introduce en una célula del cuerpo a través de un vector, en donde la célula del cuerpo es preferiblemente una célula glial, y la célula tratada de esta manera, a continuación, se vuelve a introducir en el paciente, por ejemplo, mediante micropartículas o nanopartículas. Se prefiere particularmente una integración específica del gen de beta-NGF en el genoma celular.

- 20 En la terapia génica *in vivo*, el gen de beta-NGF es transportado a las células diana en el cuerpo por los vectores, por ejemplo, por medio de virus, que por un lado puedan infectar la célula diana y, de este modo, ser capaces de introducir el gen de beta-NGF farmacéuticamente activo pero, por otro lado, no son capaces de reproducirse a sí mismos dentro de la célula diana. En este enfoque, las nanopartículas o micropartículas, por ejemplo liposomas, que se pueden fusionar con la membrana celular, también se pueden utilizar como vectores.

- 25 Como vector para el gen de beta-NGF, se puede emplear un virus o un anticuerpo a modo de ejemplo, que sea capaz de infectar específicamente la célula hospedadora o de inmunorreactar con un antígeno en la célula diana. Como vehículo vírico se pueden emplear retrovirus a modo de ejemplo. Además, es posible utilizar adenovirus o vectores basados en el virus Vaccinia, por ejemplo, virus vaccinia modificado de Ankara (MVA).

- 30 La persona experta será capaz de seleccionar una formulación adecuada sobre la base de consideraciones de rutina y elegirá una forma adecuada para la administración de la presente composición farmacéutica a un paciente. Por ejemplo, la composición farmacéutica puede comprender uno o varios ingredientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, vehículos o diluyentes. Entre estas clases de sustancias, se podrían nombrar cargas, sales, tampones, estabilizadores, potenciadores de la penetración y otros materiales bien conocidos. Las técnicas para la formulación de composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden encontrar en libros de texto estándar bien conocidos, tales como "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Co., Easton, PA, última edición.

- 35 La dosificación del betaNGF obtenido por el método de producción, tal y como se describe en la presente invención puede estar en un intervalo de 0,1 µg/kg a 500 µg/kg de peso corporal, si se administra mediante infusión, y de 2 µg/kg a 2 mg/kg de peso corporal si se administra mediante inyección.

**Breve descripción de los dibujos**

La Figura 1 muestra la secuencia de pro-NGF y de los mutantes de pro-NGF de la invención.

- 40 En negrita se muestra la secuencia de la proforma de beta-NGF humano. El sitio de escisión de la proteasa (tripsina) se muestra en negrita y subrayado (aminoácidos 101-104 de SEQ ID NO: 1; los sitios de escisión con tripsina están situados entre los aminoácidos 101-102 (R<sup>1</sup>), 103-104 (K<sup>3</sup>) y 104 -105 (R<sup>4</sup>)). X en la secuencia puede ser cualquier aminoácido.

- 45 La Figura 1a muestra una secuencia de proNGF humano (SEQ ID NO: 1) con un sitio de escisión de la proteasa RSKR (SEQ ID NO: 9).

La Figura 1b muestra una secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 2) con el sitio de escisión de la proteasa VSXR (SEQ ID NO: 10).

La Figura 1c muestra una secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 3) con el sitio de escisión de la proteasa mutado a XSXR (SEQ ID NO: 11).

- 50 La Figura 1d muestra una secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 4) con el sitio de esci-

si3n de la proteasa mutado a XSAR (SEQ ID NO: 12).

La Figura 1e muestra una secuencia de un mutante de proNGF de la invenci3n (SEQ ID NO: 5) con el sitio de escisi3n de la proteasa mutado a VSAR (SEQ ID NO: 13).

5 La Figura 1f muestra una secuencia de un mutante de proNGF de la invenci3n (SEQ ID NO: 7) con el sitio de escisi3n de la proteasa mutado a XXXR (SEQ ID NO: 14).

La Figura 1g muestra una secuencia de un mutante de proNGF de la invenci3n (SEQ ID NO: 8) con el sitio de escisi3n de la proteasa mutado a VXAR (SEQ ID NO: 15).

La Figura 1h muestra secuencias de sitios de escisi3n de la proteasa (SEQ ID NOs: 6, 9-15).

Figura 2. Procesamiento de proNGF o mutantes de proNGF a beta-NGF.

10 La Figura 2a muestra seis productos de escisi3n de beta NGF despu3s de una escisi3n con tripsina utilizando el proNGF de *tipo silvestre* que tiene un sitio de escisi3n de furina natural, RSKR. El dibujo muestra claramente que una escisi3n de proNGF de tipo silvestre a betaNGF da lugar a una mezcla no homog3nea de muchos productos de escisi3n diferentes.

15 La Figura 2b muestra productos de escisi3n de beta NGF natural despu3s de una escisi3n con tripsina usando un mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) con delecci3n del sitio de escisi3n de furina natural. El sitio de escisi3n de la proteasa RSKR (SEQ ID NO: 9) ha sido sustituido por dos amino3cidos para dar como resultado un sitio VSAR (SEQ ID NO: 12). Este sitio solo se puede escindir con una proteasa despu3s del amino3cido arginina en la posici3n 104; la tripsina solo puede cortar en un sitio de escisi3n (en lugar de tres). El dibujo muestra claramente que una escisi3n del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) a beta-NGF da lugar a solo un producto de escisi3n homog3neo (beta-NGF).

20 La Figura 3 muestra la renaturalizaci3n del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5) en comparaci3n con proNGF de tipo silvestre. La figura compara el rendimiento de la renaturalizaci3n de proNGF de tipo silvestre (l3nea continua) y el mutante de proNGF (l3nea discontinua) con el sitio de escisi3n de la proteasa mutado a VSAR. Se puede observar claramente en la figura que la eficacia de la renaturalizaci3n de proNGF de tipo silvestre y mutante es id3ntica.

La Figura 4 muestra la purificaci3n de un mutante de proNGF SP174-101 con el sitio de escisi3n de la proteasa mutado a VSAR (SEQ ID NO: 5) a trav3s de una columna con MEP HyperCel. La figura muestra un perfil de eluci3n de la purificaci3n con MEP HyperCel de un mutante de proNGF renaturalizado y filtrado.

30 La Figura 5 muestra la escisi3n de un mutante de proNGF SP174-101 con el sitio de escisi3n de la proteasa mutado a VSAR (SEQ ID NO: 5) mediante tripsina. La figura muestra un gel de SDS-PAGE te3ido con Coomassie de las fracciones de la escisi3n con tripsina. El producto de la escisi3n con tripsina del mutante de proNGF se puede observar en las pistas 4-7. Las figuras muestran claramente que el mutante de proNGF purificado da como resultado un 3nico producto de escisi3n (beta-NGF).

35 La Figura 6 muestra la purificaci3n de beta-NGF. La figura muestra un perfil de una columna de SP Sefarosa HP despu3s de la escisi3n con tripsina. La reacci3n de la digesti3n con tripsina se carg3 en una columna de SP Sefarosa HP. La eluci3n se realiz3 en tres etapas (a. 25% de fosfato de sodio 25 mM, NaCl 1 M, pH 6,5 (tamp3n B), b. en un gradiente lineal de 25-50% de tamp3n B, y c. 100% de tamp3n B (caudal de 60 cm/h)).

### Ejemplos

40 Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la t3cnica una divulgaci3n y una descripci3n completas de c3mo preparar y usar los m3todos y composiciones de la invenci3n, y no se pretende limitar el alcance de lo que los autores de la invenci3n consideran como su invenci3n. Se han hecho esfuerzos para asegurar la exactitud con respecto a los valores num3ricos usados pero se deber3an tener en cuenta algunos errores experimentales y algunas desviaciones. A menos que se indique otra cosa distinta, el peso molecular es un peso molecular promedio, la temperatura est3 en grados cent3grados y la presi3n es la atmosf3rica o est3 pr3xima a ella.

Ejemplo 1. Sustituci3n de proNGF de tipo silvestre en el sitio de escisi3n de la proteasa en las posiciones 101 a 104 ( $R^1SK^3R^4$ )

50 La sustituci3n de arginina  $R^1$  y lisina  $K^3$  que se corresponden con las posiciones 101 y 103 de pro-NGF humano (SEQ ID NO: 1) se realiz3 a nivel de ADN usando un gen sintetizado por m3todos tales como los conocidos por alguien experto en la t3cnica. La serina en la posici3n 102 permaneci3 sin cambios o se realiz3 tambi3n una sustituci3n en la posici3n 102 de pro-NGF humano (SEQ ID NO: 1) a nivel de ADN, usando un gen sintetizado por m3todos tales como los conocidos por un experto en la t3cnica. La lisina  $K^4$  correspondiente a la posici3n 104 no se sustituy3. Las secuencias se muestran en la Figura. 1

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

El hospedador bacteriano *E. coli* JM108 utilizado para la expresión de *rh*-proNGF (DSMZ 5585; *F thi Δ (lac-proAB) end Al gyrA96 relA1 phx hsdR17 supE44 recA*) es auxótrofo para prolina, el cual se neutralizó mediante el uso del plásmido con la designación pSCIL101. El plásmido pSCIL101 se basa en el plásmido pSCIL008 (véase el documento WO05061716). La cepa no puede sintetizar tiamina (Vieira y Messing, 1982 Gene. Oct; 19(3): 259-68). El mutante de pro-NGF que se muestra en SEQ ID NO: 5 se expresa bajo el control del promotor *tac* localizado sobre pSCIL101. El vector pSCIL101 usado en esta memoria es un plásmido con un *número elevado de copias* con resistencia a la kanamicina. La expresión se lleva a cabo en un medio de sales minerales definido y se induce por la adición de IPTG. El mutante de pro-NGF se deposita en el citosol en forma de cuerpos de inclusión (IBs).

10 *Línea celular:*

- cepa hospedadora, por ejemplo, *E. coli* HMS174 (K12) o JM108 (K12)
- mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5)
- promotor *tac* (inducción con IPTG)
- replicón ColE1
- 15 ▪ resistencia a la kanamicina
- selección con proBA
- sistema de vector patentado pSCIL 101 (por ejemplo, véase el documento WO05/061716)

Ejemplo 3. Fermentación

El objetivo de esta fermentación era obtener el producto y la biomasa para las etapas subsiguientes del proceso. Para controlar la sobreexpresión de la proteína diana durante el proceso de fermentación, las muestras se analizaron por medio de SDS-PAGE antes y después de la inducción.

- 20 ▪ Medio de sales minerales sin antibióticos
- Fase discontinua  $\mu \approx 0,25 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{DO}_{\text{final}} = 18$ )
- Fase I de alimentación discontinua con alimentación exponencial con  $\mu_{\text{set}} = 0,18 \text{ h}^{-1}$
- 25 ▪ Fase II de alimentación discontinua II: tasa de alimentación constante
- Punto de inducción  $\text{DO}_{\text{ind}} = 60 \pm 5$
- IPTG 1,0 mM
- Tiempo de inducción 5 h
- DO final =  $82 \pm 4$
- 30 ▪ Tiempo del proceso de  $28,5 \text{ h} \pm 1,25$
- 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 SP174-101

En las células bacterianas, la proteína recombinante está presente en forma de agregados. La expresión de la proteína de pro-NGF se llevó a cabo en forma de *IBs*. La ruptura celular y la preparación de los *IBs* se llevaron a cabo de conformidad con protocolos estándar y se pueden efectuar a escala de laboratorio hasta realizar un tratamiento de aproximadamente 200 g de la biomasa. La preparación de estos "cuerpos de inclusión" que contienen la proteína de proNGF se realizó según Rudolph, R., et al. (1987); Folding proteins. En: Creighton, T. E. (compilador): Protein Function: A Practical Approach. Oxford University Press, p. 57-99, y según el documento EP0994188B1. Para la ruptura celular, los sedimentos celulares se resuspendieron en un tampón adecuado y, posteriormente, se rompieron las células mediante homogeneización a presión elevada en fosfato de sodio 50 mM 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 se solubilizaron en una solución desnaturalizante que comprendía una solución de (i) un agente caotrópico, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón y (iv) un agente reductor. Para la solubilización, se sometió

45

a ensayo guanidinio HCl (GuaHCl) en un intervalo de concentración de 4,0-6,0 M. El tampón de solubilización se mezcló en diferentes proporciones 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 temperatura ambiente. Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE (datos no mostrados). Los experimentos revelaron que una concentración de GuaHCl 4 M era suficiente para una solubilización completa de los cuerpos de inclusión. La relación entre los cuerpos de inclusión-suspensión y el tampón es de 1 + 1,25 (v/v) (suspensión de IB: tampón). Las condiciones finales de la solución de desnaturalización para la solubilización de los cuerpos de inclusión eran:

i. Guanidinio HCl 4 M,

ii. Tris 0,1 M,

iii. EDTA 10 mM

iv. Cisteína 5 mM

v. pH 8,0

El material solubilizado se clarifica mediante filtración en profundidad de acuerdo con procedimientos convencionales.

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

Ejemplo 6. Transferencia del mutante de proNGF SP174-101 a un tampón de renaturalización en el que el proNGF desnaturalizado asume una conformación biológicamente activa

Después de la solubilización es necesario volver a plegar la proteína en su conformación natural y de este modo minimizar un plegamiento erróneo y la agregación. Para preparar muteína de proNGF biológicamente activa de acuerdo con la invención a partir de materiales solubilizados, éstos se diluyeron en una solución de renaturalización en la que proNGF asume una conformación biológicamente activa.

La solución final de renaturalización para el material solubilizado basado en una suspensión de IBs comprendía

i. Arginina 0,75 M

ii. EDTA 5 mM

iii. L-cistina 1 mM y L-cisteína 5 mM

iv. pH 9,5

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

Para aumentar la concentración de proteína en el proceso de renaturalización, se llevó a cabo una renaturalización por impulsos. Un impulso se emitió cada hora por 50 µg/ml de proteína de mutante de proNGF. La concentración de guanidinio-HCl en la solución no debía exceder 0,3 M. Con el fin de lograr esto, fueron necesarios 15 impulsos. La fracción renaturalizada clarificada se filtró antes de cargarla a otras columnas.

El rendimiento de la reacción de renaturalización se analizó después de cada impulso mediante rp-HPLC. El área del pico resultante fue sometida a una transferencia de manchas frente al número de impulsos. Para la rp-HPLC se empleó una columna de fase inversa (por ejemplo, 214MS54, 4,6 x 250 mm; 300 Å, 5 µm, Vydac) con columna de protección (por ejemplo, 214GK54; 300 Å; Vydac). Los tampones de migración eran H<sub>2</sub>O con 0,05% de ácido trifluoroacético (TFA) y acetonitrilo con 0,05% de TFA. El caudal era de 1 ml/min. Los resultados se muestran en la Figura 3. Se puede observar a partir de la Figura 3 que las eficacias de la renaturalización del proNGF de tipo silvestre y mutante son idénticas.

Ejemplo 7. Purificación del mutante de proNGF SP174-101 a partir de la solución de renaturalización a través 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 desplazando el valor de pH. Además, la elución se llevó a cabo con una baja concentración de sal que era beneficiosa para un diseño eficaz del procedimiento.

La columna se equilibró con arginina 0,75 M, EDTA 5 mM, pH 9,5. La reacción de renaturalización clarificada se cargó sobre la columna con MEP HyperCel (Pall) con una capacidad de carga máxima de 5 g de mutante de proNGF por L de medio de columna. En la etapa de lavado, la mayoría de las impurezas y la proteína no unida se redujeron mediante el uso de tampón GuaHCl 2 M, Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0 y Tris-HCl 10 mM, pH 8,0. La elución se realizó en un gradiente lineal de 0-70% de acetato 50 mM, pH 4,0 (caudal de 120 cm/h). La Figura 4 muestra un



perfil de elución de la purificación con MEP HyperCel de un mutante de proNGF renaturalizado y filtrado con el sitio de escisión de la proteasa mutado a VSAR (SEQ ID NO: 5) de la invención. En la etapa de lavado con GuaHCl se eliminaron muchas impurezas. En la etapa de "agrupamiento", se recuperó alrededor del 60-70% del mutante de proNGF.

5 Ejemplo 8. Escisión del mutante de proNGF SP174-101 para obtener beta-NGF activo

Para la digestión con tripsina del mutante de proNGF en beta-NGF, se utilizó un tampón fosfato tal, que no inhibía la actividad de la proteasa. El tampón 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 pH 6,5. Para una proteólisis, se añadió tripsina (Roche, en calidad GMP) en una relación de 1:10.000 (p/p) (tripsina:proNGF). La proteólisis se llevó a cabo usando un tiempo de incubación de 18 h a temperatura ambiente. La realización y el rendimiento de la digestión con tripsina se analizaron mediante SDS-PAGE, rp-HPLC y UV/VIS280 nm. La Figura 5 muestra un SDS-PAGE de fracciones de la escisión con tripsina. Se usó un gel de 4-12% de Bis/Tris, 1 mm, 1x MES como tampón de ejecución (Invitrogen). Las pistas 5-7 muestran los productos de la escisión con tripsina, en comparación con el mutante de proNGF no escindido (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 escisión (beta-NGF). Se podía observar una digestión completa de un mutante de proNGF para proporcionar un beta-NGF.

Ejemplo 9. Purificación de beta NGF activo

Después de la digestión con tripsina, el beta-NGF se cargó en una columna de SP Sefarosa HP para agotar la tripsina, los subproductos de la escisión e impurezas adicionales. La purificación con SP Sefarosa HP se muestra en la Figura 6.

La columna se equilibró con un tampón fosfato de Na 25 mM (pH 6,5). La reacción de digestión con tripsina se cargó sobre una columna de SP Sefarosa HP (2 g de beta-NGF/L de medio) y la proteína no unida se lavó con el tampón de equilibrado. La elución se realizó en tres etapas (3 cv con 25% de fosfato de Na 25 mM pH 6,5 / NaCl 1 M (tampón B), 10 cv en un gradiente lineal de 25-50% del tampón B, y 3 cv con 100% de tampón B (caudal 60 cm/h)).

La Figura 6 muestra la purificación de beta-NGF. La Figura muestra un perfil de una columna con SP Sefarosa HP después de la escisión con tripsina. El rendimiento de beta-NGF era de 85-95% (pico de "elución de la muestra").

Ejemplo 10. Eficacia de la escisión con tripsina en el mutante de proNGF SP174-101 y proNGF de tipo silvestre

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

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

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/mL y 10 µg/mL. Después de una incubación durante una noche (aproximadamente 17 horas) a temperatura ambiente, se analizaron todas las muestras. Con finalidades de control, se incubó también el mutante de rhProNGF sin añadir ninguna proteasa.

Tabla 3

Relación entre tripsina/rhProNGF	Volumen de tripsina (µL)	Cantidad de tripsina (µg)	Tipo de rhProNGF	Volumen de rhProNGF (µL)	Cantidad de rhProNGF (µg)
Control		-	Mutante	1000	80
1/10000	8 (1 µg/mL)	0008	Mutante	1000	80
1/10000	8 (1 µg/mL)	0008	Tipo silvestre	1000	80
1/5000	16 (1 µg/mL)	0,016	Tipo silvestre	1000	80
1/1000	8 (10 µg/mL)	0.08	Tipo silvestre	1000	80
1/250	32 (10 µg/mL)	0.32	Tipo silvestre	1000	80

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

La Tabla 4 muestra los rendimientos de la escisión que se obtuvieron después de una digestión con tripsina. Los

5 datos experimentales muestran con claridad que la escisión con tripsina del mutante de proNGF, SEQ ID NO: 5, da como resultado solamente un producto (beta-NGF) con un alto rendimiento de escisión (aproximadamente 85%) usando una relación baja entre tripsina y proteína (1/10.000). Esto se puede comparar con la escisión del proNGF de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) que muestra un bajo rendimiento de escisión (de solo aproximadamente 5%) con una relación baja entre tripsina y proteína (1/10.000) y una degradación elevada del producto (excesivamente digerido) con una relación alta entre tripsina y proteína (1/250).

Tabla 4

		Cantidad µg	Relación entre tripsina/ProNGF	% de proNGF	% de betaNGF	% Formas excesivamente digeridas de betaNGF
proNGF	Estándar	80	-	100		
NGF	Estándar	42			100,0	
proNGF	SEQ ID NO: 5	80	1/10000	1,9	84,5	
proNGF	Tipo silvestre	80	1/10000	67,1	4,6	-
proNGF	Tipo silvestre	80	1/5000	21,5	18,6	6,6
proNGF	Tipo silvestre	80	1/1000	0,0	77,9	12,9
proNGF	Tipo silvestre	80	1/250	0,0	67,9	25,7

Ejemplo 11. Ensayo de la actividad biológica de proNGF través de la estimulación de la proliferación de células TF1

10 Células TF1 (ATCC, n° de catálogo CRL2003) se cultivaron de acuerdo con unos procedimientos clásicos. Un medio de ensayo (90% de medio RPMI 1640, 10% de suero de bovino fetal FBS, 50 U/ml de penicilina y 50 µg/mL de estreptomina) 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 medio de ensayo a 37°C. La suspensión celular se mezcló con diferentes concentraciones de 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 analizaron en placas de 96 pocillos. Después de una incubación durante 48 h a 37°C, se añadió el reactivo de proliferación celular (por ejemplo, WST-1, Roche Applied Science, n° de cat. 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  $CE_{50}$  se determinó mediante el uso de programas adecuados (por ejemplo, Sigma-Plot 2000).

Esta solicitud incluye además los siguientes elementos:

- 20 1. Un mutante de proNGF en el que el sitio de escisión de la proteasa  $R^1SK^3R^4$  está sustituido al menos en las posiciones  $R^1$  y  $K^3$  correspondientes a las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) por cualquier aminoácido seleccionado a partir de un aminoácido no básico e histidina.
2. El mutante de proNGF según el apartado 1, en el que el sitio de escisión de la proteasa está sustituido en las posiciones 101 y 103 por cualquier aminoácido pero no por arginina o lisina.
- 25 3. El mutante de proNGF según el apartado 1, en el que el sitio de escisión de la proteasa está sustituido en las posiciones 101 y 103 por cualquier aminoácido seleccionado a partir de alanina, glicina, valina, serina, treonina, metionina, tirosina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, fenilalanina, isoleucina, leucina, triptófano, cisteína y prolina.
- 30 4. El mutante de proNGF según el apartado 1, en el que el sitio de escisión de la proteasa está sustituido en las posiciones 101 y 103 por cualquier aminoácido seleccionado a partir de alanina, valina, glicina, serina, treonina, metionina, tirosina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico.
5. El mutante de proNGF según el apartado 1, en el que el sitio de escisión natural de la proteasa está sustituido en las posiciones 101 y 103 por cualquier aminoácido seleccionado a partir de alanina y valina.
- 35 6. El mutante de proNGF según los apartados 1 a 3, en el que el sitio de escisión de la proteasa está sustituido en la posición 101 por valina.
7. El mutante de proNGF según los apartados 1 a 6, en el que el sitio de escisión de la proteasa está sustituido en la posición 103 por alanina.
- 40 8. El mutante de proNGF según los apartados 1 a 7, en el que el aminoácido en la posición  $R^4$  que se corresponde con la posición 104 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) se selecciona a partir de arginina o lisina.
9. El mutante de proNGF según los apartados 1 a 8, en el que el aminoácido sustituido en la posición 102 de la se-

cuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO 1) se selecciona a partir de los aminoácidos serina, glicina, cisteína, asparagina, tirosina, treonina, ácido aspártico, glutamina, alanina, valina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, triptófano, metionina.

- 5 10. El mutante de proNGF según los apartados 1 a 9, en el que el aminoácido en la posición 101 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) está sustituido por valina, en la posición 102 por serina, en la posición 103 por alanina, y en donde el aminoácido en la posición 104 es arginina.
12. El mutante de proNGF según los apartados 1 a 11, en el que el mutante se obtiene mediante expresión recombinante en células procariotas.
- 10 13. El mutante de proNGF según el apartado 12, en el que el mutante se obtiene mediante expresión recombinante en *E. coli*.
14. Un método para la preparación de un beta-NGF humano biológicamente activo que comprende
- (i) proporcionar un mutante de proNGF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, y
  - (ii) escindir el mutante de proNGF con el fin de obtener beta-NGF humano activo.
15. El método según el apartado 14, que comprende las etapas de:
- 15 a. disolver el mutante de proNGF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13 mediante solubilización de cuerpos de inclusión en una solución desnaturizante;
- b. transferir el mutante de proNGF a una solución de renaturalización en donde el proNGF desnaturizado asume una conformación biológicamente activa;
- c. purificar el mutante de proNGF renaturalizado;
- 20 d. escindir la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.
16. El método según el apartado 15, en el que la solución desnaturizante comprende una solución que contiene (i) una sustancia caotrópica, (ii) un agente quelante, (iii) un tampón y (iv) un agente reductor.
17. El procedimiento según el apartado 16, en el que la solución desnaturizante comprende
- v. Guanidinio-HCl 1 - 8 M, preferentemente 4-6 M,
  - 25 vi. Tris, 0,01 - 1 M,
  - vii. EDTA 1 - 50 mM,
  - viii. 1-100 mM seleccionado partir de glutatión (GSH) o cisteína,
  - ix. pH 7,0 - 10,0.
18. El método según el apartado 17, en el que la solución desnaturizante comprende
- 30 i. Guanidinio-HCl 4 M,
- ii. Tris 0,1 M,
- iii. EDTA 10 mM
- iv. GSH o cisteína 5 mM
- v. pH 8,0
- 35 19. El método según el apartado 15, en el que la solución de renaturalización comprende
- i. 0,5-1,0 M de una chaperona,
  - ii. 1-10 mM de un agente quelante de metales,
  - iii. 0,1-10 mM de un sistema de barajado redox,
  - iv. pH 8,0 - pH 11,0.

20. El método según el apartado 18, en el que la solución de renaturalización comprende
- i. Arginina 0,75 M,
  - ii. EDTA 5 mM
  - iii. L-cistina 1 mM y L-cisteína 5 mM, o GSSG 1 mM (glutati6n oxidado) y GSH 5 mM (glutati6n reducido)
  - iv. pH 9,5.
21. El método según los apartados 15 y 17 - 20, en el que la renaturalizaci6n se lleva a cabo como una renaturalizaci6n por impulsos.
22. El método según el apartado 21, en el que en relaci6n con el volumen de renaturalizaci6n final durante la renaturalizaci6n por impulsos, la concentraci6n de HCl de guanidinio no excede 0,3 M y la concentraci6n de proteina por impulso no debe exceder de 50 µg/ml.
23. El método según el apartado 15, en el que el mutante de proNGF se purifica a trav6s de una cromatografía de modalidad mixta.
24. El método según el apartado 23, en el que la columna de cromatografía es una columna de material de modalidad mixta con un ligando por afinidad sint6tico.
25. El método según el apartado 24, en el que una columna de material de modalidad mixta es una columna con 4-mercapto-etil-piridina (MEP), hexilamino (HEA), fenilpropilamino (PPA), 2-mercapto-5-benzamidazol en ácid6 sulfúrico (MBI), Capto MMC (GEHC), N-bencil-N-metil etanolamina (GEHC)), CHT hidroxapatito o CHT fluoroapatito.
26. El método según el apartado 25, en el que una columna de material de modalidad mixta es una columna con una 4-mercapto-etil-piridina (MEP).
27. El método según los apartados 14 a 26, en el que la pro-forma del mutante de proNGF se escinde con una proteasa.
28. El método según el apartado 27, en el que la pro-forma del mutante de proNGF se escinde con una proteasa de serina.
29. El método según el apartado 28, en el que la pro-forma del mutante de proNGF se escinde con tripsina.
30. El método según los apartados 27 a 29, en el que relaci6n entre tripsina y mutante de proNGF es desde 1:200 - 1:100.000.
31. El método según el apartado 30, en el que relaci6n entre tripsina y mutante de proNGF es desde 1: 5.000 - 1:20.000 en peso.
32. El método según el apartado 31, en el que relaci6n entre tripsina y mutante de proNGF es una relaci6n de 1:10.000 (p/p).
33. El método según los apartados 14 a 32, que comprende adem6s una etapa adicional de purificaci6n de beta-NGF.
34. El método según el apartado 33, que comprende adem6s una etapa adicional de purificaci6n de beta-NGF mediante cromatografía en columna.
35. El método según el apartado 34, que comprende adem6s una etapa adicional de purificaci6n de beta-NGF mediante una columna de SP Sefarosa HP.
36. Uso de un mutante de proNGF según cualquiera de los apartados 1-14, para producir beta-NGF humano.

**Listado de secuencias**

- <110> Wacker Chemie AG
- <120> Nuevos mutantes de proNGF y usos de los mismos en la producci6n de beta-NGF
- <130> F-30038/EP/DIV
- <160> 7
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1

ES 2 657 344 T3

<211> 222  
 <212> PRT  
 <213> homo sapiens

<400> 1

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

Asn Arg Thr His Arg Ser Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

5 Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp  
 165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
 180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
 195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
 210 215 220

<210> 2  
 <211> 222

ES 2 657 344 T3

<212> PRT  
 <213> artificial

<220>  
 <223> mutante de proNGF

5 <220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (102)..(102)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 2

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

Asn Arg Thr His Arg Xaa Lys Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

10

ES 2 657 344 T3

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp  
 165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
 180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
 195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
 210 215 220

<210> 3  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial

<220>  
 <223> mutante de proNGF

<220>  
 <221> caract\_misc  
 10 <222> (101)..(101)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<220>  
 <221> caract\_misc  
 15 <222> (103)..(103)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 3

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

ES 2 657 344 T3

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

Asn Arg Thr His Xaa Ser Xaa Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp  
 165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
 180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
 195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
 210 215 220

<210> 4  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 <213> artificial

5

<220>  
 <223> mutante de proNGF

<220>  
 <221> caract\_misc  
 <222> (101)..(101)  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

10

<400> 4

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45



ES 2 657 344 T3

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

Asn Arg Thr His Xaa Ser Ala Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp  
 165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
 180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
 195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
 210 215 220

<210> 5  
 <211> 222  
 <212> PRT  
 5 <213> artificial

<220>  
 <223> mutante de proNGF SP174-101

<400> 5

Met Glu Pro His Ser Glu Ser Asn Val Pro Ala Gly His Thr Ile Pro  
 1 5 10 15

Gln Val His Trp Thr Lys Leu Gln His Ser Leu Asp Thr Ala Leu Arg  
 20 25 30

ES 2 657 344 T3

Arg Ala Arg Ser Ala Pro Ala Ala Ala Ile Ala Ala Arg Val Ala Gly  
 35 40 45

Gln Thr Arg Asn Ile Thr Val Asp Pro Arg Leu Phe Lys Lys Arg Arg  
 50 55 60

Leu Arg Ser Pro Arg Val Leu Phe Ser Thr Gln Pro Pro Arg Glu Ala  
 65 70 75 80

Ala Asp Thr Gln Asp Leu Asp Phe Glu Val Gly Gly Ala Ala Pro Phe  
 85 90 95

Asn Arg Thr His Val Ser Ala Arg Ser Ser Ser His Pro Ile Phe His  
 100 105 110

Arg Gly Glu Phe Ser Val Cys Asp Ser Val Ser Val Trp Val Gly Asp  
 115 120 125

Lys Thr Thr Ala Thr Asp Ile Lys Gly Lys Glu Val Met Val Leu Gly  
 130 135 140

Glu Val Asn Ile Asn Asn Ser Val Phe Lys Gln Tyr Phe Phe Glu Thr  
 145 150 155 160

Lys Cys Arg Asp Pro Asn Pro Val Asp Ser Gly Cys Arg Gly Ile Asp  
 165 170 175

Ser Lys His Trp Asn Ser Tyr Cys Thr Thr Thr His Thr Phe Val Lys  
 180 185 190

Ala Leu Thr Met Asp Gly Lys Gln Ala Ala Trp Arg Phe Ile Arg Ile  
 195 200 205

Asp Thr Ala Cys Val Cys Val Leu Ser Arg Lys Ala Val Arg  
 210 215 220

<210> 6

<211> 4

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> sitio de escisión para proteasa

<220>

<221> caract\_misc

10 <222> (2)..(2)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido natural

<400> 6

**Arg Xaa Lys Arg**  
1

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> sitio de escisión para proteasa

<400> 7

**Arg Ser Lys Arg**  
1

10

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Un mutante de proNGF que tiene una secuencia que consiste en la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) en donde el sitio de escisión de la proteasa R<sup>1</sup>SK<sup>3</sup>R<sup>4</sup> está sustituido al menos en las posiciones R<sup>1</sup> y K<sup>3</sup> que se corresponden con las posiciones 101 y 103 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) por cualquier aminoácido seleccionado a partir de un aminoácido no básico e histidina.
- 10 2. El mutante de proNGF según la reivindicación 1, en el que el sitio de escisión de la proteasa está sustituido en dichas posiciones 101 y 103 por un aminoácido seleccionado a partir de alanina, glicina, valina, serina, treonina, metionina, tirosina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, fenilalanina, isoleucina, leucina, triptófano, cisteína y prolina, preferiblemente seleccionado a partir de alanina, valina, glicina, serina, treonina, metionina, tirosina, histidina, asparagina, ácido aspártico, glutamina, ácido glutámico, y más preferiblemente seleccionado a partir de alanina y valina.
- 15 3. El mutante de proNGF según las reivindicaciones 1 o 2, en el que el aminoácido en la posición R<sup>4</sup> que se corresponde con la posición 104 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) se selecciona a partir de arginina o lisina.
- 20 4. El mutante de proNGF según las reivindicaciones 1 a 3, en el que el aminoácido en la posición 102 de dicho sitio de escisión de la proteasa de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) se selecciona a partir de los aminoácidos serina, glicina, cisteína, asparagina, tirosina, treonina, ácido aspártico, glutamina, alanina, valina, ácido glutámico, histidina, isoleucina, leucina, fenilalanina, prolina, triptófano, metionina.
5. El mutante de proNGF según las reivindicaciones 1 a 4, en el que el aminoácido en la posición 101 de la secuencia de proNGF humano de tipo silvestre (SEQ ID NO: 1) está sustituido por valina, en la posición 102 por serina, en la posición 103 por alanina, y en donde el aminoácido en la posición 104 es arginina.
6. El mutante de proNGF según las reivindicaciones 1 a 5, en donde el mutante se obtiene mediante expresión recombinante en células procariotas, preferiblemente en *E. coli*.
7. Un método para la preparación de un beta-NGF humano biológicamente activo que comprende
- 25 (i) proporcionar un mutante de proNGF según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, y
- (ii) escindir el mutante de proNGF con el fin de obtener beta-NGF humano activo.
8. El método según la reivindicación 7, que comprende las etapas de:
- 30 a. disolver el mutante de proNGF de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-6 mediante solubilización de cuerpos de inclusión en una solución desnaturalizante;
- b. transferir el mutante de proNGF a una solución de renaturalización en donde el proNGF desnaturalizado asume una conformación biológicamente activa,
- c. purificar el mutante de proNGF renaturalizado,
- d. escindir la pro-secuencia del mutante de proNGF para obtener el beta-NGF activo.
- 35 9. El método según la reivindicación 8, 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, preferentemente, en donde la solución desnaturalizante comprende
- i. Guanidinio-HCl 1 - 8 M, preferiblemente 4-6 M,
- ii. Tris 0,01 - 1 M,
- iii. EDTA 1 - 50 mM,
- 40 iv. 1-100 mM seleccionado a partir de glutatión (GSH) o cisteína,
- v. pH 7,0 - 10,0
- y que comprende más preferiblemente:
- i. Guanidinio-HCl 4 M,
- ii. Tris 0,1 M,
- 45 iii. EDTA 10 mM

iv. GSH o cisteína 5 mM

v. pH 8,0

preferiblemente, en donde la solución de renaturalización comprende

i. 0,5-1,0 M de una chaperona,

5 ii. 1-10 mM de un agente quelante de metales,

iii. 0,1-10 mM de un sistema de barajado redox,

iv. pH 8,0 - pH 11,0

y más preferiblemente comprende

i. Arginina 0,75 M,

10 ii. EDTA 5 mM

iii. L-cistina 1 mM y L-cisteína 5 mM, o GSSG 1 mM (glutati3n oxidado) y GSH 5 mM (glutati3n reducido)

iv. pH 9,5.

10. El m3todo seg3n las reivindicaciones 8 o 9, en el que la renaturalizaci3n se lleva a cabo como una renaturalizaci3n por impulsos.

15 11. El m3todo seg3n la reivindicaci3n 8, en el que el mutante de proNGF se purifica a trav3s de una cromatograf3a de modalidad mixta.

12. El m3todo seg3n las reivindicaciones 7 a 11, en el que la pro-forma del mutante de proNGF se escinde con una proteasa, preferiblemente una proteasa de serina, m3s preferiblemente tripsina.

20 13. El m3todo seg3n las reivindicaciones 7 a 12, que comprende adem3s una etapa adicional de purificaci3n de beta-NGF, preferiblemente mediante cromatograf3a en columna.

14. Uso de un mutante de proNGF seg3n cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, para la producci3n de beta-NGF humano.

Figura 1

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

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHRSKRSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN  
NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

Figura 1b. Secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO:2)

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHVSXRSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN  
NNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

Figura 1c. Secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 3)

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHXSXRSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN  
NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

Figura 1d. Secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 4)

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHXSARSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN  
NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

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

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHVSARSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN  
NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

Figura 1f. Secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 7)

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHXXXRSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNIN  
NSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

Figura 1g. Secuencia de un mutante de proNGF de la invención (SEQ ID NO: 8)

MEPHSESNVPAGHTIPQVHWTQLQHSLDTALRRARSAPAAAIAARVAGQTRNITVDPRLFKKRRLRSPRVLFST  
QPPREAADTQDLDFEVGGAAPFNRTHVXARSSSHPIFHRGEFSVCDSVSVWVGDKTTATDIKGKEVMVLGEVNI  
NNSVFKQYFFETKCRDPNPVDSGCRGIDSKHWNSYCTTTHTFVKALTMDGKQAAWRFIRIDTACVCLSRKAVR

Figura 1h. Sitios de escisión adicionales de la proteasa

RXKR (SEQ ID NO: 6); RSKR (SEQ ID NO: 9); VSXR (SEQ ID NO: 10); XSXR (SEQ ID NO: 11); XSAR (SEQ ID NO: 12); VSAR (SEQ ID NO: 13); XXXR (SEQ ID NO: 14); VXAR (SEQ ID NO: 15).

Figura 2. Procesamiento de proNGF o mutantes de proNGF a beta-NGF

Figura 2a. Procesamiento de proNGF de tipo silvestre

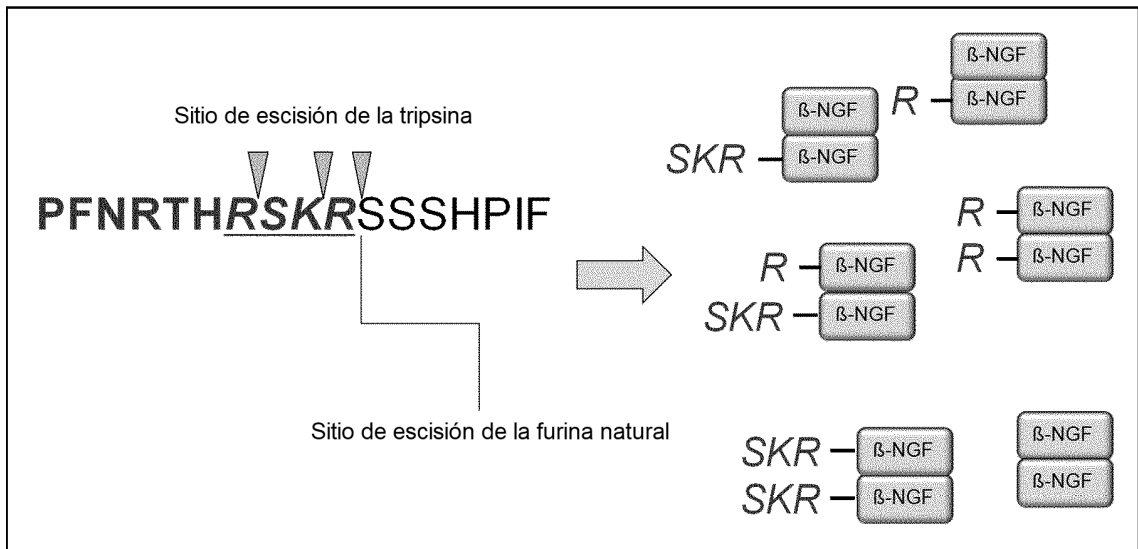


Figura 2b. Procesamiento del mutante de proNGF SP174-101 (SEQ ID NO: 5)

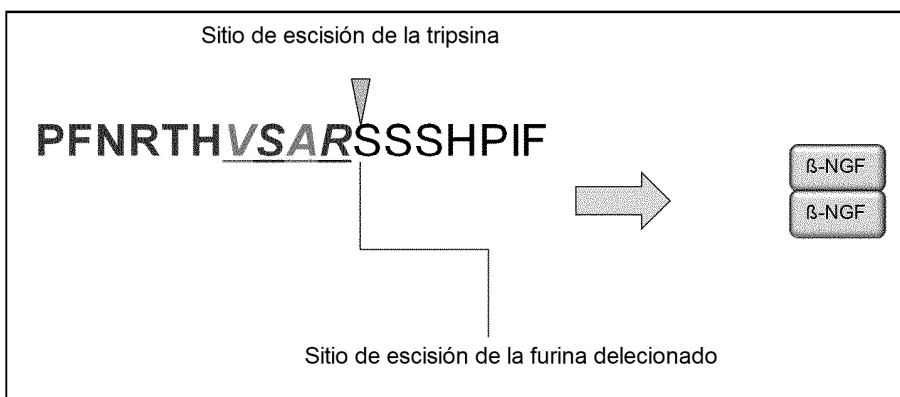


FIGURA 3. Replegamiento del mutante de proNGF SP174-101

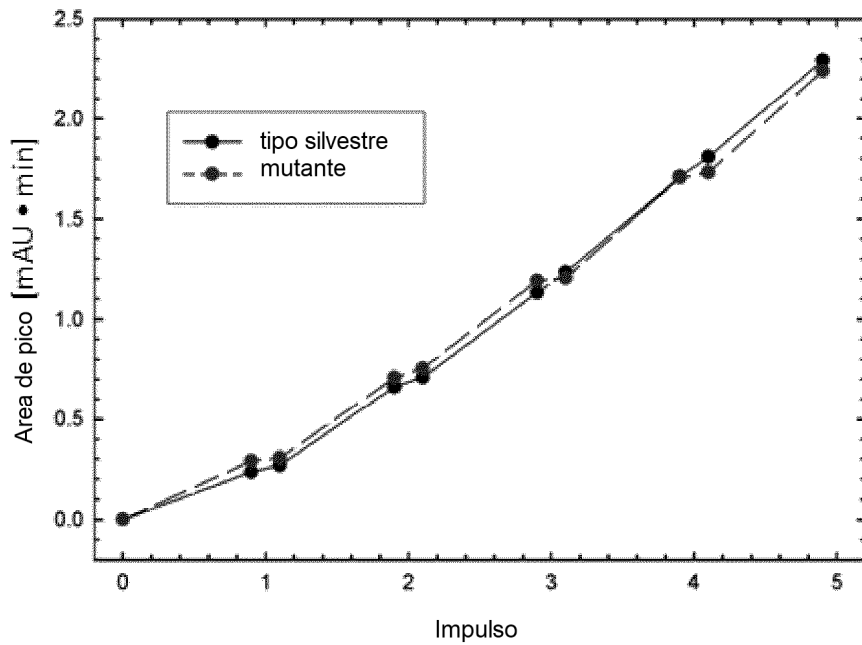


FIGURA 4. Purificación de proNGF SP174-101 mediante una columna MEP

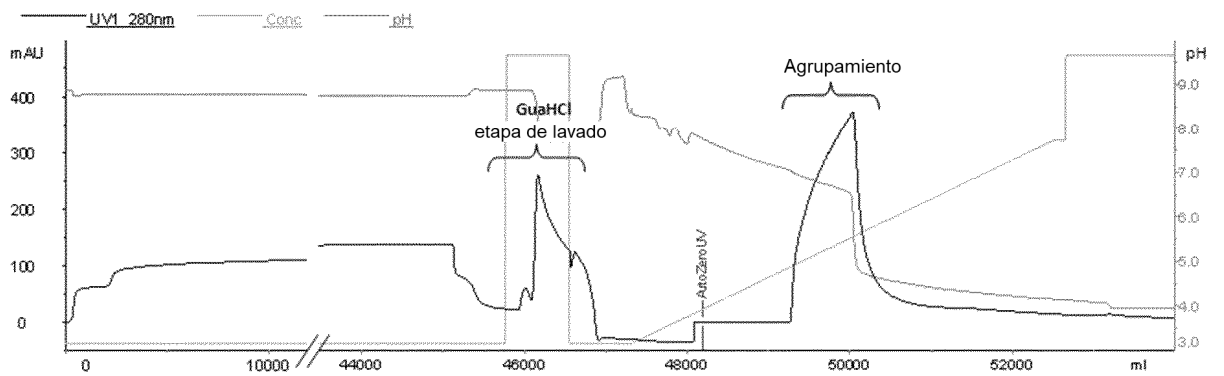




Figura 5. Escisión del mutante de proNGF SP174-101 para obtener beta-NGF activo

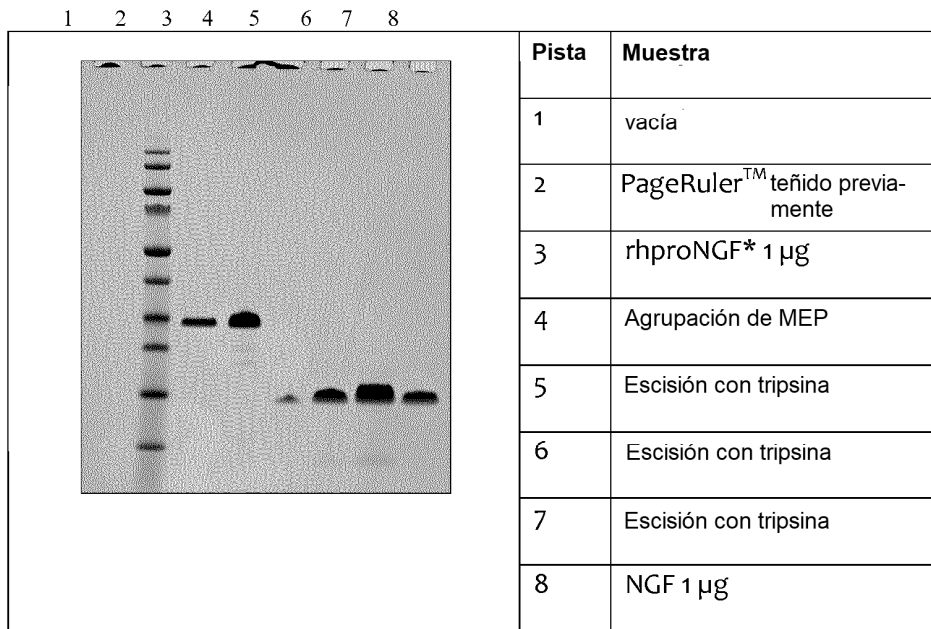


Figura 6. Purificación de beta-NGF mediante cromatografía SP Sefarosa HP.

