

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2011/064437 A2

(43) Fecha de publicación internacional
3 de junio de 2011 (03.06.2011)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 15/00 (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2010/070778
- (22) Fecha de presentación internacional:
25 de noviembre de 2010 (25.11.2010)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (30) Datos relativos a la prioridad:
P200931071
26 de noviembre de 2009 (26.11.2009) ES
- (71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): **PROYECTO DE BIOMEDICINA CIMA, S.L.** [ES/ES]; Avenida Pío XII, 22 Oficina 1, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **INSTITUTO CIENTÍFICO Y TECNOLÓGICO DE NAVARRA, S.A.** [ES/ES]; Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **ANSORENA ARTIEDA, Eduardo** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **AYMERICH SOLER, María Soledad** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **BLANCO PRIETO, María José** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **CASALES ZOCO, Erkuden** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **GARBAYO ATIENZA, Elisa** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **MOLINA SAMPER, María Carmen** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES). **SMERDOU PICAZO, Cristian** [ES/ES]; ICT (D.P.I.), Avda. Pío XII, 53, E-31008 Pamplona - Navarra (ES).
- (74) Mandatario: **ARIAS SANZ, Juan**; ABG Patentes, S.L., Avenida de Burgos, 16D, Edificio Euromor, E-28036 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Declaraciones según la Regla 4.17:**
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
 - sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))
- Publicada:**
- sin informe de búsqueda internacional, será publicada nuevamente cuando se reciba dicho informe (Regla 48.2(g))



WO 2011/064437 A2

(54) Title: VIRAL VECTORS AND METHODS USED IN THE PREPARATION OF GDNF

(54) Título : VECTORES VIRALES Y PROCEDIMIENTOS ÚTILES EN LA PREPARACIÓN DE GDNF

(57) Abstract: The invention relates to a method for the production and purification of recombinant human GDNF or a functionally equivalent variant thereof, using eukaryotic cells that contain an alphavirus vector comprising a sequence encoding recombinant human GDNF or a functionally equivalent variant thereof, operably linked to the subgenomic promoter which directs the expression of the protein in a suitable expression host. The invention also relates to alphavirus vectors and eukaryotic cells containing said alphavirus vectors.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un método para la producción y purificación de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, utilizando células eucariotas que comprenden un vector de alfavirus que comprende una secuencia que codifica el GDNF humano recombinante, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, unido operativamente al promotor subgenómico que dirige la expresión de la proteína en un huésped de expresión adecuado. La presente invención también se refiere a vectores de alfavirus y células eucariotas que comprenden dichos vectores de alfavirus.

VECTORES VIRALES Y PROCEDIMIENTOS ÚTILES EN LA PREPARACIÓN DE
GDNF

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a la ingeniería genética y, en particular, a métodos para la producción del factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) humano y a los vectores de expresión de alfavirus.

10 **Antecedentes de la invención**

El factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF) fue descrito por primera vez por Lin et al. 1993, como un potente factor neurotrófico para neuronas dopaminérgicas. El gen para GDNF humano codifica una proteína madura de 134 aminoácidos con un peso molecular de 15 kDa que está formando un homodímero (30 kDa) unido por puentes disulfuro. En base a la secuencia de aminoácidos, tiene un pI de 9,26, el pH en el que la proteína tiene un número igual de cargas positivas y cargas negativas. Considerando que GDNF es una proteína altamente glicosilada, su masa molecular aparente en un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras varía entre 18 y 22 kDa (Lin et al., 1993). De hecho, las N-glicosilaciones representan aproximadamente un 20-30% de la masa molecular de GDNF.

25 El GDNF es una proteína con un gran potencial terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, del inglés "Parkinson's disease" (PD), la esclerosis lateral amiotrófica, lesiones de la médula espinal, la lesión de los nervios periféricos, incluyendo nervios motores, como el nervio facial, 30 nervios sensoriales y motores mixtos como el nervio ciático, enfermedades oculares como el glaucoma, o la degeneración de células ganglionares retinales inducida después de la transección del nervio óptico y otros modelos de degeneración retinal. Además, el GDNF juega un papel clave en la regulación 35 negativa de las drogas de abuso, incluyendo psicoestimulantes, morfina y alcohol.

La glicosilación es una de las modificaciones pos-traduccionales más habituales de las proteínas que puede afectar a sus propiedades necesarias para su aplicación terapéutica (Walsh y Jefferis, 2006). La presencia y naturaleza de una cadena de oligosacáridos puede afectar al plegamiento, estabilidad, difusión, inmunogenicidad, unión al ligando, vida media biológica, farmacodinámica y farmacocinética, así como a la actividad funcional de las glicoproteínas. La glicosilación parece jugar un papel importante en la estabilidad del GDNF.

10

Entre los diferentes sistemas para producir proteínas recombinantes, el más adecuado para una estrategia terapéutica sería un método que produjera GDNF glicosilado. Dado que los sistemas bacterianos carecen de la capacidad de glicosilar proteínas, la expresión de GDNF glicosilado requerirá el uso de células eucariotas. Entre ellas, las células de mamífero son las mejores candidatas, ya que serán capaces de introducir el mismo patrón de glicosilación presente en el GDNF endógeno. Las células de mamífero son el sistema de expresión ideal para producir proteínas estructuralmente complejas, ya que ofrecen el mayor grado de fidelidad del producto necesario para un agente terapéutico (Walsh y Jefferis, 2006).

20

Actualmente, el GDNF humano recombinante disponible comercialmente se ha producido en *E. coli*, y, por tanto, no está glicosilado. También existe disponible comercialmente un GDNF humano truncado, que carece de 31 residuos del extremo amino terminal de la secuencia de aminoácidos, que ha sido producido en células de mieloma murino NSO. Por tanto, existe la necesidad de desarrollar métodos y medios que permitan la preparación de GDNF humano glicosilado.

30

Se han llevado a cabo diversos intentos fallidos para la obtención de GDNF humano glicosilado utilizando células BHK transfectadas con el gen de hGDNF y fibroblastos dérmicos humanos inmortalizados y transducidos con un vector lentiviral que contiene hGDNF (pCCL-WPS-hGDNF). Unas cantidades

35

insuficientes y rendimientos muy bajos del hGDNF obtenido, así como la copurificación de las proteínas contaminantes IGFBP-5 o IGFBP-7, representan el principal inconveniente de estos métodos. IGFBP-5 e IGFBP-7 son proteínas de unión a factores de crecimiento del tipo insulina con un peso molecular de 30 kDa y un pI teórico de 8,6 y 8,3, respectivamente. Estas características son muy similares a las del dímero de hGDNF, dando lugar a un solapamiento de sus correspondientes picos en el cromatograma, haciendo por tanto que el aislamiento de hGDNF sea difícil.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios que permitan la preparación de hGDNF glicosilado en rendimientos óptimos.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios que permitan la preparación de hGDNF glicosilado de una manera a escala industrial.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios que permitan la preparación de hGDNF glicosilado directamente en una forma pura.

Un objetivo de la presente invención es proporcionar métodos y medios que permitan la preparación de hGDNF glicosilado habiendo eliminado posibles proteínas contaminantes.

Blasey et al., 2000 describen la construcción del plásmido pSFV1-hCOX-2. COX-2, también conocida como ciclooxigenasa 2, es la enzima clave en la biosíntesis de prostaglandinas. Es una proteína citoplasmática.

Lundstrom (Methods in Molecular Medicine, vol. 76: Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, Edited by: C. A. Machida © Humana Press Inc., Totowa, NJ) también proporciona ejemplos específicos de vectores SFV que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica para polipéptidos

recombinantes, tales como el vector pSFV-receptor 5-HT3 de serotonina de ratón o pSFV-CAP-hNK1Rhis, donde el gen completo de la cápside está fusionado al gen del receptor de neuroquinina-1 humano (*hNK1-R*).

5

EP1386926A1 (Bioxtal) describe un vector de alfavirus que comprende una molécula de ácido nucleico o una construcción que comprende la secuencia de un genoma de alfavirus recombinante, dicho genoma del alfavirus recombinante (i) siendo deficiente en por lo menos un gen que codifica proteínas estructurales de alfavirus, (ii) comprendiendo secuencias codificantes y secuencias reguladoras de proteína no estructurales del alfavirus, y (iii) comprendiendo una secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido.

10

Forsman et al., 2000 describe los vectores pSFV1-hUGT1A6 y pSFV1-hUGT1A9.

WO09/089040 (Jaffrey y Hengst) describe métodos para expresar proteínas en los axones de neuronas de mamíferos.

Los inventores han ideado un método para la expresión y purificación de hGDNF glicosilado que evita la producción de proteínas contaminantes. Este método permite la producción de hGDNF glicosilado con rendimientos y pureza superiores. El método es además adecuado para la producción a escala industrial del hGDNF.

Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a un método para la producción de una proteína GDNF humano recombinante, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, que comprende:

a) proporcionar células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus, comprendiendo dicho vector los ácidos nucleicos de i) una secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus; ii) una secuencia que codifica para proteínas no estructurales capaces de dirigir la

35

- replicación del ARN alfaviral; iii) un promotor subgenómico del alfavirus; iv) una secuencia que codifica una proteína GDNF humana recombinante, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, unida operativamente al promotor subgenómico que dirige la expresión de la proteína en las células eucariotas; v) una secuencia 3' capaz de dirigir la replicación del alfavirus;
- 5
- b) cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo hasta que se inhiba la síntesis de las proteínas celulares;
- 10
- c) eliminar el sobrenadante;
- d) cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo durante un periodo de tiempo, de manera que se consigue la expresión del GDNF recombinante, pero sin muerte celular; y
- 15
- e) extraer la proteína GDNF recombinante del medio de cultivo.

La presente invención también se refiere a un vector de expresión de alfavirus tal como se ha definido anteriormente, una partícula alfaviral que comprende los ácidos nucleicos definidos anteriormente en forma de ARN, y una célula eucariota que comprende un vector de alfavirus según cualquiera de las realizaciones presentadas en este documento.

20

La presente invención también se refiere a proteínas de fusión que comprenden la proteína de la cápside de SFV unida al GDNF humano, o una variante funcionalmente equivalente de la misma; o que comprende por lo menos los primeros 34 aminoácidos de la proteína de la cápside de SFV unidos a una proteasa de auto-escisión, ésta última unida además al GDNF humano, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

25

30

La presente invención también se refiere a una composición que comprende GDNF humano o una variante funcionalmente equivalente de GDNF en donde el GDNF se encuentra glicosilado y en donde la composición

35

- (i) comprende un porcentaje de GDNF en peso con

respecto al total de proteína en la composición superior a 90% y/o

- (ii) se encuentra sustancialmente libre de IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-7.

5

Adicionalmente, la invención se refiere a una composición de acuerdo a la invención para su uso en medicina así como para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neurodegenerativo.

10

Descripción de la invención

Vector viral de la invención

La presente invención se refiere a un vector de expresión de alfavirus que comprende los ácidos nucleicos de:

- una secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus,
- una secuencia que codifica para proteínas no estructurales capaces de dirigir la replicación del ARN alfaviral,
- 20 - un promotor subgenómico (SG) del alfavirus,
- una secuencia que codifica una proteína GDNF humana recombinante, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, unida operativamente al promotor subgenómico que dirige la expresión de la proteína en un huésped de expresión
- 25 adecuado,
- una secuencia 3' capaz de dirigir la replicación del alfavirus.

El término "vector de expresión de alfavirus" se refiere a cualquier molécula de ácido nucleico que comprende un genoma de alfavirus recombinante que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica GDNF humana. La molécula de ácido nucleico puede ser un plásmido o un fragmento lineal, en forma de ADN o ARN de cadena única. Preferiblemente, la molécula de ácido nucleico es un ADN plasmídico o un fragmento lineal en forma de ARN. El término "vector de alfavirus" también incluye alfavirus recombinantes, es decir, partículas de alfavirus que comprenden

una molécula de ácido nucleico tal como se ha descrito anteriormente. En una realización, el vector de expresión de alfavirus es aquel con la secuencia de SEC ID NO. 1.

5 El vector de alfavirus puede tener diferentes orígenes, virus de Aura, virus de Babanki, virus de Barmah Forest, virus de Bebaru, virus de Buggy Creek, virus de Chikungunya, virus de encefalitis equina del este, virus de Everglades, virus de Fort Morgan, virus de Getah, virus de Highlands J, virus de Kyzylgach, virus
10 de Mayaro, virus de Middelburg, virus de Mucambo, virus de Ndumu, virus de O'Nyong-Nyong, virus de Pixuna, virus de Ross River, virus de Sagiyama, virus de Semliki Forest, virus de Sindbis, Arbovirus de Sudáfrica No. 86, virus de Una, virus de encefalitis equina venezolana, virus de encefalitis equina del
15 oeste y virus de Whataroa.

Preferiblemente, los vectores de alfavirus derivan del virus de Semliki Forest (SFV) (Liljeström y Garoff (1991) virus de Sindbis (SIN) (Xiong et al. (1989) Science 243, 1188-1191), o
20 virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) (Pushko et al. (1997) Virology 239, 389-401).

La estructura y secuencia de genomas de alfavirus se conoce en la técnica anterior (véase, por ejemplo, la Patente de Estados
25 Unidos No. 5.739.026, que se incorpora por referencia). Brevemente, el genoma comprende secuencias que codifican proteínas no estructurales (nsPs), secuencias que codifican proteínas estructurales (por ejemplo, la cápside, proteínas de la envoltura, etc), así como secuencias reguladoras necesarias
30 para la replicación y empaquetamiento.

Las principales secuencias reguladoras necesarias para la replicación se localizan en los extremos terminales del genoma (habitualmente en los primeros y últimos 250 nucleótidos). En
35 este aspecto, los términos "secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus" y "secuencia 3' capaz de dirigir la replicación del alfavirus" se refieren a estos extremos

terminales del genoma. En particular, la secuencia 3' capaz de dirigir la replicación del alfavirus también incluye una secuencia terminal de poliadeninas (Poly A).

- 5 El término "una secuencia que codifica para proteínas no estructurales capaces de dirigir la replicación del ARN alfaviral" se refiere al poliprecursor nsP1-4, que es dividido posteriormente en cuatro proteínas separadas.
- 10 El vector de alfavirus comprende además una región de promotor subgenómico (SG), por ejemplo el promotor 26S, o un equivalente funcional del mismo.

El término "secuencias que codifican para el GDNF recombinante humano" se refiere a la secuencias de nucleótidos que codifican para el factor neurotrófico derivado de la glia humana, también conocido como ATF1; ATF2; HFB1-GDNF.

El número de acceso para las secuencias de referencias genómicas de la secuencia génica de GDNF, derivado de *Homo Sapiens* es NG_011675.1 RefSeqGene.

El número de acceso para el ARNm y las secuencias de referencia de la proteína de la secuencia génica de GDNF, derivados de *Homo Sapiens* son:

- NM_000514.2→NP_000505.1 preproteína de la isoforma 1 del factor neurotrófico derivado de la glia (SEC ID NO. 3)
- NM_199231.1→NP_954701.1 precursor de la isoforma 2 del factor neurotrófico derivado de la glia (SEC ID NO. 4)
- 30 - NM_199234.1→NP_954704.1 isoforma 2 del factor neurotrófico derivado de la glia (SEC ID NO. 5).

Los números de acceso indicados se pueden encontrar en la base de datos de genes disponible públicamente del National Center for Biotechnology Information (NCBI) en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>.

Las secuencias de nucleótidos que codifican para el GDNF recombinante humano en la presente invención se pueden localizar en varias regiones del vector, siempre y cuando dicha secuencia no evite la replicación o empaquetamiento del vector.

5 Preferiblemente, las secuencias de nucleótidos que codifican para el GDNF recombinante humano en la presente invención se localizan en posición 3' de las secuencias codificantes no estructurales, más preferiblemente en posición 3' del promotor subgenómico (SG) y su expresión está controlada por dicho

10 promotor SG.

El término "una variante funcionalmente equivalente de la misma" se refiere a una molécula, que es funcionalmente similar a la proteína GDNF completa o a un fragmento de la misma. Se pueden

15 preparar de forma práctica variantes de proteínas mediante modificación química de la proteína obtenida según los métodos de la presente invención, utilizando métodos conocidos en la técnica. Naturalmente, dicha variante tendrá una unión al receptor y actividad de señalización intracelular similares a la

20 correspondiente proteína natural. Métodos adecuados para determinar si una variante de GDNF se puede considerar como variante funcionalmente equivalente incluye, por ejemplo, la medida de la capacidad de dicha variante de promover el crecimiento de neuritas en células PC12 en cultivo tal y como se

25 describe en el ejemplo 3.6 de la presente invención o la medida de la capacidad de promover la recaptación de dopamina con alta afinidad por neuronas dopaminérgicas del mesencéfalo tal y como ha sido descrito por W09306116 o la medida de la capacidad de la variante de promover la supervivencia de células del sistema

30 nervioso simpático y parasimpático tal y como se describe en W09306116.

Alternativamente, las variantes de proteínas se pueden obtener utilizando el vector de expresión de alfavirus donde la

35 secuencia que codifica para hGDNF se modifica convenientemente a nivel de su secuencia de bases, y posteriormente se expresa la correspondiente variante de proteína.

Las variaciones en la estructura primaria de la proteína, así como las variaciones en niveles más elevados de organización estructural, por ejemplo, en el tipo de enlaces covalentes que unen los residuos de aminoácidos o la adición de grupos a los residuos terminales de la proteína, se encuentran dentro del alcance de la presente invención. Además, las proteínas pueden incluir alteraciones conservativas y no conservativas en la secuencia de aminoácidos que dan lugar a cambios silenciosos que mantienen la funcionalidad de la molécula incluyendo, por ejemplo, deleciones, adiciones y sustituciones. Dichas moléculas alteradas pueden ser deseables cuando proporcionen ciertas ventajas en su uso. Tal como se utilizan en la presente invención, las sustituciones conservativas implicarían la sustitución de uno o más aminoácidos en la secuencia de la correspondiente proteína por otro aminoácido que tenga la misma polaridad y características parecidas de hidrofobicidad/hidrofilicidad dando lugar a una molécula funcionalmente equivalente. Dichas sustituciones conservativas incluyen, pero sin limitación, sustituciones en los siguientes grupos de aminoácidos: glicina, alanina; valina, isoleucina, leucina; ácido aspártico, ácido glutámico; asparragina, glutamina; serina, treonina; lisina, arginina, histidina; fenilalanina, tirosina; y metionina.

Variantes de GDNF adecuadas para su uso en la presente invención comprenden aquellas que tienen al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98% o al menos un 99% de identidad con cualquiera de las secuencias de GDNF de origen humano mencionadas anteriormente a lo largo de la totalidad de la secuencia y, en concreto, con la isoforma 1 de GDNF (NP_000505.1), con la isoforma 2 (NP_954701.1 o NP_954704.1) de GDNF precursor de la isoforma 2 del factor neurotrófico derivado de la glia. El grado de identidad entre dos polipéptidos se determina usando algoritmos de ordenador y métodos que son

ampliamente conocidos por los expertos en la materia. La identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina preferiblemente usando el algoritmo BLASTP [BLASTManual, Altschul, S. et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)].

Las variantes en las secuencias de aminoácidos de la proteína definida anteriormente se pueden preparar mediante mutaciones en los ácidos nucleicos que codifican los derivados sintetizados. Dichas variantes incluyen, por ejemplo, deleciones, inserciones o sustituciones de residuos en la secuencia de aminoácidos. Cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución también se puede realizar para conseguir la construcción final, siempre y cuando la construcción final posea la actividad deseada. Obviamente, las mutaciones que se realizarán en el ácido nucleico que codifica la variante de proteína no deben alterar la fase de lectura y, preferiblemente, no crearán regiones complementarias que podrían producir una estructura secundaria de ARNm.

A nivel genético, estas variantes se preparan normalmente mediante mutagénesis dirigida de nucleótidos en el ADN que codifica la molécula de la proteína, produciendo de este modo el ADN que codifica la variante, y, a continuación, expresando el ADN (o ARN) en el cultivo de células recombinantes. Las variantes muestran normalmente la misma actividad biológica cualitativa que la proteína no variante.

Un "análogo" de las proteínas definidas anteriormente, según la presente invención, se refiere a una molécula no natural, que es sustancialmente similar a las moléculas completas o a un fragmento activo de las mismas. Dicho análogo mostraría la misma actividad que la correspondiente proteína natural.

Un "fragmento" según la presente invención se refiere a cualquier subgrupo de moléculas, es decir, una proteína más corta, que mantiene la actividad biológica deseada. Los

fragmentos se pueden preparar fácilmente mediante la eliminación de aminoácidos de cualquiera de los extremos de la molécula y el análisis en el resultado de sus propiedades como agonistas del receptor. Las proteasas para eliminar a la vez un aminoácido de cualquiera de los extremos N-terminal o C-terminal de un polipéptido son conocidas en la técnica.

Los vectores alfavirus de la presente invención pueden carecer de por lo menos un ácido nucleico funcional que codifica una proteína de alfavirus estructural seleccionada entre C, E1, p62 y 6K. Las secuencias génicas de las proteínas estructurales se pueden convertir en no funcionales mediante, por ejemplo, una mutación o mutaciones, una inserción o inserciones o una delección o delecciones, o una combinación de los mismos. Preferiblemente, las secuencias génicas de las proteínas estructurales se convierten en no funcionales mediante delección, es decir, el vector de alfavirus recombinante se encuentra total o parcialmente ausente. De este modo, los vectores de alfavirus más utilizados carecen del ácido nucleico que codifica por lo menos una, preferiblemente todas las proteínas estructurales de alfavirus seleccionadas entre C, E1, p62, y 6K. Los vectores de alfavirus deberían comprender, sin embargo, las secuencias reguladoras 5' y 3' necesarias para una replicación viral y empaquetamiento eficaces.

Alternativamente, el vector de expresión de alfavirus puede comprender regiones que codifican algunas proteínas estructurales de alfavirus, tales como una secuencia que codifica una proteína con actividad potenciadora de traducción.

En una realización, la secuencia que codifica para una proteína con una actividad potenciadora de la traducción es la secuencia que codifica la cápside del virus de Semliki Forest (SFV) que comprende por lo menos los primeros 34 aminoácidos de la misma (B1).

Esta secuencia con una actividad potenciadora de la traducción

es un ácido nucleico que puede unirse a un activador, por ejemplo, un factor de traducción, para aumentar el nivel de traducción. En el contexto de la presente invención se puede utilizar cualquier potenciador de la traducción del gen adecuado. A modo de ilustración, dicho potenciador puede ser el
5 potenciador mínimo de traducción de SFV "B1" que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica los primeros 34 aminoácidos de la cápside de SFV.

10 En una realización, el vector de expresión de alfavirus comprende además una secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o una secuencia diana para una proteasa celular.

Esta secuencia, cuando se traduce, proporciona un sitio de
15 escisión mediante el cual la proteína expresada o la proteína fusionada, tal como se describe posteriormente, se procesa de manera postraducciona l o cotraducciona l en la proteína final.

En el contexto de la presente invención, cualquier secuencia de
20 nucleótidos que codifica un sitio de escisión auto-proteolítico postraducciona l, y consecuentemente la auto-proteasa o la secuencia de aminoácidos o péptido codificada por dicha secuencia de nucleótidos.

25 En una realización, la secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular es la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV), o autoproteasa 2A de FMDV. En otra realización, dicha secuencia comprende la secuencia de nucleótidos que codifica el dominio
30 carboxi-terminal de la cápside de SFV con actividad proteolítica. El uso de estos sitios de ruptura auto-proteolíticos postraducciona les se ha descrito previamente en la solicitud de Patente Europea EP 736099 y también por Ryan y Drew (1994), particularmente el uso de la secuencia que codifica la
35 región 2A de la proteína de FMDV (autoproteasa 2A de FMDV), el contenido completo de la cual se incluye por referencia.

En una realización, la secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular se expresa en fase con la secuencia con actividad potenciadora de la traducción (B1).

5

En una realización, el vector de expresión de alfavirus comprende además una secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión que actúa en cis. Alternativamente, la secuencia de nucleótidos codifica un sitio de escisión para una proteasa que actúa en trans; en este caso, dicha proteasa podría ser expresada por la célula transfectada con el vector viral de la presente invención, de forma nativa o recombinante, o alternativamente, dicha proteasa se podría añadir de manera exógena para liberar el GDNF o una variante de la proteína de fusión. En el contexto de la presente invención, se puede utilizar cualquier secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión para una proteasa que actúa en trans, y consecuentemente la secuencia de aminoácidos codifica para dicha secuencia. A modo de ilustración no limitante, dicha secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión de una proteasa que actúa en trans puede ser una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que puede ser escindida por una endopeptidasa, etc. A modo de ilustración no limitante, dicha secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión para una proteasa que actúa en trans es una secuencia de nucleótidos que codifica un sitio de escisión para una proteasa de virus, un potyvirus, por ejemplo, tal como el virus del grabado del tabaco (ETV), etc., y dicha proteasa puede ser expresada por la célula transfectada con el vector viral de la invención (de forma nativa o porque ha sido transformada de forma adecuada), etc.

Alternativamente, dicho sitio de escisión puede ser reconocido por un reactivo químico, por ejemplo, bromuro de cianógeno, para la escisión en los residuos de metionina, etc.

En una realización, la secuencia de nucleótidos para el GDNF

recombinante humano, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, se fusiona en fase y cadena abajo de la secuencia que codifica para la proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular.

5

Cuando el vector se utiliza en forma de ADN, el vector completo comprende un promotor funcional en eucariotas, particularmente un promotor que es reconocible por una ARN polimerasa eucariota, tal como un promotor de citomegalovirus (CMV) y una secuencia
10 señal de terminación de la transcripción, una secuencia señal derivada de SV40, por ejemplo. De este modo, el vector es transcrito a ARN en el interior de las células transfectadas donde será auto-amplificado.

15 De este modo, en una realización, el vector de expresión de alfavirus comprende además un promotor que es reconocido por una ARN polimerasa eucariota.

En una realización, el promotor reconocible por una ARN
20 polimerasa eucariota es el promotor de citomegalovirus (CMV).

El tamaño o longitud total del vector de alfavirus recombinante debe ser compatible para el empaquetamiento en partículas de alfavirus infecciosas. Más preferiblemente, no deberían
25 sobrepasar más del 20% del tamaño de un genoma de alfavirus natural.

Las construcciones de ARN o ADN para preparar el vector viral de la invención se pueden obtener mediante métodos convencionales
30 de biología molecular incluidos en los manuales generales de laboratorio, por ejemplo, en "Molecular cloning: a laboratory manual" (Joseph Sambrook, David W. Russel Eds. 2001, 3ª ed. Cold Spring Harbor, New York) o en "Current protocols in molecular biology" (F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. A. Smith, J. G. Seidman y K. Struhl Eds, vol. 2. Greene
35 Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, N. Y. Actualizado a septiembre del 2006.

Los alfavirus o genomas de alfavirus o fragmentos de los mismos se pueden obtener mediante diversas técnicas y de diversas fuentes. Se pueden sintetizar artificialmente, clonar a partir de plásmidos o de virus aislados por RT-PCR, o derivarse o purificar directamente a partir de muestras de virus depositadas en bibliotecas.

En una forma preferida de realización, el vector de expresión alfaviral de la invención es un vector citopático. El término "citopático", según se usa en la presente invención, se refiere a que es capaz de inducir una serie de cambios morfológicos o funcionales en la célula como consecuencia de la infección viral y que se manifiestan como redondeamiento celular, separación del sustrato, lisis celular, formación de sincitios, formación de cuerpos de inclusión o parada de la síntesis de proteínas endógenas. La citopatogenicidad de un vector puede determinarse de manera rutinaria por un experto usando cualquier método conocido en el estado de la técnica incluyendo la observación directa de las células tras la puesta en contacto de las mismas con un colorante vital, como por ejemplo el metil violeta, tal y como se describe en la solicitud de patente WO2008065225. Preferiblemente, el efecto citopático del vector de expresión alfaviral resulta en efecto citopático tras un periodo determinado de incubación de las células con dicho vector en al menos un 80%, al menos un 85%, al menos un 90%, al menos un 95% de las células.

Alternativamente, el efecto citopático se determina mediante la medida de la inhibición en la capacidad de la célula de sintetizar proteínas endógenas tras la infección con el virus o transfección con el vector viral. Preferiblemente, la medida de la inhibición de la capacidad de la célula de sintetizar proteínas endógenas se lleva a cabo mediante un método tal y como se describe en el ejemplo 3 de la presente invención en donde la inhibición en la síntesis de las proteínas endógenas se determina mediante la medida en el medio de cultivo de una

proteína secretada de forma que se considera que un vector tiene efecto citopático cuando los niveles de dicha proteína secretada son de un 20%, un 15%, un 10%, un 5%, un 4%, un 3%, un 2% o un 1% con respecto a los niveles producidos por células que no han sido infectadas con el vector. En una forma preferida de realización, dicha proteína secretada es IGFBP-4, IGFBP-5 o IGFBP-7.

Células eucariotas

La presente invención también se refiere a células eucariotas que comprenden un vector de alfavirus según cualquiera de las realizaciones presentadas en la presente invención.

Diversas células eucariotas pueden ser transformadas de manera eficaz por el vector de expresión de alfavirus, en particular de SFV.

El término "células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus" se refiere a, y sin limitación:

- células huésped eucariotas transfectadas con el vector de expresión de alfavirus en forma de ADN o ARN tal como se definen en cualquiera de las realizaciones presentadas en la presente invención,
- células huésped eucariotas infectadas con partículas virales generadas a partir del vector de expresión de alfavirus tal como se definen en cualquiera de las realizaciones presentadas en la presente invención.

La población celular o línea celular a utilizar en la presente invención pueden comprender células de mamífero, tales como glóbulos rojos, células epiteliales, células endoteliales, fibroblastos, hepatocitos, neuronas, células gliales, etc. Las células se establecen preferiblemente como líneas celulares que se pueden cultivar y almacenar. Las células pueden ser de diversos orígenes de mamífero, incluyendo humano, roedor, bovino, porcino, canino, etc. Las células preferidas son de origen humano o roedor (por ejemplo, murino, rata o hámster).

Ejemplos típicos de dichas células incluyen BHK-21, CHO-K1, HEK293, VERO, y células de glioma C6. Debe entenderse que en la presente invención se puede utilizar cualquier otra célula de mamífero.

5

Proteínas de fusión

La presente invención se refiere además a una proteína de fusión que comprende la proteína de la cápside de SFV unida a la proteína GDNF humana, o una variante funcionalmente equivalente
10 de la misma.

En una realización, la proteína de fusión comprende por lo menos los primeros 34 aminoácidos de la proteína de la cápside de SFV unida a una proteasa de auto-escisión, ésta última unida además
15 a la proteína GDNF humana, o una variante funcionalmente equivalente de la misma.

Dichas proteínas de fusión se pueden obtener a partir de construcciones de alfavirus, en las que:

- 20 - la secuencia de nucleótidos que codifica para el GDNF recombinante humano, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, se fusiona en posición 3', y manteniendo la fase de lectura, con la secuencia que codifica para la proteasa de auto-escisión o la secuencia
25 diana para una proteasa celular;
- la secuencia de nucleótidos que codifica para el GDNF recombinante humano, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, se fusiona en posición 3', y manteniendo la fase de lectura, con la secuencia que codifica
30 para la proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular, ésta última fusionada en posición 3' y en fase con la secuencia que codifica para una proteína con una actividad potenciadora de la traducción ;
- la secuencia de nucleótidos que codifica para el GDNF
35 recombinante humano, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, se fusiona en posición 3' y manteniendo la fase de lectura con la secuencia que codifica

para la proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular, ésta última fusionada en fase y en posición 3' con la secuencia que codifica la cápside del virus de Semliki Forest (SFV) que comprende por lo menos los primeros 34 aminoácidos de la misma.

En una realización la proteína de fusión es la de la secuencia SEC ID NO. 2.

10 Métodos para la producción de proteína hGDNF

La presente invención se refiere a un método para la producción de una proteína GDNF recombinante humana, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, que comprende:

- a) proporcionar células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus, comprendiendo dicho vector los ácidos nucleicos de i) una secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus; ii) una secuencia que codifica para proteínas no estructurales capaces de dirigir la replicación del ARN alfaviral; iii) un promotor subgenómico del alfavirus; iv) una secuencia que codifica el GDNF humano recombinante, o una variante funcionalmente equivalente del mismo, unida operativamente al promotor subgenómico que dirige la expresión de la proteína en las células eucariotas; v) una secuencia 3' capaz de dirigir la replicación del alfavirus;
- b) cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo hasta que se inhiba la síntesis de las proteínas endógenas celulares;
- c) eliminar el sobrenadante;
- 30 d) cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo durante un periodo de tiempo, de manera que se consigue la expresión del GDNF recombinante, pero sin muerte celular; y
- e) purificar el GDNF recombinante del medio de cultivo.

35

En una realización, el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente

equivalente del mismo, comprende además f) purificar el GDNF recombinante mediante cromatografía.

La etapa (a) del método para la producción de una proteína GDNF recombinante humana, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma comprende proporcionar células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus. Los distintos componentes del vector de expresión de alfavirus se han definido en detalle anteriormente y se usan de la misma manera en relación con el método para la producción de una proteína recombinante humana.

La etapa (b) del método para la producción de una proteína GDNF recombinante humana, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma se lleva a cabo durante un tiempo suficiente para que se inhiba la síntesis de las proteínas celulares.

La expresión "inhibición de la síntesis de proteínas celulares", según se usa en la presente invención, se refiere a que la célula pierde la capacidad de sintetizar proteínas codificadas por el propio genoma a expensas de las proteínas codificadas por el genoma viral. La inhibición de la síntesis de proteínas celulares puede ser determinada mediante métodos estándar conocidos por un experto, como por ejemplo, la determinación de los niveles o de la actividad de proteínas endógenas que aparecen de forma natural en el medio de cultivo tales como, por ejemplo, IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-7 o determinando la capacidad de extractos obtenidos de células infectadas de promover la traducción de un ARNm determinado o de una fracción de poli(A+) en comparación con extractos de células no infectadas, tal y como se describe en van Stegg et al. (J.Virol., 1981, 38:728-736). La etapa (b) del método de la invención se mantiene el tiempo suficiente para que se produzca una inhibición de la síntesis de las proteínas endógenas de al menos un 50%, al menos un 60%, al menos un 70%, al menos un 80%, al menos un 90%, al menos un 95% o un 100% de inhibición con

respecto a la síntesis en ausencia de infección viral.

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente
5 equivalente del mismo, el cultivo o la incubación de las etapas b) o d) se realiza a una temperatura entre 30 y 40° C durante un periodo de tiempo de entre 2 y 50 horas. En una realización aún más preferida, la etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 37 °C, preferiblemente durante 4 u 8 h. Alternativamente, la
10 etapa b) se lleva a cabo a una temperatura de 33 °C, preferiblemente durante 4, 8, 12 o 24 h. En una realización aún más preferida, el cultivo o la incubación de la etapa b) se realiza a una temperatura de 33°C durante 8 horas.

15 La etapa c) del método de la invención comprende la eliminación del sobrenadante del cultivo resultante de la etapa b).

La etapa d) del método comprende cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo durante un periodo de
20 tiempo, de manera que se consigue la expresión del GDNF recombinante, pero sin muerte celular.

La expresión "muerte celular", se usa indistintamente para referirse a apoptosis o muerte celular programada y se refiere a
25 un proceso que implica una serie de procesos bioquímicos que dan lugar a una serie de modificaciones morfológicas tales como modificaciones de la membrana, fragmentación nuclear, condensación de cromatina, fragmentación del ADN cromosómico y encogimiento celular. Métodos adecuados para determinar el
30 número de células del cultivo que sufren apoptosis incluyen, entre otros, el marcaje con colorantes vitales, fragmentación de ADN, actividad de caspasas, disminución del potencial de membrana de la mitocondria, producción de especies reactivas de oxígeno, condensación de cromatina y externalización de
35 fostatidilserina. Preferiblemente, la etapa d) se lleva a cabo de forma que el número de células muertas en el cultivo sea como máximo del 1%, del 2%, del 3%, del 4%, del 5%, del 6%, del 7%,

del 8%, del 9%, del 10%, del 15%, del 20% o del 30% con respecto al total de células en el cultivo.

En una realización, en el método para la producción de GDNF
5 recombinante humano, o de una variante funcionalmente
equivalente del mismo, el cultivo o la incubación de la etapa d)
se realiza a una temperatura de 33° C o a una temperatura de
37°C. En otra realización, el cultivo o la incubación de la
etapa d) se realiza durante 24 horas o 48 h. En una realización
10 aún más preferida, cultivo o la incubación de la etapa d) se
lleva a cabo durante a 37°C durante 24 horas, a 33°C durante 24
horas, a 33°C durante 48 horas.

La etapa f) del método para la producción de GDNF comprende la
15 purificación del GDNF recombinante a partir del medio de cultivo

En una realización, en el método para la producción de GDNF
recombinante humano, o de una variante funcionalmente
equivalente de la misma, el vector de expresión de alfavirus
20 comprende además un ARN transcrito in vitro.

En una realización, en el método para la producción de GDNF
recombinante humano, o de una variante funcionalmente
equivalente de la misma, el vector de expresión de alfavirus
25 comprende además partículas virales que comprenden el ARN
vector.

En una realización, en el método para la producción de GDNF
recombinante humano, o de una variante funcionalmente
30 equivalente de la misma, el vector de expresión de alfavirus
comprende además un promotor que es reconocible por una ARN
polimerasa eucariota.

En una realización, en el método para la producción de GDNF
35 recombinante humano, o de una variante funcionalmente
equivalente del mismo, el promotor reconocible por una ARN
polimerasa eucariota es el promotor de citomegalovirus (CMV).

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, el vector de expresión de alfavirus comprende además una secuencia que codifica para una proteína con una actividad potenciadora de la traducción.

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente de la misma, la secuencia que codifica para una proteína con actividad potenciadora de traducción es la secuencia que codifica por lo menos los primeros 34 aminoácidos de la cápside del virus de Semliki Forest (SFV).

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, el vector de expresión de alfavirus comprende además una secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o una secuencia diana para una proteasa celular.

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, la secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular se expresa en fase con la secuencia con actividad potenciadora de traducción.

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, la secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV).

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, la secuencia de nucleótidos que codifica para el GDNF recombinante humano, o una variante funcionalmente

equivalente del mismo, se fusiona en posición 3' y manteniendo la fase de lectura con la secuencia que codifica para la proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular.

5

En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, el alfavirus es SFV.

10 En una realización, en el método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, las células eucariotas son células de mamífero seleccionadas entre BHK, CHO, VERO, y células de glioma C6.

15

En una realización, las células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus según la presente invención se pueden preparar mediante, en primer lugar, la obtención de un ADN molde para la síntesis de ARN. Este método para la
20 preparación de un ADN molde comprende linealizar el plásmido pSFV-hGDNF mediante la incubación de dicho plásmido con una enzima de restricción adecuada, tal como Spe I. Una vez que el plásmido se ha escindido correctamente, el producto de la digestión del plásmido se extrae de manera conveniente mediante
25 su mezcla con, por ejemplo, fenol/cloroformo en presencia de una sal como, por ejemplo, NaAc, agitación, centrifugación y transferencia de la fase superior a un nuevo tubo. Esta extracción se puede repetir según se desee. A continuación se precipita el plásmido mediante la adición de etanol absoluto
30 frío, seguido de la agitación, incubación a -20° , centrifugación, eliminación del sobrenadante, y adición de etanol al 70%. Una centrifugación posterior, descartando el sobrenadante, permite obtener un precipitado que contiene el plásmido linearizado.

35

En una realización, las células eucariotas que contienen un vector de expresión de alfavirus, según la presente invención,

se pueden preparar mediante, en primer lugar, la obtención de un ADN molde para la síntesis de ARN. La síntesis de ARN se puede realizar mediante la preparación de una mezcla de plásmido pSFV-hGDNF linearizado preparado tal como se ha descrito en el párrafo anterior. La mezcla preferiblemente comprende el plásmido pSFV-hGDNF linearizado, tampón de reacción, análogo de CAP (m7G(5')ppp(5')G) (New England Biolabs. Ref. S1404S), nucleótidos trifosfato (ATP, CTP, UTP, y GTP), DTT, inhibidor de ARNasa (Promega. Ref. N2511), SP6 polimerasa (New England Biolabs. Ref. M0207S). La mezcla se incuba en condiciones adecuadas para aumentar la síntesis de ARN, preferiblemente durante 1 hora a 37°C.

En una realización, las células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus según la presente invención se pueden preparar mediante electroporación de células BHK con ARN de SFV-hGDNF tal como se obtiene en el párrafo anterior y la expresión de hGDNF. Este protocolo comprende el crecimiento de células BHK en frascos de cultivo hasta alcanzar confluencia (un frasco de cultivo confluyente de 75 cm² comprende aproximadamente 5x10⁶ células). Las células se tripsinizan, se cuentan y se centrifugan. Opcionalmente, se lavan posteriormente con, por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato (PBS sin Ca/Mg), se centrifugan y se resuspenden de nuevo en PBS sin Ca/Mg. A continuación, dichas células se mezclan con la reacción de ARN descrita anteriormente, y se transfieren a una cubeta de electroporación. La electroporación se realiza posteriormente. Preferiblemente, la electroporación se realiza a temperatura ambiente aplicando dos pulsos consecutivos de 800 voltios, manteniendo la capacitancia a 25 µF (electroporador Biorad). Estas condiciones son las más adecuadas en el caso de células BHK, ya que dan lugar a casi un 100% de células electroporadas, bloqueando de este modo casi el 100% de la síntesis de proteínas en las células huésped en el cultivo. Si se electroporan varias alícuotas de células, éstas se pueden mezclar y diluir en medio BHK completo (Glasgow-MEM (Invitrogene. Ref. Gibco 21710), suplementado con suero fetal bovino (FBS) a temperatura ambiente

y posteriormente plaquear el volumen total en frascos de cultivo. No es necesario mezclar las células de dos electroporaciones, pero al hacerlo se reduce convenientemente el volumen del medio del que se purificará el hGDNF. A continuación, las células electroporadas se incuban preferiblemente entre 6 y 12 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 8 horas a 33°C con CO₂ al 5%. Este periodo de tiempo de incubación permite una inhibición conveniente de la síntesis de proteínas celulares. Posteriormente, se elimina el sobrenadante, eliminando así el medio de cultivo que comprende suero y las proteínas celulares ya producidas, y las células se lavan posteriormente con PBS (sin Ca/Mg). Se añade medio BHK sin suero y la mezcla se incuba, preferiblemente a 33°C con CO₂ al 5% durante 48 h, más preferiblemente durante 24h. Es preferible no incubar la mezcla durante demasiado tiempo, evitando así la lisis celular y que se liberen de este modo pequeñas cantidades de proteína al sobrenadante que podrían interferir en la purificación del hGDNF. A continuación, se recoge el medio de cultivo, se centrifuga y el sobrenadante se filtra y se purifica para descartar cualquier material excepto la proteína hGDNF.

Obviamente, se pueden utilizar otros medios de cultivo adecuados, dependiendo del tipo de células eucariotas utilizadas. En la realización anterior, se ha utilizado el medio de cultivo BHK (G-MEM, Gibco), ya que se utilizaron células BHK.

Alternativamente, en otra realización, las células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus según la presente invención se pueden preparar mediante la infección de células BHK con partículas virales de SFV-hGDNF y la expresión de hGDNF. La producción de partículas virales de SFV se basa en la coelectroporación de células BHK con el ARN recombinante de SFV-hGDNF y con dos ARN auxiliares (o helper), que transportan genes que codifican para la cápside de SFV, y las proteínas de la envoltura, respectivamente, (Smerdou y Liljeström, 1999). Según esta metodología, los ADN moldes y los ARN se preparan a partir de los plásmidos pSFV-hGDNF, pSFV-helper-S2, y pSFV-

helper-C-S219A tal como se ha descrito anteriormente. Las células BHK se preparan tal como se ha descrito y las células resuspendidas se mezclan en PBS con ARN de SFV-hGDNF, SFV-helper-S2, y SFV-helper-C-S219A. A continuación, la mezcla se transfiere a una cubeta de electroporación. Preferiblemente, la electroporación se realiza a temperatura ambiente aplicando dos pulsos consecutivos de 800 voltios, manteniendo la capacitancia a 25 μ F (electroporador Biorad). Las células electroporadas se diluyen a continuación en medio BHK completo suplementado con FBS a temperatura ambiente y se incuban preferiblemente durante 24-48 horas a 33°C con CO₂ al 5%. El medio se recoge, se centrifuga para eliminar los restos celulares, y el sobrenadante que comprende las partículas virales se puede congelar y almacenar a -80°C.

En una realización, la infección de células con partículas virales preparadas anteriormente se puede realizar según la siguiente metodología. Las células BHK se crecen en frascos de cultivo hasta que alcanzan la confluencia. Las células se lavan a continuación con PBS (con Ca/Mg) y se infectan posteriormente con partículas virales de SFV-hGDNF a una multiplicidad de infección (moi) de ≥ 5 (por lo menos $2,5 \times 10^7$ partículas virales para 5×10^6 células) mediante la adición de la cantidad requerida de virus diluido en medio de infección (por ejemplo, MEM que contiene BSA al 0,2%, glutamina 2 mM y Hepes 20 mM). Se deja proceder la adsorción del virus, preferiblemente durante 1 h a 37°C. Se añade medio BHK con FBS a las células infectadas y la mezcla se incuba, preferiblemente entre 6 y 12 horas, más preferiblemente durante 8 horas, a 33°C con CO₂ al 5%. Este periodo de tiempo de incubación permite una inhibición conveniente de la síntesis de proteínas celulares. Posteriormente, se extrae el sobrenadante o medio de cultivo, y las células se lavan tantas veces como se desee con PBS (sin Ca/Mg). Esta etapa de lavado permite la eliminación del suero y las proteínas celulares presentes en el medio. A continuación, se añade medio BHK sin FBS y la mezcla se incuba, preferiblemente a 33° C con CO₂ al 5% durante 48 h, más

preferiblemente durante 24h. Es preferible no incubar la mezcla durante demasiado tiempo, evitando así la lisis celular y que se liberen de este modo pequeñas cantidades de proteína al sobrenadante que podrían interferir en la purificación del hGDNF. Se recoge el medio de cultivo, se centrifuga y el sobrenadante se filtra y se purifica para descartar cualquier material excepto la proteína hGDNF.

Alternativamente, en otra realización, las células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus según la presente invención se pueden preparar mediante la transfección de células BHK con ADN de (CMV)-SFV-hGDNF con lipofectamina u otro reactivo de transfección. Según esta metodología, las células BHK se crecen hasta alcanzar un 40-70% de confluencia. El ADN de SFV-hGDNF y los lípidos se diluyen por separado en medio Optimem (Gibco) sin suero. Aunque la proporción de ADN/lipofectamina se puede optimizar para cada nueva preparación de ADN, 1 µg de ADN de SFV/5 µl de lipofectamina (Gibco, ref. 18324-012) es una combinación preferida para 10^6 células. A continuación la dilución de los lípidos y la dilución del ADN se mezclan y se agitan. La mezcla se incuba a temperatura ambiente y se extrae el medio de cultivo de las células, seguido de la adición de medio Optimem libre de suero fetal bovino a las células. Tras la incubación, preferiblemente a 37° C, se extrae de nuevo el medio de las células, y se añade medio Optimem libre de FBS a la mezcla de lípidos y ADN. La mezcla se añade a las células y se incuba preferiblemente a 37° C durante 1 hora. La mezcla de lípidos-ADN se retira de las células, se añade el medio BHK con FBS, y se incuban entre 6 y 12 horas, más preferiblemente durante aproximadamente 8 horas a 33°C con CO₂ al 5%. Este periodo de tiempo de incubación permite una inhibición conveniente de la síntesis de proteínas celulares. Posteriormente, se extrae el sobrenadante, eliminando de este modo el medio de cultivo que contiene FBS y las proteínas celulares endógenas ya producidas, y las células se lavan con PBS (sin Ca/Mg). Se añade el medio BHK sin FBS y se incuba la mezcla, preferiblemente a 33° C con CO₂ al 5% durante 48 h, más

preferiblemente durante 24h. Es preferible no incubar la mezcla durante demasiado tiempo, evitando así la lisis celular y que se liberen de este modo pequeñas cantidades de proteína al sobrenadante que podrían interferir en la purificación del hGDNF. A continuación, se recoge el medio de cultivo, se centrifuga, se filtra el sobrenadante y se purifica para descartar cualquier material excepto la proteína hGDNF.

También se pueden utilizar otros métodos de transfección como los que utilizan fosfato de calcio, el uso de liposomas, la electroporación y similares.

En una realización, la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 37° durante aproximadamente 8 h y la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 37° durante aproximadamente 24h. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 37° durante aproximadamente 8 h y la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 24h. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 8 h y la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 24h. En otra realización, la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 12 h y la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 24h.

En una realización, el hGDNF obtenido se purifica posteriormente según la siguiente metodología. Se conecta una columna de SP-sefarosa a una bomba peristáltica. La columna se equilibra con preferiblemente 10 volúmenes de columna (CV) de tampón fosfato a una velocidad de flujo constante de 1,5 ml/min. El pH del medio de cultivo que contiene hGDNF se ajusta a 8,2 con NaOH y el medio se filtra a través de una unidad de filtración de 0,22 µm. La muestra a purificar se carga en la columna y se recoge el flujo (FT). A continuación, la columna se lava, preferiblemente con 10 CV de tampón fosfato, pH 8,2, y se recoge el lavado. El hGDNF unido se eluye, preferiblemente con tampón fosfato, pH

7,4, y altas concentraciones de NaCl.

En una realización preferida, las células eucariotas se transforman mediante electroporación. La técnica de electroporación es bien conocida en el campo de la biotecnología y un experto en la materia puede establecer las condiciones óptimas. Brevemente, se mezclan aproximadamente 25 µg de ARN sintetizado in vitro con 5×10^6 células BHK-21 y se electroporan en una cubeta de 0,4 cm mediante la aplicación de dos pulsos consecutivos de 800 V y manteniendo la capacitancia a 25 µF.

En otra realización, las células eucariotas son infectadas por partículas virales producidas mediante co-electroporación con el ARN recombinante de SFV-GDNF y dos ARN auxiliares que transportan los genes que codifican para la cápside de SFV y las proteínas de la envoltura (SFV-helper-S2 y SFV-helper-C-S219A, respectivamente) (Smerdou y Liljeström, 1999).

Brevemente, se mezclan aproximadamente 50 µg de ARN de SFV-hGDNF, 50 µg de SFV-helper-S2, y 50 µg de SFV-helper-C-S219A con 5×10^6 células BHK-21, se resuspenden en 0,8 ml de PBS y se electroporan en una cubeta de 0,4 cm mediante la aplicación de dos pulsos consecutivos de 800 V y manteniendo la capacitancia a 25 µF.

En otra realización, se lavan 5×10^6 células BHK-21 con 12 ml de PBS (con Ca/Mg) y se infectan con partículas virales de SFV-hGDNF a un moi de ≥ 5 (por lo menos $2,5 \times 10^7$ partículas virales para 5×10^6 células) mediante la adición de la cantidad requerida de virus diluida en 3 ml de medio de infección (MEM que contiene BSA al 0,2%, glutamina 2mM y Hepes 20 mM).

En otra realización, se transforman 5×10^6 células BHK-21 mediante la incubación a temperatura ambiente durante 15 minutos con 5 µg de ADN de SFV/25 µl de lipofectamina (Gibco, ref. 18324-012).

En la presente invención, se puede utilizar cualquier medio de cultivo adecuado para células de mamífero, incluyendo RPMI, DMEM, suplementado con aditivos convencionales (antibióticos, aminoácidos, suero, etc.). Las células se pueden cultivar y almacenar en cualquier dispositivo apropiado (tubos, matraces, botellas, etc.). La viabilidad celular o ausencia de contaminación se puede verificar antes de llevar a cabo los métodos de la presente invención.

10 Kit para la producción de GDNF recombinante humano

En una realización, la presente invención proporciona un kit para su uso en un método para producir GDNF recombinante humano, que comprende cualesquiera de:

- 15 - un vector de alfavirus según cualquiera de las realizaciones anteriores;
- células eucariotas que comprenden el vector de alfavirus según cualquiera de las realizaciones anteriores;
- 20 - medio de cultivo; o
- una combinación de los mismos.

La presente invención se refiere además al uso de un vector de expresión de alfavirus o partículas alfavirales según cualquiera de las realizaciones presentadas en la presente invención para la producción de proteína GDNF recombinante humana, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma.

La presente invención se refiere al uso de células eucariotas que comprenden el vector de expresión de alfavirus según cualquiera de las realizaciones presentadas en la presente invención para la producción de proteína GDNF recombinante humana, o variantes funcionalmente equivalentes de la misma.

35 Composiciones que comprenden GDNF glicosilado y usos terapéuticos de las mismas

Los autores de la presente invención han puesto a punto un método de purificación de GDNF recombinante glicosilado que permite obtener composiciones que comprenden GDNF en cantidades superiores a las descritas en el estado de la técnica. Por tanto, en otro aspecto, la invención se refiere a una composición que comprende GDNF humano o una variante funcionalmente equivalente de GDNF en donde el GDNF se encuentra glicosilado y en donde la composición

(i) comprende un porcentaje de GDNF en peso con respecto al total de proteína en la composición superior a 90% y/o

(ii) se encuentra sustancialmente libre de IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-7.

Los términos "GDNF" y "variante funcionalmente equivalente" han sido descritos en detalle con anterioridad.

El término "porcentaje" se refiere al porcentaje de GDNF con respecto al total de proteína en la muestra. Así, un 90% de GDNF implica que de cada 100 µg de proteína en la composición, al menos 90 µg corresponden a GDNF. El porcentaje de GDNF glicosilado en la muestra es de al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, al menos 99,5% o al menos 100%.

En una forma preferida de realización, el GDNF es de origen humano. El término "variante funcionalmente equivalente" ha sido descrito en detalle anteriormente. En una forma preferida, la variante funcionalmente equivalente muestra una identidad de al menos 94% con respecto a GDNF de origen humano.

El término "glicosilado", según se usa en la presente invención se refiere a una molécula en la que al menos uno de los sitios de N-glicosilación, preferiblemente los sitios de glicosilación en posiciones 126 y 162 en la secuencia del pre-proGDNF humano y las correspondientes en las variantes funcionalmente equivalentes de GDNF, se encuentran glicosilados. Típicamente, la estructura de los restos de glicosilación es la que aparece en células de mamíferos y que comprenden-glicanos del tipo complejo o de tipo híbrido modificados en posición terminal por

restos de ácido siálico, preferiblemente disialilados y trisialilados. Preferiblemente, el GDNF glicosilado de acuerdo a la invención contiene al menos un 90%, al menos un 91%, al menos un 92%, al menos un 93%, al menos un 94%, al menos un 95%, al menos un 96%, al menos un 97%, al menos un 98%, al menos un 99% o un 100% de los restos de los glicanos de tipo complejo o de tipo híbrido sialilados.

La expresión "sustancialmente libre de IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-7" se refiere a que las composiciones contienen como máximo un 5%, un 4%, un 3%, un 2%, un 1%, un 0,5%, un 0,1%, un 0,05%, un 0,01% de una o varias proteínas seleccionadas de IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-7. En una forma preferida de realización, las composiciones de la invención se encuentran sustancialmente libres de IGFBP-5 y/o IGFBP-7.

El término "IGFBP-4", según se usa en la presente invención se refiere a una proteína que es capaz de unirse a IGF-I e IGF-II tal y como ha sido descrita por LaTour et al. (Mol. Endocrinol., 1991, 4:1806-14)

El término "IGFBP-5", según se usa en la presente invención se refiere a una proteína con capacidad de unión a IGF-I y/o IGF-II, cuyo peso molecular es de aproximadamente 30 kDa, su pI de aproximadamente 8,6 y que fue descrita por Allander et al. (J. Biol. Chem. 269:10891-8).

El término "IGFBP-7" según se usa en la presente invención se refiere a una proteína con capacidad de unión a IGF-I cuyo pI es de 8,3 tal y como se describe por Wilson et al. (J. Clin. Endocrinol. Metab. 86:4504-11).

Preferiblemente, las composiciones de la invención muestran una actividad específica superior a las composiciones descritas en el estado de la técnica. La expresión "actividad específica", según se usa en la presente invención, se refiere a la actividad de una enzima por miligramo (mg) de proteína y se suele expresar en unidades de actividad por miligramo de proteína.

En una forma preferida de realización, las composiciones de la invención muestran una actividad específica superior a 1×10^7 unidades/mg determinada mediante la capacidad de promover la supervivencia y estimular el crecimiento de neuritas a partir de

neuronas obtenidas a partir del ganglio raíz dorsal (Davies, A.M. (1989) in Neurotrophic Factor Bioassay Using Dissociated Neurons, Nerve Growth Factor. Rush, R.A. (eds): John Willey and Sons, Ltd. 95).

5

En una forma preferida de realización, las composiciones de la invención muestran una actividad específica superior a 25000 TU/mg determinada mediante la capacidad de promover la captación de dopamina en cultivos de meséncéfalo de acuerdo al método de medida de la capacidad de GDNF de promover la captación de dopamina tritiada en células de cultivos primarios de mesencéfalo embrionario de rata en las condiciones descritas por Lin et al. (J.Neurochem., 1994, 63:758-768). En particular, la determinación de acuerdo a Lin et al. comprende:

- 15 - Poner en contacto células en cultivo de 6 ó 7 días con [³H]DA a 50 nM en buffer de captación (tampón fostado Krebs-Ringer's a pH 7.4 y glucosa 5.6 mM, EDTA 1.3 mM, ácido ascórbico 0.1 mM y pargilina 0.5 mM durante 15 minutos a 37°C.
- 20 - Lavar las células con el buffer de captación,
- Liberar [³H]DA de las células mediante incubación de éstas con 0.5 ml de etanol al 95% durante 30 min a 37°C,
- Determinar la radioactividad en 10 ml de EcoLite (ICN).

25 Los valores de fondo se obtuvieron mediante la adición al tampón de captación de GBR-12909 al 0.5 mM.

El número de unidades tróficas (TU) de actividad GDNF se determina como el recíproco de la dilución que dio lugar a un 50% de la máxima estimulación de captación de [³H]DA por el cultivo. La actividad específica es el cociente entre el valor de TU por mililitro y la concentración de proteína por mililitro.

35 En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de acuerdo a la invención para su uso en medicina.

En otro aspecto, la invención se relaciona con una composición de acuerdo a la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de un trastorno neurodegenerativo.

40

En otro aspecto, la invención se relaciona con el uso de una composición de acuerdo a la invención para la preparación de un

medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno neurodegenerativo.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un método para el
5 tratamiento o la prevención de un trastorno neurodegenerativo en un sujeto que comprende la administración a dicho sujeto de una composición de acuerdo a la invención.

El término "trastorno neurodegenerativo" según se usa en la
10 presente invención se refiere a cualquier tipo de alteración en la que se altera la integridad neuronal e incluye, sin limitación, trastornos de las neuronas motoras incluyendo la esclerosis lateral amiotrófica, los trastornos neurológicos asociados con la diabetes, la enfermedad de Parkinson, la
15 enfermedad de Alzheimer, y la corea de Huntington, glaucoma u otras enfermedades y condiciones que implican la degeneración de las células del ganglio de la retina; la neuropatía sensorial causada por lesión, o insultos, o degeneración, de las neuronas sensoriales; condiciones patológicas, tales como las
20 degeneraciones de la retina heredadas y las retinopatías relacionadas con la edad, las enfermedades o las lesiones, en las cuales se produce la degeneración fotorreceptora y es responsable de la pérdida de visión; y la lesión o la degeneración de las células sensoriales del oído interno, tales
25 como las células ciliadas y las neuronas auditivas para evitar y/o tratar la pérdida de oído debida a una variedad de causas.

Breve descripción de las figuras

Figura 1. Purificación de GDNF de rata a partir del medio
30 condicionado de células BHK. Análisis de las fracciones obtenidas después de la cromatografía de intercambio catiónico de medio condicionado de células BHK transfectadas con GDNF de rata. Las fracciones eluidas con un gradiente de NaCl se analizaron mediante SDS-PAGE, seguido de tinción con Azul de
35 Coomassie. Las fracciones que contienen GDNF de rata (14-16) también presentan un proteína muy abundante que se identificó como IGFBP-5.

Figura 2. Purificación de GDNF humano a partir de medio

condicionado de células MDX-12 transducidas con un vector lentiviral que contiene hGDNF: cromatografía de intercambio catiónico. El medio condicionado obtenido de MDX-12 se ajustó a pH 8,2 y a continuación, se pasó a través de una resina de flujo rápido de SP-Sefarosa. El hGDNF unido se eluyó con un gradiente de 0,15 a 1 M de NaCl. Se analizaron fracciones de 2 ml mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras seguido de tinción con azul de Coomassie (A) o transferencia Western para detectar hGDNF (B) o IGFBP-7 (C).

10 **Figura 3.** Purificación de GDNF humano a partir de medio condicionado de células MDX-12 transducidas con un vector lentiviral que contiene hGDNF: cromatografía de filtración en gel. Las fracciones de la cromatografía de SP-Sefarosa que contenían hGDNF y bajas cantidades de IGFBP-7 se desalaron y concentraron mediante liofilización. El liofilizado se resuspendió y se aplicó a una columna Superdex 200 HR. (A) Cromatograma de la proteína (absorbancia a 215 nm) frente al volumen (ml). La barra horizontal indica las fracciones que se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con azul de Coomassie (B). El primer pico del cromatograma corresponde a la IGFBP-7 y el segundo al GDNF.

Figura 4. Vector de expresión de SFV-hGDNF. (A) Diagrama del vector. El vector contiene la replicasa de SFV seguida de un promotor subgenómico (Pr sg). La ORF que codifica para hGDNF está situada corriente abajo del Pr sg fusionada en fase con el potenciador mínimo de traducción de la cápside de SFV (Enh b1) y la autoproteasa 2A de FMDV (2A). Enh b1 codifica para los primeros 34 aminoácidos de la cápside de SFV y 2A codifica para los 17 aminoácidos indicados en la figura. (B) Expresión de hGDNF. Las células BHK se electroporaron por duplicado con ARN de hGDNF y 24 h después se analizó la presencia de hGDNF en los sobrenadantes mediante transferencia Western (canales 1 y 2). Células electroporadas con ARN de un vector de SFV que codifican para la N-acetil-transferasa de puromicina se utilizaron como control negativo (SFV-pac). El sobrenadante de células MDX-12 que expresan hGDNF (lenti GDNF) o GDNF de rata comercial expresado a partir de un vector de baculovirus en células de

insectos (GDNF de insecto) se utilizaron como controles positivos. La cantidad de sobrenadante o proteína recombinante purificada (GDNF de insecto) utilizada en este estudio se indica bajo el gel.

5 **Figura 5.** Análisis del medio condicionado de células BHK electroporadas con el vector de SFV. Se analizó mediante transferencia Western del medio condicionado de células BHK electroporadas con ARN de SFV-hGDNF o sin ARN (control). Una vez se electroporaron las células, se cambió el medio a medio sin
10 suero a los tiempos indicados y se recogió 24 h más tarde. hGDNF se expresa a niveles elevados en el medio de células transfectadas. Dos proteínas secretadas al medio de cultivo en células transfectadas sin ARN, IGFBP-5 e IGFBP-4, han desaparecido completamente debido a la fuerte inhibición de
15 síntesis de proteínas endógenas inducida por el vector de SFV. La transferencia western de β -actina se realizó a partir de lisados celulares que indicaron que todos los pocillos de cultivo contenían la misma cantidad inicial de células.

Figura 6. Purificación de GDNF humano a partir de células BHK transfectadas con un vector de SFV que contiene hGDNF:
20 cromatografía de intercambio catiónico. El medio condicionado obtenido de las células BHK se ajustó a pH 8,2 y, a continuación, se pasó por una resina de flujo rápido de SP-Sefarosa. El hGDNF unido se eluyó en una única etapa con 0,5 M de NaCl (E1) y se analizó el eluido mediante tinción con Azul de Coomassie (A) y transferencia Western (B). L: Medio condicionado cargado en la columna; FT: Medio condicionado tras pasar por la
25 columna; W: lavado de la columna; E1: elución con 0.5 M de NaCl; E2: elución con 1 M de NaCl.

30 **Figura 7.** Diferenciación inducida por GDNF de PC-12. Las células PC-12 se incubaron a una densidad baja (2×10^3 células/cm²) en placas de cultivo recubiertas de colágeno. Al medio de cultivo se añadió hGDNF glicosilado puro (25 ng/ml) purificado a partir del sobrenadante de células BHK transfectadas con el vector de
35 SFV-hGDNF, o hGDNF no glicosilado producido en bacterias (50 ng/ml) en el día 0. Las imágenes de contraste de fase se tomaron el día 8.

Figura 8. Comparación entre dos protocolos para la purificación de GDNF glicosilado humano. En el panel izquierdo, una modificación del protocolo descrito por Ansorena et al. (2009) para la purificación de GDNF humano glicosilado. En los paneles central y derecho, el método de la invención para producir fácilmente una cantidad elevada de GDNF glicosilado de células BHK transfectadas con un vector de SFV que expresa hGDNF aplicado en dos escalas preparativas diferentes.

Figura 9. Estudio de la estabilidad de GDNF glicosilado después de la purificación de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF. La figura muestra que la mayoría de la proteína no glicosilada se degrada después de 24 horas de incubación a temperatura ambiente y que desaparece después de 48 horas. Sin embargo, el hGDNF glicosilado aún está presente después de 3 semanas de incubación a temperatura ambiente.

Ejemplos

Ejemplo 1: Producción de GDNF glicosilado humano utilizando células BHK transfectadas de forma estable con hGDNF

Las células BHK se utilizan comúnmente para la transfección. Esta línea celular ya se ha utilizado para expresar de manera estable y purificar el GDNF de rata (rGDNF) a partir del medio condicionado. Para ello, se obtuvo un fragmento de ADNc que contenía la región codificante del gen de rGDNF mediante PCR del ARN total de cerebro de rata P1 y se clonó en el vector pDEST26 utilizando tecnología Gateway de Invitrogen. Las células BHK se transfectaron con pDEST26-GDNF y los clones de células que expresaban de forma estable el rGDNF seleccionaron con G-418 (Invitrogen). El rGDNF liberado al medio de cultivo se purificó a través de dos etapas que comprendían una cromatografía de intercambio catiónico seguido de una cromatografía de exclusión molecular (Garbayo et al., 2007). Un problema recurrente que se observó cuando se intentó purificar el GDNF de rata del medio de células BHK que expresaban esta proteína fue la copurificación de otra proteína presente en el sobrenadante, que se identificó mediante análisis LC-ESI-MS/MS como IGFBP-5 (se detectaron 16 péptidos correspondientes a IGFBP-5 con una cobertura del 52% de

la cadena peptídica). Después de la cromatografía con SP-Sefarosa, el análisis de las fracciones mediante SDS-PAGE seguido de la tinción con Azul de Coomasie reveló la presencia de dos bandas principales, la superior correspondiente a la IGFBP-5 y la inferior al rGDNF. Las fracciones que contenían los picos de las dos proteínas se solapaban de manera que las fracciones que contenían la mayoría del rGDNF también tenían IGFBP-5. Esta proteína tiene un peso molecular (MW) de 30 kDa y un pI de 8,6, estando presente cuando el dímero de rGDNF se purificó a partir de esta línea celular (figura 1) (Garbayo et al. 2007).

Utilizando el mismo procedimiento se generó una línea de células BHK estable que expresaba el GDNF humano, pero en este caso, las células no eran capaces de producir cantidades adecuadas de hGDNF para permitir el proceso de purificación. Por otro lado, debido al hecho de que las células BHK producen IGFBP-5 a niveles elevados y esta proteína se copurifica con GDNF, se decidió producir hGDNF a partir de una línea celular diferente.

Ejemplo 2: Producción de GDNF glicosilado humano utilizando fibroblastos dérmicos humanos inmortalizados y transducidos con un vector lentiviral que contiene hGDNF

En una estrategia diferente, el hGDNF se expresó utilizando una línea celular de fibroblastos dérmicos humanos inmortalizados y transducidos con un vector lentiviral (pCCL-WPS-hGDNF) que contenía el gen de hGDNF (células MDX-12) (Sajadi et al., 2006). Estas células se crecieron en DMEM con Glutamax suplementado con FBS al 10%, 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. El hGDNF se purificó del medio condicionado (sobrenadante) de las células MDX-12 obteniéndose una cantidad muy baja de hGDNF biológicamente activo.

2.1. Recogida del medio condicionado

Las células MDX-12 se crecieron en un medio con FBS al 10% hasta alcanzar un 80% de confluencia. Después de lavar con PBS, las células se cultivaron en frascos de cultivo de 175 cm² con 22 ml de medio sin suero. El medio condicionado que contenía hGDNF se

recogió cada 48 h y se almacenó a -20°C

2.2. Purificación de hGDNF del medio condicionado

Se utilizó una cantidad total de 20 L de medio condicionado para la purificación de hGDNF. El medio se descongeló, se ajustó el pH a 8,2 con NaOH y el medio se filtró a través de una unidad de filtración de 0,22 µm. El hGDNF se purificó en tres etapas de cromatografía tal como se describe a continuación.

10 Cromatografía 1: Cromatografía de intercambio catiónico

Se procesó una cantidad total de 20 L de medio condicionado de células MDX-12 en dos lotes de 10 L cada uno. La resina de SP-Sefarosa (GE Healthcare Biosciencias) (30 ml) se empaquetó en una columna XK/ 16/20 (GE Healthcare Biosciencias) y se pasaron 15 10 L del medio condicionado que contenía hGDNF a una velocidad de flujo de 3 ml/min durante 2,5 días a 4°C. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón fosfato 10 mM de pH 8,2, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM a la misma velocidad de flujo. El hGDNF unido se eluyó con un gradiente lineal de 0,15 M a 1 M de 20 NaCl en el mismo tampón, a una velocidad de flujo de 0,62 ml/min. Se recogieron fracciones de 2 ml y se analizaron mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie y transferencia Western en condiciones reductoras (Figura 2).

25 La tinción con Azul de Coomassie mostró dos bandas mayoritarias presentes en la mayoría de fracciones (Figura 2A). Una banda correspondiente a una proteína con un MW de 29 kDa que eluía a concentraciones inferiores de sal era la más abundante. La segunda banda de 18 kDa, empezó a eluirse a NaCl 0,5 M y su MW 30 concordaba con el tamaño esperado para el monómero de hGDNF. El análisis por transferencia Western con un anticuerpo específico para hGDNF confirmó que la banda de MW inferior correspondía con este factor neurotrófico (Figura 2B).

35 Con el fin de separar ambas bandas en la siguiente etapa, se procedió a identificar la proteína de 29 kDa mediante espectrometría de masas. El fragmento de gel que contiene la

banda se cortó y se envió para su identificación. El análisis por LC-ESI-MS/MS reveló que la proteína contaminante era la proteína de unión al factor de crecimiento de tipo insulina humana 7 (IGFBP-7) con 20 péptidos que concuerdan con esta proteína, correspondientes al 32% de la secuencia. Este resultado se confirmó mediante transferencia Western con un anticuerpo específico para IGFBP-7 (Figura 2C).

Problema

10 La primera cromatografía no nos permitió obtener hGDNF puro debido a la copurificación de IGFBP-7. Si se comparan las propiedades físico-químicas de la IGFBP-7 y el hGDNF, ambas proteínas son muy similares ya que tienen un pI teórico elevado de 8,3 y 9,26, respectivamente, por lo que ambas se unen al intercambiador de cationes. Aunque la IGFBP-7 tiene un pI inferior y, por tanto, eluye a una concentración de sal inferior que el hGDNF (figura 2A), la abundancia de IGFBP-7, ensancha su pico solapándose con el pico correspondiente a la elución del hGDNF. El hGDNF es una proteína homodimérica con un MW muy similar al de IGFBP-7. Debido a la abundancia de ambas proteínas en las mismas fracciones, no es posible separarlas mediante cromatografía de filtración en gel. Con el fin de poder de continuar con la purificación de hGDNF, sólo las fracciones (29 a 40) con una cantidad baja de IGFBP-7 se pueden utilizar para continuar el proceso de purificación, teniendo que descartar las fracciones que contienen la mayoría del hGDNF recombinante.

Cromatografía 2: cromatografía de intercambio catiónico

Dado que la principal diferencia físico-química entre ambas proteínas es el pI, las fracciones que contenían hGDNF y una cantidad baja de IGFBP-7 se repitió la cromatografía de intercambio catiónico. Para ello únicamente se utilizaron las fracciones (29-40) eluidas de la primera cromatografía de intercambio catiónico (24 ml), que contenían aproximadamente NaCl 0,7 M. El conjunto de las fracciones se diluyó 4,6 veces en tampón fosfato 10 mM, pH 8,2, EDTA 5 mM para conseguir una concentración de NaCl de 0,15 mM y se cargaron de nuevo sobre la

misma columna de intercambio catiónico. La cromatografía se realizó bajo las mismas condiciones que la cromatografía 1 y los resultados fueron muy similares. En esta etapa, fue posible separar ligeramente los picos de ambas proteínas. De esta manera, el proceso de purificación continuó con el mismo grupo de fracciones (29-40) enriquecidas en hGDNF, pero que todavía contenían menos IGFBP-7.

Cromatografía 3: Filtración en gel

10 Para continuar la purificación de hGDNF, el grupo de fracciones seleccionadas de la segunda cromatografía (24 ml) se desalaron hasta NaCl 50 mM en tampón fosfato 10 mM pH 8,2 utilizando una columna de desalado HiPrep 26/10 (GE Healthcare Biosciences) en un FPLC AKTA purifier (GE Healthcare Biosciences) a una
15 velocidad de flujo de 3 ml/min. La concentración de proteína se monitorizó a lo largo del proceso y todas las fracciones que contenían proteína se recogieron y agruparon. En esta etapa, el volumen inicial se diluyó 1,5 veces. Dado que el volumen de carga máximo en esta columna es de 15 ml, esta cromatografía se
20 realizó en dos etapas (2 x 12 ml).

La muestra se concentró mediante liofilización y se resuspendió en el volumen más pequeño posible (3 ml). Finalmente, las fracciones que contenían proteínas se cargaron en una Superdex 200 HR 10/30 (GE Healthcare Biosciences) utilizando el FPLC
25 AKTA purifier a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min. Se recogieron fracciones de 0,5 ml y se analizaron por SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomasie. El cromatograma mostró un pico muy estrecho que eluyó a 16 ml y que correspondía a IGFBP-7 y un pico más amplio que contenía las diferentes formas
30 de hGDNF glicosilado que eluyó a 19 ml (Figura 3A). Cuando se analizaron las fracciones de hGDNF mediante tinción con Azul de Coomasie (Figura 3B), algunas de ellas aún contenían la proteína contaminante y se descartaron para posteriores estudios. Las fracciones que contenían hGDNF puro se liofilizaron y
35 almacenaron a -80°C.

Conclusión:

Utilizando este protocolo ha sido posible purificar $107 \pm 22 \mu\text{g}$ de hGDNF glicosilado, que es aproximadamente el 1% del GDNF contenido en la muestra inicial. Sin embargo, el procedimiento para obtener esta pequeña cantidad de proteína es muy laborioso y requiere mucho tiempo, ya que se parte de una gran cantidad de medio condicionado (20 L), obtenida a su vez de una gran cantidad de células. El tiempo total del proceso de purificación de hGDNF a partir del medio condicionado es de 16 días. Esto incluye las etapas descritas anteriormente, que se resumen en la figura 8 (panel izquierdo), junto con el análisis de proteínas (SDS-PAGE, tinción con Azul de Coomassie y transferencia Western) realizadas después de cada purificación para determinar las fracciones que contienen hGDNF con una contaminación menor de IGFBP-7. No obstante, el principal problema es el nivel elevado de co-purificación de IGFBP-7 que fuerza a descartar la mayoría de las fracciones que contienen hGDNF para obtener una proteína pura.

Ejemplo 3: Producción y purificación de GDNF glicosilado humano de células de mamífero transfectadas o infectadas con un vector del virus de Semliki Forest que expresa hGDNF (SFV-hGDNF)

3.1. Construcción del vector SFV-hGDNF

El cDNA completo correspondiente al hGDNF se amplificó mediante PCR a partir de una línea celular de astrocitos humanos, SVGp12 (Moretto et al., 1996) y se clonó en el plásmido pDONR201 (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cebadores utilizados fueron: 5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCTTAAGATGAAGTTATGGGATGTCG-3' (SEC ID NO: 6), y 5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTTTCAGATACATCCACACCTTTTAGCG-3' (SEC ID NO:7), donde las secuencias subrayadas hibridan con los extremos 5' y 3' del gen de hGDNF, respectivamente. Para la preparación del vector de expresión de SFV-hGDNF, se amplificó el gen de hGDNF mediante PCR del plásmido pDONR201-GDNF utilizando los siguientes cebadores: 5'-CGTAGTACGTA**ccccggg**AAGTTATGGGATGTCGTGGC-3' (SEC ID NO:8) donde la secuencia subrayada hibrida con el extremo 5' del gen de hGDNF y

5'-CGTAGTACGTA**ccccggg**TCAGATACATCCACACCTTTTAGC-3' (SEC ID NO:9)
donde la secuencia subrayada es complementaria al extremo 3' del
gen de hGDNF (codón de parada en cursiva). Se obtuvo un
fragmento de 0,67 kb que se digirió con Xma I (sitios indicados
5 en negrita) y se clonó en el sitio Xma I único de pSFV-b12A
(Rodríguez-Madoz et al., 2005), generando el plásmido pSFV-
hGDNF. El gen de hGDNF se clonó en fase con la secuencia que
codifica para los primeros 34 aminoácidos de la cápside de SFV
(B1) y la autoproteasa 2A de FMDV. La primera metionina de hGDNF
10 se eliminó, ya que la proteína se expresará como un producto de
fusión que se escindirán autocatalíticamente por la proteasa 2A.
La estructura del vector se representa en la figura 4A.

15 3.2. Expresión de hGDNF en células BHK transfectadas con el vector SFV-hGDNF

Se linearizó el plásmido pSFV-hGDNF con SpeI y se utilizó como
molde para la síntesis de ARN utilizando SP6 polimerasa tal como
se ha descrito previamente (Liljestrom y Garoff, 1994).
Brevemente, se incubaron 1,5 µg de ADN de pSFV-hGDNF linealizado
20 durante 1 h a 37°C en tampón SP6 suplementado con 1 mM de
m⁷G(5')ppp(5')G (New England Biolabs), DTT 10 mM, una mezcla de
rNTPs 1 mM, 50 unidades de inhibidor de ARNasa (Promega), y 30
unidades de SP6 ARN polimerasa (New England Biolabs) en un
volumen final de 50 µl, produciendo 50 µg de ARN. Se mezclaron
25 aproximadamente 25 µg de ARN sintetizado in vitro con 5x10⁶
células BHK-21 y se electroporaron en una cubeta de 0,4 cm
mediante la aplicación de dos pulsos consecutivos a 800 V y 25
µF. Estas condiciones de electroporación se utilizan de forma
rutinaria con el sistema de SFV y permiten la transfección de
30 más del 95% de las células. Después de la electroporación, las
células se diluyeron en 15 ml de medio completo de BHK (Glasgow
MEM, Gibco BRL, UK, suplementado con FBS al 5%, caldo triptosa
fosfato al 10%, glutamina 2 mM, HEPES 20 mM, estreptomycin 100
µg/ml y penicilina 100 IU/ml), sembrados en placas de 6 pocillos
35 (1,5 ml/placa) y se incubaron a 37°C con CO₂ al 5%. Después de 4
h, se extrajo el medio y se sustituyó por 1 ml de medio completo
de BHK sin FBS. 20h más tarde, se recogieron los sobrenadantes

y se analizaron mediante transferencia Western con un anticuerpo específico para GDNF (Figura 4B). Se observó una expresión muy elevada de hGDNF en dos experimentos por duplicado (canales 1 y 2). La proteína presentaba un patrón de glicosilación similar al obtenido en el hGDNF secretado por células MDX-12 (lenti GDNF), pero mucho más complejo que el observado en GDNF de rata expresado a partir de un vector de baculovirus en células de insectos (GDNF de insecto) (R&D systems).

10 3.3 Síntesis diferencial de proteínas en células BHK transfectadas con vector SFV-hGDNF

Se electroporaron 5×10^6 células BHK por duplicado con ARN de SFV-hGDNF y sin ARN (control) tal como se ha descrito. Se pusieron en tres placas de 35 cm² con 5×10^5 células de cada electroporación y se incubaron con medio completo BHK a 33°C con CO₂ al 5%. En una placa de cada electroporación se eliminó el medio a las 4 horas después del plaqueo, se lavaron las células dos veces con PBS y se añadió 1 ml del mismo medio sin suero. En la segunda y tercera placa, se siguió el mismo procedimiento, pero cambiando el medio a las 6 h u 8 h después de la electroporación. Se analizaron todos los sobrenadantes mediante transferencia Western con anticuerpos contra GDNF, IGFBP-5, o IGFBP-4, una proteína que también es producida normalmente por células BHK (figura 5B). El nivel de expresión de hGDNF en células electroporadas con SFV-hGDNF de dos experimentos duplicados fue muy similar. Sin embargo, la IGFBP-5 no se pudo detectar en el sobrenadante de células transfectadas con SFV-hGDNF. En cambio, se detectó una expresión elevada de IGFBP-5 en las células control. La expresión de otras proteínas secretadas normalmente por células BHK, como IGFBP-4, también desapareció completamente en células transfectadas con el vector de SFV (Figura 5B).

3.4 Optimización

35 La expresión de hGDNF en células BHK electroporadas con SFV-hGDNF se optimizó mediante el ensayo con diferentes temperaturas y tiempos de incubación (véase la Tabla 1).

Se electroporaron células BHK con ARN de SFV-hGDNF tal como se ha descrito. Se pusieron aproximadamente 5×10^5 células electroporadas en placas de 35 cm^2 y se incubaron con medio completo BHK a 33°C con CO_2 al 5% durante diferentes tiempos que llamaremos "Inhibición". Después de 1 tiempo de inhibición se eliminó el medio, se lavaron las placas 2 veces con PBS y se añadió 1 ml de medio completo de BHK sin suero. Se incubaron las células durante diferentes tiempos que denominaremos "Incubación" y se recogieron los sobrenadantes. La presencia de hGDNF en cada sobrenadante se determinó mediante transferencia Western. Dado que la cantidad de proteínas endógenas presentes en el medio de cultivo de células BHK transfectadas con el vector SFV-hGDNF fue muy baja, se concentraron 400 μl de cada sobrenadante mediante precipitación con ácido tricloroacético. Con el fin de evaluar la eficacia de la inhibición de la síntesis de proteínas endógenas celulares, se analizó la presencia de IGFBP-4, que es secretada de manera eficaz por células BHK, mediante transferencia Western en las muestras concentradas. La cantidad relativa de hGDNF (en muestras no concentradas) e IGFBP-4 (en muestras concentradas) se estimó midiendo la densidad óptica (DO) de cada banda. El mayor rendimiento de hGDNF con ausencia total de expresión de IGFBP-4 se obtuvo cuando el tiempo de inhibición fue de 8 h y el de incubación de 24 h, incubando las células en ambos periodos a 33°C (Tabla 1). Estas condiciones se utilizaron en experimentos de purificación (parte 3.5.)

Tabla 1: Optimización de la expresión de hGDNF en células BHK electroporadas con SFV-hGDNF

30

| Inhibición | | Incubación | | DO | | Ratio GDNF/IGFBP -4 |
|------------------------|-------------------|---------------------|----------------|-------|-------------|---------------------------|
| T ^a (°C) | Tiem po (h) | T ^a (°C) | Tiemp o (h) | GDNF | IGFBP -4 | |
| 37 | 4 | 37 | 24 | 44,74 | 12,32 | 3,63 |

| | | | | | | |
|----|----|----|----|--------|-------|------|
| 37 | 8 | 37 | 24 | 33,32 | 0 | ∞ |
| 37 | 4 | 33 | 24 | 57,50 | 10,49 | 5,48 |
| 37 | 8 | 33 | 24 | 42,75 | 0 | ∞ |
| 37 | 4 | 33 | 48 | 70,74 | 50,39 | 1,40 |
| 37 | 8 | 33 | 48 | 86,76 | 54,98 | 1,58 |
| 33 | 4 | 33 | 24 | 72,47 | 35,40 | 2,05 |
| 33 | 8 | 33 | 24 | 49,04 | 0 | ∞ |
| 33 | 12 | 33 | 24 | 43,78 | 0 | ∞ |
| 33 | 24 | 33 | 24 | 31,97 | 14,07 | 2,27 |
| 33 | 4 | 33 | 48 | 100,44 | 44,22 | 2,27 |
| 33 | 8 | 33 | 48 | 67,65 | 15,57 | 4,34 |
| 33 | 12 | 33 | 48 | 65,53 | 20,61 | 3,18 |
| 33 | 24 | 33 | 48 | 39,51 | 86,22 | 0,46 |

3.5. Purificación de hGDNF del medio condicionado de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF

5 *Purificación 1*

- Se electroporaron un total de 10^8 células BHK con 500 µg de ARN de SFV-hGDNF sintetizado in vitro tal como se ha descrito (20 electroporaciones de 5×10^6 células BHK con 25 µg de cada ARN).
- 10 Las células electroporadas se agruparon, se resuspendieron en un volumen total de 200 ml de medio completo BHK, y se distribuyeron en 10 frascos de cultivo de 75 cm². Después de 8 horas de incubación a 33° C con CO₂ al 5%, se eliminó el medio, las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS (cada frasco),
- 15 y se añadieron 10 ml de medio completo BHK sin FBS. 24 h después, se recogió el medio condicionado de todos los frascos, se centrifugó a 1200 rpm para eliminar restos celulares y se congeló.
- 20 La purificación de hGDNF se realizó a partir de un volumen total de 95 ml de medio condicionado de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF. El medio se descongeló, se ajustó el pH a 8,2 con NaOH y se filtró a través de una unidad de filtración de 0,22

µm. Como en el protocolo anterior, la muestra se pasó a través de la resina SP-Sefarosa (0,2 ml). En este caso, la resina se empaquetó en una columna desechable (Bio-Rad) y la muestra se dejó fluir a través de la columna por gravedad a 4°C. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón fosfato 10 mM a pH 8,2, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM. Dado que el hGDNF es la principal proteína presente en el medio condicionado, la proteína unida a la resina se eluyó en una única etapa con 2 ml de NaCl 0,5 M. Además se realizó una elución adicional con NaCl 1 M para asegurar que todo el hGDNF unido se había eluido de la resina.

La única proteína presente en la elución era hGDNF, tal como se detecta mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie (figura 6A) y confirmado mediante transferencia Western (Figura 6B). El hGDNF presente en el medio condicionado y en el eluido de la columna de intercambio catiónico se cuantificó mediante ELISA. En resumen se partió de una cantidad inicial de 62 µg de hGDNF en 95 ml de medio y se obtuvieron 16 µg de hGDNF en 2 ml, recuperando así el 26% de la proteína contenida en la muestra inicial. Este proceso de purificación global duró solo tres días (Figura 8).

Purificación 2

Se electroporaron un total de 5×10^8 células BHK con 2500 µg de ARN de SFV-hGDNF sintetizado in vitro tal como se ha descrito (100 electroporaciones de 5×10^6 células BHK con 25 µg de cada ARN). Las células electroporadas se agruparon, se resuspendieron en un volumen total de 600 ml de medio completo BHK, y se distribuyeron en 50 frascos de cultivo de 75 cm². Después de 8 horas de incubación a 33° C con CO₂ al 5%, se eliminó el medio, las células se lavaron dos veces con 10 ml de PBS (cada frasco), y se añadieron 10 ml de medio completo BHK sin FBS. 24 h después, se recogió el medio condicionado de todos los frascos, se centrifugó a 1200 rpm para eliminar restos celulares y se congeló.

La purificación de hGDNF se realizó a partir de un volumen total de 570 ml de medio condicionado de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF. El medio se descongeló, se ajustó el pH a 8,2 con NaOH y se filtró a través de una unidad de filtración de 0,22 μm . Como en el protocolo anterior, la muestra se pasó a través de la resina SP-Sefarosa (0,2 ml). En este caso, la resina se empaquetó en una columna desechable (Bio-Rad) y la muestra se dejó fluir a través de la columna por gravedad a 4°C. La columna se lavó con 10 volúmenes de columna (CV) de tampón fosfato 10 mM a pH 8,2, NaCl 150 mM y EDTA 5 mM. Dado que el hGDNF es la principal proteína presente en el medio condicionado, la proteína unida a la resina se eluyó en una única etapa con 0.4 ml de NaCl 0,5 M. Además se realizó una elución adicional con NaCl 1 M para asegurar que todo el hGDNF unido se había eluido de la resina.

La única proteína presente en la elución era hGDNF, tal como se detectó mediante SDS-PAGE seguido de tinción con Azul de Coomassie y confirmado mediante transferencia Western. El hGDNF presente en el medio condicionado y en el eluido de la columna de intercambio catiónico se cuantificó mediante ELISA. En resumen se partió de una cantidad inicial de 756 μg de hGDNF en 570 ml de medio y se obtuvieron 445 μg de hGDNF en un volumen de 0.4 ml, recuperando así el 58% de la proteína contenida en la muestra inicial. Este proceso de purificación global duró solo cinco días (Figura 8).

3.6 Bioactividad del hGDNF purificado de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF

Para comprobar la actividad biológica del hGDNF purificado, se añadieron 50 ng/ml al medio de cultivo de baja densidad (2×10^3 células/cm²) de células PC12 crecidas en placas recubiertas por colágeno. La Figura 7 muestra que el hGDNF glicosilado induce el crecimiento de neuritas en células PC12 de la misma manera que el hGDNF comercial no glicosilado (Invitrogen), que fue usado como control positivo.

3.7 Estabilidad del hGDNF purificado de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF

Para analizar la estabilidad del GDNF glicosilado humano obtenido, 220 ng de GDNF glicosilado humano purificado de células BHK transfectadas con SFV-hGDNF y la misma cantidad de GDNF no glicosilada de E. coli (ProSpec) se incubaron en 220 µl de tampón fosfato a pH 7,4 a temperatura ambiente. Se tomaron alícuotas de 10 ml a las 24, 48, 96 horas, 1, 2 y 3 semanas y se analizó la presencia de hGDNF mediante transferencia Western. La figura 9 muestra un panel superior correspondiente al hGDNF glicosilado y un panel inferior correspondiente al hGDNF no glicosilado. Es posible apreciar cómo la mayoría de la proteína no glicosilada se degrada después de 24 horas de incubación y desaparece después de 48 horas. Sin embargo, el hGDNF glicosilado aún está presente después de 3 semanas de incubación a temperatura ambiente.

Conclusión:

Dado que el hGDNF glicosilado no está comercialmente disponible, se han descrito previamente métodos para purificar GDNF glicosilado (Garbayo et al., 2007 and Ansorena et al., 2009) a partir de células de mamífero y se ha utilizado la misma metodología con algunas modificaciones para obtener hGDNF glicosilado puro. Sin embargo, esta metodología es extremadamente laboriosa y requiere de mucho tiempo para producir cantidades elevadas de hGDNF con fines clínicos. En el presente estudio, se propone un método nuevo y sencillo para obtener cantidades elevadas de hGDNF purificado. Se ha demostrado que en células BHK transfectadas con un vector SFV que expresa hGDNF, esta proteína se produce a niveles elevados en el sobrenadante. Si se elimina el medio celular aproximadamente 8 horas después de la transfección, el hGDNF se convierte en la única proteína expresada en los sobrenadantes de estas células, ya que el vector de SFV induce una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas celulares endógenas. Esto hace que la purificación de hGDNF sea muy sencilla y eficaz, especialmente porque las proteínas endógenas que eran difíciles

de eliminar en el proceso de purificación, como la IGFBP-5, han dejado de ser expresadas por las células productoras. Además, el hGDNF producido con este método está altamente glicosilado, lo que hace la proteína más estable y probablemente menos
5 inmunogénica, a diferencia del hGDNF producido utilizando sistemas bacterianos.

El hGDNF glicosilado podría ser muy útil para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson u otros trastornos degenerativos, ya
10 que su mayor estabilidad sugiere que serían necesarias dosis menores de esta proteína para el uso terapéutico en comparación con hGDNF no glicosilado.

Referencias

- 15 Ansorena E, Garbayo E, Lanciego JL, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. Production of highly pure human glycosylated GDNF in a mammalian cell line. Int J Pharm. 2010 Jan 29;385(1-2):6-11. Epub 2009 Oct 13.;
- Blasey HD, Lundström K, Tate S, Bernard AR. Recombinant protein
20 production using the Semliki Forest Virus expression system. Cytotechnology, 1997; 24: 65-72.
- Forsman T, Lautala P, Lundström K, Monastyrskaia K, Ouzzine M, Burchell B, Taskinen J, Ulmanen I. Life Sci. 2000 Oct 6;67(20):2473-2484.
- 25 Garbayo E, Ansorena E, Lanciego JL, Aymerich MS, Blanco-Prieto MJ. Purification of bioactive glycosylated recombinant glial cell line-derived neurotrophic factor. Int J Pharm 2007; 344: 9-15.
- Liljestrom, P., and H. Garoff. 1991. A new generation of animal
30 cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. Biotechnology (N Y) 9:1356-61.
- Liljestrom P, Garoff H. Expression of proteins using Semliki Forest virus vectors. In *Current protocols in molecular biology* (F. M. Ausubel, et al., Eds.), pp. 16.20.11-16.20.16. Greene
35 Publishing Associates and Wiley Interscience, New York, N.Y. 1994.

- Lin LF, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F. GDNF: a glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *Science* 1993; 260: 1130-2.
- Lundstrom K. Semliki Forest virus vectors for large-scale
5 production of recombinant proteins. *Methods Mol Med* 2003a; 76: 525-43.
- Moretto G, Walker DG, Lanteri P, Taioli F, Zaffagnini S, Xu RY, et al. Expression and regulation of glial-cell-line-derived neurotrophic factor (GDNF) mRNA in human astrocytes in vitro.
10 *Cell Tissue Res* 1996; 286: 257-62.
- Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R. E., and Smith, J. F. (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against
15 heterologous pathogens in vivo. *Virology*. 239: 389-401.
- Rodriguez-Madoz JR, Prieto J, Smerdou C. Semliki forest virus vectors engineered to express higher IL-12 levels induce efficient elimination of murine colon adenocarcinomas. *Mol Ther* 2005; 12: 153-63.
- 20 Ryan MD, Drew J. Foot-and-mouth disease virus 2A oligopeptide mediated cleavage of an artificial polyprotein. *Embo J* 1994; 13: 928-33.
- Sajadi A, Bensadoun JC, Schneider BL, Lo Bianco C, Aebischer P. Transient striatal delivery of GDNF via encapsulated cells leads
25 to sustained behavioral improvement in a bilateral model of Parkinson disease. *Neurobiol Dis* 2006; 22: 119-29.
- Smerdou, C., and P. Liljestrom. 1999. Two-helper RNA system for production of recombinant Semliki forest virus particles. *J Virol* **73**:1092-8.
- 30 Walsh G, Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol* 2006; 24: 1241-52.
- Xiong, C., Levis, R., Shen, P., Schlesinger, S., Rice, C. M., and Huang, H. V. (1989). Sindbis virus: an efficient, broad host
35 range vector for gene expression in animal cells. *Science*. 243: 1188-1191.

REIVINDICACIONES

1. Método para la producción de GDNF recombinante humano, o de una variante funcionalmente equivalente del mismo, que comprende:
 - a) proporcionar células eucariotas que comprenden un vector de expresión de alfavirus, comprendiendo dicho vector los ácidos nucleicos de i) una secuencia 5' capaz de dirigir la replicación del alfavirus; ii) una secuencia que codifica para proteínas no estructurales capaces de dirigir la replicación del ARN alfaviral; iii) un promotor subgenómico del alfavirus; iv) una secuencia que codifica una proteína GDNF humana recombinante, o una variante funcionalmente equivalente de la misma, unida operativamente al promotor subgenómico que dirige la expresión de la proteína en las células eucariotas; v) una secuencia 3' capaz de dirigir la replicación del alfavirus;
 - b) cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo hasta que se inhiba la síntesis de proteínas endógenas celulares;
 - c) eliminar el sobrenadante;
 - d) cultivar o incubar dichas células eucariotas en un medio de cultivo durante un periodo de tiempo, de manera que se consigue la expresión de la proteína GDNF recombinante, pero sin muerte celular; y
 - e) purificar el GDNF recombinante del medio de cultivo.
2. Método según la reivindicación 1, que comprende además una etapa f) de purificación de la proteína hGDNF recombinante mediante cromatografía.
3. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el cultivo o la incubación de las etapas b) o d) se realiza a una temperatura entre 30° y 40° C durante un periodo de tiempo de 2 a 50 horas.

4. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en el que el cultivo o la incubación de la etapa b) se realiza a una temperatura de 33° C durante 8 horas.
- 5 5. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el cultivo o la incubación de la etapa d) se realiza a una temperatura de 33° C durante 24 horas.
6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en
10 donde las condiciones de las etapas b) y d) se seleccionan del grupo consistente en:
- (i) la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 37° durante aproximadamente 8 h y la etapa d) se lleva a
15 cabo a aproximadamente 37° durante aproximadamente 24h;
- (ii) la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 37° durante aproximadamente 8 h y la etapa d) se lleva a
cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 24h;
- 20 (iii) la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 8 h y la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 24h y
- (iv) la etapa b) se lleva a cabo a aproximadamente 33°
25 durante aproximadamente 12 h y la etapa d) se lleva a cabo a aproximadamente 33° durante aproximadamente 24h.
7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el
30 que el vector de expresión de alfavirus comprende además un vector de ARN transcrito in vitro.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el
35 que el vector de expresión de alfavirus comprende además partículas virales que comprenden ARN de vector de alfavirus.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que el vector de expresión de alfavirus comprende además un promotor que es reconocible por una ARN polimerasa eucariota.
- 5
10. Método según la reivindicación 9, en el que el promotor reconocible por una ARN polimerasa eucariota es el promotor de citomegalovirus (CMV).
- 10 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en el que el vector de expresión de alfavirus comprende además una secuencia que codifica para una proteína con actividad potenciadora de la traducción.
- 15 12. Método según la reivindicación 11, en el que la secuencia que codifica para una proteína con actividad potenciadora de la traducción es la secuencia que codifica por lo menos los primeros 34 aminoácidos de la cápside del virus de Semliki Forest (SFV).
- 20
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 11 y 12, en el que el vector de expresión de alfavirus comprende además una secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o una secuencia diana para una proteasa celular.
- 25
14. Método según la reivindicación 13, en el que la secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular se expresa en fase con la secuencia con actividad potenciadora de la traducción.
- 30
15. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-14, en el que la secuencia que codifica una proteasa de auto-escisión es la autoproteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV).
- 35 16. Método según cualquiera de las reivindicaciones 13-15, en el que la secuencia de nucleótidos que codifica para el GDNF recombinante humano, o una variante funcionalmente

equivalente del mismo, se fusiona en fase y en posición 3' con la secuencia que codifica para la proteasa de auto-escisión o la secuencia diana para una proteasa celular.

- 5 17. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-16, en el que el alfavirus es SFV.
18. Método según cualquiera de las reivindicaciones 1-17, en el que las células eucariotas son células de mamífero
10 seleccionadas entre BHK, CHO, VERO, y células de glioma C6 glioma.
19. Vector de expresión de alfavirus tal como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1-18.
- 15 20. Vector de expresión de alfavirus según la reivindicación 19 en donde dicho vector es citopático.
21. Partícula alfaviral que comprende los ácidos nucleicos
20 definidos para el vector de expresión de alfavirus según las reivindicaciones 1-20.
22. Célula eucariota que comprende un vector de expresión de alfavirus tal como se define en cualquiera de las
25 reivindicaciones 1-20.
23. Proteína de fusión que comprende la proteína de la cápside de SFV unida al GDNF humano, o una variante funcionalmente equivalente del mismo.
- 30 24. Uso del vector de expresión de alfavirus según las reivindicaciones 19 o 20 para la producción del GDNF recombinante humano, o variantes funcionalmente equivalentes del mismo.
- 35 25. Uso de una partícula alfaviral según la reivindicación 21, para la producción del GDNF recombinante humano, o variantes

funcionalmente equivalentes del mismo.

26. Uso de una célula eucariota según la reivindicación 22, para la producción del GDNF recombinante humano, o variantes funcionalmente equivalentes del mismo.
- 5
27. Una composición que comprende GDNF humano o una variante funcionalmente equivalente de GDNF en donde el GDNF se encuentra glicosilado y en donde la composición
- 10 (i) comprende un porcentaje de GDNF en peso con respecto al total de proteína en la composición superior a 90% y/o
- (ii) se encuentra sustancialmente libre de IGFBP-4, IGFBP-5 y/o IGFBP-7.
- 15
28. Una composición según la reivindicación 27 para su uso en medicina.
29. Una composición según la reivindicación 27 para su uso en el
- 20 tratamiento o la prevención de un trastorno neurodegenerativo.

FIGURA 1

Fracciones

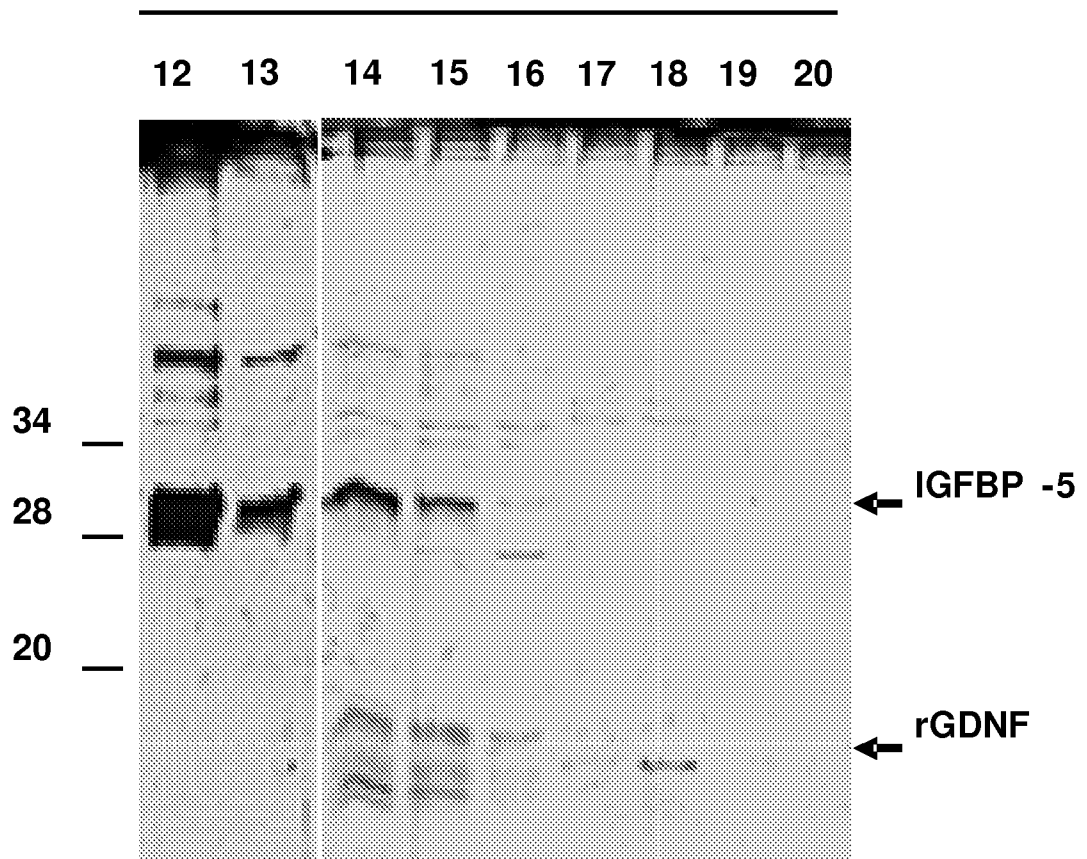


FIGURA 2

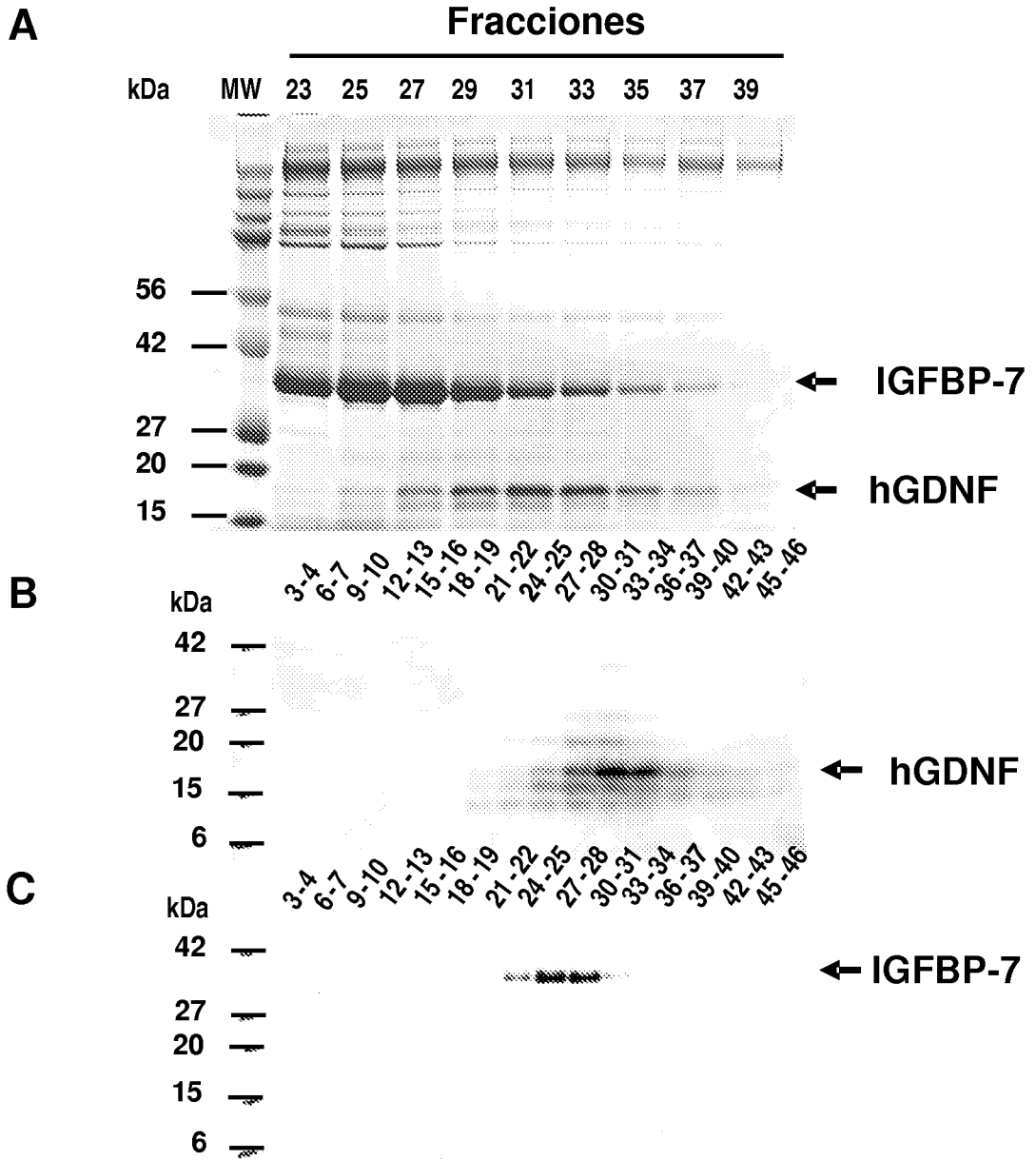


FIGURA 3

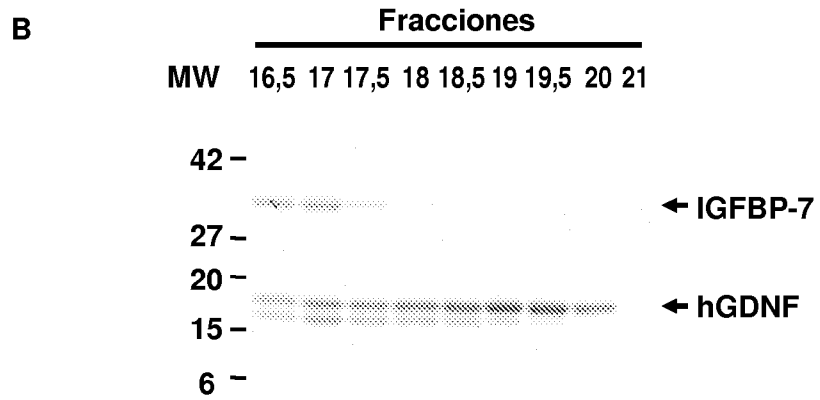
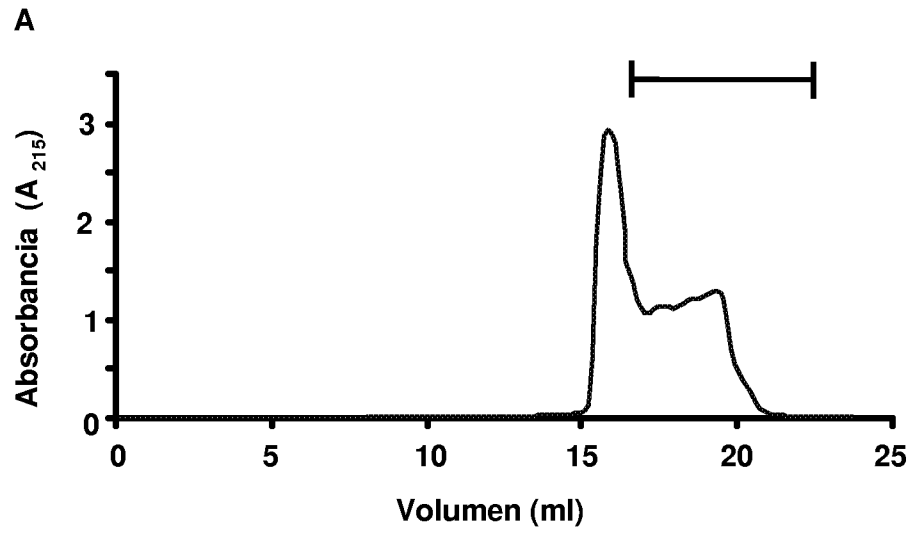


FIGURA 4

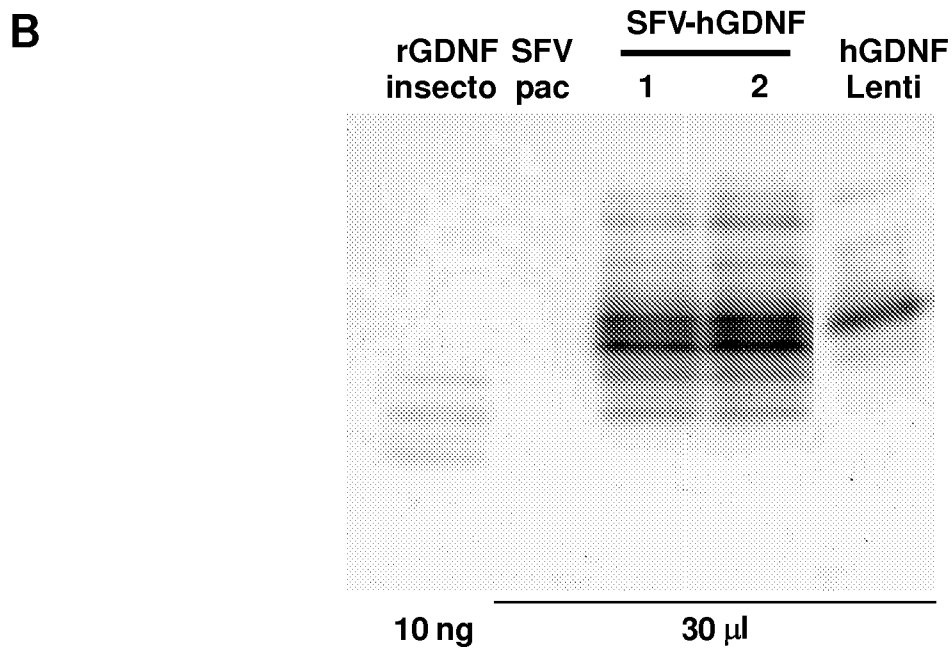
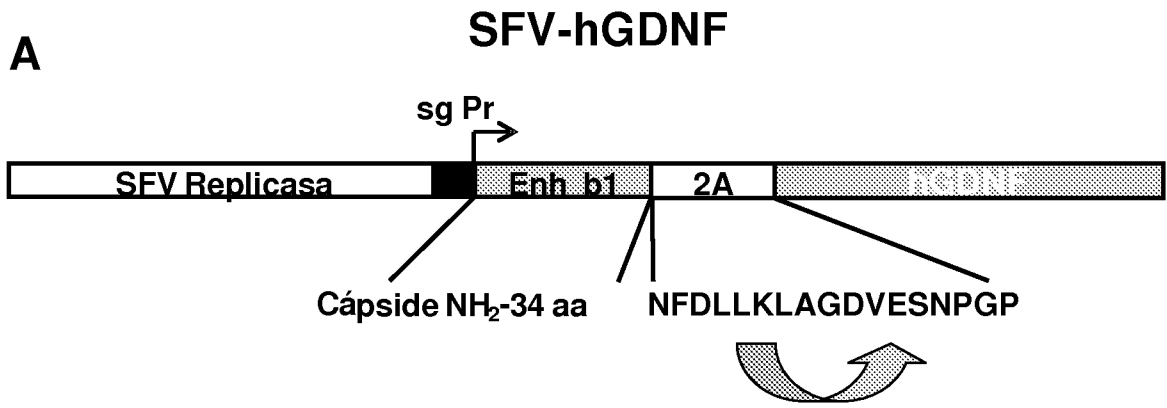


FIGURA 5

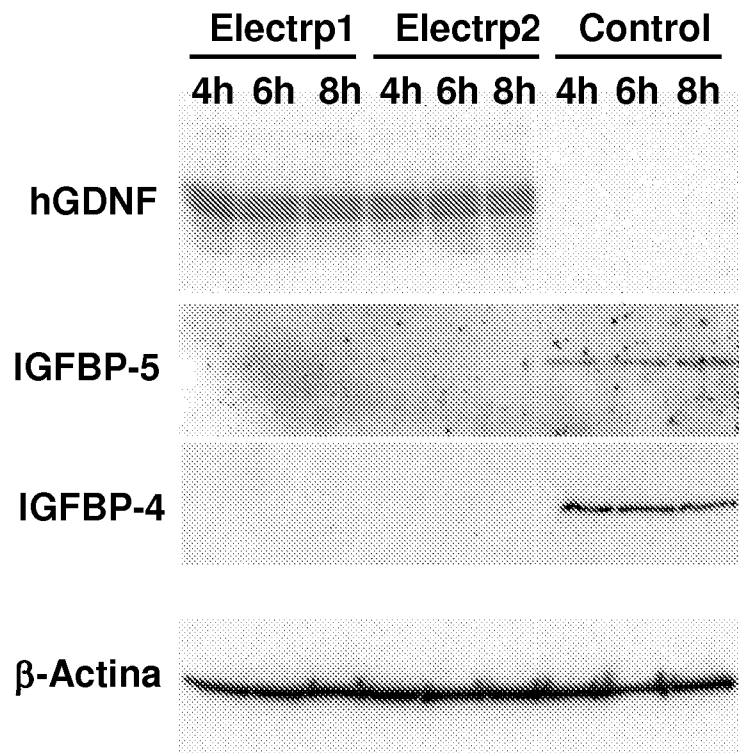


FIGURA 6

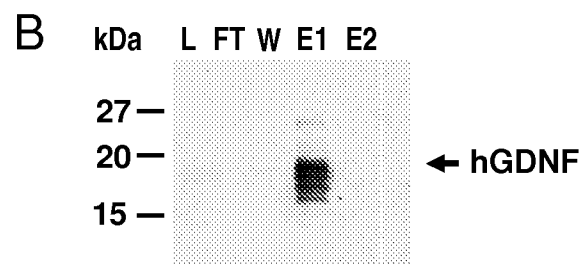
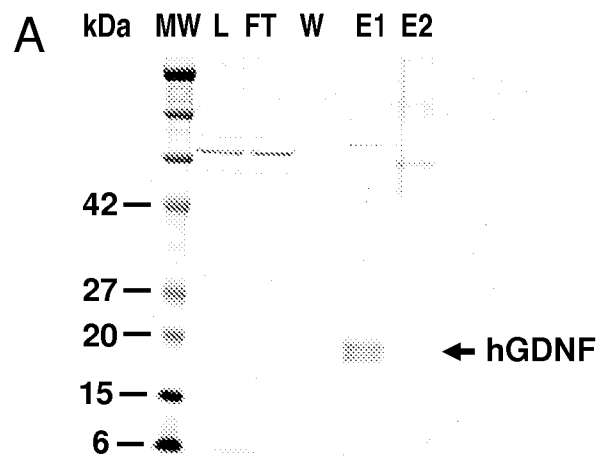
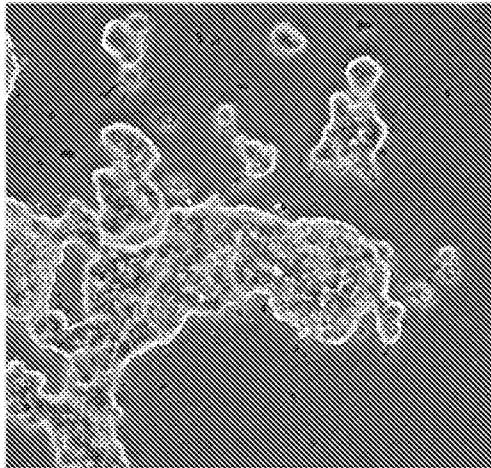
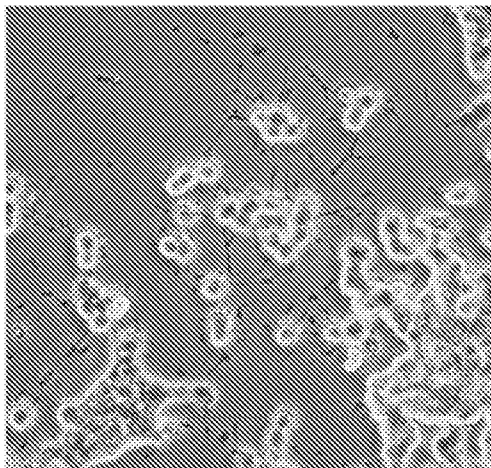


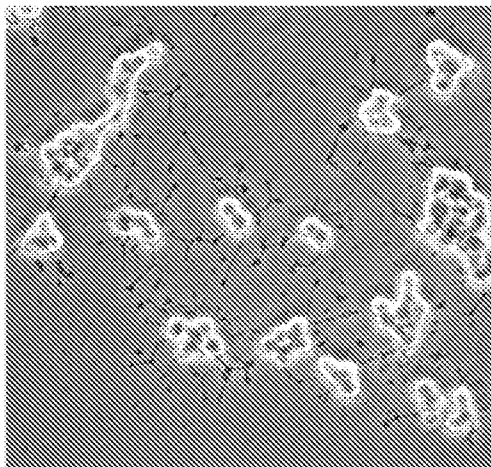
FIGURA 7



control



hGDNF glicosilado



hGDNF no glicosilado

FIGURA 8

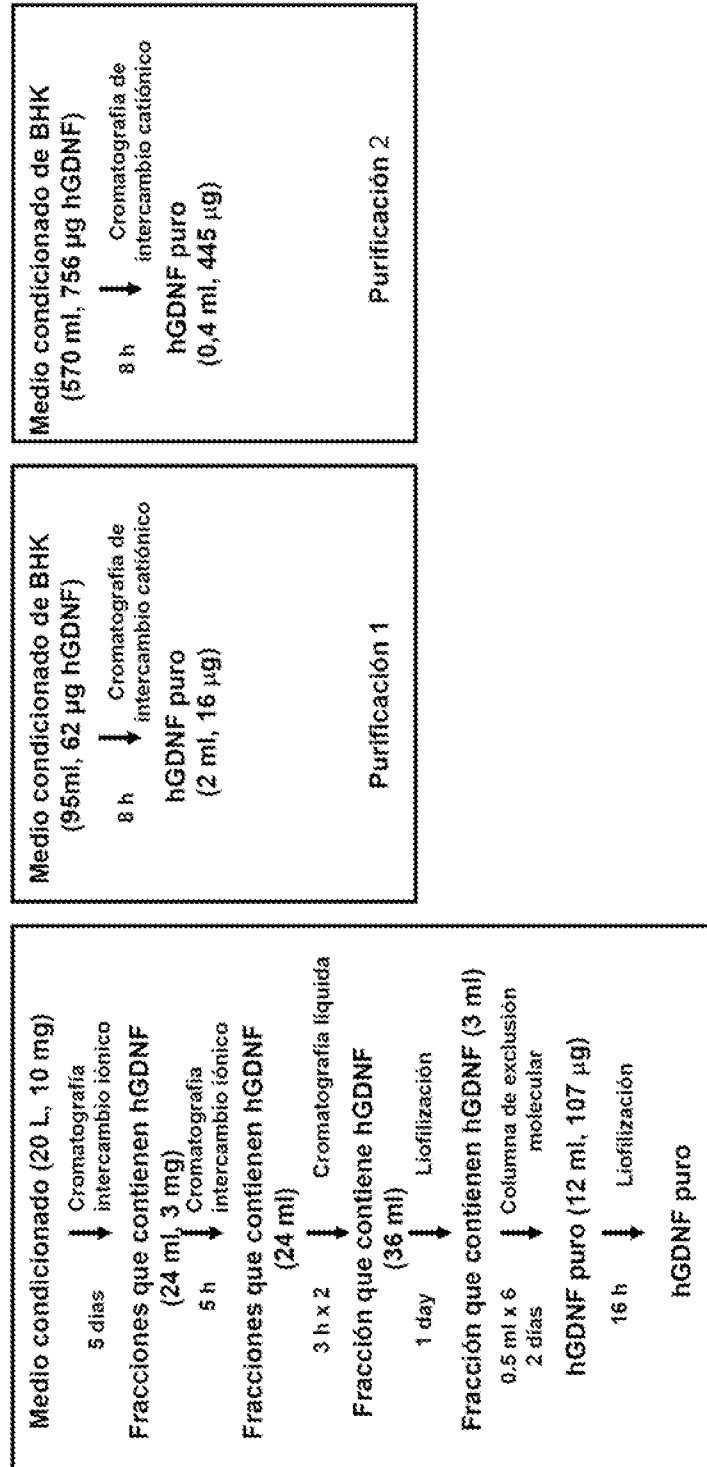


FIGURA 9

