

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 395 232**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/435** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2010** **E 10003549 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **27.10.2010** **EP 2243793**

54 Título: **Una composición acuosa estabilizada de alfa-galactosidasa y métodos relacionados con la misma**

30 Prioridad:

**24.04.2009 EP 09005753**

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

**11.02.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**HOELKE, WERNER;**  
**MUELLER, RAINER;**  
**SCHMIDT, MANFRED;**  
**SOBEK, HARALD y**  
**THALHOFER, JOHANN-PETER**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 395 232 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Una composición acuosa estabilizada de alfa-galactosidasa y métodos relacionados con la misma

La presente invención está relacionada con una composición acuosa que comprende una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa. La presente invención está relacionada además con un método para estabilizar una composición acuosa que comprende una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa, así como a un método para preparar una composición acuosa purificada que comprende dicha proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa.

El sistema de grupos sanguíneos ABO, descubierto en 1900, juega un papel importante en la transfusión de sangre humana y, en consecuencia, en medicina transfusional. El sistema de grupos sanguíneos ABO está basado en la presencia o ausencia de los antígenos de grupos sanguíneos A y B, respectivamente. Las correspondientes estructuras de carbohidratos de grupos sanguíneos, designadas ABH, se encuentran en la superficie de los eritrocitos, en particular en el extremo de las cadenas de oligosacárido sobre glucoproteínas y glucolípidos. Esto es, el antígeno A que se encuentra en los eritrocitos del grupo sanguíneo A está especificado por una N-acetilgalactosamina  $\alpha$ -1,3-unida (GalNAc) terminal, mientras que el antígeno B del grupo sanguíneo B está especificado por un monosacárido de galactosa  $\alpha$ -1,3-unida (Gal) terminal como monosacárido inmunodominante.

Las enzimas activas sobre los carbohidratos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y han encontrado aplicaciones en muchos procesos biotecnológicos y farmacéuticos (Davies et al., 2005). La eliminación enzimática de los antígenos de grupo sanguíneo ABO para desarrollar glóbulos rojos universales era una visión pionera originalmente propuesta hace más de 25 años. La eliminación enzimática de la N-acetilgalactosamina  $\alpha$ -1,3-unidos y monosacáridos de galactosa  $\alpha$ -1,3- unidos de células sanguíneas del grupo A y B, respectivamente, con lo que ofrece un enfoque atractivo para mejorar la seguridad de las transfusiones y el suministro de sangre total. Originalmente, se previó convertir enzimáticamente los antígenos A y B en los glóbulos rojos de la sangre en antígenos H, respectivamente, mediante el uso de exoglucosidasas para la eliminación selectiva de los residuos  $\alpha$ -GalNAc Y  $\alpha$ -Gal de los antígenos inmunodominantes del trisacárido A y B. Especialmente, las alfa-N-acetilgalactosaminidasas y las alfa-galactosidasas son de particular interés en la conversión enzimática de los glóbulos rojos de la sangre del grupo sanguíneo A, B y AB (WO 03/027245 A2). Mientras que la exoglucosidasa alfa-N-acetilgalactosaminidasa (A-zima) hidroliza específicamente residuos de  $\alpha$ -1,3-GalNAc terminal en los glóbulos rojos de la sangre del grupo A, la exoglucosidasa alfa-galactosidasa (B-zima) hidroliza específicamente residuos de  $\alpha$ -1,3-galactosa terminal en los glóbulos rojos de la sangre del grupo B. Ambas reacciones enzimáticas dan origen a la formación de la estructura común H que se encuentra en los glóbulos rojos de la sangre de grupo O.

Para la conversión de los glóbulos rojos del grupo B, se utilizó en primer lugar una alfa-galactosidasa derivada de granos de café verdes. Se demostró que la conversión enzimática de glóbulos rojos es plausible, y, además, que las células sanguíneas convertidas pueden funcionar en las transfusiones, la implementación clínica no fue posible debido a las grandes cantidades de enzima necesaria. Más recientemente, se describió la utilización de una alfa-galactosidasa de la bacteria marina *Pseudoalteromonas spec.* para eliminar los residuos de galactosa alfa-1,3-unida de eritrocitos del grupo sanguíneo B (Bakunina et al., 1998). Además, se encontraron dos familias de genes bacterianos de glucosidasa que proporciona enzimas capaces de eliminar de forma eficiente los antígenos A y B a pH neutro con un bajo consumo de enzimas recombinantes (Liu et al., 2007). Entre estas había un fragmento recombinante N-terminal de la alfa-galactosidasa derivada del organismo bacteriano *Bacteroides fragilis*.

La tecnología del ADN recombinante ha revolucionado la bioquímica, ya que nació en la década de 1970. Por un lado, debido a la sensibilidad de las técnicas microquímicas recientemente desarrolladas en combinación con la amplificación que ofrece la clonación de genes y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), las proteínas endógenas de células o tejidos de cualquier tipo así como sus ARN mensajeros correspondientes pueden así servir como punto de partida para la clonación y aislamiento de sus correspondientes genes. Por otro lado, la tecnología de ADN recombinante abrió el camino para la producción eficiente a gran escala de los genes así identificados y aislados, ya que permite la introducción de un ADN que codifica una proteína de interés en organismos huésped o en células que crecen en cultivo con el fin de expresar la proteína recombinante. En particular, se consideran las bacterias como huéspedes ideales tanto para la expresión de genes como para la amplificación génica ya que representan fábricas fáciles de manejar para la producción de una amplia gama de proteínas procariotas y eucariotas. La expresión de proteínas recombinantes heterólogas en una célula huésped bacteriana, sin embargo, a menudo resulta en la formación de cuerpos de inclusión que contienen la proteína de interés en forma agregada e insoluble, con la consecuencia de que la proteína expresada no es accesible para una purificación bioquímica adicional. En este caso, la recuperación de proteínas recombinantes requiere la solubilización de cuerpos de inclusión y el repliegamiento de las proteínas en su estructura activa.

Las enzimas alfa-galactosidasa, que están clasificadas como EC 3.2.1.22 por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica, se expresan de forma endógena por una serie de microorganismos, plantas y animales. No obstante, la provisión de composiciones acuosas de enzima in vitro, es muy difícil debido al rápido descenso de la actividad alfa-galactosidasa cuando se almacena en una solución acuosa. En particular, es un problema general en la técnica que las alfa-galactosidasas expresadas recombinantemente formen precipitados insolubles en

ausencia de sal, es decir en tampones con baja conductividad. Esta precipitación ocurre rápidamente, resulta ser irreversible, y se ve favorecida en el contexto de concentraciones altas de proteína. Los métodos de purificación de alfa-galactosidasa conocidos a bajas concentraciones de proteína (para evitar la precipitación), no obstante, no son una opción adecuada para un proceso de producción económicamente útil. Hasta ahora, la precipitación de la enzima por lo general ha sido impedido por la adición de sal en una concentración adecuada. Por lo tanto, un tampón que contiene alta concentración de sal es indispensable para la estabilización de la enzima en solución. Por ejemplo, un tampón que se utiliza comúnmente para el almacenamiento de enzima alfa-galactosidasa consta de fosfato de sodio 25 mM y NaCl 0,3 M, pH 7,0. No obstante, estas condiciones de tampón de salinidad alta, no permiten algunos de los métodos de purificación bioquímicos que podrían ser deseables tales como, por ejemplo, cromatografía de intercambio catiónico que requiere la unión de la proteína a una columna en condiciones bajas de sal. La cromatografía de intercambio catiónico representa una herramienta esencial para lograr una composición de alfa-galactosidasa sustancialmente pura, ya que es el método más favorable para la eficiente eliminación de productos de degradación y / u otras proteínas contaminantes.

Alternativamente, la proteína de interés puede purificarse mediante la cromatografía de intercambio aniónico. Es decir, las proteínas con un punto isoeléctrico en el intervalo de pH ácido pueden unirse a resinas de intercambio aniónico a valores de pH alcalinos. La alfa-galactosidasa, no obstante, en particular la alfa-galactosidasa de *Bacteriodes fragilis* como se ha descrito por Liu et al. (2007) tiene un punto isoeléctrico de pI 6,72, es soluble pero inestable en tampones con valores de pH alcalinos (por ejemplo a aproximadamente pH 9,0 o superior). La incubación de la enzima en tampones con un pH alcalino por lo tanto conduce a una pérdida irreversible de la actividad de la enzima. Por consiguiente, la purificación de la proteína por medio de cromatografía de intercambio aniónico a valores de pH de aproximadamente  $\text{pH} \geq 9,0$  no parece ser una opción para una estrategia de purificación de alfa-galactosidasa (también designado "B-zima" en el contexto de la presente invención).

Por lo tanto, es un objeto de la presente invención proporcionar un método de estabilización de una composición acuosa que comprende una proteína con actividad alfa-galactosidasa para proporcionar una composición estable de alfa-galactosidasa para su almacenamiento y procesamiento posterior y métodos de producción de la misma.

Una variedad de agentes son conocidos en la técnica para facilitar la recuperación de proteínas a partir de cuerpos de inclusión y para apoyar la solubilización y replegamiento de proteínas. Estos incluyen, entre otros, por ejemplo sales, caotrópicos, urea, y sulfobetainas no detergentes. En el contexto de la presente invención, se encontró sorprendentemente que la alfa-galactosidasa se estabiliza en la solución (i) en presencia de arginina en una concentración por encima de 100 mM, en particular a una concentración de al menos 150 mM, y (ii) con una conductividad de más de 40 mS / cm. Significativamente, la estabilización de la proteína no se logró por cualquier otro agente analizado en el contexto de la presente invención en diversas concentraciones.

La arginina se ha usado para mejorar la eficacia de replegamiento, o para suprimir la agregación de proteínas (Arakawa et al, 2006., Ishibashi et al., 2005). Además, ha sido descrito el papel de la arginina en la agregación de proteínas inducida por calor e inducida por dilución (Shiraki et al., 2002). La arginina también está implicada en el replegamiento de proteínas, solubilización y purificación, y se ha descrito que puede incluirse arginina de 0,1 a 1 M en los disolventes usados para el replegamiento de proteínas por diálisis o dilución. Además, la arginina en una concentración de 0,5 a 2 M se usa para extraer las proteínas activas, plegadas a partir de pellets insolubles obtenidos después de la lisis de las células de *E. coli* (Tsumoto et al., 2004).

La estabilización con arginina proporciona una clara ventaja técnica, ya que permite la concentración de la enzima a niveles altos en solución sin pérdida de material debido a la precipitación de proteína. Por consiguiente, la estabilización con arginina permite la provisión de una composición de alfa-galactosidasa adecuada para el procesamiento y el almacenamiento posterior a largo plazo. En segundo lugar, la estabilización en presencia de arginina permite la aplicación económica de un esquema de purificación de alto rendimiento incluyendo la cromatografía de intercambio iónico, en particular cromatografía de intercambio de cationes. Por consiguiente, la estabilización de la enzima en presencia de arginina permite la provisión de una composición que comprende alfa-galactosidasa purificada.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una composición acuosa que comprende una proteína bacteriana con actividad enzimática de alfa-galactosidasa, que se caracteriza porque dicha composición comprende arginina a una concentración por encima de 100 mM, en particular a una concentración de al menos 150 mM, y en que la conductividad de dicha composición es a lo sumo 40 mS / cm.

El término "composición acuosa" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier tipo de solución basada en agua que contiene la proteína de interés. Una solución basada en agua o solución acuosa significa que el disolvente es predominantemente agua (más del 50%, 60%, 75%, 80%, preferiblemente más de 90%, más preferiblemente más de 95%, o incluso el 100% del disolvente es agua). Adicionalmente, uno o más solubilizantes adecuados tales como DMSO, etanol, etc. pueden estar presentes. Además de la proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa pueden estar presentes compuestos en la composición acuosa tales como sales, otras proteínas, componentes celulares, ingredientes de medios de cultivo, etc. En particular, la composición acuosa de acuerdo con la presente invención podría comprender, además de una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa, cualquier tipo

de iones de sal mono-, di- o trivalentes, incluyendo, pero sin limitarse a,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ , y similares, así como cualquier tipo de componentes celulares y / o nucleares, incluyendo, por ejemplo, proteínas celulares y / o nucleares, ADN celular y / o nuclear, y moléculas de ARN celulares y / o nucleares. Además, la composición acuosa de la presente invención podría ser cualquier extracto celular derivado de un organismo que contiene la proteína de interés, ya sea en forma purificada o no purificada. Tales extractos celulares pueden derivar del organismo en su conjunto, de un tejido particular de dicho organismo, a partir de una variedad de tejidos del mismo, o de cualquier tipo de células, por ejemplo, cultivado en cultivo celular. Los extractos celulares preparados a partir de organismos completos o los tejidos se pueden realizar con o sin un fraccionamiento inicial y / o paso(s) de centrifugación. Además, la composición acuosa de la presente invención puede comprender además cualquier aditivo(s) que podría ser útil para la estabilización de la proteína de interés y / o proteger a esta última de una degradación proteolítica, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, inhibidores de proteasas específicos y cócteles de inhibidores de proteasa. Los aditivos adecuados que sirven en la estabilización de proteínas son bien conocidos por el experto en la materia (véase por ejemplo Sucker et al., 1991), e incluyen, por ejemplo, soluciones salinas fisiológicas, dextrosa de Ringer, Ringer con lactato, agua desmineralizada, estabilizadores, antioxidantes, agentes acomplejantes, y / o compuestos antimicrobianos. La composición de la presente invención podría comprender además glicerol, sacarosa, glucosa, vitaminas, o agentes reductores tales como, por ejemplo, DTT o beta-mercaptoetanol. Una composición acuosa de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo, en el Ejemplo 5.

Preferiblemente, la composición acuosa que comprende una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa es una solución clara y una solución ya precipitada o una solución opaca, en el que el precipitado o turbidez resultante de la proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa, no se consideraría composición acuosa que comprende una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa de acuerdo con la invención.

Una forma de determinar la claridad/turbidez es mediante inspección visual, es decir, inspección ocular. Otra forma de determinación es la medición de la atenuación de la luz con un fotómetro. Respecto a esto, el término "densidad óptica" (también referida como "DO") indica una medición sin unidades de la transmitancia de un elemento óptico para una longitud determinada de una longitud de onda determinada  $\lambda$ :

$$\text{DO}_\lambda = \log_{10} O = -\log_{10} T = -\log_{10} (I/I_0)$$

En la que

O = la opacidad por unidad

T = la transmitancia por unidad

$I_0$  = la intensidad del haz de luz incidente

I = la intensidad del haz de luz transmitido.

Cuanto mayor sea la densidad óptica, menor es la transmitancia. Debido a la dispersión de un haz de luz enfocado en las partículas, la densidad óptica de una suspensión coloidal aumenta en comparación con una solución clara.

Un modo preferido para determinar la turbidez es medir la luz dispersada. Con este fin, se utiliza con frecuencia un fotómetro de dispersión de luz. Dependiendo de la dirección en la que se detecta y cuantifica la dispersión de luz, hay varios tipos de fotómetros de dispersión de luz conocidos en la materia. En principio, se pueden usar para la evaluación cuantitativa de la turbidez en muestras líquidas. El término "dispersión de la luz" colectivamente incluye tanto la dispersión de las ondas de luz por las partículas en la muestra, como la reflexión por partículas en la muestra. La dispersión trasera se define como menos de  $90^\circ$ , hacia la fuente de luz. La dispersión frontal se define como menos de  $90^\circ$  en diferente, o en la misma dirección general que la fuente de luz. La mayoría de las unidades de turbidez de medida que se utiliza hoy en día se basan en técnicas de medida de dispersión lateral de  $90^\circ$ .

La intensidad de la luz dispersada depende de la cantidad de las (partículas) no disueltas en la mezcla heterogénea y puede describirse mediante:

$$F = I_0 \cdot \Phi \cdot (2,303 \cdot \epsilon \cdot c \cdot d)$$

En la que

F es la intensidad de la luz dispersada

$I_0$  es la intensidad de haz de luz entrante

$\Phi$  es la proporción de fotones emitidos frente absorbidos

$\epsilon$  es el coeficiente de absorción molar de la sustancia en partículas en la mezcla

C es la cantidad de la sustancia en partículas por unidad de volumen de la muestra de líquido (mezcla heterogénea) en la cubeta

d es el espesor del espacio en la cubeta.

Por ejemplo, para determinar la claridad / turbidez de la composición de la invención, se pueden hacer mediciones de dispersión lateral de  $90^\circ$  con un fotómetro de fluorescencia, por ejemplo, un instrumento Cary Eclipse (Varian, Inc. Palo Alto, CA, EE.UU.). Las muestras líquidas se suelen analizar en cubetas de cuarzo estándar. La longitud de

onda de la luz entrante puede ser 800 nm; se pueden medir la dispersión lateral de 90° en la misma longitud de onda (es decir, 800 nm). Los ajustes de los parámetros del instrumento puede ser los siguientes:

|    |                              |               |
|----|------------------------------|---------------|
| 5  | Instrumento:                 | Cary Eclipse  |
|    | N° de serie del instrumento  | EL06033429    |
|    | Modo de datos:               | Fluorescencia |
|    | Longitud de onda de Em. (nm) | 800           |
|    | Longitud de onda de Ex. (nm) | 800           |
|    | Abertura de Ex. (nm)         | 5             |
| 10 | Abertura de Em. (nm)         | 5             |
|    | Tiempo medio (seg)           | 0,1           |
|    | Filtro de excitación         | Auto          |
|    | Filtro de emisión            | abierto       |
|    | voltaje PMT (V)              | medio         |
| 15 | Soporte multicelda           | Multicelda    |
|    | Multi cero                   | apagado       |
|    | Replicas                     | 1             |
|    | Media de muestras            | apagado       |

20 Para el propósito de la presente invención, una composición acuosa "clara" se caracteriza por una turbidez (determinada como más arriba) que es aproximadamente equivalente a (es decir, aproximadamente igual a) la turbidez de una solución sin proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa pero de otra manera con la misma composición y concentraciones de los correspondientes ingredientes. Preferiblemente, esto se corresponde con el rango de 0 a 0,40, más preferiblemente de 0 a 0,13, aún más preferido para el rango de 0,05 y 0,130, determinado como dispersión lateral de 90 ° utilizando luz con una longitud de onda de 800 nm bajo las condiciones descritas.

30 En el contexto de la presente invención, una "proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa" generalmente se refiere a cualquier tipo de proteína con actividad alfa-galactosidasa. La actividad alfa-galactosidasa de la presente invención se caracteriza por la hidrólisis de residuos galactosidasa, en particular mediante la hidrólisis de residuos de alfa-D-galactosa terminales en alfa-D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa y galactomananos. Más en particular, la actividad alfa-galactosidasa de la presente invención se refiere a la hidrólisis de residuos galactosidasa terminal 1,3-unidos. Los ensayos para el análisis de actividad enzimática alfa-galactosidasa están bien establecidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en detalle por Liu et al. (2007). Tales ensayos enzimáticos pueden llevarse a cabo en un ensayo in vitro, cuyo objetivo es la determinación de la actividad enzimática de una proteína mediante el análisis de la escisión catalítica de un sustrato sintético, por ejemplo, un monosacárido Gala-pNP o un sustrato B tetrasacárido-AMC. Una unidad de actividad enzimática se define como la cantidad de enzima necesaria para escindir 1 mol de sustrato por minuto en presencia de una cierta cantidad de sustrato en un volumen definido. La actividad enzimática se calcula entonces mediante la determinación de la actividad específica basada en la escisión completa del sustrato en el volumen de reacción. En el caso del sustrato Gal -pNP, por ejemplo, la formación de p-nitro-fenol (PNP) se cuantifica en una longitud de onda de 405 nm. Una prueba para el análisis de la actividad enzimática de alfa-galactosidasa de acuerdo con la presente invención se describe, por ejemplo, en el Ejemplo 1.

45 El término "arginina" como se usa aquí denota el  $\alpha$ -aminoácido arginina (también abreviado como Arg o R), preferiblemente L-arginina o D-arginina, o una mezcla de los mismos, especialmente L-arginina. La arginina es uno de los 20 aminoácidos más comúnmente encontrados en la naturaleza. Un  $\alpha$ -aminoácido consiste en un átomo de carbono central, denominado carbono  $\alpha$ , unido a un grupo amino, un grupo carboxílico, un átomo de hidrógeno, y un grupo R distintivo, a menudo referido como cadena lateral. La arginina consiste en una cadena alifática lateral de 4 carbonos, su extremo distal está protegido por un grupo guanidino. Con un valor de pKa de 12,48, el grupo guanidino está cargado positivamente en entornos neutros, ácidos e incluso en básicos, y por lo tanto afecta a las propiedades químicas básicas de la molécula. A nivel de ADN, la arginina está codificada por los codones CGU, CGC, CGA, CGG, AGA, y AGG, respectivamente. El término "arginina" también incluye el aminoácido en cualquiera de sus formas salinas.

55 Como se ha demostrado en el contexto de la presente invención, una composición que comprende a proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa se estabiliza en presencia de arginina a una concentración por encima de 100 mM, en particular a una concentración de al menos 150 mm y superior. Estas concentraciones incluyen cualquier concentración. A partir de experimentos con otras proteínas se concluye que la concentración de arginina se puede incrementar hasta 2 M sin afectar a la estructura y / o la función de la proteína.

60 Por consiguiente, en una realización preferida, la composición de la presente invención comprende arginina a una concentración de entre 150 mM y 2 M. Molaridad (en unidades de mol / L, molar, o M) o concentración molar denota el número de moles de una sustancia dada por litro de solución. Una M mayúscula se utiliza para abreviar las unidades de mol / L.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la concentración de arginina es superior a 100 mM que incluye concentraciones de arginina de al menos, por ejemplo, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 200 mM, 220 mM, 250 mM, 275 mM, 300 mM, 320 mM, 350 mM, 375 mM, 400 mM, 425 mM, 450 mM, 475 mM, o 500 mM, preferiblemente al menos 110, mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 200 mM, 220 mM, o 250 mM, especialmente al menos 150 mM, 200 mM, 220 mM o 250 mM.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la concentración de arginina puede aumentarse hasta 2 M que incluye concentraciones de arginina como máximo de, por ejemplo, 200 mM, 220 mM, 250 mM, 275 mM, 300 mM, 320 mM, 350 mM, 375 mM, 400 mM, 425 mM, 450 mM, 475 mM, 500 mM, 550 mM, 600 mM, 650 mM, 700 mM, 750 mM, 800 mM, 850 mM, 900 mM, 1 M, o 1,5 M, preferiblemente como máximo 400 mM, 320 mM o 200 mM, especialmente como máximo 320 mM.

En otra realización preferible, la composición de acuerdo con la presente invención comprende arginina a una concentración entre 200 y 400 mM.

En el contexto de la presente invención, se ha demostrado que la composición que comprende una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa se estabiliza en presencia de arginina en una concentración de entre 250 mM y 320 mM, en particular en presencia de arginina 310 mM.

Por consiguiente, en otra realización más preferible, la composición de la presente invención comprende arginina a una concentración de entre 250 mM y 320 mM, más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 310 mM. El término "aproximadamente" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención significa el valor indicado. 10%, preferiblemente 5%, especialmente 4%, 3%, 2% o 1%.

Una solución acuosa que contiene iones conduce la electricidad. Por lo tanto, la medición de la conductancia de una solución puede ser una herramienta adecuada para investigar si la solución contiene iones disociados, y si las reacciones químicas en la solución están produciendo o consumiendo iones. Cualquier solución, incluso una que contiene iones, no obstante, ofrece una considerable resistencia al flujo de corriente a través de ella. La conductividad es el recíproco de dicha resistencia. Es decir, una alta resistencia significa una baja conductividad, y baja resistencia significa una alta conductividad. Es un método estándar en la técnica medir la conductividad de una solución mediante el uso de la solución para completar un circuito eléctrico, por lo general mediante la inserción de un par de electrodos en el circuito, y la inmersión de los electrodos en la solución. Un sensor de conductividad mide la cantidad de electricidad que está siendo conducida a través de un centímetro de agua. La conductividad específica se expresa como mhos por centímetro (M / cm), también llamados Siemens por centímetro (S / cm). Debido a que un mho (o siemens) es una unidad muy grande, normalmente se utiliza el micromho (microsiemens) o millimho (milisiemens) (mS / cm). Dado que la conductividad varía con la temperatura, es necesario corregir las lecturas para los cambios de temperatura. La mayoría de los instrumentos contienen circuitos que compensan automáticamente la temperatura y corrigen las lecturas a un estándar de 25 ° C. El experto conoce los métodos adecuados de medición de la conductividad en condiciones estándar, y uno de ellos se ejemplifica en el Ejemplo 3.

Como se ha detallado anteriormente, la composición de la presente invención puede comprender, además de la arginina, cualquier tipo de iones de sal, ingredientes de tampón y / o agentes químicos apropiados para establecer un entorno favorable para la proteína de interés. En el contexto de la presente invención, se encontró que una proteína con actividad alfa-galactosidasa se estabiliza en presencia de arginina y en ausencia de altas concentraciones de sal, es decir, bajo condiciones bajas en sal. Tales condiciones de bajo contenido de sal incluyen, pero no se limitan a, una concentración de iones de la sal mono-, di- o trivalentes de un máximo de 0,5 M, más preferiblemente de a lo sumo 450 mM, 400 mM, 350 mM, 300 mM, 250 mM, 200 mM, 150 mM, 100 mM, 50 mM, 25 mM o 10 mM, especialmente como máximo 50 mM. Se observa que los valores anteriores de concentración no están destinados a incluir la arginina presente en la composición.

En una realización preferible, la composición de la presente invención comprende arginina a una concentración de alrededor de 310 mM, e iones de sal mono-, di- o trivalentes en una concentración final de a lo sumo 50 mM. En otra realización preferible, la composición de la presente invención comprende iones de sal mono-, di- o trivalentes en una concentración final de a lo sumo 350 mM. Dichos iones de sal mono-, di- o trivalentes pueden incluir, pero no se limitan a,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Cl}^-$ , y similares.

Por consiguiente, correspondiendo a la concentración exacta de sal utilizada, la conductividad de la composición de la presente invención está entre 5 mS / cm y 50 mS / cm.

Tal como se detalló anteriormente, la conductividad de la composición de la presente invención es a lo sumo 40 mS / cm. En otra realización preferible, la composición de la presente invención tiene una conductividad de entre 15 mS / cm y 25 mS / cm, más preferiblemente entre 18 mS / cm y 22 mS / cm.

El término "mS / cm", como se usa aquí se refiere a la unidad de la conductividad en milisiemens por cm de solución, con S refiriéndose al nombre oficial de la unidad en el sistema internacional (SI). Como se detalló anteriormente, la conductividad de una solución acuosa se puede medir por medio de métodos convencionales conocidos para una

persona experta en la materia. Están disponibles comercialmente dispositivos para medir la conductividad, y se pueden comprar a partir de varios proveedores, incluyendo, por ejemplo, Sartorius (Göttingen, Alemania). En el contexto de la presente invención, el término "mS / cm" se define para incluir una desviación de + / - 0,1 mS / cm. La conductividad de la composición de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo, en la Tabla 2 de la presente solicitud (véase el Ejemplo 3).

Como se describió anteriormente, la estabilización de la enzima alfa-galactosidasa en solución también depende del valor de pH de la composición que contiene la proteína. Es decir, la alfa-galactosidasa recombinante, en particular la alfa-galactosidasa derivada de *Bacteriodes fragilis*, es inestable en tampones con valores de pH alcalinos (es decir, valores de pH de  $\geq 9,0$ ), lo que resulta en una pérdida irreversible de la actividad de la enzima. Como se demuestra en el contexto de la presente invención (ver por ejemplo el Ejemplo 3), la alfa-galactosidasa de la presente invención permaneció en solución a valores de pH alcalinos (es decir, a un valor de pH de 9,0 y 9,5).

Por consiguiente, en una realización preferible, la composición de la presente invención tiene un pH de entre pH 5 y pH 7,5. En otra realización preferible, la composición de la presente invención tiene un pH de entre pH 5,5 y pH 7, más preferiblemente de entre pH 5,8 y pH 6,5.

El término "pH" como se utiliza aquí se refiere a la concentración de iones  $H^+$  en solución, y se define como  $pH = \log_{10} (1 / [H^+]) = -\log_{10} [H^+]$ . El análisis del valor de pH de una composición de acuerdo con la presente invención es un método estándar bien conocido por la persona experta en la materia. Están disponibles comercialmente los dispositivos para medir el pH en solución de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Mettler-Toledo (Giessen, Alemania). Se hace notar que el término "pH" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se define para incluir una desviación de valores de pH + / - 0,2.

Tal como se detalló anteriormente, un ADN particular que codifica una proteína de interés puede introducirse en una célula huésped adecuada para producir la correspondiente proteína por medios recombinantes. Estas células hospedadoras pueden ser cualquier tipo de células adecuadas, preferiblemente células bacterianas o eucariotas, por ejemplo, crecidas en cultivo. En un primer paso, este enfoque puede incluir la clonación del correspondiente gen en un vector de plásmido adecuado. Los vectores plasmídicos son ampliamente utilizados para la clonación de genes, y se pueden introducir fácilmente, es decir, transfectar, en las células bacterianas que se han hecho permeables transitoriamente al ADN. Después de expresar la proteína en la correspondiente célula huésped, las células se pueden recoger y utilizar como material de partida para la preparación de un extracto celular que contiene la proteína de interés. Un extracto celular que contiene la proteína de interés se obtiene mediante la lisis de las células. Son bien conocidos por el experto en la materia los métodos de preparación de un extracto de células por medio de cualquiera de estas sustancias o lisis celular mecánica, y se incluyen, pero no están limitados a, por ejemplo, tratamiento hipotónico con sal, homogeneización, homogeneización mecánica o ultrasonidos.

En el contexto de la presente invención, se ha demostrado que una composición que comprende una proteína con actividad alfa-galactosidasa derivada de una célula huésped bacteriana se estabiliza en presencia de arginina en una concentración de por encima de 100 mM, en particular a una concentración de al menos 150 mM, y con una conductividad de un máximo de 40 mS / cm. Una composición que comprende una proteína con actividad alfa-galactosidasa derivada de una célula huésped bacteriana pretende hacer referencia a cualquier tipo de lisado de la célula huésped, opcionalmente después de haber sido procesado, por ejemplo, mediante centrifugación, cromatografía, diálisis, o ultrafiltración como se describe a continuación.

Por consiguiente, en una realización preferible, la composición de la presente invención deriva de una célula huésped bacteriana. En una realización más preferible, la composición de la presente invención deriva de la cepa bacteriana *Escherichia coli* (*E. coli*).

El término "célula huésped bacteriana" como se utiliza aquí se refiere a cualquier tipo de organismo bacteriano adecuado para su aplicación en tecnología de ADN recombinante, y comprende todas las cepas bacterianas conocidas, en particular las que se puede utilizar como células huésped para la expresión de una o más proteínas recombinantes. La cepa bacteriana *Escherichia coli* (*E. coli*) está bien caracterizada y representa el sistema de expresión más utilizado para la producción rápida y económica de proteínas recombinantes. Un experto en la materia conoce una gran variedad de células huésped de *E. coli* e incluyen, pero no se limitan a, cepas tales como DH5-alfa, HB101, MV1190, JM109, JM101, o XL-1 Blue que pueden adquirirse comercialmente a partir de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Stratagene (CA, EE.UU.), Promega (WI, EE.UU.) o Qiagen (Hilden, Alemania). Una célula huésped adecuada y una composición de acuerdo con la presente invención derivada de *E. coli* se ejemplifica, por ejemplo, en el Ejemplo 5 de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, se ha descubierto que la concentración de proteínas de la composición de acuerdo con la presente invención está normalmente en el rango de 20 - 30 mg / ml (ver por ejemplo, el Ejemplo 5).

Por consiguiente, en una realización preferible, la composición de la presente invención tiene una concentración de proteína de al menos 20 mg / ml.

El término "concentración de proteína" tal como se utiliza aquí generalmente se refiere al contenido de proteína total de la composición de acuerdo con la presente invención calculado por volumen (por ejemplo, mg / ml). Esta definición puede incluir cualquier referencia a una concentración de proteína de un extracto total de células derivado de una célula procariótica o eucariótica y que contiene la proteína de la presente invención, o igualmente puede referirse a la concentración de proteína de una composición que comprende la proteína de la presente invención ya sea en forma parcial o sustancialmente purificada. En consecuencia, la concentración de proteína que se hace referencia en este documento puede referirse a cualquier contenido de proteína que se mide en cualquier etapa durante o después del método para proporcionar alfa-galactosidasa de acuerdo con la presente invención. Los métodos para la determinación de las concentraciones de proteína de una composición particular, son bien conocidos por el experto en la materia, e incluyen, por ejemplo, el uso de un ensayo de Bradford, o simplemente midiendo la absorbancia de una solución de proteína a 280 nm.

Concentrar una proteína en una composición puede llevarse a cabo mediante diversos métodos convencionales que incluyen, por ejemplo, el uso de dispositivos de filtro ultracentrífugo. Tales dispositivos de filtro proporcionan recuperaciones altas (normalmente > 95%) de incluso soluciones de proteína diluidas (ng a  $\mu\text{g}$  / ml), y emplear membranas de filtros con puntos de corte disponibles en el intervalo de 3.000, 10.000, 30.000, 50.000 a 100.000 NMWL (Límite de peso molecular nominal). Dispositivos de filtro ultracentrífugo pueden adquirirse comercialmente de diferentes proveedores, por ejemplo de Millipore (MA, EE.UU.).

En el contexto de la presente invención, la actividad enzimática de la alfa-galactosidasa se ha determinado además por medios bioquímicos. Como se demuestra en los Ejemplos (véase por ejemplo, Ejemplo 1), la proteína de la presente invención generalmente revela una actividad enzimática de alfa-galactosidasa de 0,5 a 0,8 unidades / mg, con respeto al contenido de proteína total de la composición.

Por consiguiente, en una realización preferible, la composición de la presente invención se caracteriza en que la actividad enzimática de alfa-galactosidasa está entre 0,5 y 0,8 unidades / mg de proteína total.

Tal como se ha detallado anteriormente, los ensayos para determinar la actividad enzimática de alfa-galactosidasa están bien establecidos en la técnica y se describen, por ejemplo, en detalle por Liu et al. (2007). Estos ensayos emplean escisión de sustratos artificiales, por ejemplo, el monosacárido Gal pNP -o el sustrato B tetrasacárido-AMC. Una unidad de actividad enzimática se define por lo tanto como la cantidad de enzima necesaria para escindir 1. Mol de sustrato por minuto utilizando un volumen definido de reacción en presencia de una cantidad definida de sustrato. La actividad enzimática se calcula entonces mediante la determinación de la actividad específica basada en la escisión completa del sustrato en el volumen de reacción. La actividad enzimática se puede medir como se ejemplifica en el Ejemplo 1.

El término "unidades / mg" tal como se define en el presente documento generalmente se refiere a las unidades de actividad enzimática por 1 mg de contenido total de proteína en mg según se determina por métodos bioquímicos, como también se ha descrito anteriormente. Dicho contenido total de proteína puede derivarse de un extracto de células enteras que contiene la actividad enzimática de la presente invención, o puede derivar de una composición purificada que comprende una proteína con actividad alfa-galactosidasa.

En una realización preferible, la proteína de la presente invención tiene la especificidad de sustrato de la EC 3.2.1.22. En otra realización preferible, la composición de la presente invención comprende una proteína que hidroliza porciones terminales de alfa1,3-galactosilo.

Tal como se detalló anteriormente, el término "EC 3.2.1.22" se refiere al número sistemático que se ha asignado a la clase de enzima alfa-galactosidasa por la Comisión de Enzimas de la Unión Internacional de Bioquímica en conformidad con el tipo de reactividad enzimática de la enzima. En particular, el número sistemático EC 3.2.1.22 especifica el mecanismo catalítico de las alfa-galactosidasas como la hidrólisis de residuos terminales alfa-D-galactosa en alfa-D-galactósidos. En el contexto de la presente invención, el mecanismo catalítico de alfa-galactosidasa en particular se refiere a la hidrólisis de residuos alfa-1 ,3-galactosidasa terminal como, por ejemplo, los que se encuentran en los glóbulos rojos del grupo B, constituyendo los antígenos del grupo sanguíneo B.

Las alfa-galactosidasas se encuentran en una amplia variedad de organismos.

Por consiguiente, en una realización preferible, la composición de la presente invención comprende una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa que se caracteriza porque dicha proteína es una proteína natural. Alternativamente, la proteína de la invención es un fragmento o un derivado funcionalmente activo de dicha proteína de origen natural.

En otra realización preferible, la proteína de la presente invención deriva de un organismo seleccionado del grupo que consiste en humanos, animales, vegetales bacterias y hongos.

Una "proteína natural" referida en el contexto de la presente invención generalmente denota una proteína que se encuentra naturalmente en cualquier tipo de organismo vivo, y que como tal puede aislarse de los tejidos, líquidos y /

o de cualquier tipo de células individuales de dicho organismo. Además, dicha proteína de origen natural puede aislarse además del organismo como un todo, por ejemplo, proporcionando un extracto de células enteras del organismo que comprende dicha proteína. Los organismos en los que dicha proteína origen natural podría originarse incluyen, pero no se limitan a, humanos, animales (incluyendo insectos), plantas tal como la planta del café, hongos (incluyendo la levadura), y bacterias tales como *Pseudoalteromonas spec.* o *Bacteroides spec.*

El término "un fragmento o derivado funcionalmente activo", como se usa en el presente documento se refiere a cualquier tipo de proteína que presenta una actividad enzimática de alfa-galactosidasa que comprende la secuencia de aminoácidos de una proteína natural con actividad alfa-galactosidasa en cualquier forma parcial, sustituida o modificada.

Esto es, un fragmento funcionalmente activo de la presente invención podría estar compuesta por dominios de proteína originados de una proteína de origen natural con actividad alfa-galactosidasa que revela la misma actividad enzimática que la proteína de tipo salvaje de la que deriva. Dicho fragmento funcionalmente activo puede estar constituido de cualquier dominio N-terminal, C-terminal o central de la proteína de interés, o de cualquier combinación de esto último.

Además, un derivado funcionalmente activo también puede comprender aminoácidos adicionales en comparación con la secuencia de tipo salvaje que podría estar presente, por ejemplo, como parte de las extensiones N- o C-terminal y / o como parte de los dominios internos de la proteína.

El fragmento funcionalmente activo puede también estar caracterizado por características estructurales. Por consiguiente, en una realización preferible de la invención el fragmento funcionalmente activo consta de al menos un 60%, preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, aún más preferiblemente al menos un 90%, incluso más preferiblemente al menos un 95%, preferiblemente un 99% de una proteína de origen natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa, tal como, por ejemplo, alfa-galactosidasa de *Bacteroides fragilis* (cepa ATCC 25285 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU.), también designada NCTC 9343 (National collection of Type Cultures, Londres, Reino Unido)). Un ejemplo de tal fragmento es la proteína como se muestra en el Id. de Sec. N° 1. El fragmento funcionalmente activo como se ha definido anteriormente puede derivar de la proteína por una o más deleciones de aminoácidos. Las deleciones pueden ser C-terminal, N-terminal y / o internamente.

El porcentaje de identidad de secuencia se puede determinar por ejemplo, mediante la alineación de las secuencias. Los métodos de alineación de secuencias para comparación son bien conocidos en la materia. Varios programas y algoritmos de alineación se han descrito en, por ejemplo, Smith y Waterman (1981) o Pearson y Lipman (1988).

La herramienta de búsqueda de alineamientos local básica del NCBI (BLAST) (Altschul et al., 1990) está disponible en varias fuentes, incluyendo el Centro Nacional de Información de Biotecnología (NCBI, Bethesda, MD) y en Internet, para su uso junto con los programas de análisis de secuencias como blastp, blastn, blastx, tblastn y tblastx.

El derivado funcionalmente activo de proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa es obtener mediante alteraciones de la secuencia en la proteína (una o más deleciones, sustituciones y / o adiciones), en las que la proteína con las alteraciones de secuencia conserva una función de la proteína inalterada, es decir, su capacidad de hidrolizar las porciones terminales alfa-galactosilo de glucolípidos y glucoproteínas. Tales alteraciones de secuencia pueden incluir, pero no se limitan a, sustituciones conservadoras, deleciones, mutaciones e inserciones. No obstante, los derivados funcionalmente activos presentan actividad enzimática alfa-galactosidasa. Esta característica del fragmento o derivado funcionalmente activo se puede analizar por ejemplo como se detalla en el Ejemplo 1.

Por otra parte, un derivado funcionalmente activo de la presente invención podría comprender uno o más aminoácidos modificados, incluyendo, pero sin limitarse a, por ejemplo, residuos fosforilados, acetilados, ubiquitinados, y / o sumolilados. Un derivado funcionalmente activo de la presente invención puede además comprender cualquier tipo de marcaje químico, tal como, por ejemplo, porciones marcadas con fluorescencia. Tal como se detalló anteriormente, un fragmento o derivado funcionalmente activo de una alfa-galactosidasa de origen natural puede identificarse y caracterizarse bioquímicamente mediante un ensayo estándar en el que la actividad enzimática de una proteína se determina mediante la visualización de la escisión de sustratos artificiales. Tales ensayos son bien conocidos en la materia y se describen, por ejemplo, en Liu et al. (2007).

El término "derivado funcionalmente activo" incluye las variantes alélicas naturales, así como mutantes o cualquier otra variante que no ocurre de forma natural. Tal como se conoce en la materia, una variante alélica es una forma alternativa de un (poli) péptido que se caracteriza por tener una sustitución, delección, o adición en uno o más aminoácidos que no alteran esencialmente la función biológica del polipéptido. Por "función biológica" se entiende una función del polipéptido en las células en las que aparece de forma natural, incluso si la función no es necesaria para el crecimiento o supervivencia de las células. Por ejemplo, la función biológica de una porina es permitir la entrada en las células de compuestos presentes en el medio extracelular. La función biológica es distinta de la función antigénica. Un polipéptido puede tener más de una función biológica.

En el contexto de la presente invención un fragmento o derivado funcionalmente activo tiene actividad enzimática de alfa-galactosidasa, si la actividad del fragmento o del derivados es de al menos un 10%, preferiblemente al menos un 25%, más preferiblemente al menos un 50%, incluso más preferiblemente al menos un 70%, aún más preferiblemente al menos un 80%, especialmente al menos un 90%, particularmente al menos un 95%, más preferiblemente al menos un 99% de la actividad de la proteína sin alteraciones en la secuencia.

En una realización preferible, el derivado o fragmento funcionalmente activo derivado de la proteína de origen natural mediante intercambios de aminoácidos, deleciones o inserciones también puede conservar, o más preferiblemente mejorar, la actividad enzimática.

En una realización aún más preferible de la invención el derivado funcionalmente activo de la proteína de origen natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa tiene al menos un 50% de identidad de secuencia con la proteína, especialmente al menos un 60%, preferiblemente al menos un 70%, más preferiblemente al menos un 80%, aún más preferiblemente al menos un 90%, incluso más preferiblemente al menos un 95%, más preferiblemente un 99% con la proteína y preferiblemente deriva de la proteína por sustituciones conservativas. Las sustituciones conservativas son aquellas que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que están relacionados en sus cadenas laterales y propiedades químicas. Ejemplos de tales familias son aminoácidos con cadenas laterales básicas, con cadenas laterales ácidas, con cadenas laterales alifáticas no polares, con cadenas laterales aromáticas no polares, con cadenas laterales polares no cargadas, con cadenas laterales pequeñas, con cadenas laterales grandes etc. En una realización, una sustitución conservativa está incluida en el péptido. En otra realización, dos sustituciones conservativas o menos se incluyen en el péptido. En una realización adicional, tres sustituciones conservativas o menos se incluyen en el péptido.

Ejemplos de sustituciones conservativas de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, los enumerados a continuación:

| Residuo original | Sustituciones conservativas |
|------------------|-----------------------------|
| Ala              | Ser                         |
| Arg              | Lys                         |
| Asn              | Gln; His                    |
| Asp              | Glu                         |
| Cys              | Ser                         |
| Gln              | Asn                         |
| Glu              | Asp                         |
| His              | Asn; Gln                    |
| Ile              | Leu, Val                    |
| Leu              | Ile; Val                    |
| Lys              | Arg; Gln; Asn               |
| Met              | Leu; Ile                    |
| Phe              | Met; Leu; Tyr               |
| Ser              | Thr                         |
| Thr              | Ser                         |
| Trp              | Tyr                         |
| Tyr              | Trp; Phe                    |
| Val              | Ile; Leu                    |

La proteína de la invención puede además estar fusionada con un epítipo marcado que proporciona un epítipo al que una sustancia anti-marcaje puede unirse selectivamente. El marcaje del epítipo se coloca generalmente en el extremo amino-o carboxilo- terminal del péptido, pero puede incorporarse como una inserción interna o sustitución según permita la actividad biológica. La presencia de tales formas de epítipo marcado de un péptido se puede detectar usando una sustancia, como un anticuerpo contra el péptido marcado. También, la provisión del marcaje del epítipo permite que el péptido sea fácilmente purificado mediante purificación por afinidad utilizando un anticuerpo anti-marcaje u otro tipo de matriz de afinidad que se une al marcaje del epítipo. Varios polipéptidos marcados y sus respectivos anticuerpos son bien conocidos en la materia. Los ejemplos incluyen marcajes de poli-histidina (poli-his), poli-histidina-glicina (poli-his-gly), el marcaje de polipéptido HA, el marcaje c-myc, el marcaje Strep y el marcaje FLAG.

El término "bacteria" en referencia al contexto de la presente invención podría incluir todas las variantes de células microbianas, cuyos ejemplos pueden incluir, pero no se limitan a, microorganismos Gram-negativos anaerobios obligados, preferiblemente un microorganismo del género *Bacteroides*, tales como *Bacteroides caccae*, *Bacteroides distasonis*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides merdae*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides stercoris*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides uniformis*, y *Bacteriodes vulgatus*.

En una realización preferible, la composición de la presente invención comprende una proteína con actividad alfa-galactosidasa derivada de los organismos bacterianos *Bacteroides fragilis*, más preferiblemente cualquier forma natural de alfa-galactosidasa de *Bacteroides fragilis*.

En el contexto de la presente invención, una proteína con actividad alfa-galactosidasa derivada de *Bacteroides fragilis* podría ser cualquiera de los dos homólogos de alfa-galactosidasa encontrados en *B. fragilis*. Los dos homólogos, es decir, alfa-galactosidasa A y alfa-galactosidasa B, están codificados por los genes galA y galB, respectivamente. Las enzimas están constituidas por 605 y 595 aminoácidos cada una. Una proteína con actividad alfa-galactosidasa derivada de *Bacteroides fragilis* elimina tanto los residuos galactosa ramificados alfa-1,3-unidos de los antígenos del grupo sanguíneo B y estructuras lineales de galactosa alfa-1,3 -unidas. La actividad catalítica de dichas proteínas incluye la hidrólisis de residuos de galactosa terminales, lineales no reductoras alfa-1,3-unidos, la hidrólisis de residuos de galactosa terminales, ramificados no reductores alfa-1,3-unidos, así como la hidrólisis de residuos alfa-D-galactosa terminales, no reductores en alfa-D-galactósidos, incluyendo oligosacáridos de galactosa, galactomananos y galactohidrolasa.

En otra realización preferible, la composición de la presente invención comprende un fragmento de alfa-galactosidasa derivada de *Bacteroides fragilis* que comprende o consiste en la secuencia de aminoácidos de ID. de Sec. N° 1. En otra realización preferible, la composición comprende cualquier derivado funcionalmente activo o un fragmento del mismo.

El término "Id de Sec N° 1" como se refiere en este documento significa la secuencia de aminoácidos como se muestra en el Id. de Sec. N° 1 (también representado en la Figura 3), y representa la secuencia de aminoácidos de la alfa-galactosidasa como se encuentra en *B. fragilis* NCTC (National Collection of Type Cultures, Londres, Reino Unido) 9343 (cepa ATCC 25285 (American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, EE.UU.), también designado fragA). La secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. N° 1 se identifica por el número de acceso de la base de datos de secuencia de nucleótidos n° AM109955 del EMBL (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Alemania).

En este contexto, el término "un derivado funcionalmente activo o un fragmento del mismo" se refiere generalmente a la definición como se detalló anteriormente. En particular, se refiere a cualquier tipo de fragmento o derivado que comprende o consta de los aminoácidos de Id. de Sec. N° 1, que incluye, pero no se limita a, cada fragmento pequeño que revela actividad enzimática alfa-galactosidasa, o cualquier fragmento que comprende aminoácidos adicionales, tal como se ha definido anteriormente para los derivados y fragmentos de proteínas de origen natural con actividad alfa-galactosidasa. Dichos aminoácidos adicionales pueden estar presentes en el extremo N-terminal, C terminal o ser parte de los dominios internos de la proteína. Dichos aminoácidos adicionales pueden comprender además, pero no se limitan a, marcajes de purificación por afinidad que incluye, por ejemplo, los marcajes 6x His-, GST-, NusA-, NusB-, o proteína A. Tales marcajes de afinidad son comúnmente conocidos por el experto en la materia y se utilizan habitualmente en el contexto de la expresión de proteína recombinante. Por otra parte, un derivado funcionalmente activo o un fragmento de Id. de Sec. N° 1 incluye cualquier compuesto o proteína que comprende los aminoácidos como se muestran en el Id. de Sec. N° 1 o una parte de ella que comprende uno o más aminoácidos modificados o cualquier otro tipo de modificación química. Tal como se ha detallado anteriormente, la actividad enzimática de un derivado o fragmento funcionalmente activo puede determinarse por métodos convencionales conocidos por un experto en la materia (véase, por ejemplo, Liu et al., 2007).

Preferiblemente, la composición de la invención puede caracterizarse porque comprende

- (i) una proteína natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa, preferiblemente una proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa de acuerdo con el Id. de Sec. N° 1, y
- (ii) arginina en una concentración de entre 250 mM y 320 mM, y en la que tiene
- (iii) una conductividad de 20 mS / cm  $\pm$  0,1 mS.

En otra realización preferible, la composición de la invención puede caracterizarse porque comprende

- (i) una proteína bacteriana natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa, preferiblemente una proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa de acuerdo con el Id. de Sec. N° 1, y
- (ii) arginina en una concentración de entre 250 mM y 320 mM, y en la que tiene
- (iii) una conductividad máxima de 40 mS/cm y un pH entre 5,8 y 6,2.

Más preferiblemente, la composición de la invención puede caracterizarse porque comprende

- (i) una proteína bacteriana natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa, preferiblemente una proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa de acuerdo con el Id. de Sec. N° 1, y
- (ii) arginina en una concentración de entre 250 mM y 320 mM, y en la que tiene
- (iii) una conductividad de 20 mS/cm  $\pm$  0,1 mS, y
- (iv) un pH entre 5,8 y 6,2.

Lo más preferible, la composición de la invención puede caracterizarse porque comprende

- (i) una proteína bacteriana natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa, preferiblemente una proteína con

actividad enzimática alfa-galactosidasa de acuerdo con el Id. de Sec. N°: 1, y  
 (ii) arginina en una concentración de entre 250 mM y 320 mM, preferiblemente en una concentración de 310 mM, y  
 (iii) iones de sal mono-, di-, o trivalentes a una concentración máxima de 50 mM, y en la que tiene  
 (iv) una conductividad de 20 mS/cm  $\pm$  0,1 mS, y  
 (v) un pH entre 5,8 y 6,2.

Respecto a las realizaciones descritas anteriormente, es igualmente preferible que la composición de la presente invención comprenda un fragmento o derivado funcionalmente activo de una proteína bacteriana de origen natural con actividad enzimática alfa-galactosidasa, o un fragmento o derivado funcionalmente activo de una proteína de acuerdo con el Id. de Sec. N°: 1.

En el contexto de la presente invención, se ha demostrado además que la adición de arginina a una composición de proteína que tiene una conductividad de más de 40 mS / cm resulta en la estabilización de la alfa-galactosidasa.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de estabilización de una composición acuosa que comprende una proteína bacteriana con actividad enzimática alfa-galactosidasa, que se caracteriza porque dicho método comprende el paso de añadir arginina a dicha composición a una concentración final superior a 100 mM, en particular de al menos 150 mM y en que la conductividad de dicha composición es a lo sumo 40 mS / cm.

En este contexto, los términos "composición acuosa", "una proteína con actividad enzimática de alfa-galactosidasa", "arginina", "conductividad" y "concentración" deben entenderse tal como se detalló anteriormente.

El término "estabilizar" o "estabilización" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención incluye cualquier tipo de proceso que facilita y / o permite a una proteína de interés ser estable o mantenerse en solución, incluido cualquier proceso que facilita y / o permite la solubilización de una proteína de interés a cualquier temperatura, por ejemplo, entre 4 °C y 37 °C. La solubilización y / o estabilización de una proteína incluye, pero no se limita a, la ausencia de aparición de precipitación y / o agregación de producto(s), la presencia y / o ausencia de los cuales puede analizarse por métodos convencionales conocidos en la materia incluyendo, por ejemplo, el análisis mediante inspección visual, por medio de medidas de densidad óptica, incluyendo por ejemplo, la determinación del contenido total de proteína de una composición correspondiente que contiene la proteína estabilizada, y / o por medio de análisis de proteínas usando técnicas bioquímicas convencionales (por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida SDS). El término "estabilizar" o "estabilización" incluye además, la viabilidad de una proteína para catalizar una reacción enzimática. En particular, en el contexto de la presente invención, una proteína estabilizada de acuerdo con el método de la presente invención revela actividad enzimática alfa-galactosidasa, más en particular, la hidrólisis de residuos de galactosidasa 1,3-unidos. Como ya se ha descrito anteriormente, dicha actividad enzimática puede determinarse y evaluarse por medio de ensayos bioquímicos estándar conocidos por el experto en la materia (véase por ejemplo Liu et al., 2007). Además, la estabilización de una proteína de acuerdo con la presente invención incluye también la viabilidad de concentrar una proteína de interés en solución hasta una concentración de al menos 20 mg / ml, sin la pérdida de proteína debido a la precipitación y / o agregación.

En una realización preferible, dicha composición estabilizada se caracteriza como en cualquiera de las realizaciones detalladas anteriormente en el contexto de la composición acuosa de la presente invención.

En el contexto de la presente invención, se ha demostrado además que una proteína bacteriana con actividad enzimática de alfa-galactosidasa puede purificarse mediante cromatografía de intercambio iónico, en particular mediante el uso de cromatografía de intercambio de cationes, cuando se estabiliza en presencia de arginina a una concentración por encima de 100 mM, preferiblemente a una concentración de al menos 150 mM, y con una conductividad de un máximo de 40 mS / cm. La aplicación de cromatografía de intercambio de cationes en el contexto de la presente invención sólo ha sido posible mediante la estabilización de la proteína de acuerdo con la presente invención.

Por consiguiente, en un aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de preparación de una composición acuosa purificada que comprende una proteína bacteriana con actividad enzimática alfa-galactosidasa, dicho método comprende los pasos de

(a) proporcionar una composición que contiene dicha proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa,  
 (b) concentrar la composición del paso (a) en presencia de arginina a una concentración por encima de 100 mM, en particular de al menos 150 mM, en la que la composición posee una conductividad de como mucho 40 mS/cm, y  
 (c) purificar la composición del paso (b) mediante cromatografía de intercambio de cationes.

En este contexto, los términos "composición acuosa", "una proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa", "arginina" y "concentración" deben entenderse tal como se ha detallado anteriormente.

El término "proporcionar una composición" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención se refiere a toda clase de procedimientos adecuados para preparar una composición que contiene una proteína de interés. Estos

procedimientos incluyen, pero no se limitan a, la preparación de extractos de células enteras derivados de cualquier tipo de organismo que contiene la proteína de interés, la preparación de extractos celulares totales de especies particulares de células, por ejemplo, crecidas en cultivo, y que contienen la proteína de interés, incluyendo, pero sin limitarse a, la preparación de extractos celulares totales derivados de una célula huésped bacteriana que expresa una proteína recombinante de interés, o la preparación de una composición de proteína por cualquier otro medio. Tal como se detalló anteriormente, la preparación de un extracto celular puede incluir todos los pasos necesarios de la recogida de una célula de un cultivo mediante, por ejemplo, diversos pasos de centrifugación y / o fraccionamiento, o mediante pasos de lisis celular mediante cualquier método mecánico o químico que incluye, pero no se limita a, por ejemplo múltiple ciclos de congelación, y / o descongelación y / o tratamiento de las células con ultrasonidos.

Preferiblemente, dicha composición es una composición acuosa. El término "composición acuosa" debe entenderse tal como se ha descrito anteriormente.

El término "concentración de la composición", tal como se usa aquí, se refiere a cualquier mejora respecto a una determinada concentración de proteína de una composición y / o una solución. Esta mejora se puede lograr por medio de métodos bioquímicos estándar. Dichos métodos son bien conocidos por el experto en la materia, e incluyen, por ejemplo, diálisis y / o ultrafiltración (es decir, diafiltración) mediante el uso de dispositivos de filtros ultracentrífugos. Tal como se detalló anteriormente, tales dispositivos de filtro emplean membranas de filtro disponibles en el intervalo de 000, 10.000, 30.000, 50.000 a 100.000 NMWL (límite de peso molecular nominal), y pueden obtenerse comercialmente a partir de diferentes proveedores, por ejemplo, de Millipore (MA, EE.UU.).

En general, las proteínas se pueden purificar en base a sus características tales como la solubilidad, tamaño, carga, y afinidad específica de unión. Es decir, las proteínas se separan a menudo en base a su carga neta mediante cromatografía de intercambio iónico.

El término "cromatografía de intercambio de cationes" tal como se utiliza en el contexto de la presente invención generalmente se refiere a todo tipo de procedimientos en los que las proteínas cargadas positivamente (es decir, proteínas catiónicas que tienen una carga neta positiva a pH neutro, tal como la proteína de la presente invención) pueden unirse a las resinas cargadas negativamente que contienen grupos carboxilato, tales como carboximetil-celulosa (CM-celulosa) o carboximetil-agarosa (CM-agarosa). Una proteína cargada positivamente unida a una resina puede entonces eluirse aumentando la concentración de cloruro de sodio o de otra sal en el tampón de elución ya que los iones de sodio compiten con los grupos cargados positivamente en la superficie de la proteína para unirse a la columna. Mediante la cromatografía de intercambio de cationes, el experto en la materia es capaz de separar una proteína de interés de otras proteínas mediante la unión a una resina particular, dicho procedimiento incluye el lavado de la proteína unida y eluyendo la proteína en presencia de concentraciones crecientes de sal. Por lo tanto, la cromatografía de intercambio de cationes de acuerdo con la presente invención permite al experto en la materia purificar una proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa en su estado nativo en grandes proporciones por medios bioquímicos. La cromatografía de intercambio de cationes de acuerdo con la presente invención se ejemplifica, por ejemplo en el Ejemplo 6 de la presente invención.

En una realización preferible, la composición del paso (b) se define como en cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente.

Por lo general, se someten mezclas de proteína a una serie de pasos de separación, cada uno basado en una propiedad diferente para producir una proteína pura.

Por consiguiente, en otra realización preferible, el método de la presente invención comprende uno o más pasos de purificación adicionales (i) antes y / o después del paso (b), y / o (ii) antes y / o después del paso (c).

El término "pasos de purificación adicionales" tal como se utiliza aquí, se refiere a cualquier tipo de método bioquímico que apoya y / o permite la purificación de una proteína de interés. Dichos métodos convencionales son bien conocidos por el experto en la materia, e incluyen por ejemplo, desplazamiento salino, diálisis, (ultra) filtración, (ultra) centrifugación, cromatografía de gel de filtración, cromatografía de intercambio aniónico, y / o cromatografía de afinidad.

En detalle, el desplazamiento salino se basa en el efecto que la mayoría de las proteínas son menos solubles, por ejemplo, a altas concentraciones de sal. La concentración de sal en la que una proteína precipita difiere de una proteína a otra. En consecuencia, el desplazamiento salino se puede utilizar para fraccionar y por lo tanto para separar proteínas unas de otras, por ejemplo, mediante el uso de sulfato de amonio. El desplazamiento salino también es útil para concentrar soluciones diluidas de proteínas, incluyendo las fracciones activas obtenidas de otros pasos de purificación.

La diálisis se puede utilizar para separar las proteínas de, por ejemplo, moléculas pequeñas mediante una membrana semipermeable, por ejemplo una membrana de celulosa que incluye poros de un tamaño definido. Las moléculas que tienen dimensiones mayores que el diámetro de poro son retenidas en el interior de la bolsa de diálisis, mientras que las moléculas más pequeñas y los iones atraviesan los poros de dicha membrana.

La (Ultra) filtración se puede utilizar para, por ejemplo, separar aún más la proteína de otros componentes de la composición. Los materiales de filtro que se pueden usar son el nitrato de celulosa, acetato de celulosa, PVC, teflón o membranas de cerámica, por ejemplo, de óxido de circonio. Los filtros pueden ser membranas individuales o estar ensamblados en sistemas de membrana, tales como, por ejemplo, módulos. Los módulos pueden ser módulos tubulares, módulos espirales o módulos de herida o módulos de fibras huecas. Los filtros pueden tener un tamaño de poro de hasta aproximadamente 5  $\mu\text{M}$ , preferiblemente 4  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente 3  $\mu\text{M}$  y lo más preferible 1  $\mu\text{M}$ . El tamaño de poro de filtro utilizado para ultrafiltración es preferiblemente inferior a 100.000 NMGT (límite de peso molecular nominal), más preferiblemente inferior a 75.000 NMGT, todavía más preferiblemente inferior a 50.000 NMGT y lo más preferible no superior a 30.000 NMGT. El tamaño de poro de los filtros utilizados para filtración estéril es preferiblemente no superior a 0,8  $\mu\text{M}$ , más preferiblemente no superior a 0,6  $\mu\text{M}$ , todavía más preferiblemente no superior a 0,4  $\mu\text{M}$  y lo más preferible no superior a 0,22  $\mu\text{M}$ . Los dispositivos de filtro utilizados para filtración o ultrafiltración están disponibles comercialmente de diversos proveedores, incluyendo, por ejemplo, Sartorius (Göttingen, Alemania) o Millipore (MA, EE.UU.).

La cromatografía de filtración en gel puede utilizarse para lograr una separación de las proteínas en base a sus tamaños. La proteína se aplica sobre la parte superior de una columna que consiste de perlas porosas de un polímero insoluble pero altamente hidratado, como dextrano, agarosa o poliacrilamida. La preparación comercial comúnmente utilizada de estas perlas incluye, pero no se limita a, Sephadex, Sepharose, y Biogel, y son normalmente de 100  $\mu\text{M}$  de diámetro.

La cromatografía de intercambio aniónico se puede utilizar para separar las proteínas cargadas negativamente (proteínas aniónicas) mediante la unión de las proteínas a resinas y / o membranas de dietilaminoetilcelulosa cargada positivamente (DEAE-celulosa). Un ejemplo de cromatografía de intercambio aniónico adecuada para proporcionar una composición purificada de acuerdo con la presente invención se detalla, por ejemplo, en el Ejemplo 6.

La cromatografía de afinidad es una técnica que aprovecha las ventajas de la alta afinidad de muchas proteínas para muchos grupos químicos específicos, y puede utilizarse eficazmente para aislar una proteína que reconoce un grupo determinado mediante (1) la unión covalente de dicho grupo o un derivado del mismo a una columna, y (2) la adición de una mezcla de proteínas de esta columna, que después se lava con tampón para eliminar las proteínas no unidas, y (3) eluir la proteína deseada mediante la adición de una alta concentración de una forma soluble de dicho grupo o alterando las condiciones para disminuir la afinidad de unión. En general, la cromatografía de afinidad es más eficaz cuando la interacción de la proteína y la molécula que se utiliza como cebo es altamente específico.

Además, en cada paso del método de acuerdo con la presente invención, puede analizarse la composición de la presente invención, por ejemplo, con el fin de determinar su concentración de proteína precisa antes de llevar a cabo un procesamiento adicional de la muestra.

En una realización preferible de la presente invención, se preparó una composición de la invención esencialmente como se ha descrito en el Ejemplo 5. Es decir, la alfa-galactosidasa (por ejemplo B-zima o la proteína de Id. de Sec. N° 1) se expresa o sobreexpresa en una célula huésped adecuada, por ejemplo, E. coli HB101. Las células huésped son lisadas (por ejemplo, mediante la descongelación y / o por medio de un dispositivo APV de alta presión) y la proteína se aisló mediante purificación. Para este propósito, el lisado puede

(i) tratarse para eliminar ácidos nucleicos, por ejemplo, por precipitación de polimina;  
(ii) concentrarse en presencia de arginina, por ejemplo, mediante centrifugación y / o ultrafiltrarse en una solución tampón que contiene arginina, por ejemplo, arginina de 250 a 320 mM, y / o  
(iii) purificarse por métodos de cromatografía, por ejemplo por medio de cromatografía de intercambio de cationes y, opcionalmente, por cromatografía de intercambio aniónico.

En una realización más preferible, el lisado puede

(i) tratarse para eliminar ácidos nucleicos, por ejemplo, por precipitación de polimina;  
(ii) concentrarse en presencia de arginina, por ejemplo, mediante centrifugación y / o ultrafiltrarse en una solución tampón que contiene arginina, por ejemplo, arginina de 250 a 320 mM; y  
(iii) purificarse por métodos de cromatografía, por ejemplo por medio de cromatografía de intercambio de cationes y, opcionalmente, por cromatografía de intercambio aniónico.

Los siguientes ejemplos y figuras pretenden ilustrar diversas realizaciones de la invención. Como tal, las modificaciones específicas discutidas no deben interpretarse como limitaciones al alcance de la invención. Será evidente para el experto en la materia que pueden realizarse varios equivalentes, cambios, y modificaciones sin apartarse del alcance de la invención, y debe entenderse por lo tanto que tales realizaciones equivalentes se incluyen en este documento.

## Figuras

Fig. 1 muestra la proteína alfa-galactosidasa purificada obtenida por el método de la presente invención después de separación en un gel de poliacrilamida SDS 4-20% de Tris / Glicina usando electroforesis en gel estándar. La proteína purificada se visualizó por la tinción del gel con azul de Coomassie (Simply Blue®, Invitrogen, CA, EE.UU.). Tampón de electroforesis: Mes 1x; Marcador: Mark 12® (Invitrogen, CA, EE.UU.).

Carril 1: Marcador de peso molecular (Mark 12®, Invitrogen, CA, USA)

Carril 2: 3 µg de alfa-galactosidasa (B-zima)

Carril 3: 4,5 µg de alfa-galactosidasa (B-zima)

Carril 4: 9 µg de alfa-galactosidasa (B-zima)

Fig. 2 muestra el análisis por HPLC de alfa-galactosidasa purificada (B-zima). Se aplicaron 100 µg de muestra de proteína (1,5 mg/ml proteína) sobre una columna TSK 3000 (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania).

Fig. 3 muestra la secuencia de aminoácidos (Id. de Sec. N°: 1) de un fragmento alfa-galactosidasa (fragA) del organismo *Bacteroides fragilis* con una longitud total de 572 aminoácidos (aa). La proteína tiene un peso molecular calculado de 64564,8 Da, y un punto isoeléctrico calculado de 6,72.

## Ejemplos

## Ejemplo 1: Prueba de actividad enzimática de alfa-galactosidasa

Se midió la actividad enzimática de alfa-galactosidasa esencialmente tal como se ha descrito previamente (Liu et al., 2007). Como sustrato sintético se utilizó, 4-nitrofenil-α-D-galactósido. La liberación de p-nitrofenol fue seguida a una longitud de onda de 405 nm en un tampón de reacción que contenía fosfato sódico 100 mM, cloruro sódico 50 mM, pH 6,8.

## Ejemplo 2: Detección de aditivos

Se analizó una serie de aditivos para mejorar la solubilidad de la alfa-galactosidasa parcialmente purificada. Se utilizó como muestra el sobrenadante del paso de precipitación de polimina (ver Ejemplo 5 a continuación).

En detalle, se prepararon una serie de tampones que contienen una sustancia tampón (Tris 50 mM, cloruro sódico 20 mM de, pH 7,0) y aditivos a concentraciones diferentes (Tabla 1). Se diafiltraron alícuotas del sobrenadante que contenían aproximadamente 20 mg / ml de proteína a temperatura ambiente frente los respectivos tampones. Durante el paso de diafiltración se monitorizó la apariencia de la solución de alfa-galactosidasa mediante inspección visual de las muestras. En la mayoría de las muestras, se produjo una precipitación de alfa-galactosidasa durante la diafiltración.

Los aditivos comunes como, por ejemplo, detergentes, urea y azúcares fracasaron a la hora de solubilizar la enzima. Tal como se muestra en la Tabla 1, se encontró que el aditivo preferido para mantener la enzima en solución fue la L-arginina.

La Tabla 1 muestra la influencia de los aditivos sobre la solubilidad de la alfa-galactosidasa.

| Aditivo                | Concentración | Apariencia              |
|------------------------|---------------|-------------------------|
| Glicerol [%]           | 1,0           | precipitado blanco (pb) |
|                        | 3,0           | pb                      |
|                        | 5,0           | pb                      |
|                        | 10,0          | pb                      |
| MgCl <sub>2</sub> [mM] | 1,0           | pb                      |
|                        | 5,0           | pb                      |
|                        | 10,0          | pb                      |
|                        | 20,0          | pb                      |
| Glucopon [%]           | 0,1           | pb                      |
|                        | 1,0           | pb                      |
|                        | 5,0           | pb                      |
|                        | 10,0          | pb                      |
| DTT [mM]               | 1,0           | pb                      |
|                        | 5,0           | pb                      |
|                        | 10,0          | pb                      |
|                        | 20,0          | pb                      |
| Polimina P [%]         | 0,01          | pb                      |
|                        | 0,1           | pb                      |

| <i>Aditivo</i>   | <i>Concentración</i> | <i>Apariencia</i>          |
|------------------|----------------------|----------------------------|
| Tween 20[%]      | 5,0                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
|                  | 0,1                  | pb                         |
|                  | 0,5                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
| Nonidet P40 [%]  | 2,0                  | pb                         |
|                  | 0,1                  | pb                         |
|                  | 0,5                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
| BSA [g/ml]       | 2,0                  | Menos precipitado          |
|                  | 1,0                  | pb                         |
|                  | 10,0                 | pb                         |
|                  | 100,0                | pb                         |
| Urea [mM]        | 1000,0               | Menos precipitado          |
|                  | 1,0                  | pb                         |
|                  | 10,0                 | pb                         |
|                  | 50,0                 | pb                         |
| Rafinosa         | 100,0                | pb                         |
|                  | 0,25                 | pb                         |
|                  | 0,5                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
| Sacarosa         | 2,0                  | pb                         |
|                  | 0,1                  | pb                         |
|                  | 0,5                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
| D,L-Glicina [mM] | 2,0                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
|                  | 10,0                 | pb                         |
|                  | 50,0                 | pb                         |
| L-Arginina [mM]  | 100,0                | pb                         |
|                  | 0,1                  | pb                         |
|                  | 1,0                  | pb                         |
|                  | 10,0                 | pb                         |
|                  | 100,0                | solución ligeramente opaca |
|                  | 150,0                | solución clara             |
|                  | 200,0                | solución clara             |

Tal como se ha demostrado por los resultados mostrados en la Tabla 1, la alfa-galactosidasa se estabilizó solamente en presencia de arginina en una concentración final superior a 100 mM, como al menos 150 mM.

### 5 Ejemplo 3: Detección de las condiciones del tampón

Para caracterizar la solubilidad de la alfa-galactosidasa, se estudiaron diferentes condiciones de tampón. Para ello, se utilizó como muestra el sobrenadante del paso de precipitación de polimina (ver Ejemplo 5). Se analizó un rango de pH entre 4,5 y 9,5 en tampón de fosfato de sodio 50 mM.

10 Tal como se indica en la Tabla 2, también se estudiaron diferentes conductividades. La conductividad se ajustó mediante la adición de alícuotas de una solución de reserva de cloruro de sodio a la correspondiente solución tampón. Se monitorizó la apariencia de la solución alfa-galactosidasa mediante inspección visual de las muestras. Tal como se muestra en la Tabla 2, la enzima precipitó bajo condiciones de tampón ácidas y neutras (valores de pH inferiores a pH 7,5). Se mantuvo en solución a valores de pH más altos. La conductividad del tampón no afectó a la solubilidad en las condiciones analizadas.

Tabla 2 muestra la influencia del pH y la conductividad sobre la solubilidad de la alfa-galactosidasa.

| pH   | Conductividad [mS] | Apariencia         |
|------|--------------------|--------------------|
| 4,50 | 6,00               | precipitado blanco |
| 5,50 | 6,00               | precipitado blanco |
| 6,50 | 6,00               | precipitado blanco |
| 7,50 | 6,00               | precipitado blanco |
| 7,50 | 15,00              | precipitado blanco |
| 8,00 | 6,00               | solución opaca     |
| 8,00 | 15,00              | solución opaca     |

|      |       |                |
|------|-------|----------------|
| 8,50 | 15,00 | solución opaca |
| 9,00 | 6,00  | solución clara |
| 9,50 | 15,00 | solución clara |

El resultado mostrado en la Tabla 2 indica que la proteína se mantiene en Solución a un pH entre 9,0 y 9,5. No obstante, se encontró que la proteína perdía actividad a valores de pH más altos.

#### 5 Ejemplo 4: Medición de proteína

La concentración de proteína de las correspondientes fracciones y conjuntos se determinaron midiendo la absorbancia de la proteína a 280 nm. La medición de la concentración de proteína es un método estándar conocido en la materia. Para la alfa-galactosidasa recombinante, se utilizó un coeficiente de extinción molecular de 1,279 para calcular la concentración de la enzima.

#### Ejemplo 5: Preparación de alfa-galactosidasa (B-zima)

Células de *E. coli* HB101 que sobreexpresaban alfa-galactosidasa recombinante se utilizaron como material de partida para preparar una composición estabilizada de alfa-galactosidasa (B-zima). La preparación se llevó a cabo por medio de ultrafiltración, y por un posterior paso de diálisis después de la lisis celular y separación de los ácidos nucleicos. El proceso de preparación produjo una composición estable de enzima alfa-galactosidasa recombinante (B-zima) que puede almacenarse y utilizarse para otros procedimientos de purificación.

Se utilizaron los siguientes tampones:

Tampón A: Tris/HCl 50 mM, NaCl 20 mM, pH 7,5 +/- 0,2 (6 mS/cm +/- 0,1)

Tampón B: fosfato sódico 50 mM, L-Arginina 310 mM, pH 6,0 +/- 0,2 (20 mS/cm +/- 0,1)

Lisis celular:

3,6 l de tampón A se añadieron a 260 g de células de *E. coli* congeladas (peso en seco; equivalente a aproximadamente 1000 g de peso húmedo). Las células se descongelaron y suspendieron. Posteriormente, las células se lisaron por medio de un dispositivo APV de alta presión (de 750 hasta 800 bar) mientras se enfriaba la suspensión en hielo. Los posteriores pasos del procedimiento de purificación se realizaron a temperatura ambiente.

Precipitación de ácidos nucleicos:

Después de la lisis celular, los ácidos nucleicos presentes en el extracto crudo se eliminaron mediante precipitación con polimina. Para ello, se añadió una porción de cloruro de sodio 3 M (10% del volumen) al extracto a una concentración final de 300 mM. Si es necesario, el valor de pH se reajustó a pH 7,5 ± 0,2 utilizando NaOH 4 N o HCl 4 N. Entonces, se añadió una solución de polimina P (10%) por pasos hasta lograr una precipitación completa de los ácidos nucleicos. Después, la solución se centrifugó durante 10 min a 5000 rpm. El sobrenadante obtenido se almacenó opcionalmente a 4 °C durante toda la noche antes de someterse a un paso adicional de concentración.

Concentración y ultrafiltración (es decir, diafiltración):

El sobrenadante claro obtenido después del paso de centrifugación (es decir, el sobrenadante de polimina P) tiene normalmente una concentración de proteína de 20-30 mg / ml. El sobrenadante se concentró utilizando la membrana Amicon Ultra 4 ® (Millipore, MA, EE.UU.). El sobrenadante concentrado de polimina P se almacenó opcionalmente a 4 °C. El sobrenadante se diafiltró a continuación, por medio de un dispositivo de ultrafiltración. Para este propósito, se utilizó una membrana de 30 kDa (por ejemplo, Pellicon 2, Millipore, MA, EE.UU.). La solución se concentró primero utilizando una membrana de 30 kDa (por ejemplo, Pellicon 2, Millipore, EE.UU.) y luego se dializó extensamente (diafiltró) frente a 5 volúmenes de tampón B (pH ajustado con HCl 25%). El resultado del paso de diálisis es una composición estabilizada de alfa-galactosidasa con una actividad específica de 0,5 a 0,8 U / mg.

Debido a la adición de arginina, la diafiltración de la composición que comprende alfa-galactosidasa es posible sin precipitación de la proteína. El procedimiento como se ha expuesto anteriormente también permite la ulterior purificación de la proteína a través de cromatografía de intercambio iónico en Poros ® HS 50 (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania).

#### Ejemplo 6: Purificación de alfa-galactosidasa (B-zima)

La purificación se llevó a cabo mediante métodos cromatográficos. Se realizaron dos cromatografías consecutivas. En el primer paso de cromatografía, la alfa-galactosidasa se une a una resina de intercambio de cationes y se eluye de la columna mediante un tratamiento de alta salinidad. En el segundo paso de cromatografía, la enzima se aplica a una resina de intercambio aniónico y se obtiene tras la salida del flujo. El proceso de purificación proporciona la enzima alfa-galactosidasa recombinante en una calidad altamente purificada.

Se utilizaron los siguientes tampones:

Tampón C: fosfato sódico 50 mM, L-Arginina 0,043 M, pH 6,0 +/- 0,2 (7 mS/cm +/- 0,1)  
 5 Tampón D: fosfato sódico 50 mM, L-Arginina 0,043 M, NaCl 350 mM; pH 6,0 +/- 0,2 (40 mS/cm +/- 0,1)  
 Tampón E: Tris/HCl 20 mM, NaCl 60 mM, pH 8,0 +/- 0,2 (7,5 mS/cm +/- 0,1)  
 Tampón F: fosfato sódico 25 mM, NaCl 0,3 M, pH 7,0 +/- 0,2 (> 30 mS/cm).

Todos los valores de pH indicados se definen para comprender una desviación de +/- 0,2 unidades de pH.

Cromatografía en Poros® HS 50 (Cromatografía de intercambio de cationes):

Una columna Poros® HS 50 (5 l, Applied Biosystems, Darmstadt, Alemania) se equilibró con tampón C. La composición estabilizada de alfa-galactosidasa obtenida como se describe en el Ejemplo 5 se cargó en la columna.  
 15 La columna Poros® HS 50 tal como se usa en la presente invención puede cargarse con 0,2 a 1 g de proteína / 33 ml de material de intercambio iónico.

La columna se lavó utilizando tampón C. Tras el paso de lavado la enzima se eluyó mediante el uso de tampón D. La enzima se eluyó en un solo pico. En las fracciones relevantes se determinó la actividad enzimática y la concentración de proteína. Se agruparon las fracciones que contenían la alfa-galactosidasa recombinante.

Ultrafiltración:

El agrupamiento de fracciones que contenían la enzima se diafiltró por medio de un dispositivo de ultrafiltración. Se utilizó una membrana de 30 kDa (por ejemplo, Pellicon 2, Millipore, EE.UU.). La solución de proteína se dializó extensamente frente a tampón E. La solución de proteína se almacenó opcionalmente a 4 °C antes de posteriores procesamientos.

Cromatografía en O Sepharose® de flujo rápido (Cromatografía de intercambio de aniones):

El conjunto dializado se aplicó sobre una columna Q Sepharose® de flujo rápido (500 ml, Amersham Bioscience, Uppsala, Suecia) que se equilibró con 2 volúmenes de columna de tampón E. A lo sumo, se debe aplicar a la columna una concentración máxima de proteína de 40 mg por ml de resina de intercambio iónico. La columna se lavó con tampón E. Se recogieron las fracciones y se monitorizó para actividad alfa-galactosidasa. Se tomaron alícuotas de las fracciones, se analizó la actividad y se visualizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS. La alfa-galactosidasa recombinante se eluyó a través del flujo. Las fracciones que mostraron una banda pura de alfa-galactosidasa con un peso molecular de 64,5 kDa se combinaron y dializaron frente al tampón de almacenamiento (tampón F). Tal como muestra la electroforesis en gel de SDS, la preparación de enzima es pura (Figura 1). En el análisis de HPLC, se determinó una pureza de > 99% para la preparación de enzima (Figura 2).

Ejemplo 7: electroforesis en gel de SDS

La electroforesis en gel de SDS se llevó a cabo utilizando geles disponibles comercialmente (4-20%, Invitrogen, CA, EE.UU.). Después de realizar la electroforesis en gel, las proteínas se detectaron por tinción con azul de Coomassie (Simply Blue®, Invitrogen, CA, EE.UU.). Se utilizó un marcador de peso molecular (Mark 12®, Invitrogen, CA, EE.UU.) para determinar el peso molecular aparente de las proteínas. Los resultados se muestran en la figura. 1.

Ejemplo 8: HPLC analítica

Se utilizó la HPLC analítica para determinar la pureza de los grupos y de las fracciones de proteína. Las alícuotas (100 µL) se aplicaron sobre una TSK G3000 SW (Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania). La columna se utilizó en un tampón apropiado (Tris / HCl 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,5). Las proteínas se detectaron mediante la medición de la absorbancia a 280 nm. Los resultados se muestran en la figura. 2.

Referencias citadas

Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410.  
 Arakawa et al. (2006), Protein Peptide Letters, 13, 921-927.  
 Bakumina et al. (1998), Biochemistry (Mosc.) 63 (10), 1420-1427.  
 60 Davies et al. (2005), Current Opin. Struct. Biol. 15, 637-645.  
 Ishibashi et al. (2005), Protein Expression and Purific. 42, 1-6.  
 Liu, et al. (2007), Nature Biotechnology Vol. 25 (4), 454-464.  
 Pearson y Lipman (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. US. A. 85: 2444.  
 Shiraki et al. (2002), J. Biochem. 132, 591-595.  
 65 Smith y Waterman (1981), Adv. Appl. Math. 2: 482.  
 Sucker et al. (1991), Pharmazeutische Technologie, 2ª Edición, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Alemania.

Tsumoto et al. (2004), Biotechnol. Prog. 20, 1301-1308.

Listado de secuencias

5 <110> Roche Diagnostic GmbH/ Hoffmann-La Roche AG  
 <120> Una composición acuosa estabilizada de alfa-galactosidasa y métodos relacionados con la misma  
 <130> R66370EP2  
 10 <160> 1  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 15 <210> 1  
 <211> 572  
 <212> PRT  
 20 <213> Bacteroides fragilis  
 <400> 1  
 Met Arg Val Tyr Asp Ile Ser Gln Phe Gly Leu Lys Ala Asn Ser Lys  
 1 5 10 15  
 Lys Asn Ala Ser Pro Val Val Arg Lys Ala Ile Ala Lys Ile Lys Ala  
 20 25 30  
 Glu Cys Arg Asp Gly Glu Lys Val Ile Leu Arg Phe Pro Ala Gly Arg  
 35 40 45  
 Tyr Asn Phe His Glu Ala Gly Ser Thr Val Arg Glu Tyr Tyr Ile Ser  
 50 55 60  
 Asn His Asp Gln Asp Asn Pro Lys Lys Val Gly Ile Ala Leu Glu Asp  
 65 70 75 80  
 Met Lys Asn Leu Thr Ile Asp Gly Gln Gly Ser Glu Phe Val Phe Tyr  
 85 90 95  
 Gly Arg Met Ile Pro Val Ser Leu Leu Arg Ser Glu Asn Cys Val Leu  
 100 105 110  
 Lys Asn Phe Ser Ile Asp Phe Glu Gln Pro His Ile Ala Gln Val Gln  
 115 120 125  
 Val Val Glu Asn Asp Pro Glu Lys Gly Ile Thr Phe Glu Pro Ala Pro  
 130 135 140  
 Trp Val Asp Tyr Arg Ile Ser Lys Asp Ser Val Phe Glu Gly Leu Gly  
 145 150 155 160  
 Glu Gly Trp Val Met Arg Tyr Ser Trp Gly Ile Ala Phe Asp Gly Lys  
 165 170 175  
 Thr Lys His Val Val Tyr Asn Thr Ser Asp Ile Gly Cys Pro Thr Lys  
 180 185 190  
 Gly Ala Phe Glu Val Ala Pro Arg Arg Ile Cys Ser Pro Lys Trp Lys

ES 2 395 232 T3

| 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ala | Arg | Leu | Val | Pro | Gly | Thr | Val | Val | Ala | Met | Arg | Gly | Trp | Gly |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Arg | Pro | Thr | Pro | Gly | Ile | Phe | Met | Ser | His | Asp | Val | Asn | Thr | Ser | Leu |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Asp | Val | Lys | Val | His | Tyr | Ala | Glu | Gly | Met | Gly | Leu | Leu | Ala | Gln |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Leu | Cys | Glu | Asp | Ile | Thr | Leu | Asp | Gly | Phe | Gly | Val | Cys | Leu | Lys | Gly |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Asp | Asn | Asp | Pro | Arg | Tyr | Phe | Thr | Thr | Gln | Ala | Asp | Ala | Thr | His | Phe |
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |
| Ser | Gly | Cys | Lys | Gly | Lys | Ile | Val | Ser | Lys | Asn | Gly | Leu | Tyr | Glu | Gly |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Met | Met | Asp | Asp | Ala | Ile | Asn | Val | His | Gly | Thr | Tyr | Leu | Lys | Val | Ile |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Lys | Arg | Val | Asp | Asp | His | Thr | Leu | Ile | Gly | Arg | Tyr | Met | His | Asp | Gln |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Ser | Trp | Gly | Phe | Glu | Trp | Gly | Arg | Pro | Gly | Asp | Asp | Val | Gln | Phe | Val |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Arg | Ser | Glu | Thr | Met | Glu | Leu | Ile | Gly | Lys | Gln | Asn | Gln | Ile | Thr | Ala |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Ile | Arg | Pro | Tyr | Asp | Lys | Gly | Glu | Ile | Arg | Gly | Ala | Arg | Glu | Phe | Ser |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ile | Thr | Phe | Lys | Glu | Ala | Ile | Asp | Pro | Ala | Ile | Asn | Glu | Lys | Ser | Gly |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Phe | Gly | Ile | Glu | Asn | Leu | Thr | Trp | Thr | Pro | Glu | Val | Leu | Phe | Ala | Gly |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Asn | Thr | Ile | Arg | Asn | Asn | Arg | Ala | Arg | Gly | Thr | Leu | Phe | Ser | Thr | Pro |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Lys | Lys | Thr | Val | Val | Glu | Asp | Asn | Leu | Phe | Asp | His | Thr | Ser | Gly | Thr |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Ala | Ile | Leu | Leu | Cys | Gly | Asp | Cys | Asn | Gly | Trp | Phe | Glu | Thr | Gly | Ala |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Cys | Arg | Asp | Val | Thr | Ile | Arg | Arg | Asn | Arg | Phe | Ile | Asn | Ala | Leu | Thr |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |

Asn Met Phe Gln Phe Thr Asn Ala Val Ile Ser Ile Tyr Pro Glu Ile  
485 490 495

Pro Asn Leu Lys Asp Gln Gln Lys Tyr Phe His Gly Gly Lys Asp Gly  
500 505 510

Gly Ile Val Ile Glu Asp Asn Glu Phe Asp Thr Phe Asp Ala Pro Ile  
515 520 525

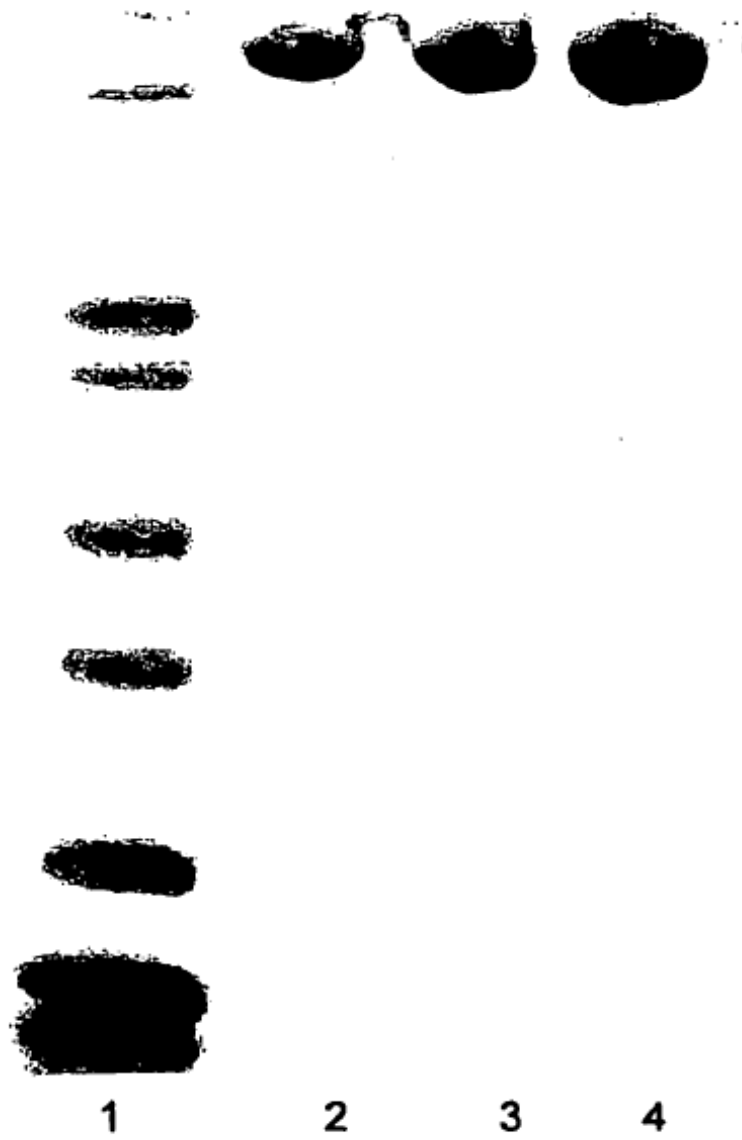
Leu Tyr Ala Lys Ser Val Asp Gly Leu Ile Phe Arg Asn Asn Val Ile  
530 535 540

Lys Thr Asn Thr Glu Phe Lys Pro Phe His Trp Asn Lys Asp Arg Phe  
545 550 555 560

Leu Leu Glu Arg Val Thr Asn Val Lys Ile Ser Glu  
565 570

# REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición acuosa que comprende una proteína bacteriana con actividad enzimática alfa-galactosidasa, que se caracteriza en que dicha composición contiene arginina a una concentración por encima de 100 mM, en particular a una concentración de al menos 150 mM, y en la que la conductividad de dicha composición es como mucho 40 mS/cm.
- 10 2. La composición de la reivindicación 1, que se caracteriza en que dicha composición contiene arginina a una concentración entre 150 mM y 2 M, más preferiblemente entre 200 y 400 mM, lo más preferible entre 250 mM y 320 mM.
- 15 3. La composición de la reivindicación 1 o 2, que se caracteriza además en que la conductividad de dicha composición está entre 15 mS/cm y 25 mS/cm, más preferiblemente entre 18 mS/cm y 22 mS/cm.
- 20 4. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que se caracteriza en que el pH de dicha composición está entre pH 5 y pH 7.5, preferiblemente entre pH 5,5 y pH 7, más preferiblemente entre pH 5,8 y pH 6,5.
- 25 5. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que se caracteriza en que dicha composición deriva de una célula huésped bacteriana, preferiblemente de *E. coli*.
- 30 6. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se caracteriza además en que el contenido total de proteína de dicha composición es de al menos 20 mg/ml.
- 35 7. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que se caracteriza además en que la actividad enzimática de alfa-galactosidasa está entre 0,5 y 0,8 unidades/mg de proteína total.
- 40 8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que se caracteriza en que dicha proteína posee una especificidad de sustrato de EC 3.2.1.22, preferiblemente en el que dicha proteína hidroliza porciones terminales de alfa-1,3-galactosilo.
- 45 9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se caracteriza en que dicha proteína con actividad enzimática e alfa-galactosidasa es un derivado o fragmento funcionalmente activo de una proteína natural.
- 50 10. La composición de la reivindicación 9, que se caracteriza en que dicha proteína deriva del organismo bacteriano *Bacteroides fragilis*, preferiblemente en la que dicha proteína es un fragmento de la alfa-galactosidasa de *Bacteroides fragilis* que comprende o consiste en una secuencia de aminoácidos de Id. de Sec. Nº: 1, o cualquier derivado o fragmento funcionalmente activo de la misma.
- 55 11. Un método para estabilizar una composición acuosa que comprende una proteína bacteriana con actividad enzimática de alfa-galactosidasa, que se caracteriza en que dicho método comprende el paso de añadir arginina a dicha composición a una concentración final por encima de 100 mM, en particular de al menos 150 mM, y en que la conductividad de dicha composición es como mucho 40 mS/cm.
- 60 12. El método de la reivindicación 11, en el que dicha composición se caracteriza además como en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
13. Un método para preparar una composición acuosa purificada que comprende una proteína bacteriana con actividad enzimática alfa-galactosidasa, dicho método comprende los pasos de
- (a) proporcionar una composición que contiene dicha proteína con actividad enzimática alfa-galactosidasa,
- (b) concentrar la composición del paso (a) en presencia de arginina a una concentración por encima de 100 mM, en particular de al menos 150 mM, en la que la composición posee una conductividad de como mucho 40 mS/cm, y
- (c) purificar la composición del paso (b) mediante cromatografía de intercambio de cationes.
14. El método de la reivindicación 13, en el que dicha composición del paso (b) se caracteriza además como en cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10.
15. El método de la reivindicación 13 o 14, que se caracteriza además en que dicho método comprende uno o más pasos de purificación adicionales (i) antes y/o después del paso (b), y/o (ii) antes y/o después del paso (c).



**Fig. 1**

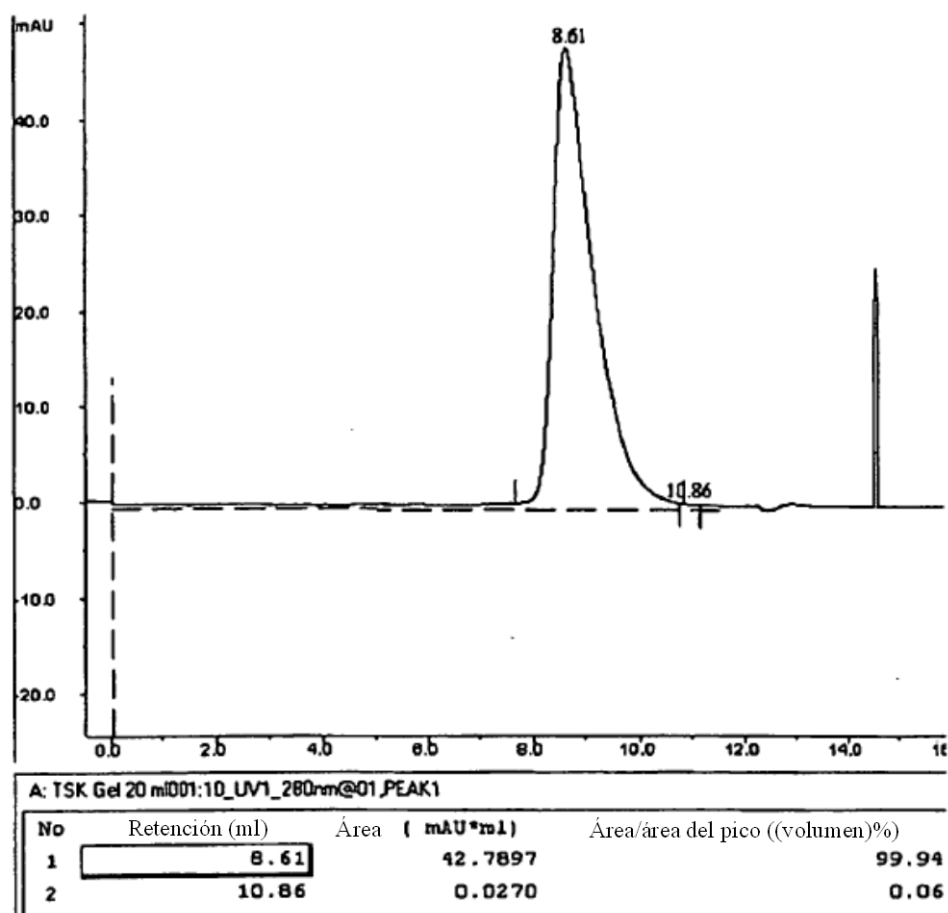


Fig.2

MRVYDISQFGLKANSKKNASPVVRKAIKAECDGEEKVILRFP  
 AGRYNFHEAGSTVREYYISNHDQDNPKKVGIALEDMKNLTIDGQG  
 SEFVFYGRMIPVSLLRSENCVLKNFSIDFEQPHIAQVQVVENDPE  
 KGITFEPAPWVDYRISKDSVFEGLGEGWVMRYSWGIAFDGKTKHV  
 VYNTSDIGCPTKGAFEVAPRRICSPKWKDARLVPGTVVAMRGWGR  
 PTPGIFMSHDVNTSLLDVKVHYAEGMGLLAQLCEDITLDGFGVCL  
 KGDNDPRYFTTQADATHFSGCKGKIVSKNGLYEGMMDDAINVHGT  
 YLKVIKRVDHTLIGRYMHDQSWGFEWGRPGDDVQFVRSETMELI  
 GKQNQITAIRPYDKGEIRGAREFSITFKEAIDPAINEKSGFGIEN  
 LTWTPEVLFAGNTIRNNRARGTLFSTPKKTVVEDNLFHDHTSGTAI  
 LLCGDCNGWFETGACRDVTIRNRFINALTNMFQFTNAVISIYPE  
 IPNLKDQQKYFHGGKDGIVIEDNEFDTFDAPILYAKSVDGLIFR  
 NNVIKTNTEFKPFHWNKDRFLLERVTVNKISE

(Id. de Sec. Nº 1)

Fig. 3