

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 713 488**

51 Int. Cl.:

A61K 38/47 (2006.01)
A61K 38/45 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
C07K 1/34 (2006.01)
C07K 1/36 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2007 E 13167427 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.01.2019 EP 2628746**

54 Título: **Un proceso para la concentración de un polipéptido**

30 Prioridad:

04.04.2006 DK 200600488
05.07.2006 DK 200600922

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

22.05.2019

73 Titular/es:

CHIESI FARMACEUTICI S.P.A. (100.0%)
Via Palermo 26/A
43122 Parma, IT

72 Inventor/es:

NILSSON, STEFAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 713 488 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

Un proceso para la concentración de un polipéptido

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un polipéptido concentrado de interés como un medicamento para la inyección subcutánea y a una composición que comprende al menos 10 mg/ml del polipéptido de interés.

10

Antecedentes de la invención

Algunos polipéptidos son útiles como un medicamento para la prevención y/o el tratamiento de determinadas enfermedades. La capacidad para inyectar un medicamento por vía subcutánea es una ventaja que facilita a los

15

Hay restricciones fisiológicas en cuanto a cómo de grande es el volumen posible que se puede inyectar por vía subcutánea. Por lo tanto, es una ventaja para los medicamentos que se van a administrar por vía subcutánea que estén disponibles en una alta concentración para asegurar que el paciente recibe una cantidad adecuada del medicamento y(o para evitar múltiples inyecciones subcutáneas.

20

El documento WO 99/37325 desvela métodos de tratamiento y de prevención de la enfermedad provocados por la ausencia o la deficiencia de la actividad de enzimas que pertenecen a la vía biosintética del grupo hemo. El documento WO 03/002731 desvela un proceso para la purificación de una porfobilinógeno desaminasa recombinante a escala industrial y al uso del producto purificado para la preparación de un medicamento. De forma similar, los documentos

25

WO 02/099092 y WO 2005/094874 proporcionan alfa-manosidasa lisosómica y usos terapéuticos de las mismas. Por último, el documento WO 2005/073367 proporciona un procedimiento para la purificación de arilosulfatasa A y el uso de la enzima en el tratamiento de leucodistrofia metacromática.

30

El documento WO 02/099092 desvela una célula capaz de producir alfa-manosidasa lisosómica humana recombinante (rh-LAMAN, del inglés *recombinant human lysosomal alpha-mannosidase*), comprendiendo dicha célula un fragmento EcoRI-XbaI de 3066 pares de bases de un ADNc humano que codifica la proteína LAMAN en la que la posición se corresponde con la posición 186 de la proteína hLAMAN de longitud completa es ácido aspártico (Asp, D). Asimismo, el documento WO 02/099092 desvela un método para la preparación de LAMAN humana recombinante así como la

35

El documento WO 2005/094874 desvela un método de reducción de los niveles intracelulares de oligosacáridos neutros ricos en manosa en células dentro de una o más regiones del sistema nervioso central de un sujeto, comprendiendo dicho método la administración a dicho sujeto de una formulación de alfa-manosidasa lisosómica, que no comprende un componente con una capacidad conocida para dirigir el sistema nervioso central.

40

El documento WO 03/029403 desvela un método de tratamiento de un sujeto que padece un trastorno de almacenamiento lisosómico que no sea la enfermedad de Fabry provocado por una deficiencia de una proteína específica que comprende: (a) producir dicha proteína o un fragmento activo de la misma en un cultivo de células de insecto, y (b) administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de dicha proteína a dicho sujeto. También el documento WO 03/029403 desvela una composición farmacéutica que comprende una proteína útil para el tratamiento de un trastorno de almacenamiento lisosómico que no sea la enfermedad de Dabry que se importa de manera selectiva a los macrófagos cuando se administra a un sujeto y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde dicha proteína se produce en un cultivo celular de insecto.

45

La presente invención se refiere al uso de una composición que comprende un polipéptido concentrado de interés para la fabricación de un medicamento para inyección subcutánea en un mamífero.

50

Sumario de la invención

55

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos 10 mg/ml de alfa-manosidasa, y en donde menos del 5 % de la cantidad total de la alfa-manosidasa en dicha composición está presente en la forma de agregados, abarcando dichos agregados cualquier dímero o multímero de la alfa-manosidasa.

60

En otro aspecto más, la presente invención se refiere al uso de una composición que comprende 50-300 mg/ml de alfa-manosidasa para la fabricación de un medicamento para inyección subcutánea en un mamífero. En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso una composición que comprende 50-300 mg/ml de alfa-manosidasa como medicamento, y en donde la composición es para inyección subcutánea en un mamífero.

65

DEFINICIONES

Para los fines de la presente invención, las alineaciones de secuencias y el cálculo de las puntuaciones de homología se pueden hacer usando una alineación completa de Smith-Waterman, útil para alineación de proteínas y de ADN. Las matrices de puntuación por defecto BLOSUM50 y la matriz de identidad se usan para las alineaciones de proteína y de ADN, respectivamente. La penalización para el primer resto en un hueco es -12 para las proteínas y -16 para el ADN, mientras que la penalización para restos adicionales en un hueco es -2 para las proteínas y -4 para el ADN. La alineación se puede hacer con el paquete FASTA versión v20u6 (W. R. Pearson y D. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448, y W. R. Pearson (1990) "Rapid and Sensitive Sequence Comparison with FASTP and FASTA", Methods in Enzymology, 183:63-98).

Se pueden hacer alineaciones múltiples de secuencias proteicas usando "ClustalW" (Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22:4673-4680). Las alineaciones múltiples de secuencias de ADN se pueden hacer usando la alineación de la proteína como un molde, sustituyendo los aminoácidos con el correspondiente codón de la secuencia de ADN.

En el contexto de la presente invención, el término "C. E." (Clase Enzimática) se refiere al sistema de clasificación de enzimas reconocido a nivel internacional, de Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes, Academic Press, Inc.

El término "origen" usado en el contexto de las secuencias de aminoácidos, por ejemplo, secuencias de proteínas o de ácidos nucleicos, se debe entender que se refiere al organismo del que procede. Dicha secuencia se puede expresar por otro organismo usando los métodos de tecnología genética bien conocidos por el experto en la materia. Esto también abarca secuencias que se han sintetizado químicamente. Además, dichas secuencias pueden comprender pequeños cambios tales como la optimización por codón, es decir, cambios en las secuencias de ácidos nucleicos que no afectan a la secuencia de aminoácidos.

Descripción detallada de la invención

Polipéptido de interés

El polipéptido de la presente invención puede ser en particular una hormona o una variante de hormona, una enzima, un receptor o porción del mismo, un anticuerpo o porción del mismo, un alérgeno o un reportero. El polipéptido de interés puede ser en particular una enzima seleccionada de uno de seis grupos principales, tal como una oxidoreductasa (C.E. 1), una transferasa (C.E. 2), una hidrolasa (C.E. 3), una liasa (C.E. 4), una isomerasa (C.E. 5), o una ligasa (C.E. 6). En un aspecto más particular, el polipéptido de interés puede ser una aminopeptidasa, amilasa, carbohidrasa, carboxipeptidasa, catalasa, celulasa, celobiohidrolasa, quitinasa, cutinasa, ciclodextrina glucosiltransferasa, desoxirribonucleasa, endoglucanasa, esterasa, alfa-galactosidasa, beta-galactosidasa, glucoamilasa, alfa-glucosidasa, beta-glucosidasa, invertasa, lacasa, lipasa, manosidasa, mutanasa, oxidasa, enzima pectinolítica, peroxidasa, fosfolipasa, fitasa, polifenoloxidasa, enzima proteolítica, ribonucleasa, transglutaminasa, xilanaso o beta-xilosidasa.

El polipéptido de interés puede ser en particular un polipéptido que es útil como un medicamento.

Los ejemplos de un polipéptido adecuado de interés incluyen pero sin limitación uno seleccionado del grupo que consiste en una porfobilinógeno desaminasa, una arilo sulfatasa, una alfa-manosidasa y una galactocerebrosidasa.

En principio, un polipéptido de interés que proviene de cualquier origen se puede tratar de acuerdo con los métodos de la presente divulgación.

En una realización particular, el polipéptido de interés puede ser de origen humano. Especialmente en el ámbito del uso de un polipéptido de interés para la fabricación de un medicamento que se va a administrar a seres humanos, el polipéptido puede ser de origen humano, ya que esto puede minimizar el riesgo de reacciones alérgicas indeseadas. Las variaciones naturales del polipéptido humano debido a, por ejemplo, el polimorfismo están incluidas en la expresión "origen humano" en el ámbito de la presente invención.

El polipéptido de interés se puede producir en particular como una proteína recombinante, es decir, una secuencia de nucleótidos que codifica el polipéptido de interés se puede introducir en una célula para la expresión del polipéptido de interés. La expresión recombinante puede ser homóloga o heteróloga, es decir, el polipéptido de interés se pueden expresar en la célula que lo expresa de forma natural (expresión homóloga) o se puede expresar en una célula que no lo expresa de forma natural (expresión heteróloga).

El polipéptido recombinante de interés se puede expresar por cualquier célula adecuada para la producción recombinante del polipéptido particular de interés. Los ejemplos de células adecuadas incluyen pero no se limitan a células procariotas, tales como una célula *E. coli* o una célula de *Bacillus*. Los ejemplos de células eucariotas

adecuadas incluyen pero no se limitan a una célula de levadura o a una célula de mamífero tal como una célula de ovario de hámster chino (CHO). Como alternativa, puede ser una célula humana.

Las células hospedadoras adecuadas para la expresión de polipéptidos glucosilados provienen de organismos multicelulares. Los ejemplos de células de invertebrados incluyen células vegetales y de insecto. Sin embargo, la célula hospedadora también puede ser una célula de vertebrado, y la propagación de las células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) ha llegado a ser un procedimiento habitual. La expresión "polipéptido recombinante" o "polipéptido recombinante de interés" indica en el presente documento un polipéptido producido de manera recombinante.

La referencia a un polipéptido particular de interés incluye en el ámbito de la presente invención también las partes o análogos funcionalmente equivalentes del polipéptido de interés. Por ejemplo, si el polipéptido de interés es una enzima, una parte funcionalmente equivalente de la enzima podría ser un dominio o subsecuencia de la enzima que incluye el sitio catalítico necesario para permitir que el dominio o la subsecuencia ejerza la misma actividad enzimática que la enzima de longitud completa o, como alternativa, un gen que codifica el catalizador. La expresión "sustancialmente la misma actividad enzimática" se refiere a una parte equivalente o análogo que tiene al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, más preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente, al menos en un 95 % y lo más preferentemente, al menos en un 97 %, al menos un 98 % o al menos un 99 % de la actividad enzimática de la enzima natural. Un ejemplo de un análogo enzimáticamente equivalente de la enzima podría ser una proteína de fusión que incluye el sitio catalítico de la enzima en una forma funcional, pero también puede ser una variante homóloga de la enzima procedente de otra especie. Asimismo, las moléculas completamente sintéticas que imitan la actividad enzimática específica de la enzima relevante también podrían constituir los "análogos enzimáticamente equivalentes".

En general, el experto en la materia será fácilmente capaz de diseñar ensayos adecuados para la determinación de la actividad enzimática. Para PBGD, sin embargo, se describe un ensayo adecuado en el documento WO 03/002731, en el ejemplo 2, así como en las secciones experimentales de las presentes solicitudes. La arilo sulfatasa, además de sus sustratos naturales, también es capaz de catalizar la hidrólisis del sustrato cromogénico sintético, para-Nitrocatecol sulfato (pNCS). El producto, para-Nitrocatecol (pNC), absorbe luz a 515 nm. Un ensayo para la determinación de la actividad arilo sulfatasa se describe en detalle en el documento WO 2005/073367 y en Fluharty et al. 1978, Meth. Enzymol. 50:537-47. Para LAMAN, se desvela un ensayo de actividad enzimática adecuado en el documento WO 02/099092.

Porfobilinógeno desaminasa

En una realización, el polipéptido de interés de la divulgación puede ser porfobilinógeno desaminasa, (también conocido como porfobilinógeno amoníaco-liasa (polimerizante)), C.E. 4.3.1.8. (Waldenstrom 1937, J. Acta.Med. Scand. Supl.8). La porfobilinógeno desaminasa es la tercera enzima en la vía biosintética del grupo hemo. Se ha transferido la C.E. 4.3.1.8 a la C.E. 2.5.1.61, de manera que la porfobilinógeno desaminasa (PBGD) está ahora colocada dentro de este número de C.E.

La porfobilinógeno desaminasa cataliza la reacción de 4 porfobilinógeno + H₂O = hidroximetilbilano + 4 NH₃.

La PBDG es importante en relación con la porfiria aguda intermitente (PAI), que es un trastorno autosómico dominante en el ser humano provocado por un defecto (reducción del 50 % de la actividad) de la PBDG (véase el documento WO01/07065 para más detalles en relación con esto).

La porfobilinógeno desaminasa se conoce de forma abreviada como PBGD, y en el contexto de la presente divulgación, estos dos términos se pueden usar de manera intercambiable entre sí.

Para la expresión recombinante de PBGD, una célula hospedadora puede ser en particular una célula de levadura o una célula *E. coli*.

Para un ejemplo detallado de la construcción de una célula *E. coli*, se hace referencia al ejemplo 1 del documento WO01/07065 y para la construcción de células HeLa recombinantes y células NIH 3T3 capaces de expresar PBGD de ratón se hace referencia al ejemplo 6 del documento WO01/07065.

La expresión "porfobilinógeno desaminasa recombinante (rPBGD)" indica en el presente documento una PBGD producida de manera recombinante. En lo sucesivo, esta enzima y la forma humana recombinante se citarán como "PBGD" y "rhPBGD", respectivamente. Dentro de este término también se incluye una parte o análogo enzimáticamente equivalente de la PBGD. Un ejemplo de una parte enzimáticamente equivalente de la enzima podría ser un dominio o subsecuencia de la enzima que incluye el sitio catalítico necesario para permitir que el dominio o la subsecuencia ejerza la misma actividad enzimática que la enzima de longitud completa o, como alternativa, un gen que codifica el catalizador. La expresión "sustancialmente la misma actividad enzimática" se refiere a una parte equivalente o análogo enzimático que tiene al menos un 50 %, preferentemente al menos un 60 %, más

- preferentemente al menos el 70 %, más preferentemente al menos el 75 %, más preferentemente al menos el 80 %, más preferentemente al menos el 85 %, más preferentemente al menos el 90 %, más preferentemente, al menos en un 95 % y lo más preferentemente, al menos en un 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % de la actividad de la rHPBGD humana natural medida en el ensayo de actividad de rHPBGD descrito en el ejemplo 2 del documento WO 03/002731. Un ejemplo de un análogo enzimáticamente equivalente de la enzima podría ser una proteína de fusión que incluye el sitio catalítico de la enzima en una forma funcional, pero también puede ser una variante homóloga de la enzima procedente de otra especie. Asimismo, las moléculas completamente sintéticas que imitan la actividad enzimática específica de la enzima relevante también podrían constituir los "análogos enzimáticamente equivalentes".
- Un ejemplo de PBGD que se puede usar en la presente divulgación incluye cualquiera de los mostrados en las Secuencias 1-10 de la presente solicitud, o en los números de Genbank X04217, X04808 o M95623.

Arilo sulfatasa

- En otra realización de la presente divulgación, el polipéptido de interés puede ser una arilosulfatasa A.
- La arilosulfatasa A cataliza la reacción de un cerebrósido 3-sulfato + H₂O = un cerebrósido + sulfato.
- Se ha purificado ASA a partir de una variedad de fuentes que incluyen el hígado humano, la placenta y la orina. Es una glucoproteína ácida con un punto isoelectrónico bajo. Por encima de pH 6,5, la enzima existe como un dímero con un peso molecular de aproximadamente 110 kDa. La ASA se somete a una polimerización dependiente del pH formando un octámero a pH 4,5. En la orina humana, la enzima consiste en dos subunidades no idénticas de 63 y 54 kDa. La ASA purificada a partir del hígado humano, de la placenta y de los fibroblastos también consiste en dos subunidades ligeramente diferentes que varían entre 55 y 64 kDa. Como en el caso de otras enzimas lisosómicas, la ASA se sintetiza en los ribosomas unidos a la membrana como un precursor glucosilado. Después pasa a través del retículo endoplasmático y del Golgi, en donde se procesan sus oligosacáridos N-ligados con la formación de oligosacáridos fosforilados y sulfatados de tipo complejo (Waheed A et al. *Biochim Biophys Acta*. 1985, 847, 53-61, Bräulke T et al. *Biochem Biophys Res Commun*. 1987, 143, 178-185). En fibroblastos normales cultivados, se produce un polipéptido precursor de 62 kDa, que se transloca a través de la unión del receptor de manosa-6-fosfato (Bräulke T et al. *J Biol Chem*. 1990, 265, 6650-6655) a un endosoma prelisosómico ácido (Kelly BM et al. *Eur J Cell Biol*. 1989, 48, 71-78).
- La arilosulfatasa A puede ser en particular de origen humano. La longitud (18 aminoácidos) del péptido señal de ASA humana se basa en la secuencia consenso y en un sitio de procesamiento específico para una secuencia señal. Por lo tanto, del ADNc de ASA humana deducido (números de registro de EMBL Genbank J04593 y X521151) la escisión del péptido señal se debería de hacer en todas las células después del resto número 18 (Ala), dando como resultado la forma madura de la ASA humana. En lo sucesivo, la arilosulfatasa A recombinante se abreviará rASA, la forma madura de arilosulfatasa A que incluye la forma madura de ASA humana se citará como "mASA" y la ASA madura recombinante humana se citará como "mrhASA".
- Se ha identificado una modificación proteica en dos sulfatasas eucarióticas (ASA y arilosulfatasa B (ASB)) y para una del alga verde *Volvox carteri* (Schmidt B et al. *Cell*. 1995, 82, 271-278, Selmer T et al. *Eur J Biochem*. 1996, 238, 341-345). Esta modificación lleva a la conversión de un resto de cisteína, que se conserva entre las sulfatasas conocidas, en un resto de ácido 2-amino-3-oxopropiónico (Schmidt B et al. *Cell*. 1995, 82, 271-278). El nuevo derivado de aminoácido también se reconoce como C*-formilglicina (FGly). En ASA y ASB derivados de células MSD, se conserva el resto Cys-69. En consecuencia, se propone que la conversión de Cys-69 a FGly-69 se requiere para generar ASA y ASB catalíticamente activas, y que la deficiencia de esta modificación proteica es la causa de MSD. Cys-69 se refiere al precursor de ASA que tiene un péptido señal de 18 restos. En la mASA, el resto de cisteína mencionado es Cys-51. Las investigaciones posteriores han demostrado que una secuencia lineal de 16 restos que rodea la Cys-51 en la mASA es suficiente como para dirigir la conversión y que la modificación de la proteína tiene lugar después o en una etapa tardía de la translocación cotraduccional de la proteína en el retículo endoplasmático cuando el polipéptido aún no se ha plegado en su estructura natural (Dierks T et al. *Proc Natl Acad Sci*. 1997, 94, 11963-1196, Wittke, D. et al. (2004), *Acta Neuropathol. (Berl.)*, 108, 261-271).
- Se han demostrado múltiples formas de ASA en electroforesis e isoelectroenfoque de preparaciones enzimáticas de orina humana, leucocitos, plaquetas, fibroblastos cultivados e hígado. El tratamiento con endoglucosidasa H, sialidasa y fosfatasa alcalina reduce el tamaño molecular y la complejidad del patrón electroforético, lo que sugiere que mucha de la heterogeneidad de la carga de la ASA se debe a variaciones en el contenido en carbohidratos de la enzima.
- La arilosulfatasa A puede ser en particular una forma de arilosulfatasa A, que es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica y/o una forma de rASA, que posee marcadores específicos para entrar en las células diana en el cerebro. En particular, puede ser una rASA, que se endocita de manera eficaz *in vivo* a través de la vía de la manosa-6-fosfato.
- Por lo tanto, la ASA puede estar en particular unida de manera covalente al denominado marcador, a los péptidos o proteínas como vehículos o toxinas como vehículos que son capaces de aumentar y/o facilitar el transporte de ASA

sobre la barrera hematoencefálica y/o a través de las membranas celulares en general (Schwarze et al., Trends Cell Biol. 2000; 10(7): 290-295; Lindgren et al., Trends Pharmacol. Sci. 2000; 21(3): 99-103). Se puede producir una molécula de ASA que contiene tales secuencias peptídicas mediante técnicas de expresión. El proceso de transducción de proteína no es específico del tipo celular, y el mecanismo mediante el cual tiene lugar no está del todo claro, sin embargo, se cree que tiene lugar por algún tipo de alteración y penetración de la membrana que es independiente del receptor. Un estado de la molécula parcialmente no plegada puede facilitar el proceso pero no es esencial.

Un ejemplo de un marcador adecuado incluye pero no se limita al marcador de manosa-6-fosfato.

Los ejemplos de los péptidos o proteínas como vehículos incluyen pero no se limitan a los denominados dominios de transducción de proteína. Los ejemplos de dominios de transducción de proteína adecuados incluyen pero no se limitan a los mencionados en el documento WO 2005/073367. Por lo tanto, el dominio de transducción de proteína puede ser el péptido básico de 11 restos de la proteína TAT del VIH -YGRKKRRQRRR (Schwarze et al., Trends Cell Biol. 2000; 10(7): 290-295), una versión sintética de TAT -YARAAARQARA que confiere más helicidad en alfa y naturaleza anfipática a la secuencia (Ho et al., Cancer Res. 2001; 61(2):474-477), un péptido líder sintético compuesto de poli -R o una mezcla de restos -R y -K básicos en combinación con otros aminoácidos y péptidos basado en restos de secuencia señal hidrófoba de integrina beta-3 o FGF de sarcoma de Kaposi (Duncan et al. Biopolymers 2001; 60(1): 45-60).

Los ejemplos de toxinas adecuadas como vehículos incluyen pero no se limitan a las descritas en el documento WO 2005/073367.

La ASA puede comprender en particular una secuencia de ácido nucleico, que codifica:

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 en el documento WO 2005/073367;
- (b) una parte de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a una arilosulfatasa A recombinante humana
- (c) un análogo de secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo comprende una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a la arilosulfatasa A recombinante humana.

En el presente contexto, una secuencia de aminoácidos o una porción de una secuencia de aminoácidos que es un polipéptido capaz de hidrolizar una cantidad del sustrato pNCS de arilosulfatasa A a 37 °C a una tasa que se corresponde con una actividad específica de al menos 20 U/mg de polipéptido (preferentemente 50 U/mg de polipéptido) cuando se determina en un ensayo para medir la actividad de la arilosulfatasa A tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 2005/073367, y/o un polipéptido, que es capaz de hidrolizar al menos el 40 % de sustrato marcado de arilosulfatasa A, fx. palmitoil sulfato de 14C, cargado en fibroblastos de LDM, cuando se ensaya por incubación a un nivel de dosis de 25 mU/ml en un ensayo tal como se describe en el ejemplo 2 del documento WO 2005/073367.

La ASA puede comprender en particular en otra realización:

- (a) la secuencia de ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005/073367
- (b) una parte de la secuencia en (a), que codifica una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a una arilosulfatasa A recombinante humana
- (c) un análogo de secuencia de ácidos nucleicos que tiene al menos el 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo codifica una secuencia de aminoácidos, que es enzimáticamente equivalente a una arilosulfatasa A recombinante humana

Se puede preferir que el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de ácidos nucleicos mencionada anteriormente y la SEQ ID NO: 1 del documento WO 2005/073367 sea al menos el 80 %, tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %. Igualmente se puede preferir que el grado de identidad de secuencia entre la secuencia de aminoácidos codificada por la secuencia de ácidos nucleicos mencionada anteriormente y la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/073367 sea al menos el 80 %, tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

Para el fin de la presente divulgación se prefiere que la arilosulfatasa A sea una enzima recombinante, en particular, se prefiere una arilosulfatasa A recombinante humana (rhASA).

Se prefiere que la rASA se produzca en una célula o línea celular de mamífero y que dicha célula o línea celular de mamífero produzca una glucoforma de rASA, que se endocita de manera eficaz *in vivo* a través de la vía del receptor de manosa-6-fosfato. Específicamente, la glucoforma preferida de rASA comprende una cantidad de manosa-6-fosfato expuesta, que permite la endocitosis eficaz de rASA *in vivo* a través de la vía de manosa-6-fosfato.

En una realización particular, al menos una de las glucoformas de rASA producidas es similar a una glucoforma producida en las células CHO.

La modificación postraduccional del resto de cisteína en la posición 51 en la arilosulfatasa A madura humana es relevante para la actividad de la enzima. En consecuencia, en una realización preferida de la presente divulgación, la producción de la arilosulfatasa A o su equivalente tiene lugar a una tasa y en unas condiciones, que dan como resultado un producto que comprende una isoforma de la enzima en la que el aminoácido que se corresponde con Cys-69 en la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/073367 se convierte a formilglicina, que se corresponde con Fgly-51 en la SEQ ID NO: 3 del documento WO 2005/073367. La SEQ ID NO:4 del documento WO 2005/073367 representa la arilosulfatasa A madura humana después de la escisión del péptido señal de 18 aminoácidos pero antes de la modificación de C-51.

Por lo tanto, en otra realización de la presente divulgación, la ASA o su equivalente enzimático se pueden seleccionar del grupo que consiste en

- (a) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:3 del documento WO 2005/073367;
- (b) una parte de la secuencia en (a), que es enzimáticamente equivalente a una arilosulfatasa A recombinante humana
- (c) un análogo de secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 75 % de identidad de secuencia con una cualquiera de las secuencias en (a) o (b) y al mismo tiempo es enzimáticamente equivalente a la arilosulfatasa A recombinante humana.

Se puede preferir que el grado de identidad de secuencia entre la enzima producida de acuerdo con la divulgación y la SEQ ID NO: 3 del documento WO 2005/073367 o la SEQ ID NO: 4 del documento 2005/073367 es al menos el 80 %, tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %.

Para que la actividad biológica y los efectos de la enzima *in vivo* requieran ser óptimos, es una ventaja si una cantidad adecuada de la enzima ha adquirido un patrón de glucosilación tal como se describió anteriormente y se ha modificado de manera postraduccional en la posición 51. Por lo tanto, al menos el 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 95 % o 98 % de la ASA de la presente divulgación puede estar en la glucoforma/isoforma descrita anteriormente.

La ASA de la presente divulgación puede, en términos de su estructura, ser diferente de la rASA de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 del documento 2005/073367. Puede ser una ventaja que la secuencia de restos de aminoácidos que rodean al Cys-51 sea idéntica o tenga un alto grado de identidad de secuencia con la secuencia correspondiente en la SEQ ID NO: 3. Por lo tanto, se puede preferir que una secuencia lineal de 20 aminoácidos, tal como 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 restos de aminoácidos que rodean al Cys-51 en la arilosulfatasa A sea idéntica o al menos el 90 % idéntica, tal como un 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a la secuencia correspondiente en la SEQ ID NO: 3 del documento 2005/073367. Como la forma activa de rASA en los lisosomas es un octámero, la ASA de la presente divulgación puede ser en particular una rASA que es un octámero o que se ensambla en un octámero en condiciones fisiológicas.

La actividad enzimática de ASA, que se entiende como la actividad catalítica de la rASA, se puede medir en un ensayo enzimático basado en la hidrólisis mediada por rASA de un sustrato detectable o un sustrato, que lleva a un producto final detectable. En un aspecto preferido, el ensayo se basa en la hidrólisis del sustrato cromogénico sintético, para-Nitrocatecol sulfato (pNCS) que tiene un producto final, para-Nitrocatecol (pNC) que absorbe luz a 515 nm.

Alfa-manosidasa lisosómica

En otra realización más, el polipéptido de interés puede ser una alfa-manosidasa lisosómica (LAMAN). La alfa-manosidasa lisosómica pertenece a la CE 3.2.1.24 y es una exoglucosidasa que hidroliza los restos terminales no reductores de alfa-D-manosa en alfa-D-manósidos del extremo no reductor durante la degradación ordenada de las glucoproteínas N-ligadas (Aronson y Kuranda FASEB J 3:2615-2622. 1989). En el contexto de la presente invención, la alfa-manosidasa lisosómica se puede usar de forma intercambiable con el término acortado LAMAN.

La LAMAN de la presente invención puede ser en particular de origen humano. La enzima humana se sintetiza como un solo polipéptido de 1011 aminoácidos con un posible péptido señal de 49 restos que se procesa en tres glucopéptidos principales de 15, 42 y 70 kD (Nilssen et al. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997).

El gen que codifica LAMAN (MANB) está ubicado en el cromosoma 19 (19cen-q12), (Kaneda et al. Chromosoma 95:8-12. 1987). MANB consta de 24 exones, que abarcan 21,5 kb (números de referencia de GenBank U60885-U60899; Riise et al. Genomics 42:200-207. 1997). El transcrito de LAMAN tiene » 3.500 nucleótidos (nt) contiene un marco de lectura abierta que codifica 1.011 aminoácidos (GenBank U60266.1).

La clonación y secuenciación del ADNc humano que codifica LAMAN se ha publicado en tres artículos (Nilssen et al. Hum.Mol.Genet. 6, 717-726. 1997; Liao et al. J.Biol.Chem. 271,28348-28358. 1996; Nebes et al.

Biochem.Biophys.Res.Commun. 200, 239-245. 1994). Curiosamente, las tres secuencias no son idénticas. Cuando se compara con la secuencia de Nilssen et al (n.º de registro U60266.1), se descubrió un cambio de TA a AT en las posiciones 1670 y 1671 que da como resultado la sustitución de valina a ácido aspártico por Liao et al. y Nebes et al.

5 En una realización más preferida, la alfa-manosidasa lisosómica comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO.: 1 del documento WO 2005/094874.

10 Por razones prácticas y económicas se prefiere que la LAMAN de la presente invención se produzca de manera recombinante. Mediante la producción recombinante también puede ser posible obtener una preparación de la enzima en donde una gran parte contiene manosa-6-fosfato. La producción recombinante se puede lograr tras la transfección de una célula usando una secuencia de ácido nucleico que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 2 del documento WO 2005/094874.

15 La alfa-manosidasa preferentemente se genera en un sistema de célula de mamífero, ya que esto dará como resultado un perfil de glucosilación, que asegura una absorción eficaz mediada por receptor en células de por ejemplo órganos viscerales del cuerpo. En particular, se ha descubierto que la producción de la enzima en células CHO, COS o BHK asegura una adecuada modificación postraduccional de la enzima mediante la adición de restos de manosa-6-fosfato. Además, se obtiene un correcto perfil de sialilación. Se sabe que la correcta sialilación es importante con el fin de evitar la absorción por el hígado, debido a los restos de galactosa expuestos.

20 En realizaciones incluso más preferidas, el sistema de célula de mamífero, por lo tanto, se selecciona del grupo que comprende células CHO, células COS o células BHK (Stein et al. J Biol Chem.1989, 264, 1252-1259). Se puede preferir además que el sistema de célula de mamífero sea una línea celular de fibroblastos humanos.

25 En una realización más preferida, el sistema de células de mamífero es una línea de células CHO.

En otra realización, la alfa-manosidasa lisosómica puede ser una preparación de alfa-manosidasa lisosómica en donde una fracción de dicha preparación consiste en alfa manosidasa lisosómica que tiene uno o más oligosacáridos N-ligados que llevan grupos de manosa 6-fosfato.

30 Se prefiere además que una fracción de una preparación de dicha alfa-manosidasa lisosómica sea capaz de unirse a los receptores de manosa 6-fosfato.

35 La capacidad de la enzima para unirse a los receptores de manosa-6-fosfato se puede determinar en un ensayo *in vitro* tal como se describe en el ejemplo 1 del documento WO 2005/094874. En este caso, la unión de la enzima a una matriz de afinidad MPR 300 proporciona una medida de su capacidad para unirse a los receptores de manosa-6-fosfato. En una realización preferida de la invención, la unión de la enzima a los receptores de manosa-6-fosfato tiene lugar *in vitro*.

40 En realizaciones más preferidas de la invención, esta fracción se corresponde con del 1 al 75 % de la actividad de una preparación de alfa-manosidasa lisosómica, tal como del 2 al 70 %, tal como del 5 al 60 %, tal como del 10 al 50 %, tal como del 15 al 45 %, tal como del 20 al 40 %, tal como del 30 al 35 %.

45 En consecuencia, se prefiere que la alfa-manosidasa lisosómica tiene un contenido de restos de manosa 6-fosfato que permite la unión dependiente de manosa 6-fosfato del 2 al 100 %, del 5 al 95 %, del 10 al 90 %, del 20 al 80 %, del 30 al 70 % o del 40 al 60 % de la cantidad de enzima a una matriz de receptor de Man-6-P. Actualmente, se ha analizado el grado de fosforilación en varios lotes de enzima y, normalmente, del 30 al 45 % de la enzima se fosforila y se une a la matriz de afinidad.

50 Se prefiere además que una fracción que constituye el 2 - 100 %, 5 - 90 %, 10 - 80 %, 20 - 75 %, 30 - 70 %, 35 - 65 % o 40 - 60 % de la cantidad de dicha alfa-manosidasa lisosómica se une al receptor de Man-6-P con alta afinidad. Teóricamente, se deben colocar dos grupos manosa 6-fosfato cercanos entre sí con el fin de que la enzima se una al receptor de Man-6-P con alta afinidad. Las últimas observaciones sugieren que la distancia entre los restos de manosa fosforilados debe ser de 40 Å o menos con el fin de obtener la unión de alta afinidad. En la alfa-manosidasa lisosómica humana de acuerdo con la SEQ ID NO:1 del documento WO 2005/094874, los dos restos de manosa 6-fosfato se pueden colocar en los restos de asparaginas en las posiciones 367 y 766. En consecuencia, se prefiere que el medicamento de acuerdo con la presente invención comprenda alfa-manosidasa lisosómica, una parte de la cual lleva grupos de manosa 6-fosfato en ambos restos de asparagina.

60 Preferentemente, la alfa-manosidasa se crea por técnicas recombinantes. En una realización adicional, la alfa-manosidasa es de origen humano (hLAMAN) y aún más preferido, una alfa-manosidasa madura humana (mhLAMAN) o un fragmento de la misma. El fragmento se puede modificar, sin embargo, los sitios activos de la enzima se deberían conservar.

Debe esperarse que, en preparaciones de alfa-manosidasa de acuerdo con la presente invención, una fracción de la enzima se representa por su forma precursora, mientras que otras fracciones representan las formas proteolíticamente procesadas de aproximadamente 55 y 70 kDa.

5 Galactocerebrosidasa

10 En otra realización, el polipéptido de interés puede ser una galactocerebrosidasa, que se puede acortar a GALC. La galactocerebrosidasa pertenece a la C.E. 3.1.6.46 y son enzimas capaces de catalizar la reacción de D-galactosil-N-acilesfingosina + H₂O = D-galactosa + N-acilesfingosina, por lo tanto, GALC cataliza la degradación de galactolípidos en, por ejemplo, mielina.

15 La enzima GALC que proviene de humanos es una enzima lisosómica glucosilada que comprende 643 aminoácidos y con un peso molecular de 72,8 kDa. La GALC de la presente divulgación puede ser en particular de origen humano. En una realización adicional, la GALC se puede expresar de manera recombinante en una de las células hospedadoras mencionadas anteriormente. La célula hospedadora para la expresión recombinante de GALC puede ser en particular una célula CHO.

20 En la descripción y en las reivindicaciones se hace referencia a las siguientes secuencias de aminoácidos y de ácidos nucleicos:

Descripción de la secuencia	Identificador de secuencia
Secuencia codificante de PBGD 1	SEQ ID NO.: 1
Secuencia codificante de PBGD 2	SEQ ID NO.: 2
Secuencia codificante de PBGD 3	SEQ ID NO.: 3
Secuencia codificante de PBGD 4	SEQ ID NO.: 4
Secuencia codificante de PBGD 5	SEQ ID NO.: 5
Secuencia codificante de PBGD 6	SEQ ID NO.: 6
Secuencia codificante de PBGD 7	SEQ ID NO.: 7
Secuencia codificante de PBGD 8	SEQ ID NO.: 8
Secuencia codificante de PBGD 9	SEQ ID NO.: 9
Secuencia codificante de PBGD 10	SEQ ID NO.: 10
Secuencia codificante de PBGD, N.º de registro de GenBank X04217	SEQ ID NO.: 11
Secuencia codificante de PBGD, N.º de registro de GenBank X04808	SEQ ID NO.: 12
Secuencia codificante de PBGD, N.º de registro de GenBank M95623	SEQ ID NO.: 13
Secuencia de aa de PBGD de la secuencia codificante, N.º de registro de GenBank M95623, Forma constitutiva	SEQ ID NO.: 14
Secuencia de aa de PBGD de la secuencia codificante, N.º de registro de GenBank M95623, Forma eritropoyética	SEQ ID NO.: 15
Secuencia codificante de ASA N.º de registro de GenBank J04593	SEQ ID NO.: 16
Secuencia codificante de ASA SEQ ID NO.: 1 del documento WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 17
Secuencia de aa de ASA de la SEQ ID NO.: 2 del documento WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 18
Secuencia de aa de ASA de la SEQ ID NO.: 3 del documento WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 19
Secuencia de aa de ASA de la SEQ ID NO.: 4 del documento WO 2005/073367	SEQ ID NO.: 20
Secuencia de aa de LAMAN de la SEQ ID NO.: 1 del documento WO 2005/094874	SEQ ID NO.: 21
Secuencia codificante de LAMAN de la SEQ ID NO.: 1 del documento WO 2005/094874	SEQ ID NO.: 22
Secuencia codificante de galactocerebrosidasa	SEQ ID NO.: 23
Secuencia de aa de galactocerebrosidasa	SEQ ID NO.: 24

Con referencia a estas secuencias, el polipéptido de interés, de acuerdo con una realización preferida de la invención, comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en:

- 25 i) una secuencia de aminoácidos tal como se define por la SEQ ID NO.: 21;
- ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i); y

iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), siendo la secuencia de aminoácidos de dicho análogo al menos el 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii).

5 En realizaciones particulares, el análogo en iii) es al menos el 80 % idénticos a una secuencia tal como se define en i) o ii), tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o tal como al menos el 99,5 % idéntica a una secuencia tal como se define en i) o ii).

10 Además, el polipéptido de interés se puede obtener mediante expresión recombinante usando una secuencia de ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en:

- i) una secuencia de ácidos nucleicos tal como se define mediante cualquiera de las SEQ ID NO.: 22;
- ii) una secuencia de ácido nucleico que es al menos el 75 % idéntica a una secuencia de ácido nucleico tal como se define en i).

15 Para la producción recombinante del polipéptido se puede preferir además que la secuencia de ácido nucleico en ii) sea al menos el 80 % idéntica a una secuencia tal como se define en i), tal como al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o tal como al menos el 99,5 % idéntica a una secuencia tal como se define en i).

20 Composición que comprende un polipéptido de interés

25 La siguiente descripción de una composición que comprende un polipéptido de interés se refiere tanto a una composición que comprende un polipéptido que se concentra de acuerdo con un método de la presente divulgación y también se refiere a una composición de la presente invención que comprende al menos 10 mg/ml de polipéptido de interés.

30 La presente invención también se refiere a una composición que comprende al menos 10 mg/ml de polipéptido de interés, en donde el polipéptido de interés es alfa-manosidasa. Dicha composición puede comprender en particular al menos 25 mg/ml de polipéptido de interés, tal como al menos 50 mg/ml o al menos 75 mg/ml o al menos 100 mg/ml de polipéptido de interés. Por lo tanto, dicha composición puede comprender en particular entre 10-1000 mg/ml de polipéptido de interés, tal como entre 10-500 mg/ml o entre 10-300 mg/ml o entre 10-200 mg/ml o entre 25-500 mg/ml o entre 25-400 mg/ml o entre 40-400 mg/ml o entre 40-300 mg/ml o entre 50-400 mg/ml o entre 50-300 mg/ml o entre 75-400 mg/ml o entre 75-300 mg/ml o entre 100-200 mg/ml o entre 100-150 mg/ml de polipéptido de interés.

35 La composición que comprende un polipéptido de interés puede ser en particular una solución acuosa.

40 Además de comprender una alta concentración de polipéptido de interés, dicha composición puede además no comprender agregados del polipéptido de interés o al menos solo muy pocos agregados. Por lo tanto, la cantidad de polipéptido de interés presente como agregados puede constituir en particular menos del 5 % en p/p de la cantidad total de polipéptido de interés en la composición. En particular, dichos agregados pueden constituir menos del 4 % en p/p, tal como menos del 3 % en p/p, o menos del 2 % en p/p, o menos del 1 % en p/p, o menos del 0,5 % en p/p, o menos del 0,1 % en p/p de la cantidad total del polipéptido de interés. En el presente contexto, el término "agregados" se refiere a cualquier forma del polipéptido de interés que no es monomérica. Por lo tanto, el término abarca cualquier dímero o multímero del polipéptido de interés.

45 Además, es una ventaja si dicha composición comprende solo el polipéptido de interés o al menos solo pequeñas trazas de otras proteínas, es decir, proteínas diferentes del polipéptido de interés. Por lo tanto, en una realización particular, dicha composición comprende menos del 1 % en p/p, tal como menos del 0,5 % en p/p, o menos del 0,1 % en p/p, o menos del 0,05 % en p/p, o menos del 0,01 % en p/p de otras proteínas que no son el polipéptido de interés.

50 Por lo tanto, se puede optimizar un intervalo de factores que afectan a la estabilidad y a la actividad de los polipéptidos y la composición que comprende un polipéptido de interés en particular para mantener el polipéptido de interés tan estable como sea posible.

55 El pH generalmente afecta a la estabilidad de un polipéptido de interés, por lo tanto, el pH de una composición que comprende un polipéptido de interés puede estar en particular en el intervalo de 7,5-8,5, tal como en particular entre pH 7,7-8,2, más en particular, entre pH 7,8-8,0 o entre pH 7,85-7,95, tal como pH 7,8 o pH 7,9. Esto puede ser en particular el caso si el polipéptido de interés es PBGD.

60 Por lo tanto, la composición que comprende un polipéptido de interés puede comprender en particular un tampón capaz de mantener la composición en el intervalo de pH descrito. Los ejemplos de dichos tampones incluyen, pero sin limitación TRIS-HCl, Na-Citrato y Na₂HPO₄. La concentración de tal tampón puede depender de la elección del tampón en particular y de la presencia de otros componentes en la composición. Si el tampón es Na₂HPO₄ la concentración de Na₂HPO₄ puede estar en el intervalo de 0,5-15 mM, tal como en el intervalo de 1-10 mM, o en el intervalo de 1,5-7,5 mM, tal como en el intervalo de 1,83-7,4 mM, o en el intervalo de 1,5-3 mM, tal como en el intervalo de 1,83-3,7

mM, o en el intervalo de 1,83-2,45 mM, o en el intervalo de 3,5-7,5 mM, tal como en el intervalo de 3,6-7,4 mM, o en el intervalo de 5,4-7,4 mM, tal como 1,84 mM, o 2,45 mM, o 3,67 mM o 5,51 mM o 7,34 mM.

5 Si el tampón es TRIS-HCl, la concentración de TRIS-HCl puede estar en particular en el intervalo de 2-50 mM, tal como 2-40 mM, o 2-30 mM, o 2-20 mM, o 2-10 mM, o 5-25 mM, o 5-20 mM, o 8-12 mM, o 9-11 mM, por ejemplo 10 mM.

10 Los ejemplos de otros compuestos que puede comprender la composición que comprende un polipéptido de interés incluyen pero no se limitan a aminoácidos, azúcares, alcoholes y detergentes. Los ejemplos de tales compuestos adecuados incluyen pero no se limitan a glicina, manitol, sacarosa, L-serina, Tween 80 o una combinación de uno o más de dichos compuestos. La concentración de estos compuestos depende del compuesto particular, pero para la glicina, la concentración puede estar en particular en el intervalo de 1-200 mM, tal como en el intervalo de 5-190 mM, o en el intervalo de 10-180 mM, o en el intervalo de 10-170 mM, o en el intervalo de 20-160 mM, o en el intervalo de 20-150 mM, o en el intervalo de 25-125 mM, o en el intervalo de 5-100 mM, o en el intervalo de 5-90 mM, o en el intervalo de 5-80 mM, o en el intervalo de 5-70 mM, o en el intervalo de 5-60 mM, o en el intervalo de 10-100 mM, o en el intervalo de 10-90 mM, o en el intervalo de 10-80 mM, o en el intervalo de 10-70 mM, o en el intervalo de 10-60 mM, o en el intervalo de 12-60 mM, o en el intervalo de 12-55 mM, o en el intervalo de 13,5-54 mM, o en el intervalo de 10-30 mM, tal como en el intervalo de 13,5-27 mM, o en el intervalo de 13,5-18 mM, o en el intervalo de 25-55 mM, tal como en el intervalo de 27-54 mM, o en el intervalo de 40-55, tal como en el intervalo de 40,5-54 mM, tal como 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 39,5, 40, 40,5, 41, 41,5, o 53, 53,5, 53, 54,5 o 55 mM.

25 La concentración de manitol en particular puede estar en el intervalo de 50-1000 mM, tal como en el intervalo de 50-900 mM, o en el intervalo de 50-800 mM, o en el intervalo de 50-700 mM, o en el intervalo de 50-600 mM, o en el intervalo de 100-900 mM, o en el intervalo de 100-800 mM, o en el intervalo de 100-700 mM, o en el intervalo de 100-600 mM, o en el intervalo de 100-500 mM, o en el intervalo de 120-525 mM, o en el intervalo de 125-500 mM, o en el intervalo de 100-300 mM, tal como en el intervalo de 120-275 mM, o en el intervalo de 120-170 mM, o en el intervalo de 200-600 mM, tal como en el intervalo de 225-550 mM, o en el intervalo de 240-510 mM, o en el intervalo de 370-525 mM, tal como 120, 125, 130, 160, 165, 166,7, 170, 175, 200, 221, 225, 250, 275, 300, 365, 370, 375, 380, 385, 490, 495, 500, 505 o 510 mM.

35 La concentración de sacarosa en particular puede estar en el intervalo de 1-200 mM, tal como en el intervalo de 5-190 mM, o en el intervalo de 10-180 mM, o en el intervalo de 10-170 mM, o en el intervalo de 20-160 mM, o en el intervalo de 20-150 mM, o en el intervalo de 25-125 mM, o en el intervalo de 5-100 mM, o en el intervalo de 5-90 mM, o en el intervalo de 5-80 mM, o en el intervalo de 5-70 mM, o en el intervalo de 5-60 mM, o en el intervalo de 10-100 mM, o en el intervalo de 10-90 mM, o en el intervalo de 10-80 mM, o en el intervalo de 10-70 mM, o en el intervalo de 10-60 mM, o en el intervalo de 12-60 mM, o en el intervalo de 12-55 mM, o en el intervalo de 13,5-54 mM, o en el intervalo de 10-30 mM, tal como en el intervalo de 13,5-27 mM, o en el intervalo de 13,5-18 mM, o en el intervalo de 25-55 mM, tal como en el intervalo de 27-54 mM, o en el intervalo de 40-55, tal como en el intervalo de 40,5-54 mM, , tal como 12,5, 13, 13,5, 14, 14,5, 17, 17,5, 18, 18,5, 19, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 39,5, 40, 40,5, 41, 41,5, o 53, 53,5, 53, 54,5 o 55 mM. Si se incluye la sacarosa en una composición que también comprende manitol, la concentración de manitol en particular se puede reducir en correspondencia con la concentración de sacarosa; es decir, la concentración de manitol y sacarosa juntas pueden ser en particular la misma que la concentración de manitol si se fuese a usar solo.

45 La concentración de Tween 80 en particular puede estar en el intervalo de 0,001-1 % en p/v, tal como en el intervalo de 0,005-1 % en p/v, o en el intervalo de 0,01-1 % en p/v, o en el intervalo de 0,001-0,5 % en p/v, o en el intervalo de 0,005-0,5 % en p/v, o en el intervalo de 0,01-0,5 % en p/v, o en el intervalo de 0,05-0,4 % en p/v, o en el intervalo de 0,05-0,3 % en p/v, o en el intervalo de 0,05-0,2 % en p/v, o en el intervalo de 0,075-0,4 % en p/v, o en el intervalo de 0,075-0,3 % p/v, o en el intervalo de 0,075-0,2 % en p/v, o en el intervalo de 0,09-0,2 % en p/v, tal como 0,075, 0,08, 0,09, 0,1, 0,125, 0,15, 0,175 o 0,2 % en p/v.

55 La composición que comprende un polipéptido de interés, en donde el polipéptido en particular puede ser una PBGD, una arilo sulfatasa, una alfa-manosidasa lisosómica o una galactocerebrosidasa, pueden comprender en particular una combinación de uno o más de los compuestos mencionados anteriormente. Un ejemplo adecuado de tal composición puede ser una que, además del polipéptido de interés, comprende Na_2HPO_4 , glicina y manitol. El pH de la composición y la concentración de los diferentes compuestos puede ser tal como se describe anteriormente. Por lo tanto, en una realización, dicha composición puede comprender Na_2HPO_4 0,5-15 mM, glicina 1-200 mM, manitol 50-1000 mM y un pH en el intervalo de 7,5-8,5. Cualquier combinación de las concentraciones mencionadas anteriormente de los compuestos y el pH se abarcan por la presente invención. Un ejemplo específico de una combinación adecuada de otros compuestos y pH en la composición que comprende un polipéptido de interés es uno que comprende Na_2HPO_4 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM y tiene un pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.

65 Otros ejemplos de composiciones adecuadas incluyen, pero sin limitación, cualquiera de los siguientes:

- Na₂HPO₄ 1,84 mM, glicina 13,5 mM, manitol 125 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na₂HPO₄ 2,45 mM, glicina 18 mM, manitol 167 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na₂HPO₄ 5,51 mM, glicina 40,5 mM, manitol 375 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na₂HPO₄ 7,34 mM, glicina 54 mM, manitol 500 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- 5 • Na₂HPO₄ 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 220 mM, sacarosa 30 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na₂HPO₄ 3,67 mM, manitol 245 mM, sacarosa 32 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na₂HPO₄ 3,67 mM, L-serina 27 mM, manitol 250 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Tris-HCl 10 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na-Citrato 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- 10 • Na₂HPO₄ 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 220 mM, sacarosa 29 mM, Tween 80 al 0,1 % (p/v) y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.
- Na₂HPO₄ 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 220 mM, sacarosa 29 mM, Tween 80 al 0,1 % (p/v) y pH en el intervalo de 7,7 a 7,9.

15 La composición que comprende un polipéptido de interés se puede usar en particular para aplicaciones terapéuticas en mamíferos. Por lo tanto, la composición que comprende un polipéptido de interés puede ser, en particular, isotónica, en relación con el tejido de los mamíferos, por ejemplo, en particular, puede tener una osmolalidad en el intervalo de 200-400 mOsm/kg, tal como en el intervalo de 250-350 mOsm/kg o en el intervalo de 275-325 mOsm/kg o en el intervalo de 295-305 mOsm/kg, tal como 295 mOsm/kg o 300 mOsm/kg o 305 mOsm/kg.

20 Método de concentración de un polipéptido de interés

El método de la presente divulgación comprende las etapas de a) centrifugación y/o filtración de una composición que comprende un polipéptido de interés y b) concentrar la composición de la etapa a). Los inventores de la presente divulgación han descubierto que mediante centrifugación y/o filtración de una composición que comprende un polipéptido de interés antes de concentrar dicha composición es posible obtener una composición que comprende un polipéptido de interés altamente concentrado sin ningún o con al menos solo unos pocos agregados del polipéptido de interés. Además, generalmente es una ventaja para aplicaciones terapéuticas de un polipéptido que se reduzca la cantidad de agregados del polipéptido, por ejemplo, ya que pueden aumentar el riesgo de generar una respuesta inmunitaria hacia el polipéptido.

Para la administración de un polipéptido por vía subcutánea es una ventaja que la composición del polipéptido tenga una alta actividad en un pequeño volumen ya que solo los pequeños volúmenes se pueden inyectar por vía subcutánea.

Las proteínas o los polipéptidos pueden formar en general agregados cuando están concentrados. Por lo tanto, es una ventaja que cuando el método de la presente invención se usa para concentrar un polipéptido de interés, no provoque una alta tasa de formación de agregados de polipéptido. Tal como se muestra en los ejemplos, la cantidad de agregados de PBGD en la composición obtenida mediante el método de concentración de la presente invención es similar a la de una composición de PBGD no concentrada.

En una realización particular, la etapa a) del método se realiza antes de la etapa b).

45 Etapa a) centrifugación y/o filtración

Los inventores de la presente divulgación han descubierto que antes de concentrar una composición que comprende un polipéptido de interés, es una ventaja pretratar la composición mediante centrifugación y/o filtración de la composición, ya que mediante este pretratamiento se eliminan muchos o la mayoría de los agregados de polipéptido.

50 Cuando la concentración de la composición en la etapa b) se realiza mediante un método que se basa en el uso de un filtro o membrana, tal como ultrafiltración, la presencia de agregados puede bloquear el filtro o la membrana, de manera que las pequeñas moléculas y líquidos no sean capaces de atravesar el filtro o la membrana. Esto puede reducir la velocidad mediante la cual se concentra la composición y/o bloquear por completo cualquier concentración adicional.

55 Por lo tanto, para este tipo de concentración, el pretratamiento de acuerdo con la etapa a) es una ventaja, ya que la eliminación de los agregados hace posible obtener composiciones de un polipéptido de interés que están más concentradas que si dicha composición no se hubiese pretratado.

60 Cuando la concentración de la composición en la etapa b) se realiza mediante un método que se basa en la eliminación de agua, tal como la liofilización o la evaporación, el pretratamiento en la etapa a) tiene la ventaja de que reduce la cantidad de agregados presentes en la composición concentrada.

La etapa a) se puede realizar mediante una de las tres siguientes alternativas:

65

- Centrifugación,
- Filtración, o
- Centrifugación y filtración.

5 Si la etapa a) comprende tanto centrifugación como filtración, es una ventaja realizar la centrifugación antes de la filtración, ya que los inventores de la presente divulgación han descubierto que la centrifugación elimina la mayoría de los agregados grandes y la filtración elimina posteriormente los agregados más pequeños restantes.

Centrifugación

10 Para ser capaz de eliminar los agregados, la composición que comprende un polipéptido de interés se puede centrifugar a una fuerza en el intervalo de 1500 - 3000 g, tal como en el intervalo de 1800-2500 g, o en el intervalo de 2000-2300 g.

15 Normalmente, la composición se puede centrifugar durante 10-60 minutos, tal como durante 15-50 minutos o durante 20-40 minutos.

Dado que la temperatura puede afectar a la estabilidad del polipéptido de interés, la centrifugación se puede realizar a una temperatura en el intervalo de 2-20 °C, tal como de 3-15 °C o en el intervalo de 3-10 °C, o en el intervalo de 3-8 °C, tal como a 4 °C o 5 °C o 6 °C.

20 La centrifugación da como resultado que los agregados del polipéptido de interés sedimentan, es decir, forman un sedimento, mientras que las moléculas individuales del polipéptido de interés permanecen en la solución. De manera que es el sobrenadante de la composición centrifugada el que se usa posteriormente en el método de la presente invención.

Filtración

30 La composición que comprende un polipéptido de interés se puede filtrar a través de un filtro que tiene un tamaño de poro en el intervalo de 0,2-5 µm, tal como en el intervalo de 0,2-2,5 µm.

Además del tamaño de poro del filtro, también el material del que está hecho el filtro puede afectar a la filtración del polipéptido de interés. Los ejemplos de filtros de membrana adecuados incluyen pero no se limitan a polietileno sulfonato (PES), acetato de celulosa, celulosa regenerada y fluoruro de polivinilideno (PVDF).

35 Cuando se filtran moléculas tales como proteínas, normalmente son las pequeñas moléculas las que se eliminan, por lo tanto, después de la filtración, el polipéptido de interés generalmente puede estar presente en el retenido. Por lo tanto, es generalmente el retenido de la filtración el que se usa en las posteriores etapas de la presente invención.

40 Etapa b) concentración

En principio, cualquier método de concentración del polipéptido de la composición de interés se puede usar en la etapa b) de la presente invención.

45 Los ejemplos de tales métodos adecuados incluyen pero no se limitan a ultrafiltración y concentración mediante eliminación de agua.

Ultrafiltración

50 La ultrafiltración es un método de separación en el que se usa presión hidráulica para forzar a las moléculas y al disolvente a través de una membrana que comprende poros de un tamaño concreto, también conocido como valor umbral del tamaño. Solo las moléculas que tienen un peso molecular más pequeño que el valor umbral de la membrana son capaces de atravesar la membrana, mientras que aquellos con un peso molecular más grande no atraviesan la membrana y forman el denominado retenido. Por lo tanto, las moléculas presentes en el retenido se concentran de este modo a medida que el disolvente fluye a través de la membrana.

55 En una realización particular, la concentración de la solución o la composición que comprende un polipéptido de interés se puede realizar mediante filtración de flujo tangencial (TFF). Este método es particularmente útil para concentración a gran escala, es decir, para la concentración de soluciones con un volumen de un litro a varios cientos de litros. Por lo tanto, este método es particularmente útil para la producción de soluciones concentradas de un polipéptido de interés a escala industrial.

60 La técnica de la TFF está basada en el uso de un aparato concreto que hace que la solución que se va a filtrar fluya a través de una membrana semipermeable; únicamente las moléculas que son más pequeñas que los poros de la membrana pasarán a través de la membrana, formando el filtrado, dejando atrás la materia que se va a recoger (retenido). Con el método de la TFF, se aplican dos presiones diferentes; una para bombear la solución al sistema y

para hacerla circular en el sistema (presión de entrada) y se aplica otra presión sobre la membrana (presión de membrana) para forzar a las moléculas pequeñas y al disolvente a través de la membrana. La presión de entrada puede estar típicamente en el intervalo de 1-3 bar, tal como entre 1,5-2 bar. La presión de membrana puede ser típicamente mayor de 1 bar.

5 La composición concentrada de un polipéptido de interés puede recogerse en forma de retenido cuando se usa la TFF para concentrar la composición.

10 Las membranas útiles para la TFF pueden estar hechas típicamente de celulosa regenerada o de polietersulfona (PES).

El tamaño de poro de la membrana normalmente puede tener un umbral de peso molecular que es menor de 10.000 Pm, tal como en el intervalo de 10-10.000 Pm.

15 En otra realización, la concentración de la composición que comprende un polipéptido de interés se puede realizar mediante el uso de un dispositivo de centrifugación. El principio de este método es que la solución se filtra sobre una membrana mediante la aplicación de una fuerza centrífuga sobre la membrana. Tales membranas a menudo se caracterizan por un umbral de peso molecular (Pm), es decir, este es el tamaño molecular máximo de los compuestos que son capaces de atravesar la membrana, y los compuestos con un tamaño molecular mayor que este no atravesarán la membrana. El umbral de Pm de las membranas usadas en la presente invención puede ser menor de 30.000 Pm, tal como entre 10-30.000 Pm.

La membrana en particular puede estar hecha de polietersulfona (PES) o de celulosa regenerada.

25 Los ejemplos de tales dispositivos de filtración comerciales adecuados pueden ser Centricon Plus-80 o Centricon Plus-15.

30 La concentración se puede realizar normalmente mediante centrifugación a 2000-4500 g, tal como a entre 2500-4000 g, o entre 2750-3500 g, o entre 3000-3500 g, tal como a 3000 g o 3100 g o 3200 g o 3300 g o 3400 g o 3500 g.

Normalmente, la centrifugación se puede poner en marcha durante varias horas, por ejemplo, durante más de una hora, tal como durante 1-10 horas.

35 Para minimizar cualquier efecto negativo sobre la estabilidad del polipéptido de interés, la centrifugación en particular se puede realizar a una temperatura en el intervalo de 2-20 °C, tal como en el intervalo de 3-15 °C o en el intervalo de 3-10 °C o en el intervalo de 3-6 °C.

Concentración mediante eliminación de agua

40 El principio de concentración mediante eliminación de agua normalmente es que todo o la mayoría del agua se elimina para obtener un sólido, y después se diluye o se disuelve posteriormente este sólido en un volumen de agua que es menos que en el que se diluyó o disolvió previamente. Sin embargo, en principio se puede realizar simplemente eliminando la cantidad necesaria de agua para obtener la concentración deseada sin rediluir o redissolver posteriormente el compuesto.

45 Los ejemplos de métodos de concentración adecuados mediante eliminación de agua incluyen la liofilización y la evaporación.

50 Tanto para la liofilización como para la evaporación, los tres parámetros más relevantes son la temperatura, la presión y el tiempo.

El método de liofilización puede comprender las siguientes tres o cuatro etapas; una fase de congelación, una fase de secado primario y una fase de secado secundario y opcionalmente una etapa de recocido tras la fase de congelación. La liofilización en particular se puede realizar tal como se describe en relación con la liofilización incluida como una etapa adicional del método de la presente invención.

Etapas adicionales

60 El polipéptido de interés puede provenir de una fuente natural, es decir, de células que expresan de forma natural el polipéptido de interés, o se puede expresar en particular de forma recombinante.

Independientemente de donde proviene el polipéptido de interés se puede haber purificado antes de someterlo a un método de la presente invención.

65 Tal "purificación" puede incluir en particular pero no se limita a la eliminación de los sedimentos celulares, la eliminación de otras proteínas que no son el polipéptido de interés y la eliminación de otros componentes que pueden estar

presentes en la fuente de la que proviene el polipéptido de interés. Por lo tanto, en una realización particular de la presente invención, la composición que comprende un polipéptido de interés comprende menos del 5 % en p/p, o menos del 1 % en p/p o menos del 0,5 % en p/p o menos del 0,1 % en p/p o menos del 0,05 % en p/p o menos del 0,01 % en p/p de otras proteínas que el polipéptido de interés.

Por lo tanto, otras proteínas que se expresan por, por ejemplo, una célula hospedadora se pueden eliminar de la composición que comprende un polipéptido de interés antes de que se use en un método de la presente invención.

Por lo tanto, en una realización particular, el método de la presente invención puede comprender una o más de las siguientes etapas antes de la etapa a):

- i) expresión recombinante de un polipéptido de interés
- ii) purificación de la composición del polipéptido de interés por una o más etapas de la cromatografía
- iii) intercambio del tampón de formulación

La expresión recombinante de un polipéptido de interés se puede realizar en particular tal como se describe anteriormente en relación con el polipéptido de interés.

Si el polipéptido de interés es PBGD, los ejemplos de los tipos adecuados de cromatografía incluyen pero no se limitan a cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico (IEC) y cromatografía en una columna de hidroxiapatito. En principio, se puede usar cualquier combinación de estos métodos de cromatografía. Los inventores de la presente invención han descubierto anteriormente para PBGD que es una ventaja realizar al menos la etapa de cromatografía de afinidad y que si esto se combina con cualquiera de los otros métodos de cromatografía, es una ventaja realizar la etapa de cromatografía de afinidad antes de las otras etapas de cromatografía (véase, por ejemplo, el documento WO 03/002731).

Para la realización en la que el polipéptido de interés es PBGD, los ejemplos de las columnas de cromatografía de afinidad disponibles incluyen columnas de acoplamiento por afinidad, afinidad específica de grupo, y afinidad del quelato de metal.

El catálogo de productos de 2001 de la compañía Amersham Pharmacia Biotech da ejemplos de columnas de acoplamiento por afinidad tales como columnas que comprenden la inmovilización de ligandos que contienen -NH₂ y columnas que comprenden ligandos que contienen grupos amino primarios.

Las columnas de afinidad de quelato de metal se prefieren especialmente para purificar proteínas a través de la formación de complejos de iones metálicos con grupos histidina expuestos. El ejemplo 3 del documento WO01/07065 describe la construcción de una porfobilinógeno desaminasa humana recombinante con un "marcador His" (rhPBGD-His). Con el fin de purificar rhPBGD-His se prefiere usar una columna de afinidad de quelatos de metal, tal como una columna que tiene una resina de afinidad de metal de cobalto.

Los ejemplos de otros métodos adecuados de cromatografía de afinidad incluyen, pero sin limitación, columnas que tienen heparina porcina como ligando o columnas que tienen ácido 1-Amino-4-[[4-[[4-cloro-6-[[3 (o 4)-sulfofenil]amino]-1,3,5-triazin-2-il]amino]-3-sulfofenil]amino]-9,10-dihidro-9,10-dioxo-2-antracenosulfónico, también conocido como Cibacon Blue 3G, como ligando y usando el acoplamiento de triazina como el método de acoplamiento de ligando. Un ejemplo comercialmente disponible de esta última es Blue Sepharose 6 Fast Flow (FF) de Amersham Pharmacia Biotech. En consecuencia, una realización preferida de la invención se refiere al procedimiento, tal como se describe en el presente documento, en donde la columna de cromatografía de afinidad de la etapa (i) es una columna que usa un acoplamiento de triazina como método de acoplamiento de ligando, y más preferentemente en donde el ligando es Cibacon Blue 3G.

La expresión "cromatografía de intercambio iónico (IEC)" se debería de entender en el presente documento de acuerdo con la materia como una columna que separa moléculas tales como proteínas basándose en su carga neta a un determinado pH por unión electrostática a un grupo cargado en la columna. El intercambio iónico indica la absorción de iones de un tipo en una columna en intercambio por otros que están perdidos en la solución.

Los ejemplos de columnas IEC son columnas tales como una columna de Q Sepharose, una columna de Q SP Sepharose, o una columna de CM Sepharose, puede ser en particular una columna de DEAE Sepharose.

Un ejemplo de una columna de hidroxiapatito adecuada es una columna de hidroxiapatito de cerámica. El hidroxiapatito (Ca₅(PO₄)₃OH)₂ es una forma de fosfato de calcio que se puede usar para la separación y la purificación de proteínas, enzimas, ácidos nucleicos, virus y otras macromoléculas. El hidroxiapatito cerámico es una forma esférica y macroporosa de hidroxiapatito. CHT Type I (Bio-Rad) es un ejemplo de una columna de cromatografía con hidroxiapatito cerámico adecuada y comercialmente disponible.

En una realización, el método de la presente invención puede comprender las siguientes etapas antes de la etapa a):

- i) expresión recombinante de PBGD
- ii) someter la composición de PBGD de la etapa i) a cromatografía de afinidad
- iii) someter la composición de PBGD de la etapa ii) a cromatografía de intercambio iónico

5 En una realización adicional, el método de la presente invención puede comprender las siguientes etapas antes de la etapa a):

- i) expresión recombinante de PBGD
- ii) someter la composición de PBGD de la etapa i) a cromatografía de afinidad
- 10 iii) someter la composición de PBGD de la etapa ii) a cromatografía de intercambio iónico
- iv) someter la composición de PBGD de la etapa iii) a una columna de hidroxiapatito

15 Ambos métodos pueden incluir opcionalmente una etapa adicional de dilución de diafiltración de la composición de PBGD obtenida de la etapa ii). Por lo tanto, dicha etapa debería ser después de la etapa ii) y antes de la etapa iii), es decir, una etapa iia). La etapa iia) tiene la finalidad de reducir la concentración de sales para una conductividad adecuada, por ejemplo < 10 mS/cm. Esto puede ser relevante en particular si se usa DEAE Sepharose como resina en la etapa de cromatografía de intercambio iónico, es decir, la etapa iii), ya que esto puede facilitar la unión de la PBGD a la resina DEAE Sepharose. Se puede obtener la dilución mediante la adición de agua purificada directamente o mediante ultrafiltración frente a agua purificada.

20 La expresión recombinante de PBGD, etapa i) se puede realizar mediante cualquiera de los métodos descritos anteriormente.

25 Los ejemplos de columnas de cromatografía de afinidad adecuadas en la etapa ii) pueden ser cualquiera de los mencionados anteriormente.

Los ejemplos de métodos adecuados de realización de cromatografía de intercambio iónico en la etapa iii) pueden ser cualquiera de los mencionados anteriormente.

30 Los ejemplos de columnas de cromatografía de hidroxiapatito adecuadas en la etapa iv) pueden ser cualquiera de las mencionadas anteriormente.

35 En una realización particular, la columna de cromatografía de afinidad puede ser una columna que usa un acoplamiento de triazina como método de acoplamiento de ligando, y en particular, tal método en donde el ligando es Cibracon Blue 3G. Esta puede ser en particular una columna de Blue Sepharose 6 Fast Flow, y la columna de cromatografía de intercambio iónico puede ser una columna de DEAE Sepharose, y en la realización en donde el método también comprende una etapa iv) esta columna puede ser en particular una columna de hidroxiapatito cerámico.

40 El método de la presente invención también puede comprender etapas adicionales después de la etapa b) del método. Tales etapas incluyen, pero sin limitación, una o más de las siguientes:

- liofilizar la composición que comprende un polipéptido concentrado de interés,
- cambiar el tampón de la composición que comprende un polipéptido de interés concentrado,
- 45 • filtración estéril de la composición que comprende un polipéptido de interés concentrado
- evaporación

50 Se pueden usar diferentes liofilizadores, volúmenes de soluciones a liofilizar y otros parámetros en el método de la presente invención. Un ejemplo de un liofilizador adecuado incluye pero no se limita a un liofilizador Lyostar (FTM-systems) tal como se usa en los ejemplos de la presente invención, en donde las soluciones que comprenden un polipéptido de interés concentrado, es decir, en este caso PBGD, se cargaron en frascos de vidrio de inyección de 2 y 6 ml (tipo 1) y se taparon con tapones de goma (clorobutilo). La liofilización se puede realizar mediante las siguientes tres etapas;

- 55 i) congelación,
- ii) secado primario, y
- iii) secado secundario.

60 La etapa i) de congelación en particular se puede realizar cargando en primer lugar una muestra a temperatura ambiente y enfriándola a 0 °C y manteniéndola a 0 °C durante 30 minutos, antes de reducir la temperatura a 1 °C por minuto hasta -40 °C y manteniéndola a -40 °C durante 30 minutos.

65 La etapa ii) de secado primario se puede realizar en particular mediante extracción de la presión de vacío de 126 mTorr, elevando la temperatura en 1 °C por minuto hasta 0 °C y manteniendo la muestra a 0 °C durante 360 minutos.

La etapa iii) de secado secundario se puede realizar en particular mediante la extracción del vacío completo elevando simultáneamente la temperatura en 0,5 °C por minuto hasta +30 °C y manteniendo la muestra a +30 °C durante 360 minutos.

5 Después del secado secundario, la muestra se puede cerrar al vacío o cerrar tras la carga con nitrógeno.

Un ejemplo de método de liofilización adecuado incluye el descrito en los ejemplos de la presente invención.

10 La liofilización puede comprender en realizaciones adicionales una etapa de recocado antes de la fase de secado primario. Los inventores de la presente invención han descubierto que la inclusión de una etapa de recocado en el método de liofilización mejora el aspecto visual, tal como se visualiza por menos roturas y/o da como resultado un tiempo de reconstitución más corto del producto liofilizado en comparación con cuando se usa el mismo método de liofilización pero sin la etapa de recocado. Es una ventaja que el tiempo para la reconstitución de un producto liofilizado se reduce, especialmente si se va a usar como un producto farmacéutico que se administra como una solución. Un aspecto visual mejorado generalmente también se considera una ventaja para la mayoría de los productos.

15 Por lo tanto, la liofilización puede comprender las siguientes etapas:

- 20 i) congelación
- ii) recocado
- iii) secado primario
- iv) secado secundario.

25 Las etapas de congelación, secado primario y secado secundario se pueden realizar en particular tal como se describe anteriormente. La etapa de recocado, es decir, la etapa ii) se puede realizar después de 30 minutos de congelación, elevando la temperatura a, por ejemplo, una velocidad de 2 °C por minuto a -10 °C o -20 °C y manteniendo esta temperatura durante 120 o 420 minutos y después bajando la temperatura, por ejemplo, a una velocidad de 2 °C por minuto a -40 °C, temperatura a la cual la muestra se puede mantener a 60-90 minutos antes del comienzo de la etapa de secado primario.

30 El cambio del tampón de la composición que comprende un polipéptido de interés concentrado se puede realizar en particular mediante a) dilución, por ejemplo, 5-15 veces, comprendiendo la composición un polipéptido de interés concentrado en un tampón o formulación, b) concentrando la composición diluida de nuevo y realizando las etapas a) y b) un número suficiente de veces como para que la cantidad de excipientes en el tampón o la formulación presente en la composición antes de estas etapas constituya menos de, por ejemplo, el 5 % en v/v o menos del 1 % en v/v de excipientes en el tampón o la formulación presente en dicha composición después de que dichas etapas se hayan realizado.

35 En particular, la composición que comprende un polipéptido de interés obtenido de la etapa b) comprende además una etapa de filtración estéril de dicha composición y/o una etapa de liofilización de la composición.

La filtración estéril generalmente se realiza mediante la filtración de la composición a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm o 0,20 µm. La liofilización se puede realizar en particular tal como se describe anteriormente.

45 La presente invención también se refiere a una composición liofilizada obtenida por un método de la presente invención.

Inyección subcutánea

50 La presente invención también se refiere al uso de una composición que comprende en el intervalo de 50-300 mg/ de polipéptido de interés para la fabricación de un medicamento para inyección subcutánea en un mamífero.

El polipéptido de interés puede ser cualquier polipéptido de interés de acuerdo con la presente divulgación, que incluye, pero sin limitación, PBGD, arilosulfatasa A, una alfa-manosidasa lisosómica y una galactocerebrosidasa.

55 El término subcutáneo a menudo se acorta a s.c. y los dos términos se pueden usar de manera intercambiable en el contexto de la presente invención.

60 Cuando la inyección se realiza por vía subcutánea, normalmente no es posible inyectar más de 1,5 ml debido a restricciones fisiológicas.

Dado que el paciente normalmente necesita una determinada cantidad del polipéptido de interés particular hay una correlación entre el volumen de la composición que comprende un polipéptido de interés que necesita ser administrado al paciente y de la concentración de polipéptido de interés en dicha composición.

Por lo tanto, es una ventaja de la presente invención que la composición que comprende un polipéptido de interés comprenda una concentración del polipéptido de interés y que esta alta concentración del polipéptido de interés se pueda obtener sin la formación de grandes cantidades de agregados de polipéptido. El uso de tales composiciones concentradas del polipéptido de interés hace posible inyectar un menor volumen de dicha composición y, al mismo tiempo, asegurarse de que el paciente recibe una cantidad adecuada del polipéptido de interés; haciendo, por lo tanto, más fácil administrar el polipéptido de interés por vía subcutánea.

La composición mencionada anteriormente que comprende un polipéptido de interés puede comprender en particular entre 75-250 mg/ml, tal como entre 75-200 mg/ml o entre 75-150 mg/ml o entre 100-150 mg/ml o entre 100-125 mg/ml o entre 125-150 mg/ml de polipéptido de interés.

Tal como se describe anteriormente, el volumen de la composición que comprende un polipéptido de interés que es necesario inyectar al paciente para asegurarse de que el paciente recibe una cantidad adecuada del polipéptido de interés se correlaciona con la concentración del polipéptido de interés en dicha composición.

Por lo tanto, el volumen de tal composición generalmente se ajustará de acuerdo con la concentración del polipéptido de interés en la composición. Sin embargo, el volumen generalmente puede estar en el intervalo de 0,1-1,5 ml, tal como en el intervalo de 0,1-1,5 ml o en el intervalo de 0,5-1,5 ml o en el intervalo de 0,5-1,5 ml o en el intervalo de 0,75-1,5 ml o en el intervalo de 0,75-1,5 ml o en el intervalo de 1-1,5 ml o en el intervalo de 1-1,5 ml.

La cantidad de polipéptido de interés que es relevante para administrar a un paciente generalmente depende del peso del individuo y del polipéptido de interés en particular.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de porfiria aguda intermitente en un mamífero que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de PBGD.

La administración de PBGD en particular puede ser útil para el tratamiento de porfiria aguda intermitente. Sin embargo, se contempla que la administración de PBGD también pueda ser útil para el tratamiento de otras porfirias, tales como coproporfiria hereditaria o porfiria variegata. Porfiria es un término usado para describir de manera colectiva una serie de enfermedades provocadas por diferentes deficiencias en la vía biosintética del grupo hemo. Por lo tanto, se contempla que la administración de PBGD, por ejemplo, en combinación con otros agentes terapéuticos, a un paciente que padece cualquier tipo de porfiria pueda ayudar a aumentar la renovación total de los diferentes intermediarios en la vía. Por ejemplo, Meissner PN et al., 1986, European Journal of Clinical Investigation, vol. 16, 257-261; Hift RJ et al., 1997, S. Afr. Med. J., vol. 87, 718-27 y Meissner P et al., 1993, J. Clin. Invest., vol. 91, 1436-44 describen la acumulación de ALA y PBG en coproporfiria hereditaria y porfiria variegata. En estas enfermedades, la acumulación de ALA y PBG es resultado de defectos enzimáticos que se localizan cuatro y cinco etapas aguas abajo de la conversión de ALA a PBG, respectivamente. En los dos artículos más recientes se describe cómo el porfirinógeno que se acumula en los pacientes con porfiria variegata es capaz de inhibir la PBG-desaminasa.

En una realización adicional, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de leucodistrofia metacromática en un mamífero que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de arilosulfatasa A.

La leucodistrofia metacromática (LDM) está causada por un defecto genético autosómico recesivo en la enzima lisosómica arilosulfatasa A (ASA), que da como resultado una degradación progresiva de las membranas de la vaina de mielina (desmielinización) y la acumulación de galactosil sulfato (cerebrósido sulfato) en la sustancia blanca del sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico. En preparaciones histológicas, el galactosil sulfato forma masas granulares esféricas que se tiñen metacromáticamente. El galactosil sulfato también se acumula en el riñón, en la vesícula biliar, y en otros determinados órganos viscerales, y se secreta en cantidades excesivas en la orina.

El galactosil sulfato normalmente se metaboliza mediante la hidrólisis del enlace de 3-O-sulfato para formar galactocerebrósido a través de la acción combinada de la enzima lisosómica arilosulfatasa A (CE 3.1.6.8) (Austin et al. Biochem J. 1964, 93, 15C-17C) y una proteína activadora de esfingolípido llamada saposina B. Una deficiencia profunda de arilosulfatasa A tiene lugar en todos los tejidos de pacientes con las formas tardías infantil, juvenil y adulta de LDM (véase a continuación). En lo sucesivo, la proteína arilosulfatasa A se denominará "ASA". Una profunda deficiencia de ASA tiene lugar en todos los tejidos de pacientes con LDM.

En otra realización más, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de un mamífero para el trastorno de almacenamiento lisosómico alfa-manosidosis que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de alfa-manosidasa lisosómica.

La alfa-manosidosis es una enfermedad autosómica recesiva que se produce en todo el mundo con una frecuencia de entre 1/1.000.000 y 1/500.000. La manosidosis se da en todos los grupos étnicos en Europa, América, África y también Asia. Se detecta en todos los países con un buen servicio de diagnóstico para trastornos de almacenamiento lisosómico, con una frecuencia similar. Los pacientes nacen aparentemente sanos; aunque los síntomas de la

enfermedad son progresivos. La alfa-manosidosis presenta heterogeneidad clínica, variando desde formas muy graves hasta muy leves. Los síntomas clínicos son: retraso mental, cambios esqueléticos, alteraciones del sistema inmunitario que dan como resultado infecciones recurrentes, deterioro auditivo y normalmente, la enfermedad se asocia con características faciales típicas, tales como cara gruesa, una frente prominente, un puente nasal aplanado, una nariz pequeña y una boca ancha. En los casos más graves (manosidosis de tipo I) los niños padecen hepatoesplenomegalia y fallecen durante los primeros años de vida. Esta muerte temprana está posiblemente causada por infecciones graves debida a la inmunodeficiencia causada por la enfermedad. En los casos más leves (manosidosis de tipo 2) los pacientes normalmente alcanzan la edad adulta. La debilidad esquelética de los pacientes provoca que los pacientes necesiten una silla de ruedas cuando alcanzan la edad de 20 a 40 años. Esta enfermedad provoca una disfunción difusa en el cerebro que normalmente da como resultado un rendimiento mental débil que excluye cualquier cosa salvo las competencias más básicas de leer y escribir. Estos problemas asociados con las incapacidades auditivas y otras manifestaciones clínicas impiden que los pacientes desarrollen una vida independiente, con la consecuencia de que necesiten cuidados de por vida.

En otra realización más, la presente divulgación se refiere a un método de tratamiento de enfermedad de Krabbe en un mamífero que comprende la inyección subcutánea de una composición de 50-300 mg/ml de galactosilcerebrosidasa.

En seres humanos, una deficiencia en la enzima GALC da como resultado una enfermedad genética hereditaria de almacenamiento lisosómico conocida como enfermedad de Krabbe o leucodistrofia de células globoides. La enzima generalmente se expresa en los testículos, riñones, placenta, hígado y cerebro de los seres humanos y una deficiencia en la enzima GALC generalmente da como resultado un trastorno en el metabolismo de la mielina y en los sistemas nerviosos central y periférico (el SNC y el SNP, respectivamente).

La enfermedad de Krabbe se ha observado en seres humanos de cualquier edad, nacionalidad y sexo.

Cabe señalar que las realizaciones y características descritas en el contexto de uno de los aspectos de la presente invención también se aplican a otros aspectos de la invención. En particular, todas las realizaciones descritas para la composición que comprende un polipéptido de interés, tal como la presencia de compuestos adicionales, tampones y pH también se aplican a la composición que comprende un polipéptido de interés usado en las presentes solicitudes.

Cuando un objeto de acuerdo con la presente invención o uno de los rasgos o características se cita en singular, esto también se refiere al objeto o a sus rasgos o características en plural. Como ejemplo, cuando se refiere a "un polipéptido" se debe de entender que se refiere a uno o más polipéptidos.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende", o "comprendiendo", se entenderá que implican la inclusión de un elemento indicado, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro elemento, número entero o etapa, o grupo de elementos, números enteros o etapas.

A continuación, se describirá la invención en más detalle en las siguientes secciones experimentales no limitantes.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

Materiales

rhPBGD

La rhPBGD usada en los siguientes experimentos se obtuvo de acuerdo con el proceso 2 en el ejemplo 1 del documento WO 03/002731, en donde el proceso 2 es el proceso que incluye la etapa IV, es decir, la etapa de cromatografía con hidroxipatito cerámico.

Tampón de formulación

La rhPBGD recombinante y purificada estaba presente en el siguiente tampón de formulación acuosa:

Na₂HPO₄ 3,67 mM
glicina 27 mM
manitol 250 mM
y un pH de 7,9

El tampón de formulación después se esterilizó por filtración a través de un filtro de 0,22 µm.

Métodos

Liofilización

La liofilización de las soluciones de rhPBGD purificada se realizó en un liofilizador Lyostar (FTM-systems) de acuerdo con las siguientes pautas:

5

Fase de congelación	0 °C	30 min	760 Torr
	de 0 °C a -40 °C	1 °C/min	760 Torr
	-40 °C	30 min	760 Torr
Secado primario	de -40 °C a 0 °C	1 °C/min	169 mTorr
	0 °C	240 min	169 mTorr
Secado secundario	de 0 °C a 30 °C	10 °C/60 min, 180 min	20 mTorr
	30 °C	720 min	20 mTorr

Observación visual (transparencia y color)

10

El líquido se estudió visualmente con respecto al color, transparencia y precipitados de acuerdo con el esquema a continuación.

Color: 1: Incoloro; 2: Ligeramente amarillo; 3: Amarillo

Transparencia: 1: Transparente; 2: Ligeramente turbio; 3: Turbio

15

Otras observaciones: En algunos casos se incluyeron otras observaciones del operador (por ejemplo, precipitados, material no disuelto, etc.)

Medición del pH

20

El pH-metro (pH-metro Metrohm 691) y el electrodo (electrodo de pH combinado LL) se calibraron con 3 soluciones patrón de referencia (Merck) en el intervalo de 4,00 a 9,00. Finalmente se analizó el líquido.

Concentración de proteína

25

La concentración de proteína en el extracto, las muestras en proceso, la sustancia de fármaco en masa y producto final se determinaron mediante un método que utiliza los principios de la reducción de Cu²⁺ a Cu⁺ mediante proteína en un medio alcalino (la reacción de Biuret). Los iones Cu⁺ se hicieron reaccionar después con un reactivo que contiene ácido biconínico y dio como resultado una detección colorimétrica altamente sensible y selectiva.

Pureza

30

La porfobilinógeno desaminasa recombinante humana (rhPBGD) y las variantes de rhPBGD se separaron de acuerdo con su capacidad de adsorción y desorción en medios estacionarios basados en sílice dependiendo del porcentaje de modificador orgánico (acetonitrilo) en la fase móvil.

35

Actividad de rhPBGD

40

La porfobilinógeno desaminasa (PBGD) cataliza la adición de 4 moléculas de porfobilinógeno (PBG) para formar un tetrámero lineal, preuroporfirinogéno, que se libera de la enzima y se circulariza *in vivo* a uroporfirinógeno III por la acción de la Uroporfirinógeno III sintasa. El preuroporfirinógeno se puede oxidar químicamente con benzoquinona para formar uroporfirina, que absorbe luz a 405 nm.

Los análisis se realizaron en un solo frasco en cada caso de prueba. Para la determinación de la actividad de rhPBGD y la concentración de proteína, se realizaron ensayos por duplicado y triplicado, respectivamente, para cada frasco.

45

Osmolalidad

50

Se resuspendió un frasco de rhPBGD en 1,00 ml de agua MilliQ. El frasco de solución acuosa de rhPBGD congelada se descongeló. El osmómetro (osmómetro Vapro) se calibró con 3 soluciones patrón en el intervalo de 100-1000 mOsm/kg (100, 290, 1000 mOsm/kg). Después se analizó el líquido.

Ejemplo 1

Concentración con dispositivos de filtración centrífuga

55

La solución de PBGD-carga (7 mg/ml de rhPBGD, Na₂HPO₄ 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM, a pH 7,9) se descongeló en un baño de agua a 20 °C, se centrifugó a 3200 g durante 10 min y después se esterilizó por filtración

mediante filtros de PES de 0,20 µm (filtros de polietersulfona de Nalgene). La solución PBGD-carga se concentró a 100 mg/ml mediante la puesta en marcha de los dispositivos de filtración centrífuga Centricon Plus-80 (umbral de Pm de 30000) y Centricon Plus-15 (umbral de Pm de 30000) a 3200 g durante varias horas. La solución concentrada, es decir, el retenido, se esterilizó por filtración en filtros de 0,22 µm (Millex GV) y finalmente una parte de esta solución se diluyó con tampón de formulación estéril para obtener 50 mg/ml. La solución de 5 mg/ml se preparó diluyendo directamente la hPBGD recombinante y purificada con tampón de formulación estéril.

Las rhPBGD de 5 mg/ml, de 50 mg/ml y de 100 mg/ml se liofilizaron después tal como se describe anteriormente. Varios frascos de cada una de las soluciones de rhPBGD liofilizadas anteriores con 5, 50 y 100 mg/ml de rhPBGD y de la solución acuosa de 5 mg/ml de rhPBGD se almacenaron a 40 °C ± 2 °C, 75 % ± 5 % de humedad relativa (HR). Los frascos se almacenaron protegidos de la luz en un paquete secundario bien sellado (caja de papel).

A los puntos temporales indicados (es decir, el tiempo de almacenamiento) un vial de cada una de las muestras liofilizadas se resuspendieron en 1,00 ml de agua Millipore.

Cada uno de los frascos resuspendidos y el frasco acuoso de rhPBGD se observaron de forma visual en relación con el color, la transparencia y los precipitados, y se midió la concentración de proteína, la pureza y la actividad de rhPBGD tal como se describe anteriormente.

Los resultados se dan en las siguientes tablas 1-4:

Tabla 1: Producto liofilizado, 5 mg/ml

Punto temporal (mes)	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	Observación visual
0	93,2	4,3	21,5	99,6	Color: 1, transparencia: 1
0,5	81,0	5,2	15,6	ND	Color: 1, transparencia: 1
1	76,6	5,9	13,1	99,9	Color: 1, transparencia: 1
1,5	87,0	5,5	15,9	99,7	Color: 1, transparencia: 1
2	53,3	4,7	11,4	99,6	Color: 1, transparencia: 1
3	50,8	4,8	10,7	99,6	Color: 1, transparencia: 1
6	34,3	5,3	6,5	99,6	Color: 1, transparencia: 1

Tabla 2; producto liofilizado; 50 mg/ml

Punto temporal (mes)	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	Observación visual
0	888	41,4	21,5	99,1	Color: 2, transparencia: 1
0,5	842	50,6	16,6	ND	Color: 2, transparencia: 1
1	746	50,6	14,8	100	Color: 2, transparencia: 1
2	640	52,9	12,1	100	Color: 2, transparencia: 1
3	634	49,0	12,9	100	Color: 2, transparencia: 1
6	422	43,0	9,8	100	Color: 2, transparencia: 1

Tabla 3: Producto liofilizado; 100 mg/ml

Punto temporal (mes)	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	Observación visual
0	1944	83,7	23,2	99,1	Color: 3, transparencia: 1
1	1470	98,7	14,9	100	Color: 3, transparencia: 1
2	1282	94,8	13,5	100	Color: 3, transparencia: 1

ES 2 713 488 T3

3	1253	82,6	15,2	100	Color: 3, transparencia: 1
6	739	75,5	9,8	100	Color: 3, transparencia: 1

Tabla 4: Producto acuoso; 5 mg/ml

Punto temporal (mes)	Actividad (U/ml)	Concentración (mg/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	Observación visual
0	95,6	4,0	23,7	99,1	Color: 1, transparencia: 1
0,5	48,1	5,4	8,9	ND	Color: 1, transparencia: 1
1	28,6	5,9	4,8	96,1	Color: 1, transparencia: 1
1,5	12,3	5,6	2,2	91,4	Color: 1, transparencia: 1
2	4,5	4,4	1,0	90,7	Color: 1, transparencia: 1
3	7,1	3,1	2,3	87,3	Color: 2, transparencia: 2
6	4,4	2,1	2,1	58,1	Color: 2, transparencia: 2

Ejemplo 2

5

Concentración de una composición de rhPBGD mediante dispositivos de filtración centrífuga

10 La solución de PBGD-carga (7 mg/ml de rhPBGD, Na₂HPO₄ 3,67 mM, glicina 27 mM, manitol 250 mM, a pH 7,9) se descongeló en un baño de agua a 20 °C, se centrifugó a 3200 g durante 10 min y después se esterilizó por filtración mediante filtros de PES de 0,20 µm (filtros de polietersulfona de Nalgene). La solución PBGD-carga se concentró a 100 mg/ml mediante la puesta en marcha de los dispositivos de filtración centrífuga Centricon Plus-80 (umbral de Pm de 30000) y Centricon Plus-15 (umbral de Pm de 30000) a 3200 g durante varias horas. La solución concentrada, es decir, el retenido, se esterilizó por filtración mediante filtros de 0,22 µm (Millex GV) y se diluyó con tampón de formulación esterilizado por filtración (véase anteriormente) para obtener soluciones de concentraciones más bajas. 15 Una parte en volumen de cada concentración se liofilizó tal como se describe anteriormente.

20 Las diferentes concentraciones de rhPBGD liofilizado y la solución acuosa de rhPBGD se almacenaron a 5 °C ± 3 °C o a -20 °C ± 5 °C (humedad relativa (RH) ambiental). Todos los frascos se almacenaron protegidos de la luz en un paquete secundario bien sellado (caja de papel).

25 A los puntos temporales indicados (es decir, el tiempo de almacenamiento) un frasco de cada muestra liofilizada se resuspendió en 1,00 ml de agua Millipore y después se probó junto con la solución acuosa de rhPBGD mediante observación visual del color, la transparencia y los precipitados, y mediante medición del pH, la concentración de proteína, la pureza, la osmolalidad y la actividad de rhPBGD.

Los resultados se dan en las siguientes tablas 5-19:

Tabla 5: Producto acuoso; 11 mg/ml; Temp. de almacenamiento: +5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	10,9	255,0	23,4	100,0	7,80	290	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
1	9,5	216,8	22,8	100,0	7,81	305	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
2	10,9	230,2	21,1	98,0	7,80	300	Color: 2
							Transparencia: 1

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
							Transparente
							Ninguno/pocos
3	11,2	226,6	20,2	100,0	7,76	290	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Pocos
6	14,7	271,1	18,4	100,0	7,77	300	Color:2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Varios

Tabla 6: Producto acuoso: 11 mg/ml; Temp. de almacenamiento: -20 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	10,4	236,1	22,6	100	7,80	290	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
1	11,7	270,3	23,1	100	7,81	302	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	12,4	247,7	20,0	100	7,77	288	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
6	13,4	291,5	21,8	100	7,77	301	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

Tabla 7: Producto liofilizado, 11 mg/ml; Temp. de almacenamiento: +5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3; Transparencia 1-3; Solución; Agregados
0	10,9	230,0	21,2	100,0	7,80	290	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	13,3	269,3	20,2	100,0	7,74	282	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3; Transparencia 1-3; Solución; Agregados
6	14,7	237,9	16,2	100,0	7,76	290	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

Tabla 8: Producto acuoso, 17 mg/ml; Temp. de almacenamiento: +5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3; Transparencia 1-3; Agregados en solución
0	18,0	471,0	26,1	100,0	7,80	298	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
1	17,5	360,4	20,6	100,0	7,81	311	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
2	18,3	397,0	21,7	100,0	7,83	302	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
3	16,6	376,5	22,7	100,0	7,77	294	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Pocos
6	16,0	257,3	16,1	100,0	7,76	305	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Varios

Tabla 9: Producto acuoso, 17 mg/ml; Temp. de almacenamiento: -20 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3; Transparencia 1-3; Agregados en solución
0	17,9	411,6	23,0	100,0	7,80	298	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
1	17,4	439,5	25,3	100,0	7,80	310	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	16,4	389,4	23,7	100,0	7,77	292	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
6	18,0	373,8	20,8	100,0	7,76	305	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

Tabla 10: Producto liofilizado, 17 mg/ml; Temp. de almacenamiento: 5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	16,9	380,1	22,5	100,0	7,80	298	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	15,6	391,9	25,1	100,0	7,76	285	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
6	16,6	341,3	20,6	100,0	7,75	297	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

Tabla 11: Producto acuoso; 36 mg/ml; Temp. de almacenamiento: +5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	36,0	844,4	23,4	100,0	7,81	305	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
1	35,5	778,1	21,9	100,0	7,82	314	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
2	35,4	798,5	22,6	100,0	7,81	310	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno/pocos
3	28,9	687,9	23,8	100,0	7,77	303	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Pocos
6	37,2	537,3	14,4	100,0	7,77	312	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
							Varios

Tabla 12: Producto acuoso, 36 mg/ml; Temp. de almacenamiento: -20 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	34,0	853,4	25,1	100,0	7,81	305	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
1	38,0	853,6	22,5	100,0	7,83	321	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	31,6	776,3	24,6	100,0	7,76	299	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
6	30,6	543,8	17,8	100,0	7,75	311	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

Tabla 13: Producto liofilizado, 36 mg/ml; Temp. de almacenamiento: 5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	29,5	657,0	22,3	100,0	7,81	305	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
1	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	28,7	747,6	26,0	100,0	7,75	290	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
6	29,8	579,3	19,4	100,0	7,76	300	Color: 2
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno

5

Tabla 14: Producto acuoso, 50 mg/ml; Temp. de almacenamiento: 5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	46,2	780,9	16,9	96,3	7,59	317	Color: 3

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
1	47,9	915	19,1	90	7,58	305	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
2	47,2	898,3	19,0	100	7,60	318	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
3	60,8	1102,6	18,1	100	7,72	314	Color: 3
							Transparencia: 1
							Transparente
							Ninguno
6	62,5	902,8	14,4	100	7,60	331	Color: 3
							Transparencia: 2
							Transparente
							Ninguno
9	41,7	618,5	14,8	100	7,60	336	Color: 3
							Transparencia: 2
							Transparente
							Ninguno
12	50,2	540,8	10,8	97,5	7,60	329	Color: 3
							Transparencia: 2
							Transparente
							Ninguno

Tabla 15: Producto acuoso, 50 mg/ml; Temp. de almacenamiento: -20 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	46,2	780,9	16,9	96,3	7,59	317	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
1	47,2	899,1	19,0	93,7	7,58	313	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
2	53	1222,7	23,1	100,0	7,60	315	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
3	61,2	1336,2	21,8	100,0	7,75	320	Color: 3

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
6	52,2	1001,3	19,2	100,0	7,60	321	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
12	50,4	887,9	17,6	100,0	7,60	320	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

Tabla 16: Producto liofilizado, 50 mg/ml; Temp. de almacenamiento: 5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Aglutinaciones/Agregados en solución
0	42,7	759,4	17,8	100. 0	7,58	292	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: amarillo, algunas roturas
							Solución: Transparente
							Ninguno
1	42,6	840,4	19,7	63,1	7,58	293	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: amarillo, algunas roturas
							Solución: Transparente
							Ninguno
2	42,1	937,0	22,3	100. 0	7,60	292	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: amarillo, algunas roturas
							Solución: Transparente
							Ninguno
3	47,4	1014,7	21,4	100. 0	7,75	291	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: amarillo, algunas roturas
							Solución: Transparente
							Ninguno
6	49,0	876,5	17,9	100. 0	7,60	304	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: amarillo, algunas roturas
							Solución: Transparente
							Ninguno

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Aglutinaciones/Agregados en solución
12	51,3	945,0	18,4	100,0	7,60	308	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno

Tabla 17: Producto acuoso, 100 mg/ml; Temp. de almacenamiento: 5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	81,8	1705,7	20,9	99,9	7,60	350	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
1	85,9	1942,4	22,6	96,9	7,55	352	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
2	95,7	1690,8	17,7	96,9	7,65	357	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
3	104,3	1671,2	16,0	100,0	7,65	350	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
6	96,0	1642,6	17,1	100,0	7,62	360	Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
9	102,8	1270,8	12,4	100,0	7,63	352	Color: 3
							Transparencia: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
11	86,2	1140,2	13,2	100,0	7,60	353	Color: 3
							Transparencia: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
12	113,9	1550,6	13,6	100,0	7,58	350	Color: 3
							Transparencia: 2
							Ligeramente opalescente
							Ninguno
15	114,7	1160,6	10,1	98,3	7,61	350	Color: 3
							Transparencia: 2
							Ligeramente opalescente

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
							Ninguno
18	86,2	907,4	10,5	100,0	7,67	340	Color: 3 Transparencia: 2 Ligeramente opalescente Ninguno

Tabla 18: Producto acuoso, 100 mg/ml; Temp. de almacenamiento: -20 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
0	81,8	1705,7	20,9	99,9	7,60	316	Color: 3 Transparencia: 1 Ligeramente opalescente Ninguno
1	89,3	2108,8	23,6	100,0	7,56	350	Color: 3 Transparencia: 1 Ligeramente opalescente Ninguno
2	112,0	2066,5	18,5	100,0	7,65	353	Color: 3 Transparencia: 1 Ligeramente opalescente Ninguno
3	100,2	2172,4	21,7	96,7	7,65	352	Color: 3 Transparencia: 1 Transparente Ninguno
6	87,5	2672,3	30,6	100,0	7,62	352	Color: 3 Transparencia: 1 Transparente Ninguno
9	97,1	2040,3	21,0	100,0	7,62	353	Color: 3 Transparencia: 1 Transparente Ninguno
11	104,6	2234,0	21,4	100,0	7,60	353	Color: 3 Transparencia: 1 Transparente Ninguno
12	94,5	1608,8	17,0	100,0	7,57	350	Color: 3 Transparencia: 1 Ligeramente opalescente Ninguno
15	118,0	2015,9	17,1	100,0	7,62	351	Color: 3 Transparencia: 1 Ligeramente opalescente

ES 2 713 488 T3

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Agregados en solución
18	90,6	1736,4	19,2	100,0	7,69	338	Ninguno
							Color: 3
							Transparencia: 1
							Ligeramente opalescente
							Ninguno

Tabla 19: Producto liofilizado, 100 mg/ml; Temp. de almacenamiento: 5 °C

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Aglutinaciones/Agregados en solución
0	76,0	1638,3	21,5	100. 0	7,60	316	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno
1	71,6	1747,6	24,4	100. 0	7,55	318	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno
2	81,6	1769,9	21,7	100,0	7,63	313	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno
3	84,1	1616,6	19,2	98,2	7,65	320	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno
6	96,7	2197,6	22,7	100. 0	7,60	324	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno
9	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	96,0	1978,4	20,6	100. 0	7,57	322	Color: 3
							Transparencia: 1
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno
15	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
18	80,6	1602,6	19,9	100. 0	7,75	310	Color: 3
							Transparencia: 1

Punto temporal (mes)	Conc. de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)	Pureza (%)	pH	Osmolalidad (mOsm/kg)	Observación visual Color 1-3 Transparencia 1-3 Aglutinaciones/Agregados en solución
							Aglutinación: Amarillo, algunas roturas Solución: Transparente
							Ninguno

Ejemplo 3

Concentración de una composición de rhPBGD mediante filtración por flujo tangencial (TFF)

- 5 La solución de carga de rhPBGD se descongeló después durante un mínimo de tres días a 5 °C y en la oscuridad.
- 10 La solución descongelada se centrifugó con tubos de centrifuga cónicos de 200 ml durante aproximadamente 10 minutos a 2200 g.
- 15 La solución después se filtró a través de una serie de filtros con los siguientes tamaños de poro: 5,0 µm; 0,65 µm; 0,45 µm y 0,20 µm antes de que se concentrase mediante filtración por flujo tangencial (TFF).
- 20 La concentración por TFF se realizó con un sistema Millipore Labscale TFF y un filtro Pellicon® XL con una presión de entrada de la bomba de aproximadamente 20-25 psi y una presión sobre el filtro Pellicon® XL de aproximadamente 4-6 psi. Las rhPBGD se protegieron de la luz durante el procedimiento cubriendo el recipiente de la muestra del sistema de TFF con láminas de papel de aluminio.
- 25 A la solución de rhPBGD concentrada obtenida del procedimiento de TFF se le cambió el tampón frente a un tampón de concentración que contiene Na₂HPO₄ x 2H₂O 3,67 mM, glicina 27 mM y manitol 220 mM preparada en agua estéril. Esto se realizó añadiendo continuamente dicho tampón al sistema de TFF y presionándolo a través de la membrana hasta que dicho tampón haya sustituido el tampón anterior.
- 30 La solución de rhPBGD concentrada y con el tampón cambiado se esterilizó por filtración pasándola a través de un filtro con un tamaño de poro de 0,22 µm. Esta esterilización por filtración se realizó dos veces con un nuevo filtro cada vez.
- 35 La solución de rhPBGD estéril concentrada se colocó después en frascos antes de que se liofilizase tal como se describe en la sección del método.

Ejemplo 4

El efecto de los diferentes modos de liofilización y/o de la cantidad de excipientes sobre el tiempo de reconstitución

- 35 La PBGD se concentró tal como se describe en el ejemplo 3 y después del intercambio del tampón se determinó la concentración de PBGD.
- 40 La solución concentrada de PBGD se liofilizó después en un liofilizador Lyostar (FTM-systems). Las soluciones se cargaron en frascos de vidrio de inyección de 2 y 6 ml (tipo 1) y se taparon con tapones de goma (clorobutilo).
- Ciclo de liofilización original:*
- 45 Las muestras se cargaron a temperatura ambiente y los estantes se enfriaron a 0 °C durante 30 minutos. La temperatura se bajó a -40 °C (1 °C por minuto) y se mantuvo ahí durante 30 minutos y después la presión de vacío se extrajo a 126 mTorr y el secado primario comenzó a subir la temperatura hasta 0 °C (1 °C por minuto). Después de 360 minutos de secado primario, la temperatura se elevó hasta +30 °C (0,5 °C por minuto) y se extrajo el vacío completo de manera simultánea (comienzo del secado secundario). La temperatura se mantuvo a +30 °C durante 360 minutos y los frascos se taparon después al vacío.
- 50 *Liofilización con inclusión de una etapa de recocido:*
- 55 Después de 30 minutos a -40 °C, la temperatura se elevó con una tasa de 2 °C por minuto a -10 °C o -20 °C, temperatura a la cual se mantuvo durante 120 o 420 minutos antes de que la temperatura bajase de nuevo con 2 °C por minuto a -40 °C, donde las muestras se mantuvieron durante 60-90 minutos antes del comienzo del secado primario.

Los resultados se muestran en la Tabla 20, en donde los términos acortados usados en relación con los excipientes y el ciclo de liofilización significan lo siguiente:

cantidad de excipientes de 1x se refiere a que la solución de PBGD comprende Na₂HPO₄ x 2H₂O, 3,67 mM, glicina 27 mM y manitol 220 mM preparada en agua estéril.

5 cantidad de excipientes de 1,5x se refiere a que la solución de PBGD comprende Na₂HPO₄ x 2H₂O, 5,51 mM, glicina 40,5 mM y manitol 375 mM preparada en agua estéril, es decir, 1,5x de cada uno de los componentes presentes en el tampón de 1x.

10 excipientes de 2x se refiere a que la solución de PBGD comprende Na₂HPO₄ x 2H₂O, 7,34 mM, glicina 54 mM y manitol 500 mM preparada en agua estéril, es decir, 2x de cada uno de los componentes presentes en el tampón de 1x.

El ciclo de liofilización original es tal como se describe anteriormente.

15 El ciclo de liofilización con recocido es tal como se describe anteriormente, en donde la etapa de recocido comprende elevar la temperatura a -10 °C y mantener la muestra a esta temperatura durante 120 minutos antes de bajarla de nuevo a -40 °C.

20 El ciclo de liofilización con recocido prolongado es tal como se describe anteriormente, en donde la etapa de recocido comprende elevar la temperatura a -20 °C y mantener la muestra a esta temperatura durante 420 minutos antes de bajarla de nuevo a -40 °C.

Tabla 20:

Cantidad de excipientes	Concentración de proteína (mg/ml)	Tiempo de reconstitución para los diferentes ciclos de liofilización		
		Original	Recocido	Recocido prolongado
1x	198	600	550	480
1x	175	540	500	450
1x	150	450	480	180
1x	125	330	100	10
1x	100	40	10	10
1x	80	25	10	10
1,5x	200	480	40	60
1,5x	175	220	10	10
1,5x	150	60	10	10
1,5x	125	15	10	10
1,5x	100	10	10	10
2x	200	120		20
2x	175	40		20
2x	150	20		10
2x	100	10		10

25 Ejemplo 5

El efecto de los diferentes modos de liofilización y/o de la cantidad de excipientes sobre el aspecto del producto liofilizado

30 Las soluciones de PBGD concentradas y liofilizadas se prepararon tal como se describe en el ejemplo 4 y las referencias a la cantidad de excipientes y al tipo de ciclo de liofilización tienen el mismo significado que en el ejemplo 4.

Los siguientes resultados se obtuvieron mediante inspección visual de los productos liofilizados:

35 A: La comparación de tres productos preparados a partir de soluciones que comprenden, respectivamente, 4,6 mg/ml 66,6 mg/ml y 109,4 mg/ml de rhPBGD mostró que el número de roturas en el producto liofilizado aumentó con el aumento de la concentración de rhPBGD.

40 B: La comparación de dos productos, preparados a partir de una solución que comprende 150 mg/ml de rhPBGD, y que comprende una cantidad de 1x y 1,5x de excipientes mostró que el número de roturas en el producto

liofilizado era menor para el producto que comprendía una cantidad de 1,5x de excipientes que el producto que comprende una cantidad de 1x de excipientes.

5 C: La comparación de dos productos liofilizados preparados a partir de una solución de 150 mg/ml de rhPBGD que comprende una cantidad de 1x y 2x de excipientes mostró que el número de roturas en el producto liofilizado con una cantidad de excipientes de 2x era menor que el producto que comprende la cantidad de 1x de excipientes.

10 D: La comparación de tres productos liofilizados preparados a partir de una solución de 150 mg/ml de rhPBGD usando los ciclos de liofilización original, con recocido y con recocido prolongado, mostró que el número de roturas en el producto liofilizado era menor en el producto que se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido que en el producto preparado de acuerdo con el ciclo de liofilización original. Además, el número de roturas en el producto preparado de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido prolongado era menor que en el producto preparado de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido.

15 E: Se prepararon tres productos liofilizados a partir de una solución de rhPBGD de 150, 175 y 200 mg/ml, respectivamente. Los productos liofilizados comprendían cada uno una cantidad de 1,5x excipientes y se liofilizaron con el ciclo de recocido. Ninguno de los productos liofilizados comprendieron ninguna rotura.

20 F: Se prepararon dos productos de rhPBGD liofilizados a partir de una solución de 150 mg/ml de rhPBGD. Uno de ellos comprendía una cantidad de excipientes de 1x y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización original, mientras que el otro comprendía una cantidad de 1,5x excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido prolongado. El producto que comprende una cantidad de 1,5x de excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido prolongado comprendió menos roturas que el producto que comprende una cantidad de excipientes de 1x y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización original.

25 G: Se prepararon dos productos de rhPBGD liofilizados a partir de una solución de 150 mg/ml de rhPBGD. Uno de ellos comprendía una cantidad de excipientes de 1x y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización original, mientras que el otro comprendía Tween 80 al 0,1 % en combinación con una cantidad de 1x de excipientes y se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido prolongado. El producto que comprende Tween 80 al 0,1 % en combinación con una cantidad de 1x de excipientes y que se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización con recocido prolongado comprendió menos roturas que el producto que comprende una cantidad de excipientes de 1x y que se preparó de acuerdo con el ciclo de liofilización original.

35 Ejemplo 6

El efecto de volumen de recuperación, la cantidad de excipientes y el modo de liofilización sobre la estabilidad de rhPBGD liofilizada

40 Las muestras liofilizadas de soluciones concentradas de rhPBGD se prepararon tal como se describe en el ejemplo 4.

La "solución de carga" es una solución concentrada de PBGD antes de la liofilización.

45 La Tabla 21 muestra los resultados de soluciones de rhPBGD que tienen las siguientes características en relación con la concentración de rhPBGD, cantidad de excipientes (en donde se usan las mismas definiciones que en el ejemplo 4), el modo de liofilización (en donde se usan las mismas definiciones que en el ejemplo 4) y la proporción de volumen de carga (vol. de carga que es el volumen de la composición antes de que se liofilice) frente al tiempo de recuperación (vol. de recuperación que es el volumen en el que el producto liofilizado se resuspende):

50 Solución 1:

- Aproximadamente 5 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec.

55 Solución 2:

- Aproximadamente 70 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec. a 2x

60 Solución 3:

- Aproximadamente 110 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec.

5

Solución 4:

- Aproximadamente 70 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec. a 1,5x

10

Solución 5:

- Aproximadamente 90 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 2/3x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec. a 1,5x

15

20

Solución 6:

- Aproximadamente 60 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1/2x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec. a 2x

25

Solución 7:

- Aproximadamente 110 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización con recocido
- Vol. de carga = Vol. de rec.

30

Solución 8:

- Aproximadamente 60 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización con recocido
- Vol. de carga = Vol. de rec. a 2x

35

40

Solución 9:

- Aproximadamente 150 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización con recocido
- Vol. de carga = Vol. de rec.

45

Solución 10:

- Aproximadamente 150 mg/ml de rhPBGD
- cantidad de excipiente de 1x
- Ciclo de liofilización original
- Vol. de carga = Vol. de rec.

50

55 Aunque no se muestra en la Tabla 21, también se probó la pureza de cada punto temporal y se descubrió que era el 100 % en todos los casos.

Para el punto temporal de la semana 4 y 9 en la solución 2 y para el punto temporal de la semana 9 en la solución 4 se usó un volumen de recuperación incorrecto.

60

Tabla 21:

Solución	Punto de medida (semana)	Vol. de carga (ml)	Vol. de rec. (ml)	pH	Osmolalidad (mosmol/kg)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
1	carga					4,6	78	17,1

ES 2 713 488 T3

Solución	Punto de medida (semana)	Vol. de carga (ml)	Vol. de rec. (ml)	pH	Osmolalidad (mosmol/kg)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
	0	0,67	0,67	7,54	274	4,8	85	17,8
	2	0,67	0,67	7,22	274	4,6	87	19,4
	4	0,67	0,67	7,78	279	5,1	75	14,5
	7	0,67	0,67	7,87	284	5,1	68	13,3
	9	0,67	0,67	7,67	403	7,0	93	13,2
2	carga					66,6	1129	16,9
	0	0,67	0,335	7,64	525	113	1915	16,9
	2	0,67	0,335	7,63	459	93,6	1593	17,0
	4	0,67	0,67	7,75	264	64,6	1104	17,1
	7	0,67	0,335	7,95	451	106,4	2106	19,8
	9	0,67	0,67	7,59	247	51,4	859	16,7
3	carga					109,4	1491	13,6
	0	0,67	0,67	7,75	274	99,9	1598	16,0
	2	0,67	0,67	7,64	269	91,4	1543	16,9
	4	0,67	0,67	7,68	274	101,2	1825	18,0
	7	0,67	0,67	7,71	278	103,4	2045	19,8
	9	0,67	0,67	7,67	274	88,3	1656	18,8
4	carga					71,5	1244	17,4
	0	0,67	0,45	7,64	448	113,8	1748	15,4
	2	0,67	0,45	7,63	411	86,4	1806	20,9
	4	0,67	0,45	7,77	362	109,9	1897	17,3
	7	0,67	0,45	7,90	379	95,2	686	(7,2)
	9	0,67	0,67	7,63	273	59,7	1090	18,3
5	carga					91,0	1610	17,7
	0	0,67	0,45	7,65	296	119,4	2014	16,9
	2	0,67	0,45	7,61	285	112,3	2093	18,6
	4	0,67	0,45	7,90	292	125,1	2409	19,3
	7	0,67	0,45	7,88	297	116,4	1928	16,6
	9	0,67	0,45	7,34	278	102,5	1490	14,5
6	carga					60,7	992	16,3
	0	0,67	0,335	7,63	295	112,6	1753	15,6
	2	0,67	0,335	7,60	288	86,9	1787	20,6
	4	0,67	0,335	7,83	287	116,4	2106	18,1
	7	0,67	0,335	8,20	299	109,7	695	(6,3)
	9	0,67	0,335	7,44	287	95,2	1636	17,2
7	carga					116,4	1926	16,5
	0	0,67	0,67	7,56	275	101,1	1750	17,3
	2	0,67	0,67	7,51	276	93,4	1831	19,6
	4	0,67	0,67	7,60	270	101,6	1774	17,5
	7	0,67	0,67	7,53	283	102,2	1639	16,0
	9	0,67	0,67	7,46	274	89,9	960	10,7
8	carga					64,5	1119	17,4
	0	0,67	0,335	7,52	511	100,7	1718	17,1
	2	0,67	0,335	7,51	459	99,3	1900	19,1

ES 2 713 488 T3

Solución	Punto de medida (semana)	Vol. de carga (ml)	Vol. de rec. (ml)	pH	Osmolalidad (mosmol/kg)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
	4	0,67	0,335	7,70	482	114,5	1913	16,7
	9	0,67	0,335	7,29	425	102,3	1650	16,1
9	carga					165	3587	21,7
	0	0,60	0,60	7,71	309	121,4	2819	23,2
	4	0,60	0,60	7,74	-	140,3	2014	14,4
	7,5	0,60	0,60	7,61	292	135,9	1640	12,1
10	carga					165	3587	21,7
	0	0,60	0,60	7,86	276	142,1	2397	16,9
	3	0,40	0,40	8,20	314	141,9	2381	16,8
	5	0,60	0,60	7,60	302	131,8	2304	17,5

Ejemplo 7

Ejemplo de diferentes excipientes sobre la estabilidad de rhPBGD

5 La rhPBGD se concentró tal como se describe en el ejemplo 4 y después se le cambió el tampón por uno de los cuatro tampones descritos a continuación. Los productos se liofilizaron tal como se describe en el Ejemplo 4 con una etapa de recocido original incluida, y se probó la estabilidad de las muestras tal como se describe en el ejemplo 6.

10 Se probó el efecto de las cuatro formulaciones sobre la estabilidad de la rhPBGD:

Formulación A (se corresponde con la solución 9 en el ejemplo 6): manitol 250 mM, glicina 27 mM y Na₂HPO₄ 3,67 mM

15 Formulación B: manitol 250 mM, glicina 27 mM y Tris-HCl 10 mM.

Formulación C: manitol 250 mM, glicina 27 mM, Na₂HPO₄ 3,67 mM y Tween 80 al 0,1 %.

20 Formulación D: manitol 221 mM, sacarosa 29 mM, glicina 27 mM, Na₂HPO₄ 3,67 mM y Tween 80 al 0,1 %.

Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22 Formulación	Punto de medida (semana)	Vol. de carga (ml)	Vol. de rec. (ml)	pH	Osmolalidad (mosmol/kg)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad específica (U/mg)
A	Carga			7,69	366	165	3587	21,7
	0	0,60	0,60	7,71	309	121,4	2819	23,2
	4	0,60	0,60	7,74	-	140,3	2014	14,4
	7,5	0,60	0,60	7,61	292	135,9	1640	12,1
B	Carga			7,54	320	173	3595	20,8
	0	0,60	0,60	7,58	284	148,1	3726	25,2
	3	0,60	0,60	7,57	280	165,4	2947	17,8
	4	0,60	0,60	7,69	-	167,5	2367	14,1
	7,5	0,60	0,60	7,60	283	150,4	2235	14,9
C	Carga			7,40	338	178	3606	20,2
	0	0,60	0,60	7,76	290	142,9	2662	18,6
	3	0,60	0,60	7,43	285	181,7	2332	12,8
	4	0,60	0,60	7,42	-	173,1	1436	8,3
	6	0,60	0,60	7,55	274	156,6	1254	7,4
	7,5	0,60	0,60	7,34	274	141,5	1252	8,9
D	Carga			7,41	337	175	3869	22,1

Tabla 22 Formulación	Punto de medida (semana)	Vol. de carga (ml)	Vol. de rec. (ml)	pH	Osmolalidad (mosmol/kg)	Concentración de proteína (mg/ml)	Actividad (U/ml)	Actividad especifica (U/mg)
	0	0,60	0,60	7,80	292	127,5	2355	18,5
	3	0,60	0,60	7,35	288	143,9	1988	13,8
	4	0,60	0,60	7,26	-	159,3	1644	10,3
	6	0,60	0,60	7,30	281	135,7	1236	9,1
	7,5	0,60	0,60	7,28	282	125,7	1146	9,1

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Zymenex A/S
Stefan Nilsson
- <120> Un proceso para la concentración de un polipéptido
- 10 <130> 39840pc01
- <150> PA 2006 00488
<151> 04/04/2006
- 15 <150> PA 2006 00922
<151> 05/07/2006
- <160> 26
- 20 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0
- <210> 1
<211> 1035
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 25 <400> 1
- ```

atgagagtga ttcgctgagg taccgcgaag agccagcttg ctgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactcctg 240
aaggacctgc ccaactgtgt tccctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aacctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatac tggagttcag gtagtattcgg ggaaacctca acaccgggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc gggttgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggcccag 600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg 720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gactctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
accatccatg tccctgcccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
aacgatgccc attaa 1035

```
- 30 <210> 2  
<211> 1035  
<212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- 35 <400> 2

ES 2 713 488 T3

atgagagtga ttcgcggtggg taccgcgaag agccagcttg ctgcgataca gacggacagt 60  
 gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120  
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180  
 accaaggagc ttgaacatgc cctgggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240  
 aaggacctgc ccaactgtgct tcctcctggc ttaccatctg gagccatctg caagcgggaa 300  
 aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg ggaagaccct agaaaccctg 360  
 ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420  
 ttcccgcatac tggagtccag gaggattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480  
 gacgagcagc aggagtccag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540  
 tggcacaacc ggggtggggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600  
 ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660

ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttcct gaggcacctg 720  
 gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780  
 ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840  
 accatccatg tccttgccca gcatgaagat ggcctgagg atgaccaca gttggtaggc 900  
 atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg ccagaactt gggcatcagc 960  
 ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatggtgc acggcaattg 1020  
 aacgatgccc attaa 1035

5 <210> 3  
 <211> 1035  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 3

atgagagtga ttcgcggtggg taccgcgaag agccagcttg ctgcgataca gacggacagt 60  
 gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120  
 accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180  
 accaaggagc ttgaacatgc cctgggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240  
 aaggacctgc ccaactgtgct tcctcctggc ttaccatctg gagccatctg caagcgggaa 300  
 aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttgttg ggaagaccct agaaaccctg 360  
 ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420  
 ttcccgcatac tggagtccag gaggattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480  
 gacgagcagc aggagtccag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540  
 tggcacaacc ggggtggggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600  
 ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660  
 ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttcct gaggcacctg 720  
 gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780  
 ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840  
 accatccatg tccttgccca gcatgaagat ggcctgagg atgaccaca gttggtaggc 900  
 atcaactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg ccagaactt gggcatcagc 960  
 ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatggtgc acggcaattg 1020  
 aacgatgccc attaa 1035

15 <210> 4  
 <211> 1034  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 4

ES 2 713 488 T3

```

atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctcgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tctctccttg 240
aaggacctgc ccactgtgct tcctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aacctcatg atgctgttgt cttcacccaa aatttgttgg gaagacccta gaaaccctgc 360
cagagaagag tgtggtggga accagctccc tgcgaagagc agcccagctg cagagaaagt 420
tcccgcacat ggagttcagg agtattcggg gaaacctcaa caccggctt cgggaagctgg 480
acgagcagca ggagttcagt gccatcatcc tggcaacagc tggcctgcag cgcattgggct 540
ggcacaaccg ggtggggcag atcctgcacc ctgaggaatg catgtatgct gtgggcccagg 600
gggccttggg cgtggaagtg cgagccaagg accaggacat cttggatctg gtgggtgtgc 660
tgcacgatcc cgagactctg cttcctgca tcgctgaaa ggccttctctg aggcacctgg 720
aaggaggctg cagtgtgccg gtagccgtgc atacagctat gaaggatggg caactgtacc 780
tgactggagg agtctggagt ctagacggct cagatagcat acaagagacc atgcaggcta 840
ccatccatgt ccctgcccag catgaagatg gccctgagga tgaccacag ttggtaggca 900
tactgctcg taacattcca cgagggcccc agttggctgc ccagaacttg ggcatcagcc 960
tggccaactt gttgctgagc aaaggagcca aaaacatcct ggatgttga cggcaattga 1020
acgatgcccc ttaa 1034

```

<210> 5  
 <211> 1035  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 5

```

atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctcgcataca gacgggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtaccct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tctctccttg 240
aaggacctgc ccactgtgct tcctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aacctcatg atgctgttgt cttcacccaa aaattgttgg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaagg 420
tcccgcacat tggagttcag gtagtattcg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagttcag tgtcatcatc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc gggttgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggcccag 600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcgtgaaa gggccttctt gaggcacctg 720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
accatccatg tcctgcccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttctgtag caaggagacc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
aacgatgccc attaa 1035

```

<210> 6  
 <211> 1035  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 6

15

ES 2 713 488 T3

```

atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctcgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
aaggacctgc ccaactgtgct tcctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatac tggagtccag gaggattcgg ggaaacctca acaccgggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagtccag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc ggggtggggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgatac ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg 720
gaaggagggtt gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
accatccatg tccctgcccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaattg 1020
aacgatgccc attaa 1035

```

<210> 7  
 <211> 1034  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

```

atgagagtga ttcgcgtggg taccgcgaag agccagcttg ctcgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
aaggacctgc ccaactgtgct tcctcctggc ttcaccatcg gagccatctg caagcgggaa 300
aaccctcatg atgctgttgt ctttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcgaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatac tggagtccag gaggattcgg ggaaacctca acaccgggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagtccag tgccatcacc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc ggggtggggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgatac ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg 720

```

```

gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggct 840
accatccatg tccctgcccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgctc gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatgttgc acggcaatta 1020
acgatgcccc ttaa 1034

```

10

<210> 8  
 <211> 1035  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 8

ES 2 713 488 T3

```

atgagagtga ttcgcgtagg taccgcaag agccagcttg ctcgcataca gacggacagt 60
gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat tgctatgtcc 120
accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa aagcctgttt 180
accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt tcaactccttg 240
aaggacctgc ccaactgtgct tcctcctggc ttaccatctg gagccatctg caagcgggaa 300
aacctcatg atgctggtgt ctttcaccca aaatttggtg ggaagaccct agaaaccctg 360
ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcaagag cagcccagct gcagagaaag 420
ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct tcggaagctg 480
gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca gcgcatgggc 540
tggcacaacc ggggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc tgtgggccag 600
ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct ggtgggtgtg 660
ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt gaggcacctg 720
gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg gcaactgtac 780
ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac catgcaggcc 840
accatccatg tccctaccca gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca gttggtaggc 900
atcactgtct gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt gggcatcagc 960
ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatggtgc acggcaattg 1020
aacgatgccc attaa 1035

```

<210> 9  
 <211> 1260  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 9

5

```

cacaggaaac agctatgacc atgattacgc caagctcgaa attaaccctc actaaagggg 60
acaaaagctg gagctccacc gcggtggcgg ccgctctaga actagtggat cccccgggct 120
gcaggaattc atgagagtga ttcgcgtagg taccgcaag agccagcttg ctcgcataca 180
gacggacagt gtggtggcaa cattgaaagc ctcgtagcct ggcctgcagt ttgaaatcat 240
tgctatgtcc accacagggg acaagattct tgatactgca ctctctaaga ttggagagaa 300
aagcctgttt accaaggagc ttgaacatgc cctggagaag aatgaagtgg acctggttgt 360
tcaactccttg aaggacctgc ccaactgtgct tcctcctggc ttaccatctg gagccatctg 420
caagcgggaa aaccctcatg atgctggtgt ctttcaccca aaatttggtg ggaagaccct 480
agaaaccctg ccagagaaga gtgtggtggg aaccagctcc ctgcaagag cagcccagct 540
gcagagaaag ttcccgcatc tggagttcag gagtattcgg ggaaacctca acaccggct 600
tcggaagctg gacgagcagc aggagttcag tgccatcatc ctggcaacag ctggcctgca 660
gcgcatgggc tggcacaacc ggggtgggca gatcctgcac cctgaggaat gcatgtatgc 720
tgtgggccag ggggccttgg gcgtggaagt gcgagccaag gaccaggaca tcttggatct 780
ggtgggtgtg ctgcacgatc ccgagactct gcttcgctgc atcgctgaaa gggccttctt 840
gaggcacctg gaaggaggct gcagtgtgcc agtagccgtg catacagcta tgaaggatgg 900
gcaactgtac ctgactggag gagtctggag tctagacggc tcagatagca tacaagagac 960
catgcaggct accatccatg tccctgcccc gcatgaagat ggccctgagg atgaccaca 1020
gttggtaggc atcactgtct gtaacattcc acgagggccc cagttggctg cccagaactt 1080
gggcatcagc ctggccaact tgttgctgag caaaggagcc aaaaacatcc tggatggtgc 1140
acggcaattg aacgatgccc attaataagc ttatcgatac cgtcgacctc gagggggggc 1200
ccggtaccca attcgcccta tagtgagtcg tattacaatt cactggccgt cgttttacia 1260

```

10

<210> 10  
 <211> 1113  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*  
  
 <400> 10

15

ES 2 713 488 T3

cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg 60  
 gaagaaaaca gcccaaagat gagagtgatt cgcgtgggta cccgcaagag ccagcttgct 120  
 cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt 180  
 gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgcact ctctaagatt 240  
 ggagagaaaa gcctgtttac caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac 300  
 ctggttgttc actccttgaa ggacctgccc actgtgcttc ctctggctt caccatcgga 360  
 gccatctgca agcgggaaaa ccctcatgat gctgttgctt ttcacccaaa atttggtggg 420  
 aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtgggtggaa ccagctccct gcgaagagca 480  
 gccagctgc agagaaagt cccgcactct gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac 540  
 acccggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct ggcaacagct 600  
 ggctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gttgggcaga tcctgcaccc tgaggaatgc 660  
 atgtatgctg tgggccaggg ggccttgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc 720  
 ttggatctgg tgggtgtgct gcacgatccc gagactctgc ttcgctgcat cgctgaaagg 780  
 gccttctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg 840  
 aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata 900  
 caagagacca tgagggtac catccatgct cctgccagc atgaagatgg ccctgaggat 960  
 gaccacagt tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gagggccca gttggctgcc 1020  
 cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg 1080  
 gatgttgcaac ggcaattgaa cgatgcccat taa 1113

<210> 11  
 <211> 1380  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 11

agcaggctct actatgcct ccctctagtc tctgcttctt tggatccctg aggagggcag 60  
 aaggaagaaa acagcccaaa gatgagagtg attcgcgtgg gtaccgcaa gagccagctt 120  
 gctcgcatac agacggacag tgtggtggca acattgaaag cctcgtacc cctgcagttt 180  
 tttgaaatca ttgctatgtc caccacaggg gacaagattc ttgatactgc actctctaag 240  
 attggagaga aaagcctggt taccaaggag cttgaacatg ccctggagaa gaatgaagtg 300  
 gacctggttg ttcactcctt gaaggacctg cccactgtgc ttctcctgg cttcaccatc 360  
 ggagccatct gcaagcggga aaaccctcat gatgctgttg tctttcacc aaaatttggt 420  
 gggaaagacc tagaaaccct gccagagaag agtgtggtgg gaaccagctc cctgcgaaga 480  
 gcagcccagc tgcagagaaa gttcccgcct ctggagtcca ggagtattcg gggaaacctc 540  
 aacacccggc ttcggaagct ggacgagcag caggagtcca gtgccatcat cctagcaaca 600  
 gctggcctgc agcgcctggg ctggcacaac cgggttgggc agatcctgca ccctgaggaa 660  
 tgcattgatg ctgtgggcca gggggccttg ggcgtggaag tgcgagccaa ggaccaggac 720  
 atcttggatc tgggtgggtg gctgcacgat cccgagactc tgcttcgctg catcgtgaa 780  
 agggccttcc tgaggcacct ggaaggaggc tgcagtgtgc cagtagccgt gcatacagct 840  
 atgaagatg ggcaactgta cctgactgga ggagtctgga gtctagacgg ctcatagagc 900  
 atacaagaga ccatgcaggc taccatccat gtccctgccc agcatgaaga tggccctgag 960  
 gatgaccac agttggtagg catcactgct cgtaacattc cacgagggcc ccagttggct 1020  
 gcccagaact tgggcatcag cctggccaac ttgttgctga gcaaaggagc caaaaccatc 1080  
 ctggatgttg cacggcagct taacgatgcc cattaactgg tttgtggggc acagatgcct 1140  
 gggttgctgc tgtccagtgc ctacatccc ggccctcagtg cccattctc actgctatct 1200  
 ggggagtgat taccocggga gactgaactg cagggttcaa gccttcagg gatttgctc 1260  
 accttggggc cttgatgact gccttgctc ctcagtatgt gggggcttca tctctttaga 1320  
 gaagtccaag caacagcctt tgaatgtaac caatcctact aataaaccag ttctgaaggt 1380

10

<210> 12  
 <211> 1377  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 12

ES 2 713 488 T3

cacacagcct actttccaag cggagccatg tctggtaacg gcaatgcggc tgcaacggcg 60  
 gaagaaaaca gcccaaagat gagagtgatt cgcgtgggta cccgcaagag ccagcttgct 120

cgcatacaga cggacagtgt ggtggcaaca ttgaaagcct cgtaccctgg cctgcagttt 180  
 gaaatcattg ctatgtccac cacaggggac aagattcttg atactgcact ctctaagatt 240  
 ggagagaaaa gcctgtttac caaggagctt gaacatgccc tggagaagaa tgaagtggac 300  
 ctggttgttc actccttgaa ggacctgccc actgtgcttc ctctggctt caccatcggg 360  
 gccatctgca agcgggaaaa ccctcatgat gctgttgtct ttcacccaaa atttggtggg 420  
 aagaccctag aaaccctgcc agagaagagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca 480  
 gccagctgc agagaaagtt cccgcatctg gagttcagga gtattcgggg aaacctcaac 540  
 acccggcttc ggaagctgga cgagcagcag gagttcagtg ccatcatcct agcaacagct 600  
 ggctgcagc gcatgggctg gcacaaccgg gtggggcaga tcctgcaccc tgagaaatgc 660  
 atgtatgctg tgggccaggg ggccttgggc gtggaagtgc gagccaagga ccaggacatc 720  
 ttggatctgg tgggtgtgct gcacgatccc gagactctgc ttcgctgcat cgctgaaagg 780  
 gccttcctga ggcacctgga aggaggctgc agtgtgccag tagccgtgca tacagctatg 840  
 aaggatgggc aactgtacct gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata 900  
 caagagacca tgcaggctac catccatgtc cctgcccagc atgaagatgg ccctgaggat 960  
 gaccacagt tggtaggcat cactgctcgt aacattccac gagggcccca gttggctgcc 1020  
 cagaacttgg gcatcagcct ggccaacttg ttgctgagca aaggagccaa aaacatcctg 1080  
 gatgttgcac ggcagcttaa cgatgcccat taactggttt gtggggcaca gatgcctggg 1140  
 ttgctgctgt ccagtgccta catcccgggc ctcagtgcc cattctcact gctatctggg 1200  
 gagtgattac cccgggagac tgaactgcag gtttcaagcc ttccagggat ttgcctcacc 1260  
 ttggggcctt gatgactgcc ttgcctcctc agtatgtggg ggcttcatct ctttagagaa 1320  
 gtccaagcaa cagcctttga atgtaaccaa tcctactaat aaaccagttc tgaaggt 1377

<210> 13  
 <211> 10024  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 13

ES 2 713 488 T3

aatcatgatt gttaattatg ttcattgatta caggcgcggt ggctcacgcc tgtactcca 60  
gcactttggg aggccgaggt gggcgaatca cctgaggtca ggagttcaag acctgcctga 120  
ctaacatgga gaaacctcat ctctaccaa aatacaaaat tagccgggtg tgggtggtgcg 180  
tgcctgtaat cccagctact cggggggctg aggcaggaga attgcttgaa cccgggaggc 240  
ggaggttgca gtgagctgag atcgtgccat tgcattccag cctgggcaac aagagcgaaa 300  
ctccgtctca aaaaaaaaaaaa aaaattatgt tcatgggaaa gcacttttcc taacaagccc 360  
ttttctcact acatgtaggt ttgtgctccc acttcagtta cttgtcttta ggcattgacct 420  
ttaatctctc tgaaccagtt tcctcatttt aagaattgaa atgctggctg gcccagtcgt 480  
cacgcctgta atcccagcac tttgggaggc caaggcgaga tgactgcttg agtccaggag 540  
ttcgagacta gcctgggcaa catagtgagg ccacctcccc gctgtctcta taaaaaatc 600  
tagaaattag tcccacgtgg tgatgtgctg ctgtagtccc agctgcttgg gaggctgagg 660  
tggggggatc gctgaagccg ggaggtcaag gctgcagtga cccgtggtca tgccgctgca 720  
ctctagtctg gggacacagt gagaccccgt atcaaaaaga aaaatgctgc ctatttcaag 780  
gtttagcaaa agctaagttt gaacagagca aaggaagcgc catagaagct gcactacttg 840  
ctcatgtcac agctgggaa tggggaggtc gaatggggag gtccactgtc gcaatgttcc 900  
aattcccgcc cagagggagg gacctcccct tccagggagg gcgccggaag tgacgcgagg 960  
ctctgctggg accaggagtc agactgtagg acgacctcgg gtcccacgtg tccccggtac 1020  
tcgcccggcc gagcctccgg cttcccgggg ccgggggacc ttagcggcac ccacacacag 1080  
cctactttcc aagcggagcc atgtctggta acggcaatgc ggctgcaacg gcggtgagtg 1140  
ctgagccggg gaccagcaca ctttgggctt ctggacgagc cgtgcagcga ttggccccag 1200  
gttgccatcc tcagtcgtct attggtcaga acggctatct tttttttttt tttttttttt 1260  
tttttggctc gagtagcttt taaaggcca gttagctcggg tgccctccgg aaggaatggg 1320  
gaaatcagag agcggtgata ctgggttaag agtggaaagga ttgtttggaa cggaaactccg 1380  
gtccctgctg gcatctgggt gggattccca tcaggcctgg gatgcacggc tctagattta 1440  
gtgaccaga ccaagaacgt tcgtctacac agacggggtc ctttcattcg aggctgggct 1500  
gaggcggatg cagatacggc ccctttggga agacacgttc cacttttgat tcataggaga 1560  
gagtatcagc caagcctccg aactgcacac aaacgtctta gaagtgcgcc ttctttttgt 1620  
gttatagtgg tctcccagcc acagccaacg ctccaagtcc ccagctgtga cacacctact 1680  
gaattactac cgtgggtggg aggccgccgt gggcctttcc attacgagcc tgcttgccga 1740  
gcctgggct tgtgcacaga caaactgcag agctggtgga ggccactgcc aggccgagat 1800  
aagaaagaga tggggagctg ctaatctccc cctgtccagc ctggtggtga gggctgggat 1860  
ctttgctctt gcagtcattc cagagccctg gactaggagt aggaagatct gaattgtggc 1920  
ccaactctc tttcggttat tagctctgtg accctaggca agtcacctca tcccttgatg 1980  
ccaccggtg cttctgtaac atggtcccaa aggtgcctgt cttgtccacc tgataggatt 2040  
tttgagacga caacaatatg caaaagcaat agcttcaaca tagaagtgct cagtgtttta 2100

ES 2 713 488 T3

|             |             |            |             |             |             |      |
|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ttttttaatg  | aaacggtttg  | acttggatat | gctgtgcaca  | ttcaatgaac  | ttaaggaatt  | 2160 |
| gtttgaacct  | agtagttctg  | ggaccttaga | gtcctttctg  | tgggctccct  | gtggcccaga  | 2220 |
| tttttggtgg  | ccacgtttaa  | tatcaagcct | agcctaattt  | gcaaagggtc  | tcccagggtt  | 2280 |
| aatttattgg  | agtgatcaca  | tggagttagc | cagagtctga  | gggcagaaag  | ctgtcacctg  | 2340 |
| cttcggcaat  | agaggcccca  | gatgtctggg | tgcaaaagaa  | ctccatagca  | ccccgaccaa  | 2400 |
| catggtgaaa  | ccccgtctct  | actaaaaata | taaaaattag  | gccgagcaca  | gtggctcatg  | 2460 |
| cctgtaatcc  | tagcactttg  | ggaggccgag | gcaggtggat  | tgccctgagct | caggagtctg  | 2520 |
| agaccagcct  | agggaacaca  | gtgaaacccc | gtttctacta  | aaaatacaaa  | aaattagccg  | 2580 |
| acgtgggtggc | atgcgctctg  | agtcccagct | acttggggagg | ctaagacagg  | agaatcgctt  | 2640 |
| gaacctggga  | ggtggagggt  | gcactgagcc | gagaccggcg  | cattgcactc  | cagcctgggt  | 2700 |
| gacagagcgc  | aactccccct  | caaaaaaaga | aaaaaatata  | tatatatata  | tatatatata  | 2760 |
| tacacacata  | ttttagctgg  | gcatggtggt | gtcgtctgtg  | agtagtccca  | gctacttggg  | 2820 |
| aggctgagtc  | aggagaatcg  | cttgaacctg | gaaggcagtg  | gttgtagtta  | gctgagaaca  | 2880 |
| tgccactgca  | ctccagcctg  | ggcaacagag | ggagactctg  | tctcaaaaaa  | aaaaaaaaaa  | 2940 |
| aggaactaca  | taggatgaac  | atcccagatc | agggaatggt  | gactgtcgac  | agtatcagta  | 3000 |
| tctacagtgg  | ctactgtctg  | atgtagaaag | aaatgggatc  | aggctaggcg  | tggtggctca  | 3060 |
| cgctgtaat   | cccagctctt  | tgggaggctg | gggcaggagg  | atcacaagtt  | cgagaccagc  | 3120 |
| ctggccaaca  | cagtgaaacc  | ccgtctctac | taaaaatgtg  | aaaattagct  | gggcatggctg | 3180 |
| gaactgtctg  | tagttccagc  | ttgaaccagc | gggtggagg   | tgtagtgagc  | ctagatcagc  | 3240 |
| ccactgcaact | ccagcctgag  | caaaaacagt | agactctgtc  | taaaaaaaaa  | aaaaaaaaaa  | 3300 |
| agagaaatgg  | gacctccgtc  | ttagactgaa | gaattcagtt  | ctacgtgctt  | agcagtgaat  | 3360 |
| acttttgtcc  | aaggtaactc  | ggcaggagga | agagggctgt  | cctcttgagt  | tcttgacttg  | 3420 |
| ggctctggcc  | tgtaaatatt  | tccatggtgg | tgaaccaga   | ggcagcactc  | taggtgaacg  | 3480 |
| aactttaggc  | agcgcagcct  | cctagtctta | tggaacatct  | gaggcagaag  | aaacctgagt  | 3540 |
| ccaacctttt  | cattttatag  | atgaacaac  | agatcctgat  | gggacagtgt  | acccaaggtc  | 3600 |
| accagccaa   | gaggctgagc  | aggactgtac | gtcagatccg  | tttacctcag  | tccttaatgc  | 3660 |
| atgcagtcca  | gccagattaa  | gggaccctta | atactgtcag  | ctttccccac  | tgtgggatct  | 3720 |
| tcatcctctt  | gacttctttt  | gtagccagag | atctgggcct  | cttgctggag  | aagggtggcag | 3780 |
| cttgctgctc  | ttagactcta  | gtctactcca | tgtggcatct  | ggatggcact  | gaaattttct  | 3840 |
| caagtgcctt  | gtctgttgta  | gataatgaat | ctatcctcca  | gtgactcagc  | acaggttccc  | 3900 |
| cagtgtggtc  | ctggctgccc  | tgcccctgcc | agctgcaggc  | cccacccttc  | ctgtggccag  | 3960 |
| gctgatgggc  | cttatctctt  | taccacctg  | gctgtgcaca  | gcactcccac  | tgacaactgc  | 4020 |
| cttggtaacg  | gtgggcttca  | gggctcagtg | tctctggttac | tgacgaggca  | gcaacagcag  | 4080 |
| gtcctactat  | cgctccctc   | tagtctctgc | ttctctggat  | ccctgaggag  | ggcagaaggt  | 4140 |
| actgaggaag  | gttaaagga   | ccagccttgg | agatattccc  | cactctgaga  | ctagctggc   | 4200 |
| cacaggccag  | gttctgaatt  | tcctttcttc | caagccagtg  | attctggttc  | ttggacaagg  | 4260 |
| tgttgaggaa  | cactagaaac  | agaggggact | gtgacctggg  | gactttttct  | gcaggaagaa  | 4320 |
| aacagccaa   | agatgagagt  | gattcgcgtg | ggtaccgcga  | agagccaggt  | gggtgcagga  | 4380 |
| gccggggtgg  | aggaggtttg  | tcagaacagt | tatgatgctc  | acagcatcac  | aaattggggg  | 4440 |
| actcagaggg  | ttagttccta  | gtatgaagga | gatggggtgg  | ctgggcgtta  | agttccccgg  | 4500 |
| gaaatggcag  | attacattct  | atggcaagat | catccctagg  | ctgggaaaat  | tgttgagagt  | 4560 |
| cagagggctc  | ccaagcccct  | tctcatgccc | agatggaaat  | tccagtcctc  | tcagatctg   | 4620 |
| cctaacctgt  | gacagtctaa  | agagtctgag | ccgtggctgg  | gaagggcagg  | actaatccaa  | 4680 |
| atctctaccc  | gcagcttgct  | cgcatacaga | cggacagtgt  | ggtggcaaca  | ttgaaagcct  | 4740 |
| cgtaccctgg  | cctgcagttt  | gaaatcagtg | agttttctgg  | aaaggagtgg  | aagctaagtg  | 4800 |
| gaagcccagt  | accccgagag  | gagagaacac | aacatttctg  | gctttgccta  | tagctaagac  | 4860 |
| ccgtcccgtc  | gccccgagat  | tccttctggg | ctgctcccag  | ttctgaaggt  | gctttcctct  | 4920 |
| gaatacctcc  | agctctgact  | acctggatta | gcctggcatt  | taacatcttg  | agctttgggt  | 4980 |
| ctttttatga  | gtgtttctgg  | tcttctgct  | cgattgtata  | tactcagagg  | gcaggaacca  | 5040 |
| gggattatgt  | gcctctgtcc  | ccatcatgaa | tctgtgcaca  | gtgctaggct  | cagtaaatgc  | 5100 |
| tgatcaataa  | tgagcacctg  | attgattgac | tctctcctca  | gttgctatgt  | ccaccacagg  | 5160 |
| ggacaagatt  | cttgatactg  | cactctctaa | ggtaacaaca  | tcttctctcc  | cagttcttgt  | 5220 |
| ccccactctt  | ctttccttcc  | ctgaagggat | tcactcaggc  | tctttctgtc  | cggcagattg  | 5280 |
| gagagaaaag  | cctgtttacc  | aaggagcttg | aacatgccct  | ggagaagaat  | gagtaagtaa  | 5340 |
| agataggaga  | gtgtgggtgcc | ctcccagctc | cttgcctggg  | ccctagtatg  | ctaggtctct  | 5400 |
| tgctgggacc  | cggggtgtca  | gataggctgc | tgggcttaaa  | ccctcagaga  | ggctgaaggc  | 5460 |
| agctcatagg  | tgggtttttt  | caggctcag  | aaaaggagag  | tgtctggttc  | tgagccatct  | 5520 |
| ggctgcctgg  | actgcaagaa  | tggctggggg | agggagggta  | ggaggagag   | ggaggagag   | 5580 |
| agtgagagga  | gagcagtttt  | catgctcctg | agatcttgag  | aagggtgtct  | tcctgaactg  | 5640 |
| ccctaggctc  | caccactgaa  | gtagaggcag | gggtgggtgg  | agaaggggtg  | aaggctggct  | 5700 |
| gctcataccc  | tttctctttg  | ccccctctc  | ccatctctat  | agagtggacc  | tggttgttca  | 5760 |
| ctccttgaag  | gacctgccc   | ctgtgcttcc | tctctggctc  | accatcggag  | ccatctgcaa  | 5820 |
| gtaagagtct  | tgcaagtaag  | gggcttgggc | aggggtagge  | atcatgtgaa  | cctttgcctt  | 5880 |

tccctttggg gcctgaccct ctgcttcagg gttatctcct ctgcccctgag gagtgttgac 5940  
 tggtagcaga aaactcaaga aataccagtg agttggcaat cgagagagaa tagaggtgat 6000  
 ctgaaacttaa atctcttccc tcattctgtg cccttccctc ctccccagg cgggaaaacc 6060  
 ctcatgatgc tgttgtcttt caccctaaat ttgttgggaa gaccctagaa accctgccag 6120  
 agaagaggta agtggggcct ggataggcag cttgggtggga tgtgcccaga agatgcaggg 6180  
 atgggaggag gaggaaagga acagtgactg cctagtggtta aaatctcatt gtaacttctc 6240  
 tctgggcagt gtggtgggaa ccagctccct gcgaagagca gccagctgc agagaaagtt 6300  
 cccgcatctg gagttcagga gtattgtatc cttttagaag agtgacggat ccttttggaa 6360  
 gagtgcgga gacagcagcc aaggaaaaag acaaggtcta gagggtctg ggagtccgga 6420  
 gagtggaaag ggcttccagc aagcagcccg tggggtcagt gccctgtctg tctttccatg 6480  
 cactcatccg tccactcatt tacagtctaa tgttttctta gccccagaca agtgttcaga 6540  
 gtgcaaggca ttggggataa tggtagcaaa gataaacatt cccctgcata tgtagagttt 6600  
 acgtcttact tagggataat gcagttatac tgaactgaat agtgactact tctggaggga 6660  
 tagggagtag ttcctttttt tttttttttt tttctgagac ggagtctcgc tctgttgccc 6720  
 aggttggagt gcagtgccg cactgcaact tctgcctcct gagttcaagc 6780  
 aatcttctg cctcagcctc ctaagtagtt gggattacag gtgccaccac acctggctaa 6840  
 tttttgtatt ttttagtagg actgggtttc acctagttag tcaggctggt ctcaaactcc 6900  
 tgacctcagg tgatccacca gcctcggcct cccaaagggc tgggattaca ggtctgagcc 6960  
 ccgcaaccgg tcagtaactt catttttata tgctactata ttgtcttgac ttttacaatg 7020  
 aatatgtagt acatttcata aaactaaatt taaaaatagt atgtgctaag tgctccaata 7080  
 agtgaagttg ggaattttct ggaacttct agttggaaca tctaaacaca gaagtctggg 7140  
 gtgtcagggg aggtttctca gaggtcttgt aacctggca agttatttag cctccctatg 7200  
 tcattttcct tatctgtaaa gtggggataa taatactacc ttcctcacag ggttgtttgt 7260  
 aagatgaaat gagctgacat atggaaagta cttttagagc agtgtctggc atgtagtaag 7320  
 tatgatgtaa ctggttagct ttaacattaa gctgagagct ggaagatgac tgaagtcag 7380  
 ccagctagag agggaaagac agactcaggc agagggaaacc gcacgaggcc ccagattgcc 7440  
 cgacactgtg gtccttagca actctccaca gcggggaaac ctcaacacc ggcttcggaa 7500  
 gatggacgag cagcaggagt tcagtgccat catcctggca acagctggcc tgcagcgc 7560  
 gggctggcac aaccgggttg ggcagtagg gcctgccctc atcctctccc cagctcatct 7620  
 gcatctcctt tctgccttac agtcatccc aatttaggat ttttagact tatgattgtg 7680  
 taaaagcgat atacgttcag tagaaactgt acttagtacc catacagcca ttctgtttt 7740  
 tactttcagt acagtattca ttacatgaga tattcacttt attgtaaac aggttgggtg 7800  
 tcagatagtt ttgtccaact ataataagct aatcttaagt gttctgagca catgtaaggt 7860  
 aggttaggtg ttttaaatgc attttcagct tgttttcaac ttaacaatgg gtttatcagg 7920  
 atgtaaccct attgtaagtc aaggaccatc tgtcttcaact tcttgaccac cccacctcta 7980  
 acaccgtagg ctgggaagat tgtgaatcag aggccagact ctaggctttc atggagaaaa 8040  
 ttacaaaaaa aaaaaaaaag aggccagact cacacttagg cctaccagg ctttctagat 8100  
 gatagggaac tcccattctca ctgccaggtg cttttagaca ccccctgtc caccctttt 8160  
 actccctgtt ccgcctccac agatcctgca ccctgaggaa tgcattgatg ctgtgggcca 8220  
 ggtacacttg accaggggag ccacatggtg acatattgcct tccctttgtt ctcaaccaag 8280  
 aagcttgtct cacaaccttc tgcattctgt tccccagaat agcattctca gggagggcca 8340  
 gaccttggga tgctaccggt ccaaaagcg ctggggagca agtagataga ggtgttccca 8400  
 tgctttgcgc cattgggttg ggaaagatca ggcctgatgt cctaggatgt ttttccatca 8460  
 gggggccttg ggcgtggaag tgcgagccaa ggaccaggac atcttggatc tgggtgggtg 8520  
 gctgcacgat cccgagactc tgcttcgctg catcgctgaa agggccttcc tgaggcacct 8580  
 ggtagggcct gtgctccacc tgtggagggc tggggacttg gagagctggg aaaggtggca 8640  
 ggaagattt cttacatgaa tgctctgtat acagtgctaa ctcattcttg ttgaatgtt 8700  
 tgtatggata ggaccaggtc tgggccca cagtgatgtc cagtgatgtc ctcaggtctg 8760  
 tggtagcagg gtggtggtta aagcccttgc agctcacaag aacttcttgc tacaggaag 8820  
 aggtgcaggt gtcgagtag ccgtgcatac gatgggcaag gatgggcaag taagtggggg 8880  
 gaaatgggog ggaagccagg gaaaggagga ctgtggcatt tcttctgtg catcccaggt 8940  
 ttctaggtag tcccctctca gactgtgctg aggcaactgt tttcttccc agctgtacct 9000  
 gactggagga gtctggagtc tagacggctc agatagcata caagagacca tgcaggctac 9060  
 catccatgtc cctgccaggt taccaaagct ggagggcgag ggggtaataa acaagagtgc 9120  
 atataatctc ttgttctcac caatcccac ctccctccct catacagcat gaagatggcc 9180  
 ctgaggatga cccacagttg gtaggcatac ctgctcgtaa cattccacga gggccccag 9240  
 tggctgcccc gaacttgggc atcagcctgg ccaacttgtt gctgagcaaa gggccaaaa 9300  
 acatcctgga tgttgacagg cagctaacg atgcccatta actggtttgt ggggacacaga 9360  
 tgcttgggtt gctgctgtcc agtgctaca tcccgggcct cagtgcccc aactcactgc 9420  
 tatctgggga gtgattacc cgggagactg aactgcaggg ttcaagcct ccagggattt 9480  
 gcctcacctt ggggccttga tgactgcctt gcctcctcag tatgtgggg cttcatctct 9540  
 ttagagaagt ccaagcaaca gccttgaat gtaaccaatc ctactaataa accagttctg 9600  
 aaggtgttgt gtgtgcgcgt gtggagttgg cgggaagata ggaacaaaca caaagccctt 9660

ES 2 713 488 T3

```

tcatccttac ctcagaggct gggacttttg cccagagttc tcctgggtacg tcctttctgc 9720
ttctgcctca atagttttca tttcacacag aataaattgt ctcccaggaa caccaagaaa 9780
cagagccaca atcttaaatt cctatggttt gccccttcag ttaacagtag agcctgttta 9840
tattgcatgg cccctcccac ccctattatc aggaaagtat agaaagtcac taattctaca 9900
actctcttgc aaaatgaaaa caaatgctcc atttaaaaaa aaaacaatcc tttaataaaa 9960
ttagtccatc taaaactccc caatgcctaa ggttctagtc gtggaagggt tagctgcaga 10020
attc 10024

```

<210> 14  
 <211> 361  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 14

```

Met Ser Gly Asn Gly Asn Ala Ala Ala Thr Ala Glu Glu Asn Ser Pro
1 5 10 15
Lys Met Arg Val Ile Arg Val Gly Thr Arg Lys Ser Gln Leu Ala Arg
20 25 30
Ile Gln Thr Asp Ser Val Val Ala Thr Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Gly
35 40 45
Leu Gln Phe Glu Ile Ile Ala Met Ser Thr Thr Gly Asp Lys Ile Leu
50 55 60
Asp Thr Ala Leu Ser Lys Ile Gly Glu Lys Ser Leu Phe Thr Lys Glu
65 70 75 80
Leu Glu His Ala Leu Glu Lys Asn Glu Val Asp Leu Val Val His Ser
85 90 95
Leu Lys Asp Leu Pro Thr Val Leu Pro Pro Gly Phe Thr Ile Gly Ala
100 105 110
Ile Cys Lys Arg Glu Asn Pro His Asp Ala Val Val Phe His Pro Lys
115 120 125
Phe Val Gly Lys Thr Leu Glu Thr Leu Pro Glu Lys Ser Val Val Gly
130 135 140
Thr Ser Ser Leu Arg Arg Ala Ala Gln Leu Gln Arg Lys Phe Pro His
145 150 155 160
Leu Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys
165 170 175
Met Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly
180 185 190
Leu Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro
195 200 205
Glu Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val
210 215 220
Arg Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp
225 230 235 240
Pro Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His
245 250 255
Leu Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys
260 265 270
Asp Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser
275 280 285
Asp Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln
290 295 300
His Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala
305 310 315 320
Arg Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile
325 330 335
Ser Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp
340 345 350
Val Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His
355 360

```

10

ES 2 713 488 T3

<210> 15  
 <211> 344  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 15

```

Met Arg Val Ile Arg Val Gly Thr Arg Lys Ser Gln Leu Ala Arg Ile
 1 5 10 15
Gln Thr Asp Ser Val Val Ala Thr Leu Lys Ala Ser Tyr Pro Gly Leu
 20 25 30
Gln Phe Glu Ile Ile Ala Met Ser Thr Thr Gly Asp Lys Ile Leu Asp
 35 40 45
Thr Ala Leu Ser Lys Ile Gly Glu Lys Ser Leu Phe Thr Lys Glu Leu
 50 55 60
Glu His Ala Leu Glu Lys Asn Glu Val Asp Leu Val Val His Ser Leu
 65 70 75 80
Lys Asp Leu Pro Thr Val Leu Pro Pro Gly Phe Thr Ile Gly Ala Ile
 85 90 95
Cys Lys Arg Glu Asn Pro His Asp Ala Val Val Phe His Pro Lys Phe
 100 105 110
Val Gly Lys Thr Leu Glu Thr Leu Pro Glu Lys Ser Val Val Gly Thr
 115 120 125
Ser Ser Leu Arg Arg Ala Ala Gln Leu Gln Arg Lys Phe Pro His Leu
 130 135 140
Glu Phe Arg Ser Ile Arg Gly Asn Leu Asn Thr Arg Leu Arg Lys Met
 145 150 155 160
Asp Glu Gln Gln Glu Phe Ser Ala Ile Ile Leu Ala Thr Ala Gly Leu
 165 170 175
Gln Arg Met Gly Trp His Asn Arg Val Gly Gln Ile Leu His Pro Glu
 180 185 190
Glu Cys Met Tyr Ala Val Gly Gln Gly Ala Leu Gly Val Glu Val Arg
 195 200 205
Ala Lys Asp Gln Asp Ile Leu Asp Leu Val Gly Val Leu His Asp Pro
 210 215 220
Glu Thr Leu Leu Arg Cys Ile Ala Glu Arg Ala Phe Leu Arg His Leu
 225 230 235 240
Glu Gly Gly Cys Ser Val Pro Val Ala Val His Thr Ala Met Lys Asp
 245 250 255
Gly Gln Leu Tyr Leu Thr Gly Gly Val Trp Ser Leu Asp Gly Ser Asp
 260 265 270
Ser Ile Gln Glu Thr Met Gln Ala Thr Ile His Val Pro Ala Gln His
 275 280 285
Glu Asp Gly Pro Glu Asp Asp Pro Gln Leu Val Gly Ile Thr Ala Arg
 290 295 300
Asn Ile Pro Arg Gly Pro Gln Leu Ala Ala Gln Asn Leu Gly Ile Ser
 305 310 315 320
Leu Ala Asn Leu Leu Leu Ser Lys Gly Ala Lys Asn Ile Leu Asp Val
 325 330 335
Ala Arg Gln Leu Asn Asp Ala His
 340

```

10 <210> 16  
 <211> 2022  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 16

ES 2 713 488 T3

ccggtaccgg ctccctctgg gtcacctata ggccttccc cccggcccga ctgcctggtc 60  
 agcgccaagt gacttacgcc cccgaccctg agccccgacc gctaggcgag gaggatcaga 120  
 tctccgctcg agaactctgaa ggtgccctgg tccctggagga gttccgtccc agccctgcgg 180  
 tctcccggta ctgctcgccc cggccctctg gagcttcagg aggcggccgt cagggtcggg 240

gagtatttgg gtccggggtc tcagggaaag gcggcgcctg ggtctgcggt atcggaaaga 300  
 gcctgctgga gccaaagtag cctccctctc ttgggacaga cccctcggtc ccatgtccat 360  
 gggggcaccg cggtcctctc tcctggccct ggctgctggc ctggccggtt cccgtccgcc 420  
 caacatcgtg ctgatctttg ccgacgacct cggctatggg gacctgggct gctatgggca 480  
 ccccagctct accactccca acctggacca gctggcggcg ggagggtgc ggttcacaga 540  
 cttctacgtg cctgtgtctc tgtgcacacc ctctagggcc gccctcctga cgggcccggct 600  
 cccggttcgg atgggcatgt accctggcgt cctggtgccc agctcccggg ggggectgcc 660  
 cctggaggag gtgaccgtgg ccgaagtcct ggctgccga ggctacctca caggaatggc 720  
 cggcaagtgg caccttgggg tggggcctga gggggccttc ctgccccccc atcagggctt 780  
 ccatcgattt ctaggcatcc cgtactccca cgaccagggc ccctgccaga acctgacctg 840  
 cttcccgcgg gccactcctt gcgacgggtg ctgtgaccag ggcctggtcc ccatcccact 900  
 gttggccaac ctgtccgtgg aggcgcagcc cccctggctg cccggactag aggcccgcta 960  
 catggctttc gcccatgacc tcatggccga cgcccagcgc caggatcgcc ccttcttctt 1020  
 gtactatgcc tctaccaca cccactacct tcagttcagt gggcagagct ttgcagagcg 1080  
 ttcaggccgc gggccatttg gggactccct gatggagctg gatgcagctg tggggacctt 1140  
 gatgacagcc ataggggacc tggggctgct tgaagagacg ctggtcatct tcaactgcaga 1200  
 caatggacct gagaccatgc gtatgtcccg aggcggctgc tccgggtctct tgcgggtgtg 1260  
 aaaggaacg acctacgagg gcggtgtccg agagcctgcc ttggccttct ggccaggtca 1320  
 tatcgctccc ggcgtgacct acgagctggc cagctccctg gacctgctgc ctaccctggc 1380  
 agccctggct ggggccccac tgcccaatgt caccttggat ggctttgacc tcagccccct 1440  
 gctgctgggc acaggcaaga gccctcggca gtctctcttc ttctaccgct cctaccocaga 1500  
 cgaggtccgt ggggtttttg ctgtgcggac tggaaagtac aaggctcact tcttcaccca 1560  
 gggctctgcc cacagtgata ccaactgcaga ccctgcctgc cacgcctcca gctctctgac 1620  
 tgctcatgag cccccgctgc tctatgacct gtccaaggac cctggtgaga actacaacct 1680  
 gctggggggg gtggccgggg ccaccccaga ggtgctgcaa gccctgaaac agcttcagct 1740  
 gctcaaggcc cagttagacg cagctgtgac cttcggcccc agccaggtgg cccggggcga 1800  
 ggaccccgcc ctgcagatct gctgtcatcc tggctgcacc ccccgcccag cttgctgcca 1860  
 ttgccagat ccccatgcct gagggcccct cggctggcct gggcatgtga tggctcctca 1920  
 ctgggagcct gtgggggagg ctcaggtgtc tggagggggg ttgtgcctga taacgtaata 1980  
 acaccagtgg agacttgcac atctgaaaa aaaaaaaaaa aa 2022

<210> 17  
 <211> 1524  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 17

ES 2 713 488 T3

```

atgggggcac cgcggtccct cctcctggcc ctggctgctg gcctggccgt tgcacgtccg 60
cccaacatcg tgctgatcct tgccgacgac ctcggctatg gggacctggg ctgctatggg 120
caccacagct ctaccactcc caacctggac cagctggcgg cgggagggct gcggttcaca 180
gacttctacg tgctgtgtc tctgtgcaca ccctctaggg ccgccctcct gaccggccgg 240
ctcccggttc ggatgggcat gtaccctggc gtccctgggtc ccagctcccg ggggggcctg 300
cccctggagg aggtgaccgt ggccgaagtc ctggctgccc gaggtacct cacaggaatg 360
gccggcaagt ggcaccttgg ggtggggcct gagggggcct tcctgcccc ccacagggc 420
ttccatcgat ttctaggcat cccgtactcc caccgaccagg gccctgccca gaacctgacc 480
tgcttcccgc cggccactcc ttgcgacggg ggetgtgacc agggcctggt ccccatccca 540
ctggtggcca acctgtccgt ggaggcgag cccccctggc tgcccggact agaggcccgc 600
tacatggctt tcgcccata cctcatggcc gacgcccagc gccaggatcg ccccttcttc 660
ctgtactatg cctctacca caccactac cctcagttca gtgggcagag ctttgacagag 720
cgttcaggcc gcgggccatt tggggactcc ctgatggagc tggatgcagc tgtggggacc 780
ctgatgacag ccatagggga cctggggctg cttgaagaga cgtgggtcat cttcactgca 840
gacaatggac ctgagaccat gcgtatgtcc cgaggcggct gctccggtct cttgcggtgt 900
ggaaagggaa cgacctacga gggcgggtgc cgagagcctg ccttggcctt ctggccagggt 960
catatcgctc ccggcgtgac ccacgagctg gccagctccc tggacctgct gcctaccctg 1020
gcagccctgg ctggggcccc actgcccatt gtcaccttgg atggctttga cctcagcccc 1080
ctgctgctgg gcacaggcaa gagccctcgg cagtctctct tcttctacct gtccctacca 1140
gacgaggtcc gtggggtttt tgctgtgcgg actggaaagt acaaggctca cttcttcacc 1200
cagggtctcg cccacagtga taccactgca gacctgctt gccacgcctc cagctctctg 1260
actgctcatg agccccgcgt gctctatgac ctgtccaagg accctgggtga gaactacaac 1320
ctgctggggg gtgtggccgg ggccaccca gaggtgctgc aagccctgaa acagcttcag 1380
ctgctcaagg cccagttaga cgcagctgtg accttcggcc ccagccagggt ggcccggggc 1440
gaggaccccg ccctgcagat ctgctgtcat cctggctgca cccccgccc agcttgcctg 1500
cattgcccag atccccatgc ctga 1524

```

- <210> 18
- <211> 507
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
  
- <400> 18

5

ES 2 713 488 T3

Met Gly Ala Pro Arg Ser Leu Leu Leu Ala Leu Ala Ala Gly Leu Ala  
1 5 10 15  
Val Ala Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly  
20 25 30  
Tyr Gly Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn  
35 40 45  
Leu Asp Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val  
50 55 60  
Pro Val Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg  
65 70 75 80  
Leu Pro Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser  
85 90 95  
Arg Gly Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala  
100 105 110  
Ala Arg Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val  
115 120 125  
Gly Pro Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe  
130 135 140  
Leu Gly Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr  
145 150 155 160  
Cys Phe Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu  
165 170 175  
Val Pro Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro  
180 185 190  
Trp Leu Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu  
195 200 205  
Met Ala Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala  
210 215 220  
Ser His His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu  
225 230 235 240  
Arg Ser Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala  
245 250 255  
Ala Val Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu  
260 265 270  
Glu Thr Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg  
275 280 285  
Met Ser Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr  
290 295 300  
Thr Tyr Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly  
305 310 315 320  
His Ile Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu  
325 330 335  
Leu Pro Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr  
340 345 350  
Leu Asp Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser  
355 360 365  
Pro Arg Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg  
370 375 380  
Gly Val Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr  
385 390 395 400  
Gln Gly Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala  
405 410 415  
Ser Ser Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser  
420 425 430  
Lys Asp Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala  
435 440 445

ES 2 713 488 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | Pro | Glu | Val | Leu | Gln | Ala | Leu | Lys | Gln | Leu | Gln | Leu | Leu | Lys | Ala |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Gln | Leu | Asp | Ala | Ala | Val | Thr | Phe | Gly | Pro | Ser | Gln | Val | Ala | Arg | Gly |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Glu | Asp | Pro | Ala | Leu | Gln | Ile | Cys | Cys | His | Pro | Gly | Cys | Thr | Pro | Arg |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Pro | Ala | Cys | Cys | His | Cys | Pro | Asp | Pro | His | Ala |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 500 |     |     |     |     | 505 |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 19  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<220>  
 <221> FORMILACIÓN  
 <222> 51  
 <223> C-alfa formilglicina

10

<400> 19

ES 2 713 488 T3

Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn Leu Asp  
 20 25 30  
 Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val Pro Val  
 35 40 45  
 Ser Leu Xaa Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg Leu Pro  
 50 55 60  
 Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg  
 85 90 95  
 Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val Gly Pro  
 100 105 110  
 Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe Leu Gly  
 115 120 125  
 Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr Cys Phe  
 130 135 140  
 Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu Val Pro  
 145 150 155 160  
 Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro Trp Leu  
 165 170 175  
 Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu Met Ala  
 180 185 190  
 Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala Ser His  
 195 200 205  
 His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu Arg Ser  
 210 215 220  
 Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Ala Val  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Thr  
 245 250 255  
 Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg Met Ser  
 260 265 270  
 Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr Thr Tyr  
 275 280 285  
 Glu Gly Gly Val Arg Glu Pro Ala Leu Ala Phe Trp Pro Gly His Ile  
 290 295 300  
 Ala Pro Gly Val Thr His Glu Leu Ala Ser Ser Leu Asp Leu Leu Pro  
 305 310 315 320  
 Thr Leu Ala Ala Leu Ala Gly Ala Pro Leu Pro Asn Val Thr Leu Asp  
 325 330 335

ES 2 713 488 T3

Gly Phe Asp Leu Ser Pro Leu Leu Leu Gly Thr Gly Lys Ser Pro Arg  
 340 345 350  
 Gln Ser Leu Phe Phe Tyr Pro Ser Tyr Pro Asp Glu Val Arg Gly Val  
 355 360 365  
 Phe Ala Val Arg Thr Gly Lys Tyr Lys Ala His Phe Phe Thr Gln Gly  
 370 375 380  
 Ser Ala His Ser Asp Thr Thr Ala Asp Pro Ala Cys His Ala Ser Ser  
 385 390 395 400  
 Ser Leu Thr Ala His Glu Pro Pro Leu Leu Tyr Asp Leu Ser Lys Asp  
 405 410 415  
 Pro Gly Glu Asn Tyr Asn Leu Leu Gly Gly Val Ala Gly Ala Thr Pro  
 420 425 430  
 Glu Val Leu Gln Ala Leu Lys Gln Leu Gln Leu Leu Lys Ala Gln Leu  
 435 440 445  
 Asp Ala Ala Val Thr Phe Gly Pro Ser Gln Val Ala Arg Gly Glu Asp  
 450 455 460  
 Pro Ala Leu Gln Ile Cys Cys His Pro Gly Cys Thr Pro Arg Pro Ala  
 465 470 475 480  
 Cys Cys His Cys Pro Asp Pro His Ala  
 485

<210> 20  
 <211> 489  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 20

ES 2 713 488 T3

Arg Pro Pro Asn Ile Val Leu Ile Phe Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Leu Gly Cys Tyr Gly His Pro Ser Ser Thr Thr Pro Asn Leu Asp  
 20 25 30  
 Gln Leu Ala Ala Gly Gly Leu Arg Phe Thr Asp Phe Tyr Val Pro Val  
 35 40 45  
 Ser Leu Cys Thr Pro Ser Arg Ala Ala Leu Leu Thr Gly Arg Leu Pro  
 50 55 60  
 Val Arg Met Gly Met Tyr Pro Gly Val Leu Val Pro Ser Ser Arg Gly  
 65 70 75 80  
 Gly Leu Pro Leu Glu Glu Val Thr Val Ala Glu Val Leu Ala Ala Arg  
 85 90 95  
 Gly Tyr Leu Thr Gly Met Ala Gly Lys Trp His Leu Gly Val Gly Pro  
 100 105 110  
 Glu Gly Ala Phe Leu Pro Pro His Gln Gly Phe His Arg Phe Leu Gly  
 115 120 125  
 Ile Pro Tyr Ser His Asp Gln Gly Pro Cys Gln Asn Leu Thr Cys Phe  
 130 135 140  
 Pro Pro Ala Thr Pro Cys Asp Gly Gly Cys Asp Gln Gly Leu Val Pro  
 145 150 155 160  
 Ile Pro Leu Leu Ala Asn Leu Ser Val Glu Ala Gln Pro Pro Trp Leu  
 165 170 175  
 Pro Gly Leu Glu Ala Arg Tyr Met Ala Phe Ala His Asp Leu Met Ala  
 180 185 190  
 Asp Ala Gln Arg Gln Asp Arg Pro Phe Phe Leu Tyr Tyr Ala Ser His  
 195 200 205  
 His Thr His Tyr Pro Gln Phe Ser Gly Gln Ser Phe Ala Glu Arg Ser  
 210 215 220  
 Gly Arg Gly Pro Phe Gly Asp Ser Leu Met Glu Leu Asp Ala Ala Val  
 225 230 235 240  
 Gly Thr Leu Met Thr Ala Ile Gly Asp Leu Gly Leu Leu Glu Glu Thr  
 245 250 255  
 Leu Val Ile Phe Thr Ala Asp Asn Gly Pro Glu Thr Met Arg Met Ser  
 260 265 270  
 Arg Gly Gly Cys Ser Gly Leu Leu Arg Cys Gly Lys Gly Thr Thr Tyr

ES 2 713 488 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |
| Glu | Gly | Gly | Val | Arg | Glu | Pro | Ala | Leu | Ala | Phe | Trp | Pro | Gly | His | Ile |
|     | 290 |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |
| Ala | Pro | Gly | Val | Thr | His | Glu | Leu | Ala | Ser | Ser | Leu | Asp | Leu | Leu | Pro |
| 305 |     |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |
| Thr | Leu | Ala | Ala | Leu | Ala | Gly | Ala | Pro | Leu | Pro | Asn | Val | Thr | Leu | Asp |
|     |     |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |
| Gly | Phe | Asp | Leu | Ser | Pro | Leu | Leu | Leu | Gly | Thr | Gly | Lys | Ser | Pro | Arg |
|     |     |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |
| Gln | Ser | Leu | Phe | Phe | Tyr | Pro | Ser | Tyr | Pro | Asp | Glu | Val | Arg | Gly | Val |
|     |     | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |
| Phe | Ala | Val | Arg | Thr | Gly | Lys | Tyr | Lys | Ala | His | Phe | Phe | Thr | Gln | Gly |
|     | 370 |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |
| Ser | Ala | His | Ser | Asp | Thr | Thr | Ala | Asp | Pro | Ala | Cys | His | Ala | Ser | Ser |
| 385 |     |     |     |     | 390 |     |     |     |     | 395 |     |     |     |     | 400 |
| Ser | Leu | Thr | Ala | His | Glu | Pro | Pro | Leu | Leu | Tyr | Asp | Leu | Ser | Lys | Asp |
|     |     |     |     | 405 |     |     |     |     | 410 |     |     |     |     | 415 |     |
| Pro | Gly | Glu | Asn | Tyr | Asn | Leu | Leu | Gly | Gly | Val | Ala | Gly | Ala | Thr | Pro |
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     |     | 430 |     |     |
| Glu | Val | Leu | Gln | Ala | Leu | Lys | Gln | Leu | Gln | Leu | Leu | Lys | Ala | Gln | Leu |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     |     | 445 |     |     |     |
| Asp | Ala | Ala | Val | Thr | Phe | Gly | Pro | Ser | Gln | Val | Ala | Arg | Gly | Glu | Asp |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Pro | Ala | Leu | Gln | Ile | Cys | Cys | His | Pro | Gly | Cys | Thr | Pro | Arg | Pro | Ala |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Cys | Cys | His | Cys | Pro | Asp | Pro | His | Ala |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 21  
 <211> 1011  
 <212> PRT  
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 21

ES 2 713 488 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Met | Gly | Ala | Tyr | Ala | Arg | Ala | Ser | Gly | Val | Cys | Ala | Arg | Gly | Cys | Leu |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Asp | Ser | Ala | Gly | Pro | Trp | Thr | Met | Ser | Arg | Ala | Leu | Arg | Pro | Pro | Leu |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Pro | Pro | Leu | Cys | Phe | Phe | Leu | Leu | Leu | Leu | Ala | Ala | Ala | Gly | Ala | Arg |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ala | Gly | Gly | Tyr | Glu | Thr | Cys | Pro | Thr | Val | Gln | Pro | Asn | Met | Leu | Asn |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Val | His | Leu | Leu | Pro | His | Thr | His | Asp | Asp | Val | Gly | Trp | Leu | Lys | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Val | Asp | Gln | Tyr | Phe | Tyr | Gly | Ile | Lys | Asn | Asp | Ile | Gln | His | Ala | Gly |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Val | Gln | Tyr | Ile | Leu | Asp | Ser | Val | Ile | Ser | Ala | Leu | Leu | Ala | Asp | Pro |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Arg | Arg | Phe | Ile | Tyr | Val | Glu | Ile | Ala | Phe | Phe | Ser | Arg | Trp | Trp |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| His | Gln | Gln | Thr | Asn | Ala | Thr | Gln | Glu | Val | Val | Arg | Asp | Leu | Val | Arg |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Gln | Gly | Arg | Leu | Glu | Phe | Ala | Asn | Gly | Gly | Trp | Val | Met | Asn | Asp | Glu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Ala | Ala | Thr | His | Tyr | Gly | Ala | Ile | Val | Asp | Gln | Met | Thr | Leu | Gly | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Arg | Phe | Leu | Glu | Asp | Thr | Phe | Gly | Asn | Asp | Gly | Arg | Pro | Arg | Val | Ala |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Trp | His | Ile | Asp | Pro | Phe | Gly | His | Ser | Arg | Glu | Gln | Ala | Ser | Leu | Phe |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Ala | Gln | Met | Gly | Phe | Asp | Gly | Phe | Phe | Phe | Gly | Arg | Leu | Asp | Tyr | Gln |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |

ES 2 713 488 T3

Asp Lys Trp Val Arg Met Gln Lys Leu Glu Met Glu Gln Val Trp Arg  
 225 230 235 240  
 Ala Ser Thr Ser Leu Lys Pro Pro Thr Ala Asp Leu Phe Thr Gly Val  
 245 250 255  
 Leu Pro Asn Gly Tyr Asn Pro Pro Arg Asn Leu Cys Trp Asp Val Leu  
 260 265 270  
 Cys Val Asp Gln Pro Leu Val Glu Asp Pro Arg Ser Pro Glu Tyr Asn  
 275 280 285  
 Ala Lys Glu Leu Val Asp Tyr Phe Leu Asn Val Ala Thr Ala Gln Gly  
 290 295 300  
 Arg Tyr Tyr Arg Thr Asn His Thr Val Met Thr Met Gly Ser Asp Phe  
 305 310 315 320  
 Gln Tyr Glu Asn Ala Asn Met Trp Phe Lys Asn Leu Asp Lys Leu Ile  
 325 330 335  
 Arg Leu Val Asn Ala Gln Gln Ala Lys Gly Ser Ser Val His Val Leu  
 340 345 350  
 Tyr Ser Thr Pro Ala Cys Tyr Leu Trp Glu Leu Asn Lys Ala Asn Leu  
 355 360 365  
 Thr Trp Ser Val Lys His Asp Asp Phe Phe Pro Tyr Ala Asp Gly Pro  
 370 375 380  
 His Gln Phe Trp Thr Gly Tyr Phe Ser Ser Arg Pro Ala Leu Lys Arg  
 385 390 395 400  
 Tyr Glu Arg Leu Ser Tyr Asn Phe Leu Gln Val Cys Asn Gln Leu Glu  
 405 410 415  
 Ala Leu Val Gly Leu Ala Ala Asn Val Gly Pro Tyr Gly Ser Gly Asp  
 420 425 430  
 Ser Ala Pro Leu Asn Glu Ala Met Ala Val Leu Gln His His Asp Ala  
 435 440 445  
 Val Ser Gly Thr Ser Arg Gln His Val Ala Asn Asp Tyr Ala Arg Gln  
 450 455 460  
 Leu Ala Ala Gly Trp Gly Pro Cys Glu Val Leu Leu Ser Asn Ala Leu  
 465 470 475 480  
 Ala Arg Leu Arg Gly Phe Lys Asp His Phe Thr Phe Cys Gln Gln Leu  
 485 490 495  
 Asn Ile Ser Ile Cys Pro Leu Ser Gln Thr Ala Ala Arg Phe Gln Val  
 500 505 510  
 Ile Val Tyr Asn Pro Leu Gly Arg Lys Val Asn Trp Met Val Arg Leu  
 515 520 525  
 Pro Val Ser Glu Gly Val Phe Val Val Lys Asp Pro Asn Gly Arg Thr  
 530 535 540  
 Val Pro Ser Asp Val Val Ile Phe Pro Ser Ser Asp Ser Gln Ala His  
 545 550 555 560  
 Pro Pro Glu Leu Leu Phe Ser Ala Ser Leu Pro Ala Leu Gly Phe Ser  
 565 570 575  
 Thr Tyr Ser Val Ala Gln Val Pro Arg Trp Lys Pro Gln Ala Arg Ala  
 580 585 590  
 Pro Gln Pro Ile Pro Arg Arg Ser Trp Ser Pro Ala Leu Thr Ile Glu  
 595 600 605  
 Asn Glu His Ile Arg Ala Thr Phe Asp Pro Asp Thr Gly Leu Leu Met  
 610 615 620  
 Glu Ile Met Asn Met Asn Gln Gln Leu Leu Leu Pro Val Arg Gln Thr  
 625 630 635 640  
 Phe Phe Trp Tyr Asn Ala Ser Ile Gly Asp Asn Glu Ser Asp Gln Ala  
 645 650 655  
 Ser Gly Ala Tyr Ile Phe Arg Pro Asn Gln Gln Lys Pro Leu Pro Val  
 660 665 670  
 Ser Arg Trp Ala Gln Ile His Leu Val Lys Thr Pro Leu Val Gln Glu  
 675 680 685  
 Val His Gln Asn Phe Ser Ala Trp Cys Ser Gln Val Val Arg Leu Tyr  
 690 695 700  
 Pro Gly Gln Arg His Leu Glu Leu Glu Trp Ser Val Gly Pro Ile Pro  
 705 710 715 720  
 Val Gly Asp Thr Trp Gly Lys Glu Val Ile Ser Arg Phe Asp Thr Pro

ES 2 713 488 T3

|     |      |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|
|     |      |     |     | 725 |     |     |      |     | 730 |     |     |      | 735 |     |     |
| Leu | Glu  | Thr | Lys | Gly | Arg | Phe | Tyr  | Thr | Asp | Ser | Asn | Gly  | Arg | Glu | Ile |
|     |      |     | 740 |     |     |     |      | 745 |     |     |     |      | 750 |     |     |
| Leu | Glu  | Arg | Arg | Arg | Asp | Tyr | Arg  | Pro | Thr | Trp | Lys | Leu  | Asn | Gln | Thr |
|     |      | 755 |     |     |     |     | 760  |     |     |     |     | 765  |     |     |     |
| Glu | Pro  | Val | Ala | Gly | Asn | Tyr | Tyr  | Pro | Val | Asn | Thr | Arg  | Ile | Tyr | Ile |
|     | 770  |     |     |     |     | 775 |      |     |     |     | 780 |      |     |     |     |
| Thr | Asp  | Gly | Asn | Met | Gln | Leu | Thr  | Val | Leu | Thr | Asp | Arg  | Ser | Gln | Gly |
| 785 |      |     |     |     | 790 |     |      |     |     | 795 |     |      |     |     | 800 |
| Gly | Ser  | Ser | Leu | Arg | Asp | Gly | Ser  | Leu | Glu | Leu | Met | Val  | His | Arg | Arg |
|     |      |     | 805 |     |     |     |      |     | 810 |     |     |      |     | 815 |     |
| Leu | Leu  | Lys | Asp | Asp | Gly | Arg | Gly  | Val | Ser | Glu | Pro | Leu  | Met | Glu | Asn |
|     |      |     | 820 |     |     |     |      | 825 |     |     |     |      | 830 |     |     |
| Gly | Ser  | Gly | Ala | Trp | Val | Arg | Gly  | Arg | His | Leu | Val | Leu  | Leu | Asp | Thr |
|     |      | 835 |     |     |     |     | 840  |     |     |     |     | 845  |     |     |     |
| Ala | Gln  | Ala | Ala | Ala | Ala | Gly | His  | Arg | Leu | Leu | Ala | Glu  | Gln | Glu | Val |
|     | 850  |     |     |     |     | 855 |      |     |     |     | 860 |      |     |     |     |
| Leu | Ala  | Pro | Gln | Val | Val | Leu | Ala  | Pro | Gly | Gly | Gly | Ala  | Ala | Tyr | Asn |
| 865 |      |     |     |     | 870 |     |      |     |     | 875 |     |      |     |     | 880 |
| Leu | Gly  | Ala | Pro | Pro | Arg | Thr | Gln  | Phe | Ser | Gly | Leu | Arg  | Arg | Asp | Leu |
|     |      |     |     | 885 |     |     |      |     | 890 |     |     |      |     | 895 |     |
| Pro | Pro  | Ser | Val | His | Leu | Leu | Thr  | Leu | Ala | Ser | Trp | Gly  | Pro | Glu | Met |
|     |      |     | 900 |     |     |     |      | 905 |     |     |     |      | 910 |     |     |
| Val | Leu  | Leu | Arg | Leu | Glu | His | Gln  | Phe | Ala | Val | Gly | Glu  | Asp | Ser | Gly |
|     | 915  |     |     |     |     |     | 920  |     |     |     |     | 925  |     |     |     |
| Arg | Asn  | Leu | Ser | Ala | Pro | Val | Thr  | Leu | Asn | Leu | Arg | Asp  | Leu | Phe | Ser |
|     | 930  |     |     |     |     | 935 |      |     |     |     | 940 |      |     |     |     |
| Thr | Phe  | Thr | Ile | Thr | Arg | Leu | Gln  | Glu | Thr | Thr | Leu | Val  | Ala | Asn | Gln |
| 945 |      |     |     |     | 950 |     |      |     |     | 955 |     |      |     |     | 960 |
| Leu | Arg  | Glu | Ala | Ala | Ser | Arg | Leu  | Lys | Trp | Thr | Thr | Asn  | Thr | Gly | Pro |
|     |      |     |     | 965 |     |     |      |     | 970 |     |     |      |     | 975 |     |
| Thr | Pro  | His | Gln | Thr | Pro | Tyr | Gln  | Leu | Asp | Pro | Ala | Asn  | Ile | Thr | Leu |
|     |      |     | 980 |     |     |     |      | 985 |     |     |     |      | 990 |     |     |
| Glu | Pro  | Met | Glu | Ile | Arg | Thr | Phe  | Leu | Ala | Ser | Val | Gln  | Trp | Lys | Glu |
|     |      | 995 |     |     |     |     | 1000 |     |     |     |     | 1005 |     |     |     |
| Val | Asp  | Gly |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |
|     | 1010 |     |     |     |     |     |      |     |     |     |     |      |     |     |     |

<210> 22  
 <211> 8079  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Plásmido de expresión pLamanExp1

10

<400> 22

ES 2 713 488 T3

```

agatcttcaa tattggccat tagccatatt attcattggt tatatagcat aaatcaatat 60
tggctattgg ccattgcata cgttgtatct atatcataat atgtacattt atattggctc 120
atgtccaata tgaccgccat gttggcattg attattgact agttattaat agtaatcaat 180
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 240
tggccccgct ggctgaccgc ccaacgacc cgcgccattg acgtcaataa tgacgtatgt 300
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 360
aactgcccac ttggcagtac atcaagtga tcatatgccca agtccgcccc ctattgacgt 420
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttac gggactttcc 480
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc ggttttggca 540
gtacaccaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc tccaccccat 600
tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa aatgtcgtaa 660
caactgcgat cgcgcgcccc gttgacgcaa atgggcggta ggcgtgtacg gtgggaggtc 720
tatataagca gagctcgttt agtgaaccgt cagatcacta gaagctttat tgcggtagtt 780
tatcacagtt aaattgctaa cgcagtcagt gcttctgaca caacagtcctc gaacttaagc 840
tgcagtgact ctcttaaggt agccttgacg aagttggtcg tgaggcactg ggcaggtaa 900

```

tatcaaggtt acaagacagg ttttaaggaga ccaatagaaa ctgggcttgt cgagacagag 960  
aagactccttg cgtttctgat aggcacctat tgggtcttact gacatccact ttgcctttct 1020  
ctccacaggt gtccactccc agttcaatta cagctcttaa ggctagagta cttaatacga 1080  
ctcactatag gctagcctcg agaattcgcc gccatgggcg cctacgcgcg ggcttcgggg 1140  
gtctgcgctc gaggctgcct ggactcagca ggcccctgga ccatgtcccg cgccctgcgg 1200  
ccaccgctcc cgcctctctg cttttctctt ttggtgctgg cggctgcggy tgctcggggc 1260  
gggggatacg agacatgccc cacagtgcag ccgaacatgc tgaacgtgca cctgctgcct 1320  
cacacacatg atgacgtggg ctggctcaaa accgtggacc agtactttta tggaatcaag 1380  
aatgacatcc agcacgccgg tgtgcagtac atcctggact cggtcactctc tgcttgctg 1440  
gcagatccca cccgtcgctt catttacctg gagattgcct tcttctcccg ttggtggcac 1500  
cagcagacaa atgccacaca ggaagtctgt cgagacctg tgcgccaggy ggcctggag 1560  
ttcgccaatg gtggctgggt gatgaacgat gaggcagcca cccactacgy tgccatcgtg 1620  
gaccagatga cacttgggct gcgctttctg gaggacacat ttggcaatga tgggcgacc 1680  
cgtgtggcct ggcacattga ccccttcggy cactctcggg agcaggcctc gctgtttgcy 1740  
cagatgggct tcgacggctt cttctttggg cgccttgatt atcaagataa gtgggtacgy 1800  
atgcagaagc tggagatgga gcaggtgtgg cgggcagca ccagcctgaa gcccccgacc 1860  
gcggactcct tcactgggtg ctttccaat ggttacaacc cgccaaggaa tctgtgctg 1920  
gatgtgctgt gtgtcgatca gccgctggtg gaggacctc gcagccccga gtacaacgcy 1980  
aaggagctgg tcgattactt cctaaatgtg gccactgccc agggccggtt ttaccgcacc 2040  
aaccacactg tgatgaccat gggctcggac ttccaatatg agaatgcaa catgtggttc 2100  
aagaaccttg acaagctcat ccggctggtt aatgocgagc aggcaaaagg aagcagtgtc 2160  
catgttctct actccacccc cgcttgttac ctctgggagc tgaacaaggy caacctcacc 2220  
tggtcagtga aacatgacga cttcttccct tacgcggytg gccccacca gttctggacc 2280  
ggttactttt ccagtgggcy gccctcaaa cgctacgagc gcctcagctt caacttctctg 2340  
caggtgtgca accagctgga ggcctggcgy ggcctggcgy ccaacgtggg ccctatggy 2400  
tccggagaca gtgcaccct caatgaggcy atggctgtgc tccagcatca cgacgccgtc 2460  
agcggcacct cccgccagca cgtggccaac gactacgcyg gccagcttgc ggcaggyctg 2520  
gggcttgcg aggttcttct gagcaacgcy ctggcgcggy tcagaggctt caaagatcac 2580  
ttcacctttt gccaacagct aaacatcagc atctgcccgy tcagccagac ggcggcgcyg 2640  
ttccaggtca tcgtttataa tcccctgggy cggaggytga attggytgyt acggyctgcy 2700  
gtcagcgaag gcgtttctgt tgtgaaggac cccaatggca ggacagtgcy cagcgyatgtg 2760  
gtaatatctc ccagctcaga cagccaggyg caccctcgyg agctgctgtt ctcagctca 2820  
atcagccggt ttggcttcag cacctattca gtagccaggy tgccctcgyt gaagccccag 2880  
gcccgcgcyg cacagcccat ccccagaaga tcctggytcc ctgctttaac catcgaaaat 2940  
gagcacatcc gggcaacggt tgatcctgac acaggyctgt tgatggagat tatgaacatg 3000  
aatcagcaac tcctgctgcy tgttcgcyg accttcttct ggtacaacgc cagtataggy 3060  
gacaacgaaa gtgaccaggy ctcaggytgc tacatcttca gaccacaac caagaaacyg 3120  
ctgctgtgca gccgctgggy tcagatccac ctggytgaaga caccctggyt gcaggyaggyt 3180  
caccagaact tctcagcttgy gtgttcccag gtyggttcgcy cctgtyggcy acacctgggy gaaggyaggyt 3240  
ctggagctag agtgytgyt ggggcygata cctgtyggcy acacctgggy gaaggyaggyt 3300  
atcagccggt ttgacacacc cctggagaca aaggyagcgt tctacacaga cagcaatggy 3360  
cgggagatcc tggagaggyg gcggyattat cgacccacct ggaaactgaa ccagacgyg 3420  
cccgtggcyg gaaactacta tccagtcaac acccgyattt acatcacgyg tggaaacatg 3480  
cagctgactg tgctgactga ccgctcccag ggggcygca gcctgagaga tggctcgyt 3540  
gagctcatgy tgcaccgaag gctgctgaag gacgyatgyg gcggyatct gcagccacta 3600  
atggagaacy ggtcgggggy gtggytgcga gggcgyccac tgytgytgyt gyacacagcy 3660  
caggytgcag ccgcccgyca ccggytctgy gcggyagcgy aggtcctgy cctcaggyt 3720  
tgctgygccc cgggtggcgy cgcgcyctac aatctcgggy ctctcgyg cagcagtyt 3780  
tcaggyctgc caggygacct gccgcyctcy gtgcaacctg tcacgytgyt cagctgggyg 3840  
cccgaatgy tgytgytgy cttggygcy cagtytgcy taggyaggya ttccgyagct 3900  
aacctgagcy cccccgttac cttgaaactg aggyaacgt tctccacct caccatcac 3960  
cgcctgcyg agaccacgyt ggytgccaac cagctcgyg aggcagcct caggytcaag 4020  
tggacaacaa acacaggycc cacaccccac caaactcgyt accagtygga cccgyccaac 4080  
atcacgytgy aacccatgga aatcgycact ttctggyct cagtycaatg gaaggyaggyt 4140  
gatggytagg tctgctggya tggccctct agactcagc cgggcygcy cttccctta 4200  
gtgaggytta atgcttcgag cagacatgat aagatacatt gatgagtyt gacaaccac 4260  
aactagaatg cagtgaaaaa aatgctttat ttgtgaaatt tgytgytca atttgctt 4320  
tgytaacctt ataagctgca ataacaacy taacaacaac aattgctt atttatgt 4380  
tcaggytcag ggggagatgt ggyaggyttt ttaaagcaag taaaacctc acaatgyt 4440  
taaaatcgy taaggyatcga tccggyctgy cgytaatgcy aaggycccy caccgyatc 4500  
ccttcccaac agtygcyg cctgaaatgy gaatgyagcy gccctgtag cccgyatca 4560  
gcggyggyg tgytgytgyt acgcygcyg tgyacctac acttgcagc gccctagcy 4620  
cgytctctt cgytttctt ccttcttct tcgccaagty cgcggyctt cccgytcaag 4680

|            |            |             |             |             |             |      |
|------------|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|
| ctctaaatcg | ggggctccct | ttagggttcc  | gatttagagc  | tttacggcac  | ctcgaccgca  | 4740 |
| aaaaacttga | tttgggtgat | ggttcacgta  | gtggggccatc | gccctgatag  | acggtttttc  | 4800 |
| gccctttgac | gttgaggtcc | acgttcttta  | atagtgact   | cttgttccaa  | actggaacaa  | 4860 |
| cactcaacc  | tatctcggtc | tattcttttg  | atataaagg   | gattttgggg  | atctcggcct  | 4920 |
| attgggttaa | aaatgagctg | atatacaaaa  | aatttaacgc  | gaattaattc  | tgtggaatgt  | 4980 |
| gtgtcagtta | gggtgtggaa | agtccccagg  | ctccccaggc  | aggcagaagt  | atgcaaagca  | 5040 |
| tgcatctcaa | ttagtcagca | accaggtgtg  | gaaagtcccc  | aggctcccca  | gcaggcagaa  | 5100 |
| gtatgcaaag | catgcatctc | aattagtcag  | caacctagtc  | cccggcccta  | actccgcccc  | 5160 |
| tcccggccct | aactccgccc | agttccgccc  | attctccgcc  | ccatggctga  | ctaatttttt  | 5220 |
| ttattttatg | agaggccgag | gcccgcctcg  | cctctgagct  | attccagaag  | tagtgaggag  | 5280 |
| gcttttttgg | aggcctaggc | ttttgcaaaa  | agctcccggg  | atgggtcgac  | cattgaaactg | 5340 |
| catcgtcgcc | gtgtcccaaa | atatggggat  | tggcaagaac  | ggagacctac  | cctggcctcc  | 5400 |
| gctcaggaac | gagttcaagt | acttccaaag  | aatgaccaca  | acctcttcag  | tggaaggtaa  | 5460 |
| acagaatctg | gtgattatgg | gtaggaaaac  | ctggttctcc  | attcctgaga  | agaatcgacc  | 5520 |
| tttaaaggac | agaattaata | tagttctcag  | tagagaactc  | aaagaaccac  | cacgaggagc  | 5580 |
| tcattttctt | gccaaaagt  | tggatgatgc  | cttaagactt  | attgaacaac  | cggaattggc  | 5640 |
| aagtaaagta | gacatggttt | ggatagtcgg  | aggcagttct  | gtttaccagg  | aagccatgaa  | 5700 |
| tcaaccaggc | caccttagac | tctttgtgac  | aaggatcatg  | caggaatttg  | aaagtgaac   | 5760 |
| gtttttccca | gaaattgatt | tggggaata   | taaactctc   | ccagaatacc  | caggcgtcct  | 5820 |
| ctctgaggtc | cagygagaaa | aaggcatcaa  | gtataagttt  | gaagtctacg  | agaagaaaga  | 5880 |
| ctaattcgaa | atgaccgacc | aagcgacgcc  | caacctgcca  | tcacgatggc  | cgcaataaaa  | 5940 |
| tatctttatt | ttcattacat | ctgtgtgttg  | gtttttgtg   | tgaatcgata  | gcgataagga  | 6000 |
| tccgcgatg  | gtgactctc  | agtacaatct  | gctctgatgc  | cgcatagtta  | agccagcccc  | 6060 |
| gacaccgccc | aacaccgct  | gacgcgccct  | gacgggcttg  | tctgctcccg  | gcatccgctt  | 6120 |
| acagacaagc | tgtgaccgct | tccgggagct  | gcatgtgtca  | gaggttttca  | ccgtcatcac  | 6180 |
| cgaaacgcgc | gagacgaaa  | ggcctcgtga  | tacgcctatt  | tttataggtt  | aatgtcatga  | 6240 |
| taataatggt | ttcttagacg | tcaggtggca  | cttttcgggg  | aatgtgcgc   | ggaacccta   | 6300 |
| tttgtttatt | tttctaata  | cattcaata   | tgtatccgct  | catgagacaa  | taacctgat   | 6360 |
| aaatgcttca | ataatattga | aaaaggaaga  | gtatgagtat  | tcaacatttc  | cgtgtcgccc  | 6420 |
| ttattccctt | ttttgcggca | ttttgccttc  | ctgtttttgc  | tcaccagaa   | acgctgggtga | 6480 |
| aagtaaaaga | tgtggaagat | cagttgggtg  | cacgagtggg  | ttacatcgaa  | ctggatctca  | 6540 |
| acagcggtaa | gatccttgag | agttttcgcc  | ccgaagaacg  | ttttccaatg  | atgagcactt  | 6600 |
| ttaaagttct | gctatgtggc | gcggtattat  | cccgtattga  | cgccgggcaa  | gagcaactcg  | 6660 |
| gtcgcgcat  | acactattct | cagaatgact  | tggttgagta  | ctcaccagtc  | acagaaaagc  | 6720 |
| atcttacgga | tggcatgaca | gtaagagaat  | tatgacgtgc  | tgccataacc  | atgagtgata  | 6780 |
| acactcgggc | caacttactt | ctgacaacga  | ctggaggacc  | gaaggagcta  | accgcttttt  | 6840 |
| tgcacaacat | gggggatcat | gtaactcgcc  | ttgatcgttg  | ggaaccggag  | ctgaaatgaag | 6900 |
| ccataccaaa | cgacgagcgt | gacaccacga  | tgctgttagc  | aatggcaaca  | acggttgcgc  | 6960 |
| aactattaac | tggcgaacta | cttactctag  | cttcccggca  | acaattaata  | gactggatgg  | 7020 |
| aggcggataa | agttgcagga | ccacttctgc  | gctcggccct  | tccggctggc  | tggtttattg  | 7080 |
| ctgataaatc | tggagccggt | gagcgtgggt  | ctcgcggtat  | cattgcagca  | ctggggccag  | 7140 |
| atggtaagcc | ctcccgtatc | gtagttatct  | acacgacggg  | gagtcaaggca | actatggatg  | 7200 |
| aacgaaatag | acagatcgct | gagataggtg  | cctcactgat  | taagcattgg  | taactgtcag  | 7260 |
| accaagttta | ctcatatata | ctttagattg  | atthaaaact  | tcatttttaa  | tttaaaagga  | 7320 |
| tctaagtgaa | gatccttttt | gataatctca  | tgaccaaaat  | ccctaacgt   | gagtttctgt  | 7380 |
| tccactgagc | gtcagacccc | gtagaaaaga  | tcaaaggatc  | ttcttgagat  | cctttttttc  | 7440 |
| tgcgcgtaat | ctgctgcttg | caaacaaaaa  | aaccaccgct  | accagcggtg  | gtttgtttgc  | 7500 |
| cggatcaaga | gctaccaact | ctttttccga  | aggtaactgg  | cttcagcaga  | gcgcagatac  | 7560 |
| caaatactgt | ccttctagtg | tagccgtagt  | taggccacca  | cttcaagaac  | tctgtagcac  | 7620 |
| cgctacata  | cctcgctctg | ctaatacctgt | taccagtggc  | tgctgccagt  | ggcgataagt  | 7680 |
| cgtgtcttac | cggttggac  | tcaagacgat  | agttaccgga  | taaggcgcag  | cggctcgggct | 7740 |
| gaacgggggg | ttcgtgcaca | cagcccagct  | tggagcgaac  | gacctacacc  | gaactgagat  | 7800 |
| acctacagcg | tgagctatga | gaaagcgcca  | cgcttcccga  | aggagaaaag  | ggggacaggt  | 7860 |
| atccggtaag | ggcagggctc | ggaacaggag  | agcgcacgag  | ggagcttcca  | gggggaaacg  | 7920 |
| cctggtatct | ttatagtcct | gtcgggtttc  | gccacctctg  | acttgagcgt  | cgattttttg  | 7980 |
| gatgctcgtc | agggggggcg | agcctatgga  | aaaacgccag  | caacgcggcc  | tttttacggg  | 8040 |
| tcctggcctt | ttgctggcct | tttgctcaca  | tggctcgac   |             |             | 8079 |

<210> 23  
 <211> 3761  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

<400> 23

ggctactctc ggcttcctgg caacgccgag cgaaagctat gactgcgggc gcggggttcgg 60  
 cgggccgcgc cgcggtgcc ttgctgctgt gtgctgctgt ggcgccggc ggcgcgtacg 120  
 tgctcgacga ctccgacggg ctgggccggg agttcgacgg catcggcgcg gtcagcggcg 180  
 gcggggcaac ctcccgactt ctagtaaat acccagagcc ctatcgttct cagatattgg 240  
 attatctctt taagccgaat tttggtgcct ctttgcata tttaaaagtg gaaatagggtg 300  
 gtgatgggca gacaacagac ggcactgagc cctcccacat gcattatgca ctagatgaga 360  
 attatttccg aggatcacgag tggtggttga tgaaagaagc taagaagagg aatccaata 420  
 ttacactcat tgggttgcca tggtcattcc ctggatggct gggaaaagggt ttcgactggc 480  
 cttatgtcaa tcttcagctg actgcctatt atgtcgtgac ctggattgtg ggcgccaagc 540  
 gttaccatga tttggacatt gattatattg gaatttggaa tgagaggtca tataatgcca 600  
 attatattaa gatattaaga aaaatgctga attatcaagg tctccagcga gtgaaaatca 660  
 tagcaagtga taatctctgg gagtccatct ctgcatccat gctccttgat gccgaactct 720  
 tcaaggtggg tgatgttata ggggctcatt atcctggaac ccattcagca aaagatgcaa 780  
 agttgactgg gaagaagctt tggcttctg aagactttag cactttaaat agtgacatgg 840  
 gtgcaggctg ctgggctcgc attttaaatc agaattatat caatggctat atgacttcca 900  
 caatcgcag gaatttagtg gctagtact atgaacagtt gccttatggg agatgcgggt 960  
 tgatgacggc ccaagagcca tggagtggc actacgtggg agaatctcct gtctgggtat 1020  
 cagctcatic cactcagttt actcaacctg gctggatta cctgaagaca gttggccatt 1080  
 tagaagaag aggaagctac gtagctctga ctgatggctt agggaacctc accatcatca 1140  
 ttgaaacct gagtcataaa cattctaagt gcatacggcc atttcttctt tatttcaatg 1200  
 tgtcacaaca atttgccacc tttgttctta agggatcttt tagtgaaata ccagagctac 1260  
 aggtatggta taccaaactt ggaaaaacat ccgaaagatt tctttttaag cagctggatt 1320  
 ctctatggct ccttgacagc gatggcagtt tcacactgag cctgcatgaa gatgagctgt 1380  
 tcacactcac cactctcacc actggtcgca aaggcagcta cccgcttctt ccaaaatccc 1440  
 agcccttccc aagtacctat aaggatgatt tcaatggtga ttaccattt tttagtgaag 1500  
 ctccaaactt tgctgatcaa actggtgat ttgaatatt taaaaatatt gaagaccctg 1560  
 gcgagcatca cttcacgcta cgccaagttc tcaaccagag acccattacg tgggctggcg 1620  
 atgcatgcaa cacatcagt attataggag actacaactg gaccaactg actataaagt 1680  
 gtgatgttta catagagacc cctgacacag gagggtgtgtt cattgcagga agagtaata 1740  
 aagggtggtat tttgattaga agtgccagag gaattttctt ctggattttt gcaaatggat 1800  
 cttacagggg tacaggtgat ttagctggat ggattatata tgctttagga cgtggtgaag 1860  
 ttacagcaaa aaaatgggat aactcacgt taactattaa gggtcatttc gcctctggca 1920  
 tgctgaatga caagtctctg tggacagaca tcctgtgaa ttttccaaag aatggctggg 1980  
 ctgcaattgg aactcactcc tttgaatttg cacagtttga caactttctt gtggaagcca 2040  
 cacgctaata cttaacaggg catcatagaa tactctggat tttcttccct tctttttggg 2100  
 tttggttcag agccaattct tgtttcattg gaacagtata tgaggctttt gagactaaaa 2160  
 ataatgaaga gtaaaagggg agagaaattt atttttaatt taccctgttg aagattttat 2220  
 tagaattaat tccaagggga aaactggtga atctttaaca ttacctgggtg tgttccctaa 2280  
 cattcaaact gtgcattggc cataccctta ggagtggttt gagtagtaca gacctcgaag 2340  
 ccttgctgct aacactgagg tagctctctt catcttattt gcaagcgggtc ctgtagatgg 2400  
 cagtaacttg atcatcactg agatgtattt atgcatgctg accgtgtgtc caagtgagcc 2460  
 agtgtcttca tcacaagatg atgtgcctat aatagaaagc tgaagaacac tagaagtagc 2520  
 tttttgaaaa ccacttcaac ctgttatgct ttatgctcta aaaagtattt ttttattttc 2580  
 ctttttaaga tgatactttt gaaatgcagg atatgatgag tgggatgatt ttaaaaacgc 2640  
 ctctttaata aactacctct aacactattt ctgcggtaat agatattagc agattaattg 2700  
 ggttatttgc attatttaatt ttttttgatt ccaagttttg gtcttgaac cactataact 2760  
 ctctgtgaac gttttccag gtggctggaa gaaggaagaa aacctgatat agccaatgct 2820  
 gttgtagtcg tttcctcagc ctcatctcac tgtgctgtgg tctgtcctca catgtgcact 2880  
 ggtaacagac tcacacagct gatgaatgct tttctctcct tatgtgtgga aggaggggag 2940  
 cacttagaca tttgctaact ccgagaattg gatcatctcc taagatgtac ttacttttta 3000  
 aagtccaaat atgtttatat taaatatac gtgagcatgt tcatcatggt gtatgattta 3060  
 tactaagcat taatgtggct ctatgtagca aatcagttat tcatgtaggt aaagtaaatc 3120  
 tagaattatt tataagaatt actcattgaa ctaattctac tatttaggaa tttataagag 3180  
 tctaacatag gcttagctac agtgaagttt tgcatttctt ttgaagaca gaaaagtgtc 3240  
 agaataaata agattacaga gaaaattttt tgttaaaacc aagtgatttc cagctgatgt 3300  
 atctaattat ttttaaaaca aacattatag aggtgtaatt tatttacaat aaaatgttcc 3360  
 tactttaaat atacaattca gtgagttttg ataaattgat ataccatgt aaccaacact 3420  
 ccagtcaagc ttcagaatat ttccatcacc ccagaagggt ctcttgata cctgctcagt 3480  
 cagttccttt cactccaat tgttggcagc cattgatagg aattctatca ctataggtta 3540  
 gttttctttg ttccagaaca tcatgaaagc ggcgtcatgt actgtgtatt cttatgaatg 3600

ES 2 713 488 T3

```
gtttctttcc atcagcataa tgatttgaga ttggtccatg ttgtgtgatt cagtggtttg 3660
ttccttctta tttctgaaga gttttccatt gtatgaatat accacaattt gtttcctccc 3720
caccagtttc tgatactaca attaaaactg tctacattta c 3761
```

5 <210> 24  
<211> 669  
<212> PRT  
<213> *Homo sapiens*

10 <400> 24

ES 2 713 488 T3

Met Thr Ala Ala Ala Gly Ser Ala Gly Arg Ala Ala Val Pro Leu Leu  
1 5 10 15  
Leu Cys Ala Leu Ala Pro Gly Gly Ala Tyr Val Leu Asp Asp Ser  
20 25 30  
Asp Gly Leu Gly Arg Glu Phe Asp Gly Ile Gly Ala Val Ser Gly Gly  
35 40 45  
Gly Ala Thr Ser Arg Leu Leu Val Asn Tyr Pro Glu Pro Tyr Arg Ser  
50 55 60  
Gln Ile Leu Asp Tyr Leu Phe Lys Pro Asn Phe Gly Ala Ser Leu His  
65 70 75 80  
Ile Leu Lys Val Glu Ile Gly Gly Asp Gly Gln Thr Thr Asp Gly Thr  
85 90 95  
Glu Pro Ser His Met His Tyr Ala Leu Asp Glu Asn Tyr Phe Arg Gly  
100 105 110  
Tyr Glu Trp Trp Leu Met Lys Glu Ala Lys Lys Arg Asn Pro Asn Ile  
115 120 125  
Thr Leu Ile Gly Leu Pro Trp Ser Phe Pro Gly Trp Leu Gly Lys Gly  
130 135 140  
Phe Asp Trp Pro Tyr Val Asn Leu Gln Leu Thr Ala Tyr Tyr Val Val  
145 150 155 160  
Thr Trp Ile Val Gly Ala Lys Arg Tyr His Asp Leu Asp Ile Asp Tyr  
165 170 175  
Ile Gly Ile Trp Asn Glu Arg Ser Tyr Asn Ala Asn Tyr Ile Lys Ile  
180 185 190  
Leu Arg Lys Met Leu Asn Tyr Gln Gly Leu Gln Arg Val Lys Ile Ile  
195 200 205  
Ala Ser Asp Asn Leu Trp Glu Ser Ile Ser Ala Ser Met Leu Leu Asp  
210 215 220  
Ala Glu Leu Phe Lys Val Val Asp Val Ile Gly Ala His Tyr Pro Gly  
225 230 235 240  
Thr His Ser Ala Lys Asp Ala Lys Leu Thr Gly Lys Lys Leu Trp Ser  
245 250 255  
Ser Glu Asp Phe Ser Thr Leu Asn Ser Asp Met Gly Ala Gly Cys Trp  
260 265 270  
Gly Arg Ile Leu Asn Gln Asn Tyr Ile Asn Gly Tyr Met Thr Ser Thr  
275 280 285  
Ile Ala Trp Asn Leu Val Ala Ser Tyr Tyr Glu Gln Leu Pro Tyr Gly  
290 295 300  
Arg Cys Gly Leu Met Thr Ala Gln Glu Pro Trp Ser Gly His Tyr Val  
305 310 315 320  
Val Glu Ser Pro Val Trp Val Ser Ala His Thr Thr Gln Phe Thr Gln  
325 330 335  
Pro Gly Trp Tyr Tyr Leu Lys Thr Val Gly His Leu Glu Lys Gly Gly  
340 345 350  
Ser Tyr Val Ala Leu Thr Asp Gly Leu Gly Asn Leu Thr Ile Ile Ile  
355 360 365  
Glu Thr Met Ser His Lys His Ser Lys Cys Ile Arg Pro Phe Leu Pro  
370 375 380  
Tyr Phe Asn Val Ser Gln Gln Phe Ala Thr Phe Val Leu Lys Gly Ser  
385 390 395 400  
Phe Ser Glu Ile Pro Glu Leu Gln Val Trp Tyr Thr Lys Leu Gly Lys  
405 410 415  
Thr Ser Glu Arg Phe Leu Phe Lys Gln Leu Asp Ser Leu Trp Leu Leu

ES 2 713 488 T3

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     | 420 |     |     |     |     | 425 |     |     |     | 430 |     |     |     |
| Asp | Ser | Asp | Gly | Ser | Phe | Thr | Leu | Ser | Leu | His | Glu | Asp | Glu | Leu | Phe |
|     |     | 435 |     |     |     |     | 440 |     |     |     | 445 |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Thr | Thr | Leu | Thr | Thr | Gly | Arg | Lys | Gly | Ser | Tyr | Pro | Leu | Pro |
|     | 450 |     |     |     |     | 455 |     |     |     |     | 460 |     |     |     |     |
| Pro | Lys | Ser | Gln | Pro | Phe | Pro | Ser | Thr | Tyr | Lys | Asp | Asp | Phe | Asn | Val |
| 465 |     |     |     |     | 470 |     |     |     |     | 475 |     |     |     |     | 480 |
| Asp | Tyr | Pro | Phe | Phe | Ser | Glu | Ala | Pro | Asn | Phe | Ala | Asp | Gln | Thr | Gly |
|     |     |     |     | 485 |     |     |     |     | 490 |     |     |     |     | 495 |     |
| Val | Phe | Glu | Tyr | Phe | Thr | Asn | Ile | Glu | Asp | Pro | Gly | Glu | His | His | Phe |
|     |     | 500 |     |     |     |     |     | 505 |     |     |     | 510 |     |     |     |
| Thr | Leu | Arg | Gln | Val | Leu | Asn | Gln | Arg | Pro | Ile | Thr | Trp | Ala | Ala | Asp |
|     |     | 515 |     |     |     |     | 520 |     |     |     |     | 525 |     |     |     |
| Ala | Ser | Asn | Thr | Ile | Ser | Ile | Ile | Gly | Asp | Tyr | Asn | Trp | Thr | Asn | Leu |
|     | 530 |     |     |     | 535 |     |     |     |     |     | 540 |     |     |     |     |
| Thr | Ile | Lys | Cys | Asp | Val | Tyr | Ile | Glu | Thr | Pro | Asp | Thr | Gly | Gly | Val |
| 545 |     |     |     |     | 550 |     |     |     |     | 555 |     |     |     |     | 560 |
| Phe | Ile | Ala | Gly | Arg | Val | Asn | Lys | Gly | Gly | Ile | Leu | Ile | Arg | Ser | Ala |
|     |     |     | 565 |     |     |     |     | 570 |     |     |     |     |     | 575 |     |
| Arg | Gly | Ile | Phe | Phe | Trp | Ile | Phe | Ala | Asn | Gly | Ser | Tyr | Arg | Val | Thr |
|     |     |     | 580 |     |     |     | 585 |     |     |     |     |     | 590 |     |     |
| Gly | Asp | Leu | Ala | Gly | Trp | Ile | Ile | Tyr | Ala | Leu | Gly | Arg | Val | Glu | Val |
|     |     | 595 |     |     |     |     | 600 |     |     |     |     | 605 |     |     |     |
| Thr | Ala | Lys | Lys | Trp | Tyr | Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Ile | Lys | Gly | His | Phe |
|     | 610 |     |     |     | 615 |     |     |     |     |     | 620 |     |     |     |     |
| Ala | Ser | Gly | Met | Leu | Asn | Asp | Lys | Ser | Leu | Trp | Thr | Asp | Ile | Pro | Val |
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Asn | Phe | Pro | Lys | Asn | Gly | Trp | Ala | Ala | Ile | Gly | Thr | His | Ser | Phe | Glu |
|     |     |     | 645 |     |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |
| Phe | Ala | Gln | Phe | Asp | Asn | Phe | Leu | Val | Glu | Ala | Thr | Arg |     |     |     |
|     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     |     |     |     |     |

5 <210> 25  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> péptido básico de 11 restos de la proteína TAT del VIH  
 <400> 25

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg  
 1 5 10

15 <210> 26  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> péptido TAT sintético  
 <400> 26

Tyr Ala Arg Ala Ala Ala Arg Gln Ala Arg Ala  
 1 5 10

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición que comprende al menos 10 mg/ml de alfa-manosidasa, y en donde menos del 5 % de la cantidad total de la alfa-manosidasa en dicha composición está presente en la forma de agregados, abarcando dichos agregados cualquier dímero o multímero de la alfa-manosidasa.
2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la alfa-manosidasa comprende:
- 10 i) una secuencia de aminoácidos tal como se define por la SEQ ID NO: 21; y/o  
ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i); y/o  
iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), siendo la secuencia de aminoácidos de dicho análogo al menos el 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), y en donde
- 15 la parte funcionalmente equivalente en ii) y/o el análogo funcionalmente equivalente en iii) comprende un dominio o una subsecuencia de la alfa-manosidasa que incluye el sitio catalítico necesario para permitir que el dominio o la subsecuencia ejerza sustancialmente la misma actividad enzimática que la alfa-manosidasa de longitud completa.
- 20 3. Uso de una composición que comprende 50-300 mg/ml de alfa-manosidasa para la fabricación de un medicamento para inyección subcutánea a un mamífero.
4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la alfa-manosidasa comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en:
- 25 i) una secuencia de aminoácidos tal como se define por la SEQ ID NO: 21; y/o  
ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i); y/o  
iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), siendo la secuencia de aminoácidos de dicho análogo al menos el 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), y en donde
- 30 la parte funcionalmente equivalente en ii) y/o el análogo funcionalmente equivalente en iii) comprende un dominio o una subsecuencia de la alfa-manosidasa que incluye el sitio catalítico necesario para permitir que el dominio o la subsecuencia ejerza sustancialmente la misma actividad enzimática que la alfa-manosidasa de longitud completa.
- 35 5. El uso de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el medicamento es para su uso en el tratamiento de alfa-manosidosis.
6. Una composición que comprende 50-300 mg/ml de alfa-manosidasa para su uso como un medicamento y en donde la composición es para inyección subcutánea a un mamífero.
- 40 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6, para su uso en el tratamiento de alfa-manosidosis.
8. La composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6-7, en donde la alfa-manosidasa comprende:
- 45 i) una secuencia de aminoácidos tal como se define por la SEQ ID NO: 21; y/o  
ii) una parte funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i); y/o  
iii) un análogo funcionalmente equivalente de una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), siendo la secuencia de aminoácidos de dicho análogo al menos el 75 % idéntica a una secuencia de aminoácidos tal como se define en i) o ii), y en donde
- 50 la parte funcionalmente equivalente en ii) y/o el análogo funcionalmente equivalente en iii) comprende un dominio o una subsecuencia de la alfa-manosidasa que incluye el sitio catalítico necesario para permitir que el dominio o la subsecuencia ejerza sustancialmente la misma actividad enzimática que la alfa-manosidasa de longitud completa.